

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 6 日現在

機関番号：82675

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15406

研究課題名（和文）新規高速超解像顕微鏡による転写因子促進拡散挙動の可視化

研究課題名（英文）Visualization of facilitated diffusion of transcription-factor by utilizing novel high-speed super-resolution microscopy

研究代表者

堤 元佐（Tsutsumi, Motosuke）

大学共同利用機関法人自然科学研究機構（新分野創成センター、アストロバイオロジーセンター、生命創成探究・生命創成探究センター・特任助教

研究者番号：60782422

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：微小時間空間で生じる生細胞内分子挙動の可視化を目指し、高速かつ深部観察可能な超解像観察法を確立した。画像解析による新規超解像法SRRFを駆使し、研究グループが保有する先端2光子励起蛍光顕微鏡に適用することで、数十枚/秒での高速観察と、ミリメートルオーダーの生体・組織深部での超解像観察を実証した。また、研究期間中に生じた新型コロナ情勢に対応するため、共同研究者とリモート観察システムを構築し、海を越えた超解像観察を実証した。これらの成果を複数の学会・国際会議で発表し、2021年度には学会発表賞を授与された。また、本研究で得られた知見を活用した共同研究成果として、共著論文3報を海外学術誌に発表した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で確立された高速・深部超解像観察法は、転写因子の高速DNA認識動態の観察のみならず、脳をはじめとする生体組織、臓器、3次元培養細胞など、既存超解像顕微鏡法では観察困難な対象における微細分子挙動や形態観察に適用でき、生命科学研究の発展に貢献する。また、本研究に関連して得られた細胞スフェロイド培養法やその2光子観察法の知見は薬剤活性の評価モデルとして有用であり、国際共同研究を含む複数の研究に応用されている。さらに、本研究で実証したリモート顕微鏡観察の系は、感染症蔓延下の対応だけでなく、遠隔地に住む研究者が先端顕微鏡観察の機会を得られる点から、海外顕微鏡共用施設の運営者からも注目されている。

研究成果の概要（英文）：Aiming to visualize intracellular molecular behavior in living cells occurring in nano-scale area at several ten milli-seconds, I established a super-resolution observation method that enables high-speed and deep observation. By utilizing SRRF, a novel super-resolution method based on image analysis, and applying it to our research group's advanced two-photon excitation fluorescence microscope, I demonstrated super-resolution observation with several ten milli-seconds temporal resolution at millimeter-order depths in living organisms and tissues. In addition, in this study, I established a remote super-resolution observation system with a collaborator. These results were presented at several conferences and international meetings, and awarded a conference presentation award. In addition, three co-authored papers were published in academic journals as the results of joint research utilizing the findings obtained in this study.

研究分野：生物物理

キーワード：深部超解像イメージング 高速超解像イメージング 生体イメージング 先端蛍光顕微鏡

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体分子の生体内・生細胞内動態の観察は、生命科学研究において長年の課題であった。蛍光顕微鏡技術の発展により、一分子レベルでの分子動態観察が可能になってきた。私は以前の研究で、生体の機能発現に重要な役割を果たす DNA 結合タンパク質である転写因子を対象にした、蛍光相関分光法 (FCS) 解析を行った¹⁾。転写因子に関する研究は長年、安定な DNA 結合と解離を評価するものが中心であったが、FCS 解析の結果、「Facilitated diffusion」(促進拡散)と呼ばれる、数秒未満の時間スケールで DNA 鎖近傍において生じる過渡的な DNA 相互作用が示唆された。しかしながら、転写因子の促進拡散は数十ミリ秒以下の時間・数十ナノメートルの空間スケールという非常に微小な時空間で生じる現象のため、既存の蛍光顕微鏡観察の時間・空間分解能では可視観察することが困難であった。

2. 研究の目的

本研究は、生きた細胞において転写因子の促進拡散等の生体分子の微小時空間動態を可視化するため、画像解析による新規超解像顕微鏡法を我々の研究グループが持つ高速蛍光顕微鏡と組み合わせることで、高速超解像観察を実現することを主目的とした。さらに、その顕微鏡法を用いて異なる細胞環境や野生型・変異体による転写因子挙動の差異を定量的に比較することで、促進拡散の DNA 認識における意義を評価したいと考えた。

3. 研究の方法

本研究では SRRF (Super Resolution Radial Fluctuation) 法を用いた。SRRF 法は 2016 年に発表された、画像解析による新規超解像顕微鏡法である²⁾。この手法は、連続取得された蛍光顕微鏡画像の蛍光強度の画素間の相関(空間相関)と、連続画像間の相関(時間相関)の解析を組み合わせることで、蛍光ピークの重心位置を精度よく決定する。細胞など込み入った構造の観察の場合、通常の蛍光分子局在化法では 1 枚の超解像画像を再構成するために数千~数万枚の画像取得が必要となる場合、本法では数十~数百枚の画像取得で済み、高い時間分解能での超解像観察が可能になるという特徴を持つ。

本研究では、我々の研究グループが保有する顕微鏡の中で特に高速画像取得が可能な 2 種類の顕微鏡装置、ニコン A1R-MP⁺ 顕微鏡と、グループ自作のスピニングディスク多点走査型 2 光子顕微鏡 (CSU-MP) を改良し、SRRF 高速超解像観察を試した。

4. 研究成果

ニコン A1R-MP⁺ 顕微鏡による画像取得では、高速レゾナントスキャナによる最速 2.4 ミリ秒毎の連続画像取得を行い、アガロースゲル包埋蛍光ビーズの観察で数十ミリ秒毎の超解像観察を実証できた。また、CSU-MP 顕微鏡ではより広視野での高速イメージングが可能であり、本研究で SRRF との組み合わせによって 100 ミリ秒以下の時間スケールでの超解像観察が可能であることが確認された。

高速超解像観察の実証に続き、2 光子励起蛍光顕微鏡による深部観察の超解像化に着目した。上述の 2 種類の顕微鏡法はいずれも 2 光子励起観察が可能である。2 光子励起観察では、長波長の励起光を用いることから、1 光子励起蛍光観察と比べて空間分解能の低下が課題であった。これを克服するため、我々の研究グループでも近年 2 光子顕微鏡の高解像化の取り組みが進められている。SRRF 法は画像解析による手法であることから、光学的なアプローチによる既存の超解像顕微鏡技術よりも容易に 2 光子顕微鏡に適用できる可能性があると考え、本研究では高速超解像観察の取り組みに加え、既存超解像法では困難であった深部超解像法を実現すべく、2 光子 SRRF 観察 (TP-SRRF) 法の検討を進めた。

TP-SRRF 法の検証のため、不透明生体組織モデルサンプルやマウス固定脳スライス、そして麻醉下の生体マウスでの大脳皮質深部イメージングにおいて TP-SRRF の適用を試した。撮像条件、SRRF 処理条件等を最適化した結果、既存法では困難であった数百マイクロメートルから数ミリメートルの組織深部において、100 ナノメートル前後の空間分解能で超解像観察が可能であることを実証した(下図)。また、画像解析による超解像法ではアーティファクトによる形態再現性の低下が課題となるが、本研究で再現性の良い SRRF 処理条件を見出すことができた。これらの成果については論文執筆中であり、2021 年度には日本バイオイメージング学会 学術集会で発表し、ベストイメージング賞(学会発表賞)を受賞している。また、現在は本研究で構築された高速 TP-SRRF 観察法を用いた生体微小分子の挙動解析について、引き続き取り組んでいるところである。

本研究において、TP-SRRF による生細胞・組織観察のモデルサンプルとして、HeLa 細胞スフェロイドに着目した。低吸着ウェルプレートを用いた細胞スフェロイド作製法を導入し、2 光子観察に適したサイズのスフェロイド培養技術を確立した。TP-SRRF での観察に並行して、同培養技術を活用した共同研究も実施し、補償光学技術による 2 光子観察の改善に関する成果³⁾、および深層学習を用いた 3 次元細胞追跡技術の開発に関する成果⁴⁾について、海外学術誌に共著論文を

発表した。さらに、本研究で得られた SRRF の最適条件の知見を適用して超解像観察を支援した共同研究成果 1 報も共著論文として発表した⁵⁾。

本研究期間中には新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の世界的蔓延が発生し、社会活動に大きな影響が生じた。本研究においても、研究出張の自粛等により当初予定していた共同研究スケジュールからの遅延が生じるなどの影響を被った。その情勢下で、本研究の共同研究先でもある顕微鏡共同利用施設 北海道大学ニコンイメージングセンターと共同で、同所保有の超解像顕微鏡 (ニコン N-SIM) のリモート観察実証実験を行った。オンライン会議システムの画面制御共有機能を用いて、約 1000 km 離れた北海道札幌市の同所と我々の研究所 (愛知県岡崎市) 間を繋ぎ、マウス固定脳スライスの観察を試した結果、観察位置の調整、撮像条件の設定、画像取得、画像処理、超解像画像の再構成、データ保存までの一連の操作を全て遠隔で行うことに成功した。このリモート観察については、複数回実証実験を行って課題の洗い出しと改善策の検討も行い、その成果について 2021 年の顕微鏡研究者の国際会議 (Global Bioimaging Exchange of Experience) の招待講演にて発表した。

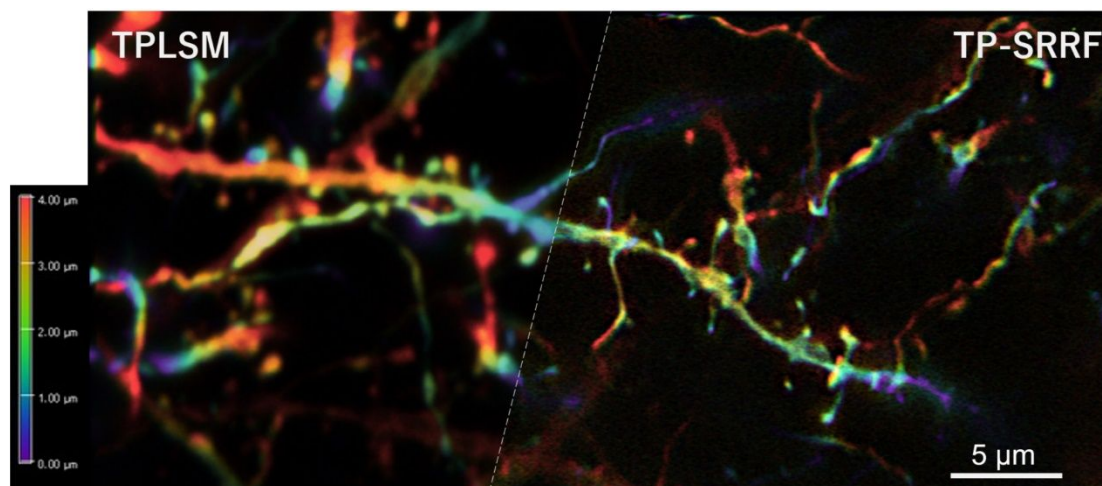


図 1 マウス脳組織に対する TP-SRRF の適用例

Thy1-EYFP (H-line) マウス固定脳冠状切片中の大脳皮質第 5 層錐体細胞樹状突起に対する TP-SRRF 適用例。2 光子顕微鏡による連続取得画像の平均化像 (左) と SRRF 処理像 (右) の比較を示す。TP-SRRF 観察 によって、組織透明化処理を施さずとも、組織内部の神経細胞のスパイン構造などの微細形態を観察することに成功した。

References

- 1) Tsutsumi et al., *FEBS Open Bio*, 2016, **6**; 106.
- 2) Gustafsson et al., *Nat. Commun.* 2016, **7**; 12471.
- 3) Yamaguchi et al., *ACS Omega*, 2021, **6**; 438-447.
- 4) Wen et al., *eLife*, 2021, **10**; e59187.
- 5) Kamasaki et al., *iScience*, 2021, **24**; 102994.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yamaguchi Kazushi, Otomo Kohei, Kozawa Yuichi, Tsutsumi Motosuke, Inose Tomoko, Hirai Kenji, Sato Shunichi, Nemoto Tomomi, Uji-i Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Adaptive Optical Two-Photon Microscopy for Surface-Profiled Living Biological Specimens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 438 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c04888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Wen Chentao, Miura Takuya, Voleti Venkatakaushik, Yamaguchi Kazushi, Tsutsumi Motosuke, Yamamoto Kei, Otomo Kohei, Fujie Yukako, Teramoto Takayuki, Ishihara Takeshi, Aoki Kazuhiro, Nemoto Tomomi, Hillman Elizabeth MC, Kimura Koutarou D	4. 巻 10
2. 論文標題 3DeeCellTracker, a deep learning-based pipeline for segmenting and tracking cells in 3D time lapse images	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/elife.59187	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kamasaki Tomoko, Miyazaki Yumi, Ishikawa Susumu, Hoshiba Kazuya, Kuromiya Keisuke, Tanimura Nobuyuki, Mori Yusuke, Tsutsumi Motosuke, Nemoto Tomomi, Uehara Ryota, Suetsugu Shiro, Itoh Toshiki, Fujita Yasuyuki	4. 巻 24
2. 論文標題 FBP17-mediated finger-like membrane protrusions in cell competition between normal and RasV12-transformed cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 102994 ~ 102994
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2021.102994	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 5件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 堤 元佐	
2. 発表標題 SRRF-時空間蛍光相関超解像法 ~ 画像解析による新規超解像顕微鏡 ~	
3. 学会等名 オックスフォード・インストゥルメンツ社 Andor ウェビナー 第2回 (招待講演)	
4. 発表年 2020年	

1. 発表者名 堤 元佐
2. 発表標題 蛍光イメージングの最新動向：より速く、より深く、より細かく、そしてより優しく
3. 学会等名 琉球大学 理学部海洋自然科学科生物系 公開講演会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中田開人、鎌田恭史、大友康平、石井宏和、堤 元佐、榎木亮介、根本知己
2. 発表標題 多点走査型 2 光子顕微鏡による A オリゴマー曝露時のアストロサイト Ca ²⁺ 動態の可視化解析
3. 学会等名 第29回 日本バイオイメーjing学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山口和志、大友康平、小澤祐市、堤 元佐、猪瀬朋子、平井健二、佐藤俊一、根本知己、雲林院 宏
2. 発表標題 空間光位相変調器を用いた収差補正による生体組織深部の微細構造の可視化
3. 学会等名 日本化学会 第101春季年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazushi Yamaguchi, Kohei Otomo, Yuichi Kozawa, Motosuke Tsutsumi, Tomoko Inose, Kenzi Hirai, Syunichi Sato, Tomomi Nemoto, Hiroshi Uji-i
2. 発表標題 Two-photon 3D live imaging of cellular ERK activation in multicellular tumor spheroid adhering gold nanostar for plasmonic photothermal effects
3. 学会等名 The 3rd Australia-Belgium-Japan joint symposium on excitonics and cellular communication（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Motosuke Tsutsumi, Tomomi Nemoto
2. 発表標題 Image analysis based super-resolution two-photon microscopy TP-SRRF for deep imaging
3. 学会等名 第3回 ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Motosuke Tsutsumi
2. 発表標題 TP-SRRF, Image analysis based super-resolution two-photon microscopy for deep imaging
3. 学会等名 第3回 ExCELLS若手交流リトリート
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 元佐、根本知己
2. 発表標題 深部高速超解像イメージングのための新規画像解析法SRRFの適用検討
3. 学会等名 第2回ExCELLSシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 元佐、根本知己
2. 発表標題 Application of novel image analysis method SRRF for deep and fast super resolution imaging
3. 学会等名 大学共同利用機関法人若手コロキウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 堤 元佐、根本知己
2. 発表標題 Application of novel image analysis method SRRF for deep and fast super resolution imaging
3. 学会等名 ExCELLS若手リトリート
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tsutsumi M., Nemoto TTsutsumi M
2. 発表標題 Application of novel image analysis method SRRF for deep and fast super resolution imaging
3. 学会等名 ABiS International Symposium 2020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堤 元佐、高橋泰伽、小林健太郎、根本知己
2. 発表標題 画像解析による超解像法SRRFのin vivoイメージングへの適用
3. 学会等名 第30回 日本バイオイメージング学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsutsumi M, Kobayashi K, Nemoto T
2. 発表標題 Remote support of optical microscope observation beyond 1000 km distance
3. 学会等名 Global Bio Imaging -Exchange of Experience VI- online meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tsutsumi M
2. 発表標題 Image analysis based super-resolution two-photon microscopy for in vivo imaging
3. 学会等名 第4回 ExCELLS若手交流リトリート
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tsutsumi M, Nemoto T
2. 発表標題 Image analysis based super-resolution two-photon microscopy for in vivo imaging
3. 学会等名 第11回 生理研-霊長研-新潟脳研 合同シンポジウム
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 堤 元佐
2. 発表標題 光学顕微鏡の観察の新展開 - 光学分解能を超える観察とリモート観察 -
3. 学会等名 北海道大学 技術支援・設備共用コアステーション オンライン会議（招待講演）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ベルギー	Katholieke Universiteit Leuven			
米国	Columbia University			