

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22422

研究課題名(和文) ライブセル観察と機械学習を用いた細胞表層骨格のダイナミクス解析

研究課題名(英文) Analyses of cortical actin dynamics by live-cell imaging and machine-learning

研究代表者

吉村 成弘 (Yoshimura, Shigehiro)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：90346106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：高速原子間力顕微鏡により得られた生きた細胞表層の連続画像から、アクチン線維の時空間的情報を自動抽出し、機械学習に必要な大量の学習データとして利用する手法を確立した。画像の局所毎にアクチンフィラメントの方向を潜在変数とした確率的生成モデルを構築し、アクチンフィラメントの存在とその方向を推定することに成功している。これを培養細胞から得られた連続画像データに応用することで、これまで未知であったアクチンフィラメントの角度分布構造を発見するに至っている。また、蛍光顕微鏡との相関イメージングと光刺激型シグナル分子を組み合わせ、Rhoシグナルに応じたアクチン線維の情報(学習データ)を取得することに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの画像解析技術では、高速原子間力顕微鏡により得られた連続画像から、各アクチン線維の時空間的情報を自動抽出するのは極めて困難であった。本研究課題で確立した画像解析技術は、様々なクオリティの連続画像から自動かつ高いS/N比でアクチン線維の時空間的情報を抽出することが可能であり、機械学習に用いる大量の学習データを取得するのに貢献するのみならず、これまで未報告であった表層アクチン動態の解明を可能にするものである。このデータを機械学習に入力することで、従来の人の手による画像解析では発見不可能であった細胞の状態変化(がん、細胞死等)を、早期に見つける技術の確立がより現実的になると期待される。

研究成果の概要(英文)：We established the method to extract spatio-temporal information of individual actin filaments from a series of images obtained from a living cultured cell by high-speed atomic force microscopy (HS-AFM), and to use it as an input data set for the machine learning. We first made a stochastic generative model at individual regions in the target image, which carries vector information of an actin filament as a latent variable, and successfully predicted the location and the direction of the actin filament. We applied this technique to a series of HS-AFM images obtained from a living cell surface and found an uneven distribution of the filaments angle. We also combined correlative imaging of HS-AFM and fluorescence microscopy with optogenetic tool to obtain input data set under the control of Rho activities. We use these data sets as training data for the machine learning and will extract the properties of actin network in different signaling states.

研究分野：生物物理

キーワード：アクチン 原子間力顕微鏡 表層骨格 シグナル伝達 機械学習

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞の表層骨格は、細胞の形状維持や細胞運動で重要な役割を果たしており、細胞分裂・増殖、がん化、がんの転移、細胞分化、発生などの生物的過程において重要な役割を果たしている。表層骨格は、アクチン線維とそれに結合するタンパク質から構成されており、細胞内総アクチン量の半分以上を占める。数百本のアクチンが束になったストレスファイバーと異なり、表層アクチンは単線維が形成するランダムネットワークであり、線維の重合・脱重合・架橋・分岐により動的平衡構造が維持されている。また、多くのシグナル分子により平衡状態が制御されており、がん細胞の中には、このシグナル分子の機能異常により引き起こされるものが少なくない。よって、シグナル分子の機能と表層骨格の動的構造との関係性を明らかにすることは、がんの解明に極めて重要であるが、従来の電子顕微鏡や蛍光顕微鏡の技術では、分子レベルでの動的構造を解析するのは困難である。

これまでの技術革新と問題点：本申請者はこれまでに、生細胞観察に特化した高速原子間力顕微鏡(ライブセル高速 AFM)を開発し、表層アクチン線維の動態を、数秒の時間分解能で可視化するという世界で唯一の技術を確立した。この膨大な連続画像とシグナル分子の活性情報を統合することにより、表層骨格の動的構造の定量解析が原理的には可能であるが、現時点では以下の問題が存在する。i) ネットワークの構造的複雑さとノイズによって、従来の画像解析法の組み合わせでは、その動的構造変化を識別することが困難なこと。ii) 動的構造を制御するシグナル分子の多様性により、多次元・多変数解析が必要であるが、これはヒトの手による解析レベルをはるかに超えていること。

### 2. 研究の目的

細胞のがん化にともなう表層骨格の構造変化を解明するには、生きた細胞から得られる動的構造情報とシグナル分子活性という多次元・多変数のデータ相関を解析する新手法が必要である。そこで本研究課題では、近年めざましい進歩を遂げたディープラーニングによる画像処理技術を駆使することで、表層アクチンの動的構造変化を定量的に捉える。そして、細胞内の時空間的なシグナル分子活性の情報が表層アクチン線維の動的構造変化へと変換される過程をデータ駆動的に明らかにする。さらにこれを用いて、がん化に伴う表層骨格の変化を解析し、その仕組みの解明に資する解析法の確立を目指す。

### 3. 研究の方法

本研究課題では、ライブセル高速 AFM 技術を確立した代表者と、機械学習やシステム生物学を専門とする分担者(本田)が連携して研究を遂行する。具体的な研究項目は以下の通りである。研究課題 I：細胞内シグナル分子活性とアクチン単線維ダイナミクスとの相関イメージング  
細胞骨格のダイナミクスを調節するシグナル分子および効果分子群(RhoA, Rac1, Cdc42, Ras, Formin, N-WASP など)に着目し、FRET バイオセンサー等を用いてその局在・活性と、アクチン線維のダイナミクスとの相関イメージングを行う。また、光活性化型シグナル分子(PA-RhoA, PA-Rac1 など)を用いて、シグナル分子の活性を観察下で制御することで、より定量的な相関イメージングを目指す。

研究課題：機械学習によるシグナル活性と分子構造動態との関係性解明

上記 I) で得られた 2 種の異なる画像集合に対して、機械学習を用いて以下の解析を行う。

I) で得られたアクチン線維の連続 AFM 画像に対しては、通常の画像解析法およびディープラーニング(U-Net 法)を用いて重合・脱重合・架橋・枝分かれをパターン認識する手法を確立する。

I) で得られた細胞内シグナル分子の活性に関する多次元データを「入力」、上記で得られるアクチン線維の動的構造変化を「出力」として、それらの入出力変換を機械学習により明らかにする。

研究課題：がん細胞におけるシグナル分子活性と表層骨格動態との関連性解明

II) で得られた関数を用いて、がん細胞と正常細胞における表層骨格の違いについて解析を行う。YAP は Ras 依存性のがんで機能することが知られており、細胞骨格との関係性が示されると共に、正常細胞(非形質転換細胞)に過剰発現させると、腫瘍細胞のすべての特徴を示すことが知られている。ここでは、この系を用いて、Ras を中心としたシグナル分子と、表層骨格との関係性を、II) で得られた関数を用いて解析する。

### 4. 研究成果

研究課題：細胞内シグナル分子活性とアクチン単線維ダイナミクスとの相関イメージング

細胞内アクチンを制御することが知られているシグナル分子として、RhoA ファミリータンパク質(RhoA, Rac1, Cdc42)に着目し、光刺激によりその活性を制御する系を構築した(図 1)。

光刺激型 Rac1 を発現させた COS7 細胞の一部を光刺激し、アクチンの動態が変化することを確認した上で、高速原子間力顕微鏡観察を行う系を構築することに成功した。また、RhoA, Rac1, Cdc42 の恒常活性化型やドミナントネガティブ型を過剰発現させた COS7 細胞を高速原子間力顕微鏡で観察した (図 2)。通常細胞と比較すると、アクチンの構造に若干の差が見られる場合もあったが、人の手による画像解析(密度や角度等)では優位な差を見つけることはできなかった。よって、これらを機械学習の入力データに適した画像と判断した。以上の成果により、アクチン構造制御に関与するシグナル分子の活性を制御した細胞で原子間力顕微鏡観察をおこない、機械学習に必要な入力データを取得する系が確立できたと判断した。

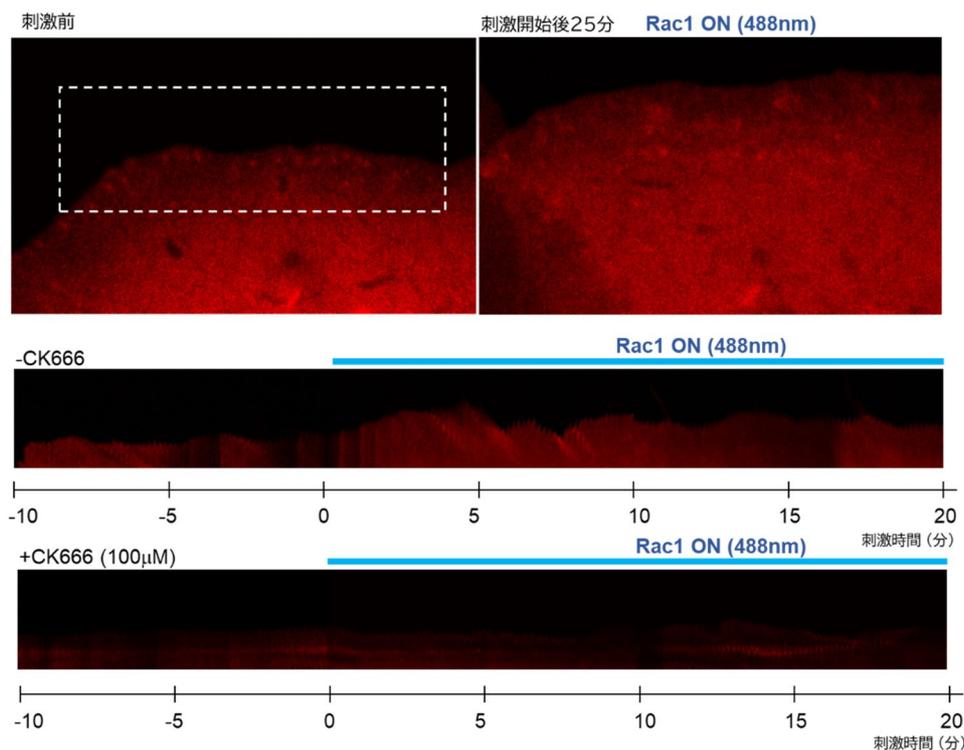


図 1: 光刺激によるシグナル分子の制御。COS7 細胞に光刺激型 Rac1 を発現させ、点線領域を 488nm で刺激したときの細胞の形状変化。接着班を構成する paxillin に mCherry に融合したものを同時に発現している。下段には、細胞端の時間経過をカイモグラフで示す。光刺激中は細胞端の動きが活発になり、これはアクチン重合の阻害剤である CK666 で阻害される。

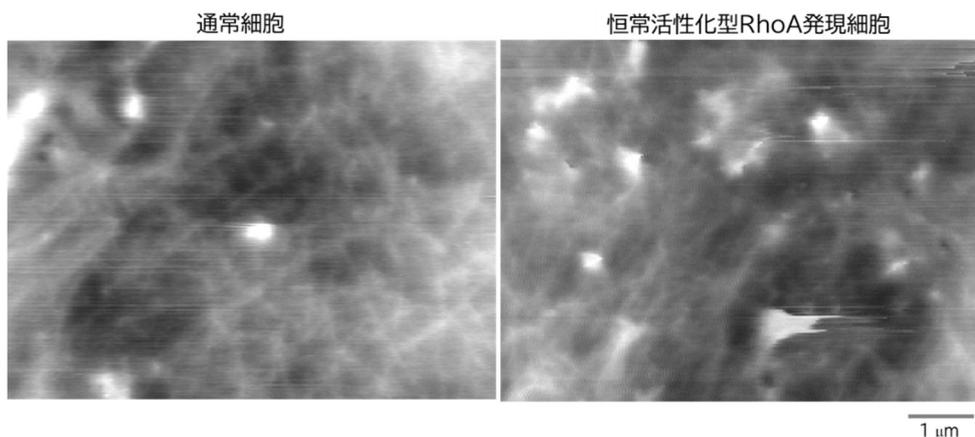


図 2: 恒常活性化型 RhoA(Q63L) を発現させた COS7 細胞の高速原子間力顕微鏡画像。アクチン線維の密度に大きな差はないが、RhoA 発現細胞には、アクチン線維束中に凝集体のような構造物が多く見られる。人の手による画像解析では差が見つけにくいいため、これを機械学習に用いることとした。

### 研究課題：機械学習によるシグナル活性と分子構造動態との関係性解明

これまでの画像解析技術では、高速原子間力顕微鏡により得られた生きた細胞表面の連続画像から、各アクチンフィラメントの時空間的情報を自動抽出するのが極めて困難であり、機械学習に必要な大量の学習データ(入力データ)として利用できないという問題があった。そこで、画像の局所毎にアクチンフィラメントの方向を潜在変数とした確率的生成モデルを構築し、アクチンフィラメントの存在とその方向を推定する手法を開発した。これを培養細胞から得られた連続画像データに応用することで、各アクチンフィラメントを明瞭に捉えることが可能になった(図3)。さらに、これまで未知であったアクチンフィラメントの角度分布構造を発見するに至っている。これらの成果により、原子間力顕微鏡で得られた大量の連続画像データから、自動でアクチン線維の構造・位置情報を抽出することが可能となり、機械学習の学習データとして用いることが可能になった。現在、これらを入力データとした機械学習方の構築に取り組んでいる。

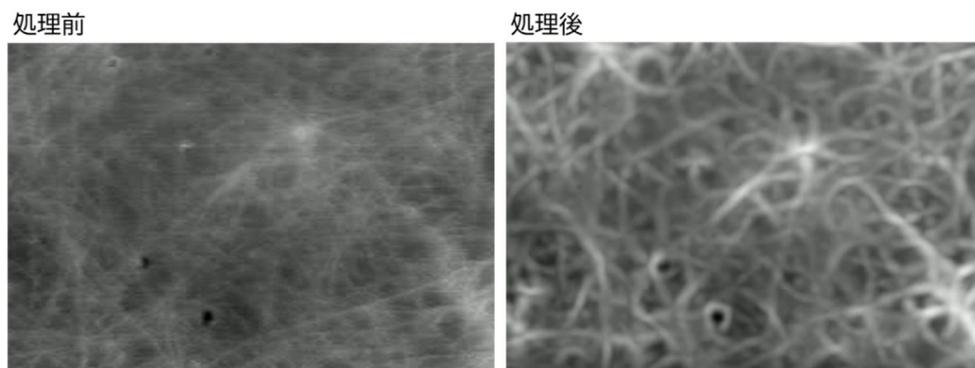
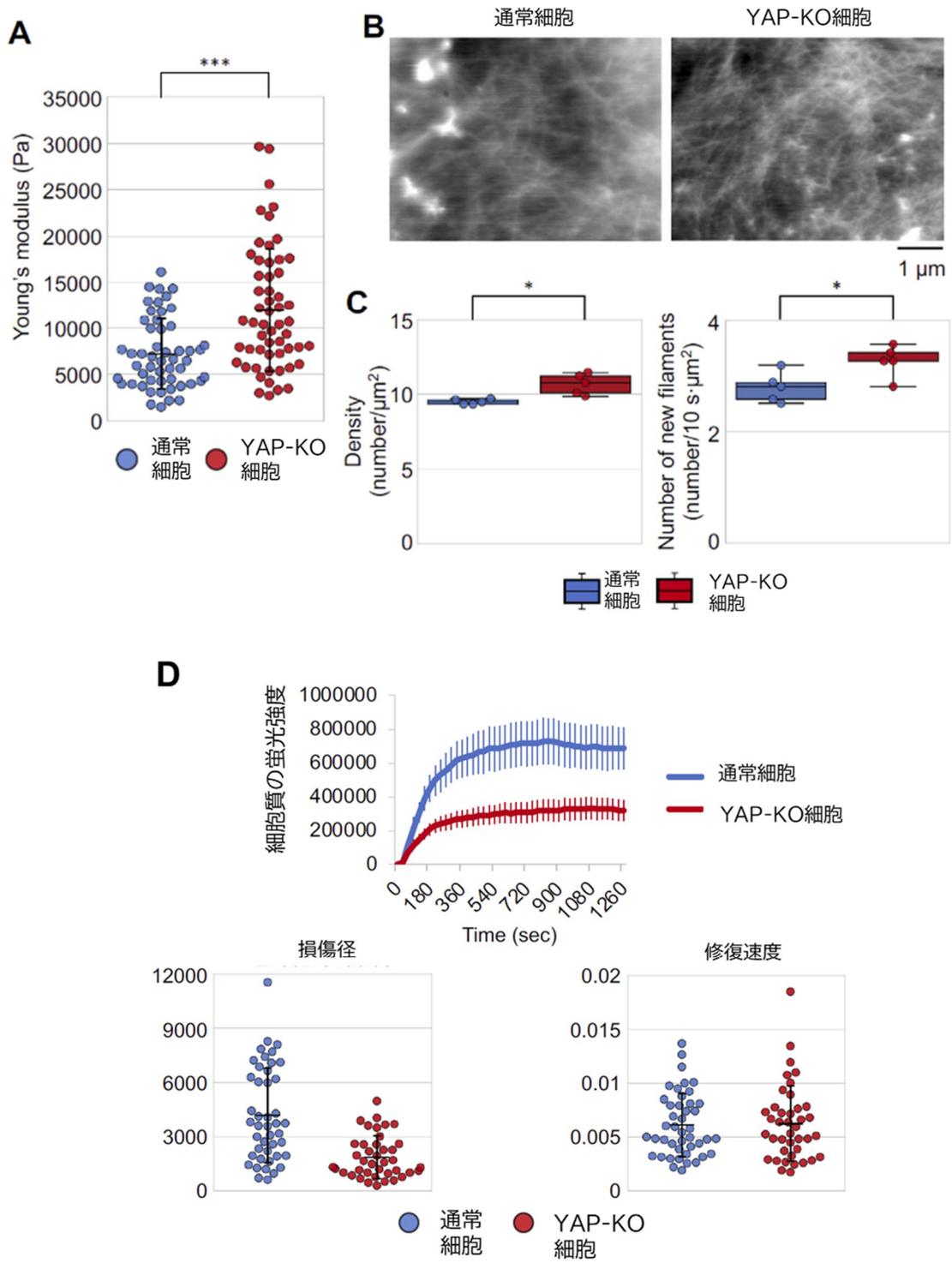


図3: 高速原子間力顕微鏡で取得したアクチン線維の画像から線維の位置構造情報を抽出する手法。アクチン線維の方向を潜在変数とした確率的生成モデルを構築し、線維の存在とその方向を推定する手法を適用した画像。処理前の画像ではアクチン線維の位置情報が分かりにくいですが、処理後では、線維の位置構造情報が明確に抽出されている。

### 研究課題：がん細胞におけるシグナル分子活性と表層骨格動態との関連性解明

がん細胞における表層アクチンの構造情報を抽出するために、腫瘍形成と関係性の深いYAPに着目して研究をおこなった。研究協力者の清木が作成したYAPノックアウト(YAP-KO)細胞を対象に、表層の力学測定、膜損傷回復能の定量解析、および高速原子間力顕微鏡による観察を行った。YAP-KO細胞では、表層弾性の上昇、および損傷率の低下が見られた(図4)。高速原子間力顕微鏡による観察では、アクチン線維密度の上昇が見られた。これらの結果はすべて、YAP-KO細胞で、表層アクチン線維の増加とそれに伴う構造硬化が進行していることを示す。さらに、この分子機構を調べたところ、RhoAの活性を制御するRho GTPase activating proteinのひとつであるARHGAP18の細胞内局在が変化しており、これにより表層部のRhoAの活性が上昇していることを突き止めた。これらの結果は、YAPによる転写制御と表層アクチン構造との関係性とを繋ぐ新しい重要な知見であり、今後、表層アクチンとがん化との関係性を明らかにする上で、重要な入力データであることを示す。

図4(次ページ): YAP-KO細胞における表層骨格の解析。(A)原子間力顕微鏡を用いた細胞表面の力学測定。得られたフォースカーブからヤング率を算出し、通常細胞とYAP-KO細胞とで比較した。YAP-KO細胞のほうが優位に大きなヤング率を示した。(B)高速原子間力顕微鏡で観察した表層アクチン。(C)アクチン線維の密度と合成頻度。ともに、YAP-KO細胞の方が高い値を示した。(D)細胞膜損傷修復アッセイ。レーザーにより細胞表面に数 $\mu\text{m}$ の損傷を与え、培地中の蛍光色素の流入をタイムラプスで観察したもの。通常細胞に比べ、YAP-KO細胞の方が流入が少ない(上段)。蛍光シグナルの解析により、損傷径には有意差が見られたが(左下)、修復速度には見られなかった(右下)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 H. Yamazaki, H. Kosako and S.H. Yoshimura	4. 巻 1968
2. 論文標題 Quantitative proteomics indicate a strong correlation of mitotic phospho-/dephosphorylation with non-structured regions of substrates.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochim. Biophys. Acta. Proteins Proteom.	6. 最初と最後の頁 140295
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbapap.2019.140295.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 H.A. Konishi and S.H. Yoshimura	4. 巻 34
2. 論文標題 Interactions between non-structured domains of FG- and non FG-nucleoporins coordinate the ordered assembly of the nuclear pore complex in mitosis	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FASEB J.	6. 最初と最後の頁 1532-1545
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1096/fj.201901669R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Duic Ivana, Tadakuma Hisashi, Harada Yoshie, Yamaue Ryo, Deguchi Katashi, Suzuki Yuki, Yoshimura Shige H, Kato Hiroki, Takeyasu Kunio, Fujita Takashi	4. 巻 48
2. 論文標題 Viral RNA recognition by LGP2 and MDA5, and activation of signaling through step-by-step conformational changes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 11664 ~ 11674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkaa935	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 -
1. 著者名 Yamaguchi Itsuki, Yoshimura Shige H., Katoh Hironori	4. 巻 295
2. 論文標題 High cell density increases glioblastoma cell viability under glucose deprivation via degradation of the cystine/glutamate transporter xCT (SLC7A11)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 6936 ~ 6945
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1074/jbc.RA119.012213	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 -

1. 著者名 Zhang Wanzhen, Watanabe Ryuji, Konishi Hide A., Fujiwara Takahiro, Yoshimura Shige H., Kumeta Masahiro	4. 巻 33
2. 論文標題 Redox-Sensitive Cysteines Confer Proximal Control of the Molecular Crowding Barrier in the Nuclear Pore	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 108484 ~ 108484
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.108484	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5件(うち招待講演 3件/うち国際学会 2件)

1. 発表者名 ZHANG Y, YOSHIDA A, SAKAI N, UEKUSA Y, KUMETA M, YOSHIMURA SH
2. 発表標題 In vivo dynamics of the cortical actin network revealed by fast-scanning atomic force microscopy.
3. 学会等名 第75回日本顕微鏡学会学術講演会(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIMURA SH
2. 発表標題 Protein-induced morphological changes of the plasma membrane during clathrin-mediated endocytosis and its dependency on the membrane tension revealed by live-cell fast-scanning atomic force microscopy.
3. 学会等名 EMBO workshop, Physics and Chemistry of Endocytosis(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 YOSHIMURA S,H.
2. 発表標題 How Clathrin-mediated Endocytosis Proceeds under Membrane Tension.
3. 学会等名 International Symposium on AMED "Mechanobiology" Project(招待講演)(国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村成弘
2. 発表標題 Live-cell analysis of protein-mediated membrane deformation during clathrin-mediated endocytosis by High-speed atomic force microscopy
3. 学会等名 日本顕微鏡学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉村成弘
2. 発表標題 ライブセル高速原子間力顕微鏡による細胞表層骨格の可視化とメカノセンシング機構の解明
3. 学会等名 日本生体医工学会（招待講演）
4. 発表年 2020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
研究 分担者	本田 直樹  (Honda Naoki)  (30515581)	京都大学・生命科学研究科・准教授   (14301)	

	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
研究 協力者	清木 誠  (Seiki Makoto)		

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
---------	---------