

〈特別研究課題〉 シングルオルガネラアナリシスに資する

次世代顕微鏡の開発

助成研究者 名古屋大学 高橋 康史



シングルオルガネラアナリシスに資する 次世代顕微鏡の開発

高橋 康史
(名古屋大学)

Development of next-generation microscopy for single-organelle analysis

Yasufumi Takahashi
(Nagoya University)

Abstract :

Recent breakthroughs in bioimaging technologies have enabled the visualization of intracellular structures at the nanoscale. However, these advances in imaging resolution have not yet directly translated into a deeper understanding of cellular functions. One major challenge lies in the trade-off between spatial and temporal resolution in imaging techniques, as well as the underdevelopment of manipulation technologies. In particular, there is a pressing need for methods to understand how proteins, lipids, and peptides— molecules that cannot be amplified by PCR— are distributed and change over time within living cells.

A conventional glass micropipette-based extraction techniques have required a high level of manual skill and have suffered from low throughput. Consequently, many studies have relied on experience-based assumptions— for example, that mRNAs involved in cytoskeletal organization during cell migration tend to localize near the cell periphery— rather than high-resolution, quantitative data. The automation of recovery techniques with spatial resolution on the order of several hundred nanometers has the potential to shift research from inference-based approaches to data-driven exploration of cellular functions. In this study, we focus on applying machine learning to three key components: (1) the identification of cells and organelles, (2) the movement of nanopipettes, and (3) the delivery of reagents and recovery of organelles. By doing so, we aim not

merely to improve throughput but to enable rapid sensing and labeling of dynamically changing intracellular proteins, lipids, and peptides. Furthermore, by repeatedly sampling specific regions from different cells, we seek to make it possible to apply multi-cellular analytical techniques such as mass spectrometry— which have traditionally required larger sample quantities— to single-organelle and single-cell studies.

1. はじめに

バイオイメージング技術の飛躍的な進歩により、細胞内の構造は、ナノスケールで可視化されつつある。しかし、このイメージング精度の向上が、細胞の機能解明と直接的に結びついていない。このような細胞の機能解明の際の課題として、イメージング技術の時空間分解能の両立がなされていないこと、マニピュレーション技術が十分に発展していないことなどが挙げられる。特に、PCRによる増幅ができないタンパク質、脂質、ペプチドなどが細胞内でどのように分布し、時間とともにどのように変化するかを理解する技術が切望されている。ガラスピペットを用いた細胞の回収・分析は、単一細胞レベルで細胞質を回収することができる。しかし、細胞の厚みは光学画像から予測する以外方法がなく、これまでの細胞回収技術は職人技を必要とするものであり、そのスループットの低さから、経験による推論に基づいた研究(例えば細胞の縁部分で遊走に関係する細胞骨格形成に関与するmRNAが豊富など)が主流である。数百nmスケールの空間分解能を有する回収技術の自動化は、これまでの推論ベースの研究からの脱却とデータドリブンな細胞機能の解明の可能性を秘めている。

我々は、これまでガラスピペットを用いた走査型プローブ顕微鏡である走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)の独自開発を行い、細胞表面のナノスケールの構造や力学特性の評価を実現させてきた¹⁻³。また、SICMにより得られる試料表面の形状情報をもとにガラスピペットを細胞表面にナビゲートして、局所的な細胞質の回収と、回収した細胞質からのmRNAの分析を実現させてきた^{4,5}。この手法は、細胞中の遺伝子発現の不均一性を評価するには大変有効であったが、一方で、回収量が微量なために、遺伝子以外の生体分子を観察することができなかった。

本研究では、‘細胞・オルガネラの識別’、‘ナノピペットの移動’、‘試薬の投与・オルガネラの回収’に対して機械学習を適用することで、単なるスループットの向上ではなく、動的に変化を続ける細胞内のタンパク質、脂質、代謝物などの迅速なセンシングやラベリング、異なる細胞の特定領域からのサンプリングを繰り返すことで、回収量がネックとなっていた質量分析などの多細胞分析技術を適用できることに着目した。

2. 試料および実験方法

細胞やオルガネラの位置の自動識別とガラスピペットによる自動回収を行うため、細胞の位置を確認するための倒立顕微鏡顕微鏡(Nikon TiS2)上に、サンプルを電動で移動させるための粗動用のXYステッピングモータステージと、ナノスケールの精密位置決め用のXYピエゾステージを搭載した。また、ガラスピペットを取り付けるZステッピングモータステージとZピエゾステージを搭載した(図1)。細胞やオルガネラに対してガラスピペットを自動ナビゲートする制御については、ブロックダイアグラム使ってプログラムを構築可能なLabviewでプログラムを自作したものを使用

した。Labviewは、視覚的に非常にわかりやすくプログラムを書くことが可能なため、機器制御のプログラムとして有効である。一方、細胞の位置は、SCMOSカメラ (Orca FusionBT) で取得した細胞の画像について、機械学習 (Yolov8) を活用して自動で座標を取得した。この際に、Yolov8は、Pythonで書かれている。Pythonは、シンプルな文法と学習のしやすさに加え、豊富なライブラリ・フレームワークが存在し、機械学習・深層学習分野においてデファクトスタンダードとなっている。ガラスピペットを制御するプログラムは、Labviewで作成しているため、TCP/IPを活用してLabviewとPythonの2言語間での情報のやり取りを行った。ガラスピペットへの陰圧や加圧の制御は、電磁バルブを用いてプログラムで任意のタイミングでmsオーダーの精度で行えるように作成した。また、回収中のガラスピペット内の内圧は、圧力センサーによりモニターすることで、オルガネラ回収の再現性を向上させた。

細胞内への試薬のインジェクトでは、ガラスピペット内に挿入したAg/AgCl電極と細胞が存在するディッシュに配置したAg/AgCl電極間に電圧を印加して、電気浸透流を活用したインジェクトを行った。細胞の自動回収では、明視野画像を利用した。オルガネラの回収では、蛍光画像を使用し、ミトコンドリアをターゲットとして、ミトトラッカーグリーンで染色したHeLaを用いた。

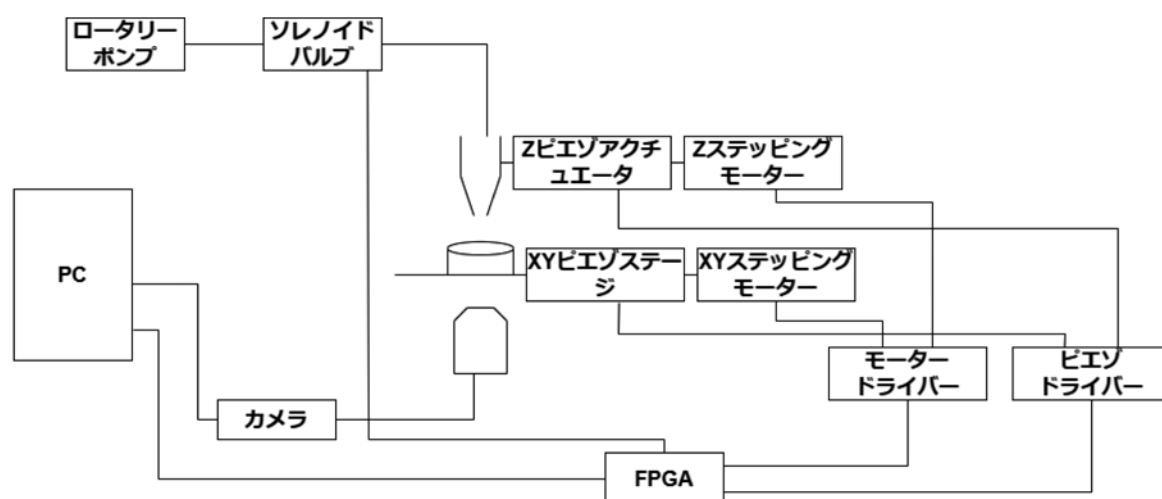


図1. ガラスピペットを用いた細胞・オルガネラ回収装置の概要図

3. 実験結果

3.1 細胞内への試薬のインジェクト

ガラスピペットを用いて細胞内への試薬のインジェクトを試みた。ガラスピペットによるインジェクトでは、ピペット内に配置したAg/AgCl電極と、細胞を培養している溶液中に配置したAg/AgCl電極との間に電圧を印加することで、電気泳動と電気浸透流が発生する。電気泳動を利用したインジェクトでは、分子の輸送はその分子の電荷に依存する。ガラスピペット内の電極に印加する電圧と分子の電荷が同符号である場合に、ピペット外へと分子が放出される。一方で電気浸透流は、ガラス壁面に静電相互作用で吸着しているイオンが、電圧を印加することで雪崩状に移動する現象でインジェクトする分子の電荷に依存しない。一般的に負に帯電したガラス壁面に正に帯電した分子が吸着しており、正の電圧を印加すると、このガラスに吸着している分子が雪崩状にピペット外へと放出され、ピペット内の分子もこの雪崩に巻き込まれる形で放出される。ガラスピペット

からの試薬のインジェクトの際には、この電気泳動と電気浸透流のバランスで分子が放出される。図2に生に帯電した分子に働く電気泳動と電気浸透流の流れを示す。この場合には、正に帯電した分子に対しては、電気泳動および電気浸透流ともにピペットの内側方向への流れが形成される。インジェクトされる分子の量は、印加する電圧と時間により制御することが可能である。また、インジェクトされた分子の量については、これまで蛍光プローブや、電気化学的な手法により定量が試みられてきた。

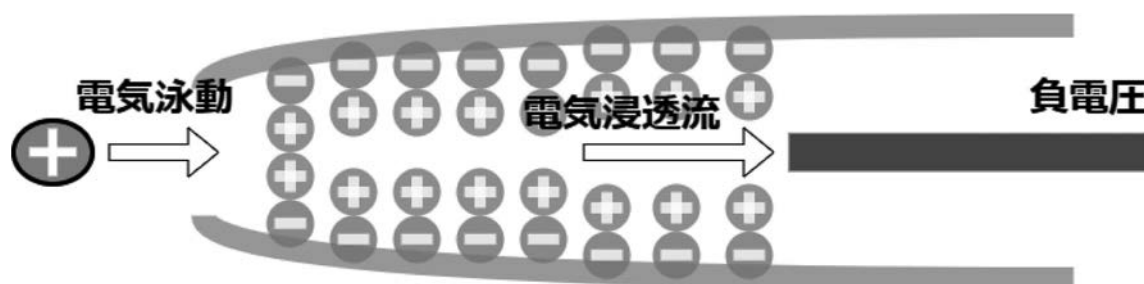


図2. 電気泳動と電気浸透流によるピペット内外のイオンの動き

これまでガラスピペットを用いた細胞内への試薬のインジェクトでは、細胞内へ試薬を導入する際に、ガラスピペットを細胞内に挿入しており、細胞へのダメージからブレブが発生してしまっていた。そこで、ガラスピペットを細胞内へ挿入した際の細胞へのダメージを回避するため、ガラスピペットを細胞内に挿入するのではなく、細胞表面にガラスピペットを接触させた状態で細胞膜をガラスピペットが接触する極微小な領域のみ破り、試薬を導入する手法を開発した。ガラスピペットと細胞との距離制御は、走査型イオンコンダクタンス顕微鏡(SICM)に利用されるイオン電流を利用した手法を活用した。ガラスピペット内に電極を挿入して、ディッシュにもう一本の電極を配置して、イオン電流を計測した。このイオン電流は、細胞の近傍にガラスピペットが近接すると減少するため、この変化を活用して、ガラスピペットと細胞との距離をナノスケールレベルで調整することができる。さらに、ガラスピペットが細胞に近接させた状態でパルス状の電圧を印加することで細胞膜の破碎と試薬のインジェクトを同時に達成した。従来は、ガラスピペットを細胞に挿入して試薬を注入する過程で、50%ほどの確率でブレブが発生していた。今回、パルス電圧の印加条件およびピペットの接近速度を最適化することにより、このブレブ発生率を30%ほどに抑えることが可能となった。

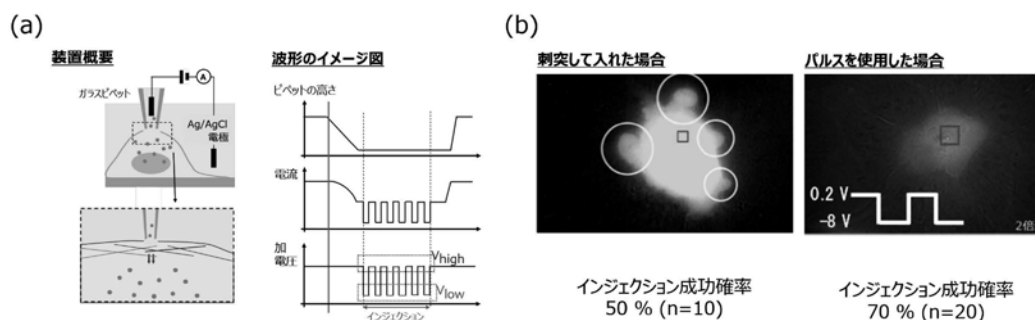


図3. ガラスピペットを用いた細胞内への試薬のインジェクション

(a) パルス電圧を用いたマイクロインジェクション法の概略図。(b) 各手法によって処理された細胞の比較。左: ピペットを直接挿入した場合。右: パルス電圧を用いた場合。

3.2 細胞やオルガネラの識別に関する学習の効率化

機械学習を用いた個々の細胞やオルガネラの識別において、教師データの作成は不可欠なプロセスである。しかしながら、従来のアノテーション作業は手作業に大きく依存しており、多大な時間と労力を要するという課題が存在した。加えて、撮像条件(レンズ倍率や照明強度など)や実験環境の変化(例えば、ガラスピペットの細胞への近接)が識別精度に影響を及ぼす可能性があり、多様な条件下でロバストな性能を維持するためには、状況に応じて学習データを迅速に更新または再構築できる柔軟なシステムが求められていた。そこで、これらの課題に対応するため、効率的な教師データ作成を支援する学習システムを構築した。本システムでは、まず少数の初期画像から細胞およびオルガネラの教師データを作成する。次に、YOLOv8を用いてこれらの対象物を識別し、その識別結果における誤認識された箇所を人が手で修正する。この修正されたデータを新しい学習データとして加え、モデルを再学習させるというサイクルを繰り返すことで、学習データを効率的に作製・改善していく。

このアプローチにより、教師データ作成の効率は著しく向上し、実験ごとの条件変化にも柔軟に対応して、その都度、最適化された学習データを迅速に準備することが可能となった。これは、継続的な識別精度の向上に貢献すると期待される。

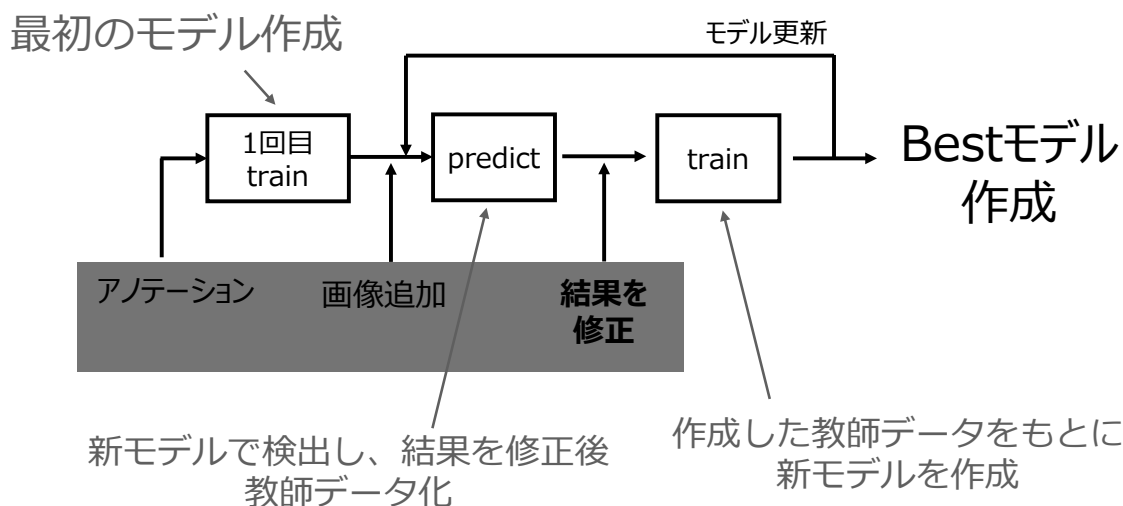


図4. 学習システム概略図

3.3 明確な構造的な境界のない構造の識別

細胞の遊走などの際に、細胞の突起状の構造が現れるが、この部分にはアクチンなどの分子が高い密度で存在しており、このようなダイナミックなタンパク質の変化をとらえることができれば、より細胞の遊走に関する理解が深まる。しかし、ほとんどの場合に、このような識別を行う際に、個々の細胞のように明確に膜で仕切られているわけではないため、通常の閾値ベースの手法では、突起構造を識別することは、困難である。そこで、機械学習を用いて、細胞の突起構造の識別を試みた。

まず、図5(a)に示す通り細胞の先端部全体を選択して学習を行ったところ、検出範囲が大きく形状の特徴を抽出しやすいため適合率99%以上になったが、先端部が枠の端になってしまうため、枠内のどの位置で回収するか決められないという欠点があった。そこで、本来は検出対象が枠に

ちょうど収まるように選択するのが望ましいが、あえて選択範囲に余白を設けて先端部が枠の中央になるように広い範囲を選択した(図5(c))。こうすることで先端の位置が明確になり、形状の特徴も抽出しやすくなった。

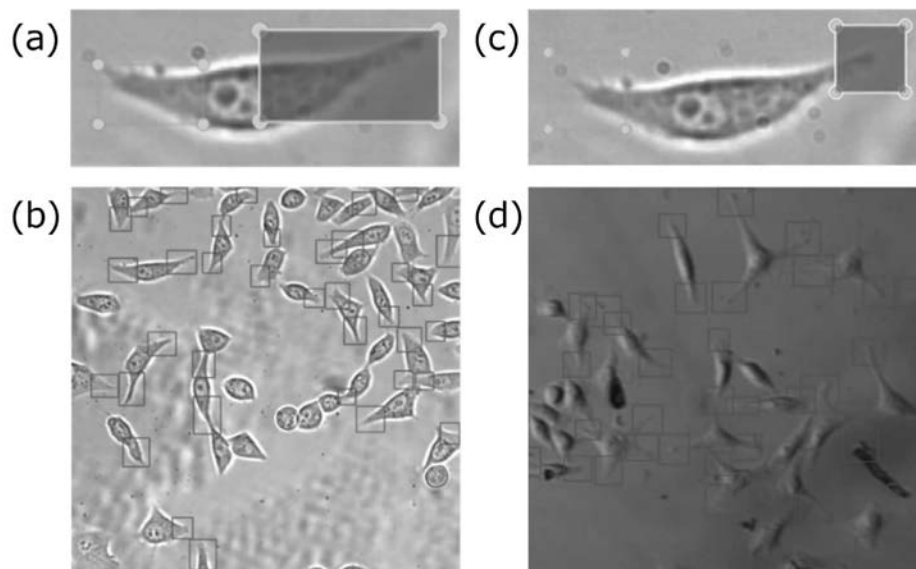


図5. 学習のための画像の選択範囲と検出結果
細胞先端部全体を広く囲んだ場合(a, b)と細胞先端部の周囲に余白を含めた場合の画像(c,d)の
典型的な学習データと検出結果

この条件で画像21枚に対して選択箇所1605か所のアノテーションを行い、教師データを作成して学習をした。アノテーションの選択範囲変更後、静止画による学習済みモデルの精度の確認では適合率が99%以上と誤検出がほとんどなく、再現率も95%程度と検出漏れも少なくなり、いずれの評価指標も高い数値を実現できた(図5(d))。

3.4 細胞内への試薬のインジェクト自動化

これまでガラスピペットによるインジェクト実験では、スループットが課題とされてきた。そこで、機械学習による細胞の自動検出とインジェクト技術を融合することにより、スループットの向上を試みた。図6に、自動インジェクションの様子およびその結果を示す。図6(a)は細胞中央部の検出の様子であり、大きな赤い四角は細胞の検出範囲を示している。この枠内で細胞の検出を行い、細胞の検出位置は小さな赤い四角で表示する。ピペットは検出範囲の左上に配置されている。細胞が検出されると、xyピエゾステージ及びzピエゾアクチュエータが自動で移動し、ピペットが細胞に挿入される。そのあと電圧を印加して試薬を注入する。

今回は、 -10 V の電圧を 250 ms 印加し、フルオレセイン溶液(200 mg/L)を注入した。使用したピペットの先端半径は $1\text{ }\mu\text{m}$ である。一つの細胞あたりインジェクトに必要な時間は約1秒であり、従来の手動操作に比べ、大幅に時間を短縮することができた。図6(c)は、自動インジェクション後に蛍光顕微鏡で観察した細胞像を示す。インジェクションを行った細胞内に注入されたフルオレセインに由来の蛍光シグナルを確認することができた。

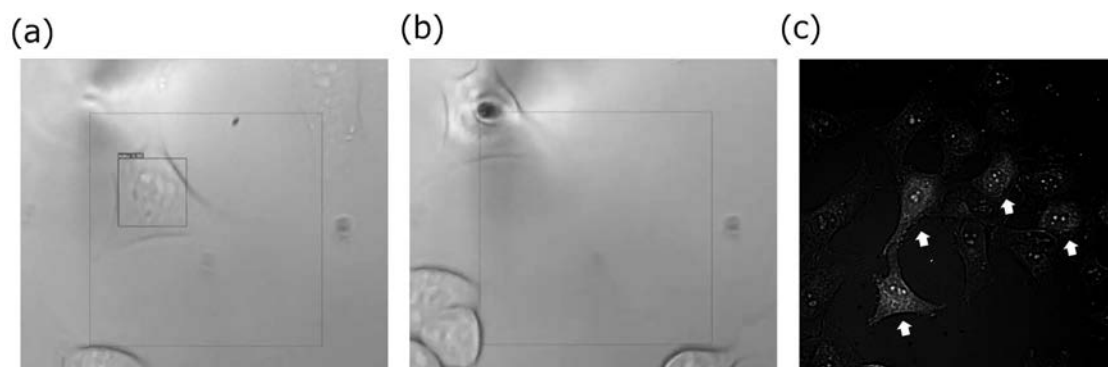


図6. 細胞中央部の検出と自動インジェクションの結果

(a) 細胞中央部の検出の様子。(b) インジェクションの様子。ピペットは検出範囲左上に配置されており、細胞検出後にピエゾステージが自動的に移動し、インジェクションが行われる。(c) インジェクション後の細胞の蛍光像。矢印の細胞にインジェクトを行っており、細胞内に注入されたフルオレセインの存在が確認できる。

3.5 オルガネラの自動識別と回収

これまでガラスピペットによるオルガネラの回収では、スループットが課題とされてきた。そこで、機械学習によるオルガネラの自動検出とオルガネラ回収技術を融合させ、スループットの向上を試みた。オルガネラの回収では、ピペット先端開口のサイズを回収対象のオルガネラより若干大きく作ることが必要であり、ミトコンドリアの回収を行うため、ピペットの開口径を約2 μm となるように調整を行った。今回はMitoTracker™ Green FMで染色したミトコンドリアを回収対象として実験を行った。蛍光画像をもとに機械学習を行い、ミトコンドリアを検出するモデルを作成した。図7に、ミトコンドリアの自動吸引前後の蛍光イメージを示す。吸引後、図中の黄色矢印で示した領域において蛍光シグナルが消失していることから、ミトコンドリアの吸引が成功したことが確認された。

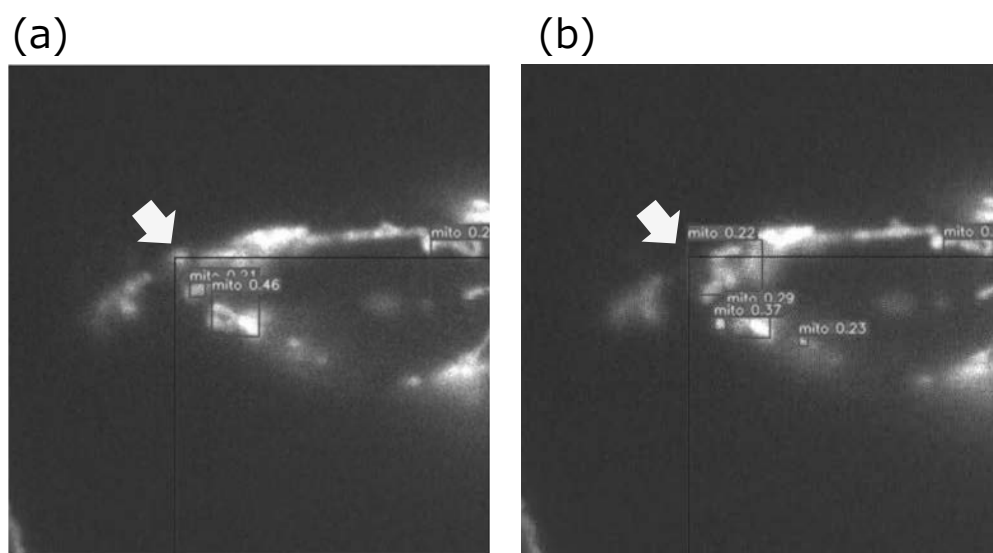


図7. (a) 吸引前, (b) 吸引後 のミトコンドリアの様子

参考文献

- (1) Takahashi, Y.; Sasaki, Y.; Yoshida, T.; Honda, K.; Zhou, Y. S.; Miyamoto, T.; Motoo, T.; Higashi, H.; Shevchuk, A.; Korchev, Y.; et al. Nanopipette Fabrication Guidelines for SICM Nanoscale Imaging. *Analytical Chemistry* **2023**. DOI: 10.1021/acs.analchem.3c01010.
- (2) Takahashi, Y.; Zhou, Y.; Miyamoto, T.; Higashi, H.; Nakamichi, N.; Takeda, Y.; Kato, Y.; Korchev, Y.; Fukuma, T. High-Speed SICM for the Visualization of Nanoscale Dynamic Structural Changes in Hippocampal Neurons. *Analytical Chemistry* **2020**, *92* (2), 2159–2167. DOI: 10.1021/acs.analchem.9b04775.
- (3) Ida, H.; Takahashi, Y.; Kumatani, A.; Shiku, H.; Matsue, T. High Speed Scanning Ion Conductance Microscopy for Quantitative Analysis of Nanoscale Dynamics of Microvilli. *Analytical Chemistry* **2017**, *89* (11), 6016–6021. DOI: 10.1021/acs.analchem.7b00584.
- (4) Ida, H.; Yoshida, T.; Kumatani, A.; Hanayama, R.; Takahashi, Y. Direct Extraction and Evaluation of Intraluminal Vesicles Inside a Single Cell. *Nano Lett* **2025**, *25* (11), 4322–4329. DOI: 10.1021/acs.nanolett.4c06315.
- (5) Nashimoto, Y.; Takahashi, Y.; Zhou, Y. S.; Ito, H.; Ida, H.; Ino, K.; Matsue, T.; Shiku, H. Evaluation of mRNA Localization Using Double Barrel Scanning Ion Conductance Microscopy. *Acs Nano* **2016**, *10* (7), 6915–6922. DOI: 10.1021/acsnano.6b02753.