

Column 蛍光蛋白質を用いた従来の拡散係数測定法

10 $\mu\text{m}^2/\text{秒}$ 以上の速い動きの測定法としては、微小領域で少数の分子の出入りによってひき起こされる蛍光強度のゆらぎから自己相関関数を用いた解析を行なって分子の拡散係数を解析するFCS法がある¹⁴⁾。この方法では、自己相関関数を用いる性質上、まったく動かない分子がある場合にはそれを解析することは不可能であり、また、遅い動きを解析することも困難である。10 $\mu\text{m}^2/\text{秒}$ よりも遅い動きの測定に関しては、小さな領域の蛍光蛋白質をブリーチングさせたのちに、その領域に流入する蛍光分子によってひき起こされる蛍光強度の回復を測定・解析するFRAP法が用いられてきた^{15,16)}。この方法では、ブリーチング中(100ミリ秒程度)に起こる分子の拡散の影響で、速い拡散に関しては正しい拡散係数を求めることがむずかしい。したがって、FRAP法とFCS法は相補的に用いられている。1 $\mu\text{m}^2/\text{秒}$ よりも遅い拡散の解析については、蛍光蛋白質1分子の移動をイメージングで追跡するSMT(single molecule tracking, 1分子解析)法を用いることもできる。

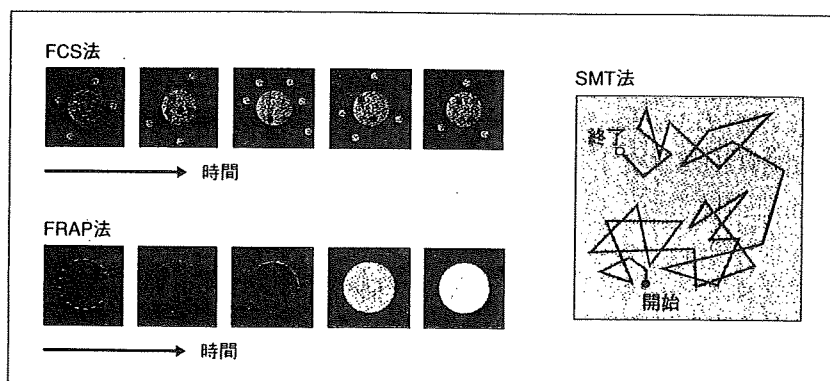


図 3 拡散係数測定法のイメージ

ならば、単純拡散をしている状態の移動速度と等しいと考えられるが、細胞内の動かない構造物やほかの自由な蛋白質との特異的あるいは非特異的な相互作用があると、単純拡散の速度から変化をうける。したがって、蛋白質の拡散を定量的に示す拡散係数を測定することにより、蛋白質のおかれている環境の変化をとらえることができる。また、シグナル伝達などにかかわる蛋白質の拡散係数の観測から、情報伝達速度の変化を議論することもできる。

先述したとおり、光変換蛋白質はイメージングのみならず、このような蛋白質拡散係数の定量的な解析にも用いることができる。従来法であるFRAP法を応用して、光変換蛍光蛋白質でも光刺激により増大した蛍光強度が拡散により減衰するさまをプロットした減衰曲線から、カーブフィッティングにより同様に拡散係数の解析を行なうことが可能である。さらに、光変換の過程はFRAP法のブリーチングに比べて小さなエネルギーで達成され、光変換の刺激光の照射はごく短時間で行なうことができるため、刺激中の拡散による影響が小さく、速い拡散にも適用できる可能性が考えられていた⁶⁾。しかし、これまでに行なわれてきた光変換蛍光蛋白質を用いた拡散係数解析では、厳密な定量的

FRAP法が適用されていたわけではなく、理論的な裏づけに乏しいものであったため、速い拡散に関してFCS (fluorescence correlation spectroscopy, 蛍光相関分光) 法の結果と比較できるような結果は得られていなかった (Column)。そこで筆者らは、光変換蛍光蛋白質を用いてFRAP法の理論式を応用して蛋白質拡散係数を求める方法、FDAP (fluorescent decay after photostimulation) 法を開発した。解析にはいくつかの特有の行程を必要とするが、その詳細は原著論文を参照されたい¹³⁾。

筆者らは、Phamret精製蛋白質の溶液中での拡散係数測定を、レーザー共焦点顕微鏡を用いて試みた。速い拡散に対応するため刺激光の照射時間を0.25ミリ秒と短くし、およそ4000 Hzの高速ラインスキニングで200ミリ秒間の観測を行なった。得られた減衰曲線を理論式にフィッティングして拡散係数を求めると、 $49.5 \pm 0.6 \mu\text{m}^2/\text{秒}$ と、Phamretと類似の立体構造をとっていると予想されるGFPタンデム2量体に関してFCS法により得られた値(50.4 $\mu\text{m}^2/\text{秒}$)とよく一致した(図3c)。さらに、HeLa生細胞内でPhamretに関して測定を行なったところ、やはりGFPタンデム2量体に関するFCS法での測定結果とよく一致した。一方、

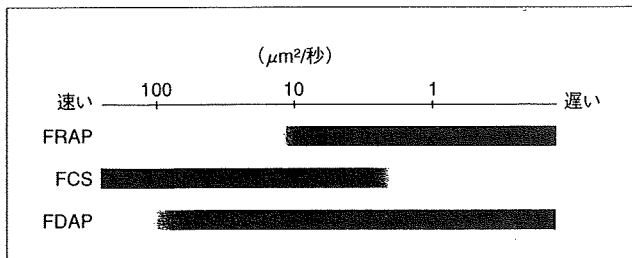


図4 FDAP法の測定可能な領域

FDAP法では、FRAP法の得意とする拡散係数 $10\mu\text{m}^2/\text{秒}$ 以下の遅い拡散から、FCS法の得意とする $10\mu\text{m}^2/\text{秒}$ 以上の速い拡散にいたるまで、幅広いレンジの拡散係数を測定することができる。

GFP単量体の拡散係数については、FRAP法で得た測定値はFCS法のそれと大きく異なっていることが知られていたが、分子量がほぼ同じPA-GFPのFDAP法で測定した拡散係数は、FCS法で測定したGFPのそれとよく一致していた(表2)。

以上の結果は、FDAP法がこれまでFCS法でなければ達成できなかった $50\mu\text{m}^2/\text{秒}$ をこえる分子拡散について、これと同じレベルの正確性で解析できることを示している。FDAP法は刺激光の照射を行なうことができれば専用の測定ユニットをつけることなく細胞観察に用いられている通常の共焦点顕微鏡システムで測定を行なうことができるため、より簡便に、FRAP法の世界領域からFCS法の世界領域までの幅広い測定領域をカバーできる汎用性の高い方法であるといえる(図4)。

おわりに

光変換蛍光蛋白質を用いたイメージングにより、細胞、オルガネラ、蛋白質のさまざまな時間スケールでのダイナミックな動きを、標識したパターンの変化として、直感的にわかりやすく説得力のある情報として得ることができる。また、拡散係数の定量的な解析から蛋白質の動きの微妙な差を議論することも可能である。この技術を、細胞や個体の形態形成、複雑に絡みあう神経細胞どうしの回路のしくみや、細胞内シグナル伝達などで起こる動きを解析するツールとして用いて、通常の蛍光蛋白質を用いた解析ではみ

表2 各測定法で求められた拡散係数の比較¹³⁾

蛍光蛋白質	測定法		
	FDAP法	FRAP法	FCS法
単量体	22.9 ± 3.7	34.0 ± 8.5	23.4 ± 2.5
タンデム2量体	14.1 ± 2.4	18.3 ± 6.4	16.4 ± 0.8

単位： $\mu\text{m}^2/\text{秒}$

えてこなかった隠された動きから新たな知見がもたらされることを期待したい。

文 献

- Giepmans, B. N., Adams, S. R., Ellisman, M. H., Tsien, R. Y.: *Science*, 312, 217-224 (2006)
- Lukyanov, K. A., Chudakov, D. M., Lukyanov, S., Verkhusha, V. V.: *Nature Rev. Mol. Cell Biol.*, 6, 885-891 (2005)
- Datta, S. R. et al.: *Nature*, 452, 473-477 (2008)
- Aizawa, H., Goto, M., Sato, T., Okamoto, H.: *Dev. Cell*, 12, 87-98 (2007)
- Lippincott-Schwartz, J., Altan-Bonnet, N., Patterson, G. H.: *Nature Cell Biol.*, Suppl, S7-14 (2003)
- Kimura, H.: *DNA Repair*, 4, 939-950 (2005)
- Betzig, E. et al.: *Science*, 313, 1642-1645 (2006)
- Hofmann, M., Eggeling, C., Jakobs, S., Hell, S. W.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 17565-17569 (2005)
- Patterson, G. H., Lippincott-Schwartz, J.: *Science*, 297, 1873-1877 (2002)
- Ando, R., Mizuno, H., Miyawaki, A.: *Science*, 306, 1370-1373 (2004)
- Flors, C. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 13970-13977 (2007)
- Dedecker, P. et al.: *J. Am. Chem. Soc.*, 129, 16132-16141 (2007)
- Matsuda, T., Miyawaki, A., Nagai, T.: *Nature Methods*, 5, 339-345 (2008)
- 金城政孝: 蛋白質 核酸 酵素, 44, 1431-1438 (1999)
- 木村 宏: 実験医学, 22, 1739-1745 (2004)
- 木村 宏: 実験医学, 22, 1851-1856 (2004)

松田知己

略歴：2003年 大阪大学大学院理学研究科化学専攻 修了，2004年 理化学研究所 リサーチアソシエイト，2005年 北海道大学電子科学研究所 非常勤研究員などを経て，2008年より同 助教。
研究テーマ：蛍光蛋白質プローブの開発。

光スイッチング蛍光タンパク質を用いた超解像観察法

永井健治

分光研究 第58巻 第1号 (2009年) 別刷

トピックス

光スイッチング蛍光タンパク質を用いた
超解像観察法

北海道大学電子科学研究所 永井健治

電子顕微鏡や原子間力顕微鏡でなければ不可能と考えられてきたナノメートルオーダーの空間観察が、光学顕微鏡と蛍光タンパク質を巧みに用いることで可能になりつつある。しかも固定試料ではなく、生きた細胞を用いてである。このような常識外れの技がどのようにして可能になるのか、その原理と応用例について紹介する。

蛍光タンパク質が2008年度のノーベル化学賞の受賞対象になったことは記憶にあたらしい。Shimomuraらによって1962年に発見され、Prasherが1992年に遺伝子クローニングを行い、Chalfieが1994年に異所性発現に成功し、そしてTsienによって実用的に明るいものや波長変異体が開発された¹⁾。今や生物学に留まらず、医学、薬学、農学などおよそ生物を扱う研究分野において至極当然のツールとなっている。近年ではPA-GFPやKaede、Dronpa等々の刺激光を照射することで蛍光特性が変化する光スイッチング蛍光タンパク質も開発され(図1)²⁾、細胞内の任意の領域にのみ存在するタンパク質を例えば緑から赤に色を変えて、その動きを追跡することなどが頻繁に行われるようになった。また、全反射顕微鏡と高感度カメラを併用すれば1分子の動きも可視化でき、多光子励起顕微鏡を利用すれば比較的厚い試料の奥深くに潜む細胞の

形態や、その中に存在するタンパク質も鮮明に捉えることができる。このように蛍光タンパク質と蛍光顕微鏡の組み合わせによって、十数年前は不可能であった観察が可能となり、多くの科学的発見へと結びついた。しかしながら、光学顕微鏡による観察を余儀なくされるため、タンパク質の位置や動きを検出はできても、そのものの形を可視化することは今もって不可能である。何故なら、光学顕微鏡のようにレンズを使用して物体を拡大結像するファーフィールド顕微鏡は“回折限界の壁”により、200 nm程度以下に接近した2点を分解することができないからである。ところがごく最近になってこの壁を破り、まさにタンパク質の大きさ程度の空間分解能に迫る観察が可能な“超解像顕微鏡観察法”が実用化され始めた。実はこの超解像観察に大きく貢献しているのが光スイッチング蛍光タンパク質である。

回折限界の壁を如何にして破ることができたかという、端的に言えば「蛍光分子の2つの状態間、例えば明状態と暗状態の遷移を空間的・時間的に制御すること」によってである。大まかに分類すると2種類の超解像顕微鏡観察法が開発されており、1つは“蛍光の励起に工夫”を凝らしたもので、もう一つは“蛍光の観察に工夫”を凝らしたものである。前者、後者の代表的なものがそれぞれSTED (stimulated emission depletion) とPALM (photoactivated localization microscopy) である³⁾。

STEDは試料面の蛍光分子が励起されうる範囲を極力小さくすることで空間分解能の向上を達成している。回折限界の壁によって、励起レーザーを200 nm以下のスポットに絞り込むことは出来ないが、Hellらは励起レーザーを取り囲むような、ドーナツ状のレーザーを照射することを考案した(図2A)。このドーナツ状の光(STEDビーム)は、誘導放出のための光であり、励起状態にある蛍光分子を強制的に基底状態へと戻す。使用する蛍光分子の発光スペクトルの最も長波長側の光をSTEDビームの波長に設定し、それより短波長側の光を観察する。これによって、見かけの発光領域がより局所に絞り込まれ、空間分解能が50 nm以下にまで向上した。この方法の利点はSTEDビームのためのレーザーが一本増えただけで原理的には通常の共焦点顕微鏡と変わらないことである。しかしながら、誘導放出させるためにGW/cm²というとても高いパワー密度のSTEDビームを照射する必要がある。蛍光分子のみならず、試料そのものへの光損傷を回避することが不可能であった。そこでHellらは照射エネルギーを大幅に減少させることができるRESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transitions) という方法を考案した。RESOLFTは莫大なエネルギーを必要とする誘導放出の代わりに、少ない光エネルギーで蛍光のOn/Offを制御できる光スイッチング蛍光タンパク質を利用することがポイントで、実に1/10⁸に照射エネルギーを減

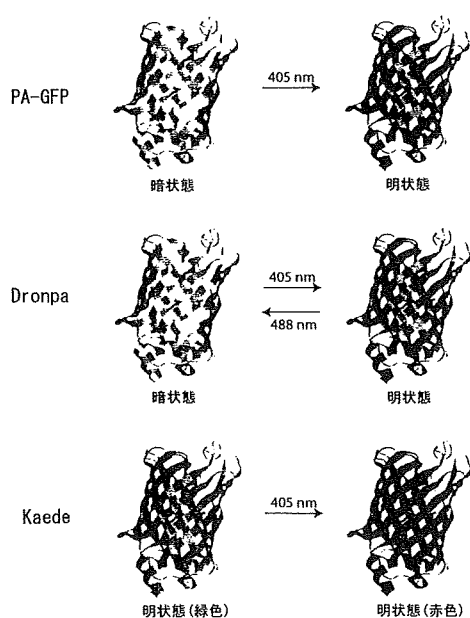


図1 光スイッチング蛍光タンパク質の特性。PA-GFPは不可逆的、Dronpaは可逆的に明暗状態間を変化する。Kaedeは不可逆的に蛍光色が変化する

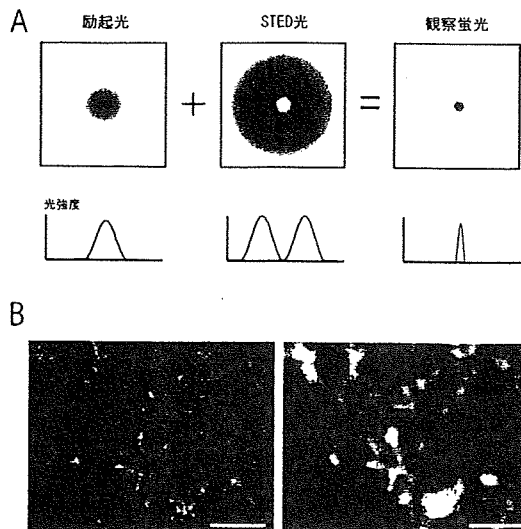


図2 STED法(A) STEDの原理。回折限界まで絞り込んだ励起レーザー光(紫)とドーナツ形に成形されたSTEDビーム(赤)が蛍光分子に照射されると、STEDビームが照射されている部分の蛍光分子は誘導放出によって強制的に基底状態へと遷移させられ、ドーナツの中心部分のみ蛍光が観察される(緑)。この領域は回折限界よりも小さく、数十nmの半値全幅をもつ鋭いピーク形状の蛍光スポットとなる。(B) STED法による黄色蛍光タンパク質Citrineで標識した小胞体の超解像観察。右パネルは同視野の共焦点顕微鏡観察像を示す。文献4cよりそれぞれPNASの許可を得て掲載。スケールバーは5 μ m(A)。

少させることに成功した。光スイッチング蛍光タンパク質としてはLukyanovらが開発したasFP595を利用し、黄色光と青色でそれぞれ蛍光のOnとOffを制御している。近年は生細胞観察が実現しただけでなく(図2B)、Dronpaを遺伝子工学的に改変することで特徴的な吸収特性やスイッチング特性を有するbsDronpaとPadronが開発されマルチカラー観察も行われ始めた⁴⁾。

一方のPALMは光スイッチング蛍光タンパク質を発現した試料を全反射顕微鏡で1分子観察することを基本とする。従って、撮像素子はEM-CCDなどの高感度カメラの使用が必須である。この方法ではまず刺激光の光量を調節して、回折限界の領域内に存在する光スイッチング蛍光タンパク質を1つだけ活性化する。もし2つ以上が活性化された場合は観察対象から外す。次に、輝点のシグナルを十分なS/N比が得られる程度の露光時間で取得し、最後に蛍光タンパク質を褪色させる。これら3つのステップを、試料中のすべての蛍光分子が褪色するまで繰り返す(図3A)。画像取得後は一つ一つの輝点の強度分布からその重心位置を計算する。このような計算によって輝度重心が1nm程度の“位置精度”で決定でき、幅が数百nmの輝度分布を数nmに変換することで、超解像が達成される。実際にはノイズ等の影響により、数nmの空間分解能は達成されていないが、それでも透過型電子顕微鏡

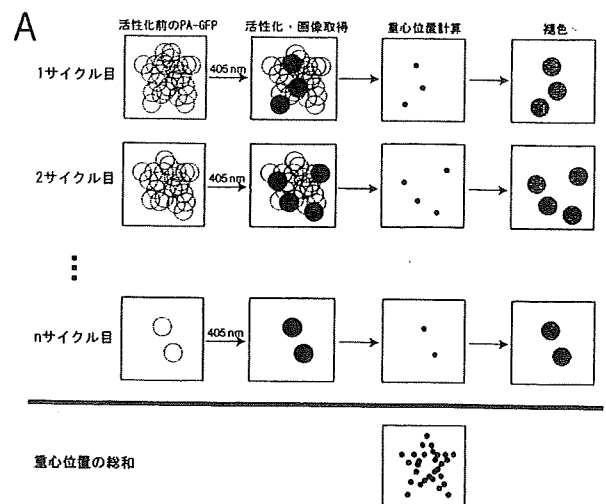


図3 PALM法(A) PALMの原理。PALMは光活性化→画像取得→重心位置計算→褪色の過程を1サイクルとして、視野中の蛍光分子が全て褪色されるまで繰り返す。得られた全ての輝度重心輝点を重ね合わせることで最終画像を得る。(B) PALMによるdEosFPで標識したミトコンドリアの超解像観察。右パネルは同視野の全反射顕微鏡像を示す。文献5aよりScienceの許可を得て掲載。スケールバーは1 μ m。

像に肉迫する、10nm程度の空間分解能が得られている(図3B)⁵⁾。開発当初は2~12時間かかっていた画像取得が、最近では25~60秒に短縮され、生細胞における細胞接着複合体の観察に成功している。しかしながら、ビデオレート観察からはほど遠く、依然として動きの速い現象を観察するのは難しい。時間分解能を向上させるためには単位時間・単位面積当たりを取得可能な光子数をさらに増やす必要があり、その為にはより明るい光スイッチングタンパク質の開発が待たれる。Manleyらに依れば、現時点でPALMに最適な光スイッチング蛍光タンパク質はEosFPとのことで、この蛍光タンパク質を改良することで、高い時間分解PALMが可能になるかも知れない。

現在も超解像観察に関する技術開発は日進月歩の勢いで進められており、そう遠くない将来に生きた試料を10nm程度の空間分解能でビデオレート観察できるようになるかもしれない。顕微鏡開発と蛍光タンパク質開発のバランスが益々重要になるであろう。光学屋と生物屋のコラボレーションによってのみなし得るまさに境界領域科学である。今後のさらなる発展を多いに期待したい。

参考文献

- 1) R. Y. Tsien: *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 509 (1998).
- 2) K. A. Lukyanov, D. M. Chudakov, S. Lukyanov, and V. V. Verkhusha: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **6**, 885 (2005).
- 3) M. Fernandez-Suarez and A. Y. Ting: *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* **9**, 929 (2008).
- 4) a) S. W. Hell and J. Wichmann: *Opt. Lett.* **19**, 780 (1994), b) M. Hofmann, C. Eggeling, S. Jakobs, and S. W. Hell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 17565 (2005), c) B. Hein, K. I. Willig, and S. W. Hell: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **105**, 14271 (2008), d) M. Andresen, A. C. Stiel, J. Fölling, D. Wenzel, A. Schonle, A. Egner, C. Eggeling, S. W. Hell, and S. Jakobs: *Nature Biotechnol.* **26**, 1035 (2008).
- 5) a) E. Betzig et al: *Science* **313**, 1642 (2006), b) H. Shroff, C. G. Galbraith, J. A. Galbraith, and E. Betzig: *Nature Methods* **5**, 417 (2008).

Engineering a Novel Multifunctional Green Fluorescent Protein Tag for a Wide Variety of Protein Research

Takuya Kobayashi¹, Nobuhiro Morone², Taku Kashiya¹, Hideto Oyamada³, Nagomi Kurebayashi¹, Takashi Murayama^{1*}

¹ Department of Pharmacology, Juntendo University School of Medicine, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan, ² Department of Ultrastructural Research, National Institute of Neuroscience, National Center of Neurology and Psychiatry, Kodaira, Tokyo, Japan, ³ Department of Pharmacology, School of Medicine, Showa University, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan

Abstract

Background: Genetically encoded tag is a powerful tool for protein research. Various kinds of tags have been developed: fluorescent proteins for live-cell imaging, affinity tags for protein isolation, and epitope tags for immunological detections. One of the major problems concerning the protein tagging is that many constructs with different tags have to be made for different applications, which is time- and resource-consuming.

Methodology/Principal Findings: Here we report a novel multifunctional green fluorescent protein (mfGFP) tag which was engineered by inserting multiple peptide tags, i.e., octa-histidine (8×His), streptavidin-binding peptide (SBP), and c-Myc tag, in tandem into a loop of GFP. When fused to various proteins, mfGFP monitored their localization in living cells. Streptavidin agarose column chromatography with the SBP tag successfully isolated the protein complexes in a native form with a high purity. Tandem affinity purification (TAP) with 8×His and SBP tags in mfGFP further purified the protein complexes. mfGFP was clearly detected by c-Myc-specific antibody both in immunofluorescence and immuno-electron microscopy (EM). These findings indicate that mfGFP works well as a multifunctional tag in mammalian cells. The tag insertion was also successful in other fluorescent protein, mCherry.

Conclusions and Significance: The multifunctional fluorescent protein tag is a useful tool for a wide variety of protein research, and may have the advantage over other multiple tag systems in its higher expandability and compatibility with existing and future tag technologies.

Citation: Kobayashi T, Morone N, Kashiya T, Oyamada H, Kurebayashi N, et al. (2008) Engineering a Novel Multifunctional Green Fluorescent Protein Tag for a Wide Variety of Protein Research. PLoS ONE 3(12): e3822. doi:10.1371/journal.pone.0003822

Editor: Axel Imhof, University of Munich and Center of Integrated Protein Science, Germany

Received: July 14, 2008; **Accepted:** November 7, 2008; **Published:** December 2, 2008

Copyright: © 2008 Kobayashi et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported in part by grants from the Japan Science and Technology Agency (SENTAN), Grants-in-Aid for Scientific Research, Japan Society for Promotion of Science, and a Health Labor Sciences Research Grant (NANO-001).

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: takashim@juntendo.ac.jp

Introduction

Protein complexes mediate the majority of cellular processes. Information on localization, structure, and interaction of such protein complexes provides key insights into their functions. Genetically encoded protein tags are a useful tool for characterization of protein complexes. There are a variety of tags for localizing proteins in living cells. Among them, the most widely used are *Aequorea victoria* green fluorescent protein (GFP) and the related fluorescent proteins, which are easily fused to proteins of interest [1,2]. Because the N- and C-termini of GFP are closely located to each other, this protein can be inserted in the middle of the fusion partner, as well as fusion at its N- and C-termini [3]. This is great advantage in case that the protein has intolerant of tag fusion at both N- and C-termini.

Structural and interaction analysis of the protein complexes requires isolation of the complex. A variety of affinity tags have been developed, which strongly bind to a specified ligand [4,5]. The use of multiple tags, such as tandem affinity purification (TAP) strategy, has recently become popular for purification of the

protein complexes with a high purity [6]. Epitope tags, small peptides to which commercially available highly specific antibody bind, are used for a wide variety of immunological detections [7]. Epitope tags are also useful for affinity isolation of the protein complexes by immunoprecipitation.

In general, cellular localization and isolation of protein complexes are determined using fusion proteins with different tags; GFP-tagged protein for localization and affinity tagged-protein for structural and protein composition analysis. However, making of different constructs is time- and resource-consuming, especially in case of analyzing a large number of proteins, e.g., genome-wide analysis. In addition, it is better to correlate the two determinations using the same fusion protein. Development of a single tag with multifunction is therefore highly desirable.

GFP forms a rigid and stable 11-stranded β -barrel structures [1,2] (see Fig. 1A). It has been shown that GFP is tolerant to insertion of foreign peptides within certain loops between the β -strands [8] and thus can be a scaffold for short peptides [9,10]. In this study, we engineered "multifunctional GFP" (mfGFP), in which the multiple peptide tags (affinity tags and epitope tags) were

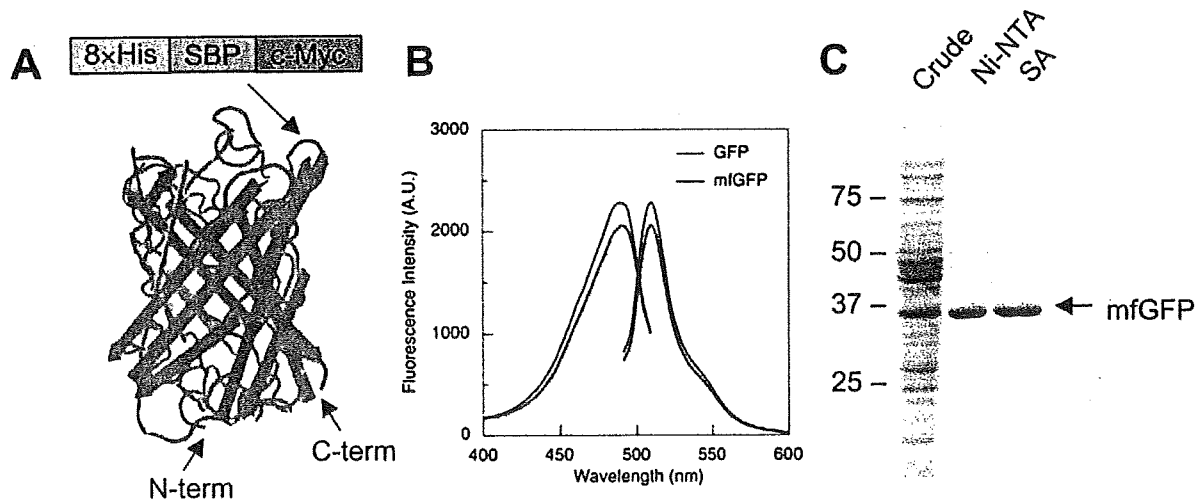


Figure 1. Design and characterization of multifunctional GFP (mfGFP). (A) Schematic representation of mfGFP. Octa-histidine (8×His), streptavidin-binding peptide (SBP), and c-Myc tag were inserted in tandem after Asp173 within a loop between the β -strands (blue) that is located on the opposite side of N- and C-termini. (B) Excitation and emission spectra of wild type GFP (with N-terminal His-tag) and mfGFP that were expressed in *E. coli* and purified by nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) beads. (C) Purification of mfGFP. mfGFP was purified by either Ni-NTA beads or streptavidin beads, processed on an SDS-polyacrylamide gel, and stained with CBB. doi:10.1371/journal.pone.0003822.g001

inserted in tandem into a loop of GFP. The mfGFP successfully monitored localization of the fusion protein in living cells, isolated the protein complex in native form with a high purity, and detected the protein in immunofluorescence and immuno-electron microscopy (EM). mfGFP is a useful tool for a wide variety of protein research including live-cell imaging, affinity isolation, and immunological detection.

Results and Discussion

The mfGFP was engineered by inserting three tags (a total of 67 residues including linkers) into GFP in tandem: octa-histidine (8×His) and streptavidin-binding peptide (SBP) for affinity isolation, and c-Myc for immunological detection (see Supplementary Figure S1). The Asp173-Gly174 was chosen as an insertion site, because it is located at the opposite side of N- and C-termini that would allow tags to work effectively by minimizing steric hindrance provided by the fusion partner (Fig. 1A).

We initially tested the properties of mfGFP which was expressed in bacterial system. MfGFP was expressed in *E. coli* as a soluble protein with bright green fluorescence. Excitation and emission spectra of the mfGFP were almost identical with those of wild type GFP with only a slight reduction of peak fluorescent intensity (Fig. 1B). Thus, insertion of the tags did not substantially affect the fluorescence properties of GFP. MfGFP was isolated as a single band in SDS-PAGE by nickel-nitrilotriacetic (Ni-NTA) acid and streptavidin (SA) chromatography (Fig. 1C). These findings indicate that 8×His and SBP work well in the loop of mfGFP.

Next, we tested the ability of mfGFP in mammalian cells. HeLa cells expressing mfGFP alone demonstrated a homogeneous fluorescence throughout the cells, being consistent with the distribution of wild type GFP (Fig. 2A). This suggests that mfGFP is not associated with any specific organelle or cellular structures. mfGFP was fused to several membrane proteins to evaluate its fusion properties: clathrin light chain A (CLCA), a 30 kDa component of clathrin coated pits [11] (Fig. 2B), calnexin, a 90 kDa endoplasmic reticulum (ER) chaperon protein [12] (Fig. 2C), and ryanodine receptor type 1 (RyR1), a large

homotetrameric Ca^{2+} release channel protein in the ER [13] (Fig. 2D). The mfGFP was fused at C-terminus for CLCA and calnexin or in the middle of the coding sequence for RyR1 [13]. All the fusion proteins demonstrated appropriate cellular localization, indicating that mfGFP can monitor localization of the fusion partner as is the case with wild type GFP.

The mfGFP-tagged protein complexes were isolated by SA column using SBP-tag (see Materials and Methods). SBP-tag is superior than His-tag in purity of the isolated proteins in higher organisms including mammalian cells [14]. The isolated CLCA fraction contained two polypeptide bands (~160 and ~60 kDa) which correspond to clathrin heavy chain (CHC) and CLCA-mfGFP, respectively (Fig. 2E). CLCA interacts with CHC to form "triskelion" which is an assemble unit of clathrin cage [11]. Negative staining EM of the isolated CLCA fraction exhibited characteristic three-armed pinwheel morphology of triskelion (Fig. 2F). Calnexin fraction exhibited a major 120 kDa polypeptide of calnexin-mfGFP (Fig. 2E). RyR1 was successfully isolated as a single high molecular weight band in SDS-PAGE (Fig. 2E). A quarterfoil appearance in negative staining EM (Fig. 2G) together with a specific [^3H]ryanodine binding (data not shown) confirmed that the isolated RyR1 forms functional Ca^{2+} release channel [13]. Thus, mfGFP can isolate protein complexes in a native form, at both terminal and internal fusion.

Tandem affinity purification (TAP) is a powerful strategy for protein interaction analysis, which isolates the protein complex with a high purity using two distinct affinity tags [6]. We tested 8×His tag and SBP-tag inserted into mfGFP as TAP tags using 74-kDa dynein intermediate chain (DIC). DIC interacts with ~500 kDa dynein heavy chain (DHC) to form the cytoplasmic dynein complex. mfGFP was fused to C-terminus of DIC. When expressed in HeLa cells, DIC-mfGFP exhibited as dots in the cytoplasm which move along with microtubules (Fig. 3A). SA column chromatography isolated two major bands; >250 kDa for DHC and ~110 kDa for DIC-mfGFP (Fig. 3B). Some contaminants were also detected in 50–75 kDa range. Ni-NTA chromatography with 8×His tag isolated the two bands but many

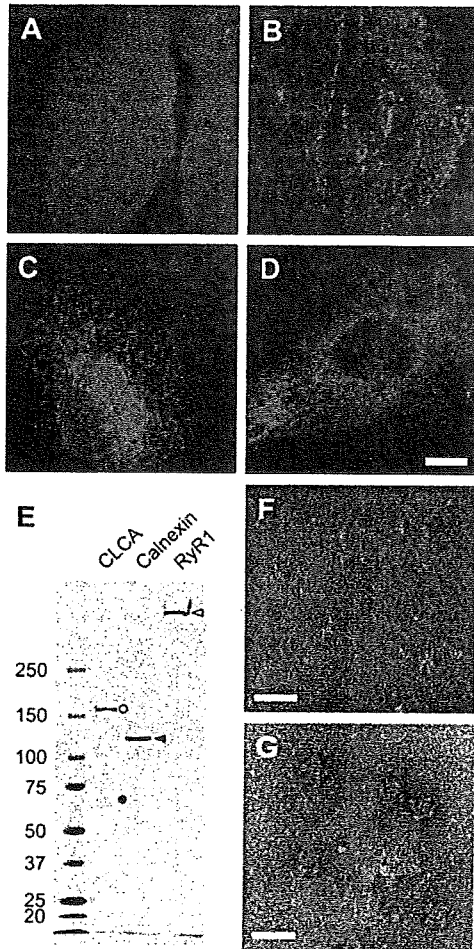


Figure 2. Localization of mfGFP fusion proteins in living cells and isolation of mfGFP-fusion protein complexes. (A–D) HeLa cells were transfected with expression vectors of either mfGFP alone (A) or mfGFP fused with clathrin light chain A (CLCA) (B), calnexin (C), and type 1 ryanodine receptor (RyR1) (D). Whereas mfGFP alone distributed throughout the cells, fusion proteins were localized at the expected site. Scale bars, 10 μ m. (E) mfGFP-fusion protein complexes were isolated by streptavidin column chromatography using SBP-tag. The isolated fractions were processed on an SDS-polyacrylamide gel, and stained with CBB. CLCA (black circle) co-purified clathrin heavy chain (CHC) (white circle). Calnexin and RyR1 were isolated as a single band. (F and G) Negative staining EM observation of isolated CLCA and RyR1 fractions. CLCA exhibited three-armed pinwheel morphology of triskelion (F), whereas RyR1 exhibited characteristic quarterfoil appearance (G). Scale bar, 50 nm.
doi:10.1371/journal.pone.0003822.g002

contaminants were also detected. This indicates that 8 \times His tag alone is insufficient to isolate the protein complexes from the mammalian cells. The SA chromatography of the eluted fraction from Ni-NTA, however, significantly reduced contaminants in 50–75 kDa range relative to the SA chromatography alone. These findings suggest that 8 \times His tag and SBP-tag work well as TAP tags. Several peptide affinity tags for TAP strategy have been proposed, which include calmodulin-binding peptide, StrepTagII, and FLAG tag [6,15]. These tags would also be good candidates for TAP strategy with mfGFP.

Properties of the epitope tag in immunological detections were tested with CLCA. GFP fluorescence of HeLa cells stably expressing CLCA-mfGFP distributed in a punctate pattern within the cell (Fig. 4A). AlexaFluor594 staining with c-Myc-specific antibody co-localized with GFP fluorescence (Fig. 4B). In frozen-replica immuno-EM [16], clathrin coated pits and vesicles were observed in the cytoplasmic surface of the plasma membrane together with caveolae and membrane cytoskeletons formed by actin filaments (Fig. 4C). c-Myc tag was detected by c-Myc-specific antibody and 10 nm colloidal gold-conjugated secondary antibody. Gold label was specifically detected on clathrin coated pits and vesicles (Fig. 4D,E), but not on caveolae or actin cytoskeletons (Fig. 4C,F). These findings demonstrated that c-Myc tag in mfGFP works well both in immunofluorescence and immuno-EM studies.

A pair of fluorescent proteins (e.g., CFP and YFP) is widely used for fluorescence resonance energy transfer (FRET), a strategy for interaction analysis of two proteins [17]. A detailed cellular localization by immuno-EM and direct interaction by FRET results. However, no antibodies are so far available, which can distinguish fluorescent proteins from the same origins (e.g., CFP, GFP, and YFP). Fluorescent proteins with different epitope tags can be easily distinguished by commercially available tag-specific antibodies. Insertion of epitope tags into fluorescent proteins is highly useful for immunological detections of multiple fluorescent proteins.

The fluorescent proteins so far discovered share typical 11-stranded β -barrel structures [1,2]. The tag insertion will be applicable to the other fluorescent proteins. We successfully inserted several tags into the corresponding loop of mCherry, a red fluorescent protein derived from the *Discosoma* sp. [18] (supplementary Figure S2). In addition, because the loop of GFP is enough tolerant to insertion of the large foreign peptides [8], the tags can also be varied depending on applications. Suitable combinations of fluorescent proteins and inserted tags will be adjusted for individual proteins and/or research applications.

Linking GFP and affinity tag in tandem is used as a simple approach for live-cell imaging and protein isolation [19]. When the tag is inserted into the coding sequence of the protein of interest, it would be expected that affinity tag sometimes does not work due to steric hindrance produced by GFP and the protein of interest that surround the affinity tag. In contrast, the affinity tag in mfGFP work well irrespective of the insertion site, because the affinity tag is located at the opposite side of N- and C-termini of GFP that are linked to the protein of interest (see Fig. 1A). Transposon-based random insertion of GFP is an interesting approach to study structure-function relationship of the relatively large protein [3]. mfGFP will also be useful for the strategy.

The engineered tag systems for both live-cell imaging and protein isolation have recently been available (HaloTag and SNAP-tag) [20,21]. These tags are derived from some enzymes and covalently attach the specific ligand to themselves. By choosing the ligand, they can be used for live-cell imaging (with fluorescent ligands) or protein isolation (with affinity ligands such as biotin). As compared with these tags, the main advantage of mfGFP is its high expandability and compatibility with existing and future tag technologies. Whereas HaloTag and SNAP-tag systems are limited by its ligand design, all the peptide tags are a potential candidate for mfGFP. In addition, easy-to-use format is of great advantage of mfGFP. GFP and the related fluorescent proteins are widely used in the world and the system works just by replacing the original GFP by mfGFP. Thus, mfGFP is superior to the other tag systems. mfGFP will be a powerful tool for a wide variety of protein research, especially in analyzing a number of target proteins, such as genome-wide analysis of unknown proteins.

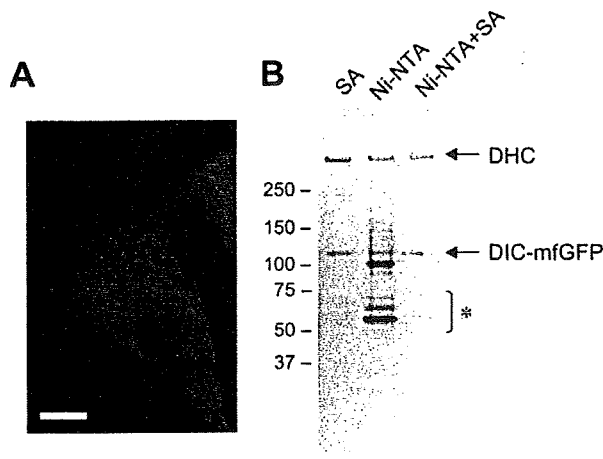


Figure 3. Tandem Affinity Purification (TAP) of cytoplasmic dynein complexes using His-tag and SBP-tag. mfGFP was fused to C-terminus of dynein intermediate chain (DIC). (A) Localization of DIC-mfGFP in living HeLa cells. Scale bar, 10 μm. (B) Isolation of cytoplasmic dynein complexes. Streptavidin (SA) column chromatography isolated DIC-mfGFP and dynein heavy chain (DHC) with some contaminating proteins in 50-75 kDa range (asterisk). Ni-NTA chromatography isolated the two proteins, but many contaminants were also seen. TAP strategy with Ni-NTA and SA (Ni-NTA + SA) isolated the two proteins with a significantly reduction of contaminants in 50-75 kDa range. doi:10.1371/journal.pone.0003822.g003

Materials and Methods

Construction of mfGFP and fusion proteins

The gene encoding the GFP was PCR amplified from pEGFP-N1 (Clontech) and subcloned into the pCold III vector (Takara). The DNA sequence encoding octa-histidine (8×His), streptavidin-binding peptide (SBP), and c-Myc tag were inserted after Asp173 by several steps of PCR. The DNA sequence of the product was confirmed by DNA sequencing.

cDNAs encoding CLCA, calnexin, and DIC were obtained from human embryonic kidney (HEK) cells by RT-PCR and ligated into the pcDNA5/FRT/TO expression vector (Invitrogen). cDNA encoding rabbit RyR1 was constructed as described elsewhere [22]. The mfGFP was fused either at the C-terminus (CLCA, calnexin, and DIC), or in the middle of the coding sequence (RyR1, after Ala1397). For generation of stable transfectants, cDNA fragments for fusion proteins were ligated into pIRESmyc2 vector (Clontech). A detailed procedure of construction (with sequences of PCR primers) and full amino acid sequence of mfGFP are shown in supporting information (Supplementary Methods S1 and Supplementary Figure S1).

Fluorescent measurements

Wild type GFP (with N-terminal hexa-histidine tag) and mfGFP were expressed in *E. coli*. The bacterial cell pellet was lysed by sonication and proteins were purified by Profinity IMAC Ni-charged resin (Bio-rad). The protein amount was measured using the Advanced protein assay reagent (Cytoskeleton Inc.) with bovine serum albumin as a standard. Fluorescence spectra of wild type GFP and mfGFP were measured in a Hitachi F-4500 fluorescence spectrophotometer in a buffer containing 150 mM NaCl and 20 mM sodium phosphate, pH 7.2.

Cell culture

HeLa cells were grown in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum, 2 mM glutamine, and antibiotics (penicillin/streptomycin). Transfection of the expression vector was carried out using Lipofectamine LTX reagent (Invitrogen). Stable transfectants were generated by selecting colonies resistant to hygromycin after transfection of pIRESmyc2 expression vector. For isolation of protein complexes, stable and inducible HEK cell lines were generated using Flp-In T-REx system according to the manufacturer's instructions.

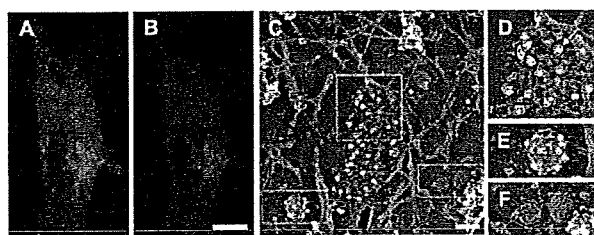


Figure 4. Immunofluorescence and immuno-EM of CLCA-mfGFP expressing cells with c-Myc-specific antibody. (A, B) Immunofluorescence microscopy. The cells were fixed and stained with c-Myc-specific antibody followed by AlexaFluor594 labeled rabbit IgG-specific secondary antibody. The AlexaFluor594 fluorescence (B) was overlapped with GFP fluorescence (A). Scale bar, 10 μm. (C-F) Frozen-replica immuno-EM using 10 nm colloidal gold. Boxed areas in (C) are shown at higher magnification (D-F). Gold particles (white dots, marked by an arrow) were detected on the clathrin coated pits (D) and vesicles (E), but not caveolae (F) or actin cytoskeleton (C). Scale bar, 100 nm. doi:10.1371/journal.pone.0003822.g004

Fluorescence microscopy

HeLa cells were grown on the collagen-coated coverslips. Fluorescence imaging was carried out with a confocal laser scanning microscope system (Yokogawa, CSU22) equipped with an Argon Krypton Ion Confocal Laser System (488 and 568 nm excitation). For immunofluorescent microscopy, anti-c-Myc antibody (Abcam, ab9106) and AlexaFluor594-labeled goat anti-rabbit IgG (Invitrogen, A11012) were used.

Isolation of mfGFP-tagged protein complexes

For CLCA, microsomes containing clathrin coated vesicles were prepared from HeLa cells stably expressing CLCA-mfGFP according to Prasad et al [23]. Clathrin triskelions were extracted with high ionic strength solution [23] and applied onto a HiTrap streptavidin column (GE Healthcare) that had been equilibrated with buffer A (0.5 M NaCl, 20 mM MOPS, pH 7.4, 0.3 M sucrose, and 2 mM dithiothreitol). The column was washed with the buffer and the bound protein was eluted by buffer A containing 2.5 mM d-desthiobiotin. For calnexin and RyR1, microsomes prepared from the HEK cells were solubilized with buffer A containing 1% CHAPS and 0.5% soybean phosphatidylcholine, and the HiTrap streptavidin column chromatography was carried out with buffer A containing 0.5% CHAPS.

Tandem affinity purification of dynein complex

HEK cells expressing DIC-mfGFP were homogenized with buffer B (0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% sucrose, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, and 0.1 mM dithiothreitol) containing 0.05% Triton X-100, and the supernatant after ultracentrifugation was incubated with Profinity IMAC Ni-charged resin in buffer B containing 20 mM imidazole. After washing with the buffer, the bound protein was eluted with buffer B containing 300 mM imidazole. The eluted fraction was then applied onto a HiTrap streptavidin column that had been equilibrated with buffer C (0.2 M NaCl, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10% sucrose, 5 mM MgCl₂, 0.1 mM ATP, and 0.5 mM dithiothreitol). After extensive washing, the bound protein was eluted with buffer C containing 2.5 mM d-desthiobiotin.

Negative staining EM

Negative staining of the clathrin triskelion and RyR1 was carried out according to the standard procedures using 2% uranyl acetate. The specimens were examined in a Hitachi H-7100 electron microscope operating at 75 kV.

Freeze-Etch EM of the Cytoplasmic Cell Surface

Rapid-freeze, deep-etch EM for the cytoplasmic surface of the plasma membrane was carried out according to previously described methods [16,24,25]. HeLa cells cultured on glass

coverslips were unroofed from the apical cell membrane and fixed. After being quenched and blocked, the cells were treated with anti-c-Myc antibody (Abcam, ab9106) followed by 10 nm gold-conjugated anti-rabbit IgG secondary antibody (GE Healthcare). Specimens were rapidly frozen to contact with the pure copper block cooled by liquid helium by using the rapid-freezing device (Polaron, USA) and the frozen cytoplasmic surface was deeply etched and rotary shadowed with platinum/carbon and carbon, using the freeze-etching device (Bal-Tec BAF060, Liechtenstein). The replica was observed by TEM (FEI Tecnai *Sphera* or *Sprit*, USA).

Supporting Information

Supplementary Methods S1

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003822.s001 (0.03 MB DOC)

Figure S1 Amino acid sequence of mfGFP. Peptide tags inserted between Asp173 and Gly174 (boxed) are shown in color: 8×His in light blue, streptavidin-binding peptide (SBP) in yellow, c-Myc tag in green, and linkers in grey.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003822.s002 (0.35 MB TIF)

Figure S2 Design and characterization of multifunctional mCherry. (A) Schematic representation of multifunctional mCherry. Octa-histidine tag (8×His) and hemagglutinin (HA) tag were inserted in tandem after Asp174 within a loop between the β-strands (yellow) that is located on the opposite side of N- and C-termini. (B) Live-cell imaging of clathrin light chain A (CLCA)-multifunctional mCherry. Scale bar, 10 μm. (C) Detection of HA tag in immunofluorescent microscopy. The cells were fixed and stained with anti-HA antibody followed by AlexaFluor488 labeled anti-mouse IgG secondary antibody. Left, mCherry fluorescence; Right, AlexaFluor488 fluorescence. Scale bar, 10 μm. (D) Detection of HA tag in frozen-replica immuno-electron microscopy using 10 nm colloidal gold. Gold particles (white dots) were detected on the clathrin coated pits and vesicles. Scale bar, 100 nm.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003822.s003 (1.92 MB TIF)

Acknowledgments

The authors thank Eisaku Katayama and Takashi Sakurai for valuable discussions, Taro Q. P. Uyeda and Yoshitaka Kimori for continuous encouragement, and Masako Hoshi for technical assistance.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: TM. Performed the experiments: TKobayashi NM TKashiyama HO NK TM. Wrote the paper: TM.

References

- Giepmans BN, Adams SR, Ellisman MH, Tsien RY (2006) The fluorescent toolbox for assessing protein location and function. *Science* 312: 217–224.
- Miyawaki A, Nagai T, Mizuno H (2005) Engineering fluorescent proteins. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 95: 1–15.
- Giraldez T, Hughes TE, Sigworth FJ (2005) Generation of functional fluorescent BK channels by random insertion of GFP variants. *J Gen Physiol* 126: 429–438.
- Arnaud J, Lauritzen C, Petersen GE, Pedersen J (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expr Purif* 48: 1–13.
- Terpe K (2003) Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol* 60: 523–533.
- Puig O, Caspary F, Rigaut G, Rutz B, Bouveret E, et al. (2001) The tandem affinity purification (TAP) method: a general procedure of protein complex purification. *Methods* 24: 218–229.
- Fritze CE, Anderson TR (2000) Epitope tagging: general method for tracking recombinant proteins. *Methods Enzymol* 327: 3–16.
- Abedi MR, Caponigro G, Kamb A (1998) Green fluorescent protein as a scaffold for intracellular presentation of peptides. *Nucleic Acids Res* 26: 623–630.
- Paramban RI, Bugos RC, Su WW (2004) Engineering green fluorescent protein as a dual functional tag. *Biotechnol Bioeng* 86: 687–697.
- Zhong JQ, Freyzo Y, Ehrlich DJ, Matsudaira P (2004) Enhanced detection sensitivity using a novel solid-phase incorporated affinity fluorescent protein biosensor. *Biomol Eng* 21: 67–72.
- Edeling MA, Smith C, Owen D (2006) Life of a clathrin coat: insights from clathrin and AP structures. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7: 32–44.
- Bedard K, Szabo E, Michalak M, Opas M (2005) Cellular functions of endoplasmic reticulum chaperones calreticulin, calnexin, and ERp57. *Int Rev Cytol* 245: 91–121.

13. Hamilton SL (2005) Ryanodine receptors. *Cell Calcium* 38: 253–260.
14. Keefe AD, Wilson DS, Scelig B, Szostak JW (2001) One-step purification of recombinant proteins using a nanomolar-affinity streptavidin-binding peptide, the SBP-Tag. *Protein Expr Purif* 23: 440–446.
15. Gloeckner CJ, Boldt K, Schumacher A, Roepman R, Ueffing M (2007) A novel tandem affinity purification strategy for the efficient isolation and characterization of native protein complexes. *Proteomics* 7: 4228–4234.
16. Morone N, Fujiwara T, Murase K, Kasai RS, Ike H, et al. (2006) Three-dimensional reconstruction of the membrane skeleton at the plasma membrane interface by electron tomography. *J Cell Biol* 174: 851–862.
17. Piston DW, Kremers GJ (2007) Fluorescent protein FRET: the good, the bad and the ugly. *Trends Biochem Sci* 32: 407–414.
18. Shaner NC, Campbell RE, Steinbach PA, Giepmans BN, Palmer AE, et al. (2004) Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nat Biotechnol* 22: 1567–1572.
19. Wu GF, Cha HJ, Rao G, Valdes JJ, Bentley WE (2000) A green fluorescent protein fusion strategy for monitoring the expression, cellular location, and separation of biologically active organophosphorus hydrolase. *Appl Microbiol Biotechnol* 54: 78–83.
20. Los GV, Wood K (2007) The HaloTag: a novel technology for cell imaging and protein analysis. *Methods Mol Biol* 356: 195–208.
21. Gautier A, Juillerat A, Heinis C, Correa IR Jr., Kindermann M, et al. (2008) An engineered protein tag for multiprotein labeling in living cells. *Chem Biol* 15: 128–136.
22. Tong J, Oyamada H, Demarex N, Grinstein S, McCarthy TV, et al. (1997) Caffeine and halothane sensitivity of intracellular Ca²⁺ release is altered by 15 calcium release channel (ryanodine receptor) mutations associated with malignant hyperthermia and/or central core disease. *J Biol Chem* 272: 26332–26339.
23. Prasad K, Barouch W, Martin BM, Greene LE, Eisenberg E (1995) Purification of a new clathrin assembly protein from bovine brain coated vesicles and its identification as myelin basic protein. *J Biol Chem* 270: 30551–30556.
24. Enomoto A, Murakami H, Asai N, Morone N, Watanabe T, et al. (2005) Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* 9: 389–402.
25. Heuser J (1989) Effects of cytoplasmic acidification on clathrin lattice morphology. *J Cell Biol* 108: 401–411.



Mathematical morphology に基づくバイオイメージからの 構造情報の抽出と解析

Extraction of Structural Features of Biological Images and Its Evaluation by Mathematical Morphology

木森 義隆^{a, b, c}, 諸根 信弘^b, 片山 栄作^c
Yoshitaka Kimori, Nobuhiro Morone and Eisaku Katayama

^a(財)医療機器センター

^b国立精神・神経センター神経研究所

^c東京大学医科学研究所

要旨 Mathematical morphology は、画像中の物体形状を操作し計測する理論的枠組みである。本稿では、バイオイメージに対し、mathematical morphology に基づく画像処理を適用することにより、その構造情報を抽出し、定量的に計測する手法について述べる。

キーワード: 画像処理, mathematical morphology, 電子顕微鏡

1. はじめに

光学または電子顕微鏡を用いて *in vitro* 条件、あるいは組織・細胞中における生体高分子の分布や構造を捉え、それらの機能や動態を探るバイオイメージング技術は、現代のライフサイエンスにとって必須の手段である。しかし、画像データの解釈には、観察者の主観が介在し、客観的とは言い難い面もある。これは、計算機による画像処理・認識技術に未整備な部分が多いことに起因する。観察者が像を解釈する場合、経験や知識に基づいて“かたち”を読み解くプロセスを経る。しかし、従来の画像処理手法ではそれを定量的に取り扱う手立てがなく、また、互いに関連性のない様々なフィルタを寄せ集めて実行することが多く、解析に対する論理性があいまいであった。

これを踏まえ、我々は、Mathematical morphology¹⁾(数理論形態学、以降モルフォロジ)に基づく非線形的な画像解析手法を開発し、画像の定量的、客観的な評価を目指して従来とは異なる観点から新たな試みを行った²⁾。

モルフォロジは、集合論を基盤に、様々な画像処理を一貫した理論体系のもとで表現し実行する数理体系である。物体の“丸い”、“線維状”などのかたちの表現形式を直接取り扱うことができるため、形態に対し一定の論理的根拠を備えた定量的な解釈が可能となる。これは、輝度分布に基づく画像

処理や、周波数選択型の処理にはないユニークな特性である。また、全ての演算は、Minkowsky 和と差という単純な2項演算を基本とするため、計算機での実装が容易である。バイオイメージングの分野においてモルフォロジはまだ公知ではないが、光学顕微鏡像³⁾、電子顕微鏡像²⁾さらにDNAマイクロアレイの画像⁴⁾などに対して適用した例がある。いずれも、対象物のセグメンテーションや特徴的な構造の抽出に用いられ、効果的な処理方法が実現されている。

本稿では、様々なバイオイメージから生物学的に有意な情報を発掘・整理して観察者に提示し、新たな知見につなげるための一連のワークフローを計算機上に構築するモルフォロジカル画像処理理論について概説する。

2. Minkowski 集合演算とモルフォロジの基本演算

モルフォロジは、1960年代の後半、鉱物の顕微鏡画像中に分布する鉱物の幾何学的特性と物理的特性の関連を解析するための手段として G. Matheron と J. Serra により考案された。理論の整備と計算機環境の発展に伴い、1980年代になって、テクスチャ解析や様々な画像処理に適用されるようになった。モルフォロジは、対象画像に構造要素と呼ばれる基底関数作用させる集合論的操作により、画像中の構造を単純な“かたち”の集合として処理できることに特徴がある。これを活かし、画像中の形状に関わる特徴抽出や識別に適した手法として用いられる。モルフォロジは一般に N 次元空間における集合論として展開されるが、本稿では、バイオイメージへの適用を鑑み、2次元モルフォロジ演算について説明する。

¹⁾ 〒113-0033 東京都文京区本郷3-42-6・NKDビル6F
TEL: 042-341-2712; FAX: 042-346-1749
E-mail: kimori@ncnp.go.jp
2008年11月17日受付

2.1. 2値のモルフォロジ演算

ここでは、まず、2値のモルフォロジについて説明する。2値画像は、黒い画素（値0）の背景中に、白い画素（値1）が集まってできた物体で構成されるものとする。この物体の存在領域が関心領域である。このとき、物体は「白い画素の集合」と捉えられる。個々の白い画素は集合の要素（元）であり、画像の原点からのベクトルとして表現されるので、物体の形状をベクトルの集合として捉えなおすことができる。本稿では、集合（画像）は、アルファベットの大文字で、要素は小文字で表す。

モルフォロジの演算は以下に示すMinkowski和と差が基本になり、それらの組み合わせで演算が構成される。Minkowski和とは、2つの集合 X, B があるとき、それぞれの集合の要素 x, b の全ての組み合わせからできる集合のことである。集合 X を b だけ平行移動して得られる集合を $(X)_b$ と書くと、Minkowski和はその和集合であり、以下のように定義できる。

$$X \oplus B = \bigcup_{b \in B} (X)_b \quad (1)$$

一方、Minkowski差は、集合 $(X)_b$ の積集合として以下のようにならされる。

$$X \ominus B = \bigcap_{b \in B} (X)_b \quad (2)$$

ここで、記号 \oplus, \ominus はそれぞれ、Minkowski和、差の演算子を意味する。

また、集合 B を原点を中心として180°回転させて得られる集合を、集合 B の対称集合と呼ぶ。ここでは、 B^s と表し、以下のように定義する。

$$B^s = \{-b : b \in B\} \quad (3)$$

集合 B をその対称集合 B^s で置き換えたときのMinkowski和と差をそれぞれ、dilation, erosionと呼ぶ。これらはモルフォロジの基本演算であり、dilationは、“ざらし重ね”、erosionは“掻き取り”と訳される。dilationは次のように定義される。

$$X \oplus B^s = \bigcup_{b \in B} (X)_{-b} \quad (4)$$

一方、erosionは次のように定義される。

$$X \ominus B^s = \bigcap_{b \in B} (X)_{-b} \quad (5)$$

これらの演算の適用例を図1に示す。2値画像を表す閉集合 X に、2次元の円盤状の閉集合 B （構造要素）を作用させる。この場合、 B は原点に対し対称であるため、dilationとerosionの結果は、それぞれ、Minkowski和と差の結果に等しくなる。 X に B をざらし重ねた結果、dilationは B の半径分だけ外側に膨張させる。一方、erosionは B の半径の大きさだけ X を掻き取り、その分だけ収縮させる。また、dilationとerosionを組み合わせた演算としてopeningとclosingがある。集合 X の構造要素 B によるopeningを X_B と表すと、以下のように定義できる。

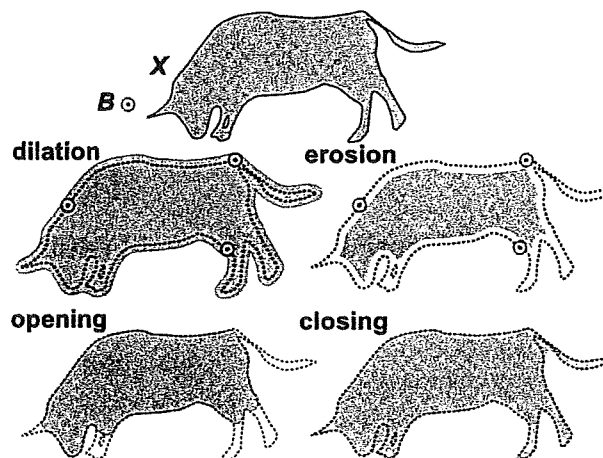


図1 原画像 X の構造要素 B による dilation, erosion, opening および closing 演算。点線は原画像の輪廓を、灰色の領域は演算後の画像を表す。

$$X_B = (X \oplus B^s) \oplus B \quad (6)$$

一方、closingを X^B とすると、

$$X^B = (X \oplus B) \ominus B \quad (7)$$

と定義される。これらは、dilationとerosionの演算順序が異なる。

図1に openingとclosingの例を示す。openingは境界を滑らかにし、円盤 B が入り込めないような地峡形状や尖った岬形状を除去する平滑化作用をもつ。一方closingは、 B が入り込めないような間隙や穴を埋め、一方で突起領域をそのまま残す作用をもつ。

2.2. 多値のモルフォロジ演算

多値（濃淡）画像は、画素の座標（画像の空間領域）を x, y の2つの次元で表し、画素値 $f(x, y)$ を次元 z で表す3次元Euclid空間上の集合と考える。多値画像に対するモルフォロジ演算は、陰影（Umbra）という概念を用いれば、2値画像の場合の演算と平行な議論が可能となる。陰影とは、 $z \leq f(x, y)$ を満たす領域であり、これは2値集合として表現することができるため、濃淡画像が2値の集合へ変換される。

関数 f の関数 g によるMinkowski和は、次のようになる。

$$(f \oplus g)(x) = \max_{x-z \in F, z \in G} \{f(x-z) + g(z)\} \quad (8)$$

ここで、 F, G はそれぞれ、関数 f, g の定義域である。Minkowski差は、次のようになる。

$$(f \ominus g)(x) = \min_{x-z \in F, z \in G} \{f(x-z) - g(z)\} \quad (9)$$

関数 $g(x)$ の原点に対する対称関数 $g^s(x)$ を定義すると以下のようになる。

$$g^s(x) = g(-x) \quad (10)$$

2値のモルフォロジ演算と同様、この対称関数を用いた

Minkowski 和と差をそれぞれ dilation と erosion と呼び、多値画像に対する opening, closing もこれらを用いて定義される。

$$\text{Opening: } f_g = (f \ominus g^s) \oplus g \quad (11)$$

$$\text{Closing: } f^g = (f \oplus g^s) \ominus g \quad (12)$$

3. Image rotation mathematical morphology に基づく新規フィルタ

生物試料の形態は微細かつ複雑な様相を呈し、画像取得の段階で不可逆的なノイズが重畳される。それを軽減し原画像に含まれる情報を有効に利用するためには、微細構造の特性を良好に保存しつつ、背景ノイズや、画素値の変調にロバストに対応できる画像処理法が望ましい。しかし、前章で示した通常のモルフォロジ演算では構造要素の作用方向が一定のため、対象画像中に含まれる様々な向きの構造物に対し、均質な処理が困難である²⁾。そのまま実施すれば、解析対象の変形、構造要素の形状に依存したアーチファクトなどが生じる場合がある。

そこで我々は、モルフォロジの特性を活かしつつバイオイメージに対応できる画像処理を目指して新たなモルフォロジ演算 (Image Rotation Mathematical Morphology (IRMM) 演算)^{2,5)}を開発した。これは対象画像をあらゆる方向に回転させて処理することにより、任意の方向を向いた構造の処理を可能にするものである。

いま、対象画像を f 、構造要素を g とする。 f をその中心座標を回転の中心として角度 $180 \cdot i/N$ 度 ($i = 0, 1, \dots, N-1$) ごとに回転させ、そのつど演算を行う。 N は 180 度を等分した数である。結果は、各角度ごとの処理画像 N 枚のセットを統合して出力する。

この opening および closing 演算は以下の最大 (max)、最小 (min) 演算として定義される。

$$\text{Opening: } h_0(x,y) = \max[h_0(x,y), h_1(x,y), \dots, h_{N-1}(x,y)] \quad (13)$$

$$\text{Closing: } h_c(x,y) = \min[h^0(x,y), h^1(x,y), \dots, h^{N-1}(x,y)] \quad (14)$$

ここで、 h_i は画像 f_i の g による opening, h^i は closing を意味する。

3.1. IRMM による平滑化フィルタ

画像処理において平滑化は重要な役割を担う。単に画像のノイズ除去の目的のみではなく、背景と対象物体の分割 (segmentation) や特徴パターン抽出の前処理として使われる。平滑化フィルタには、対象物の領域が十分に均質な濃度値で表現されるとともに、そのエッジや比較的小きな構造的な特徴を保存することが要求される。これまで、線形や非線形の様々な平滑化フィルタが提案されているが、この要求を満たすロバストな処理は困難であった。

Maragos らは、従来のフィルタでは実現できない、幾何学的な解析を行うことが大きな優位性をもつとして、モルフォ

ロジ演算を用いた平滑化フィルタを提案している⁶⁾。その具体例として opening と closing を組み合わせた、open-closing (OC) 演算、close-opening (CO) 演算があり、これらの演算をさらに線形結合した LOCO (Linear combination of OC and CO) フィルタ⁷⁾が知られる。しかし、これらのフィルタには、処理結果に前述した構造要素の形状由来のアーチファクトが生じる場合がある。それを改善するため、OC, CO 演算を式 (13, 14) で書き直し (それぞれ $h_c h_c, h_c h_o$ とする)、それらを線形結合した IRMM による新たな平滑化フィルタ (SF) を定義する。

$$SF = (h_c h_c)/2 + (h_c h_o)/2 \quad (15)$$

図 2 はノイズ除去を目的として、原画像 (図 2a) に対し、メディアンフィルタ、LOCO フィルタおよび SF による平滑化処理の結果を比較した例である。図 2b は、メディアンフィルタでの結果である。ウィンドウサイズは、 9×9 画素とした。ノイズの除去とともに、解析対象の輪郭がなまっている。図 2c は、LOCO フィルタでノイズを除去した結果である。やはり 9×9 画素の正方形構造要素を用いたが、この場合も輪郭形状が変形している。さらに、構造要素の形状が重畳されアーチファクトが生じた。対象物は、6 回の回転対称性をもつため、この輪郭形状を保持するには、それぞれの突起の方向に沿った平滑化処理が必要である。SF による処理では、 9×9 画素の正方形構造要素を用い、原画像を 22.5 度ずつ回転させ、そのつど平滑化処理したものを統合し出力した (図 2d)。その結果、ノイズは除去され、対象物の輪郭形状が保たれている。図 2c と比較すると、構造要素の処理方向の多方向性が結果の向上をもたらしている。

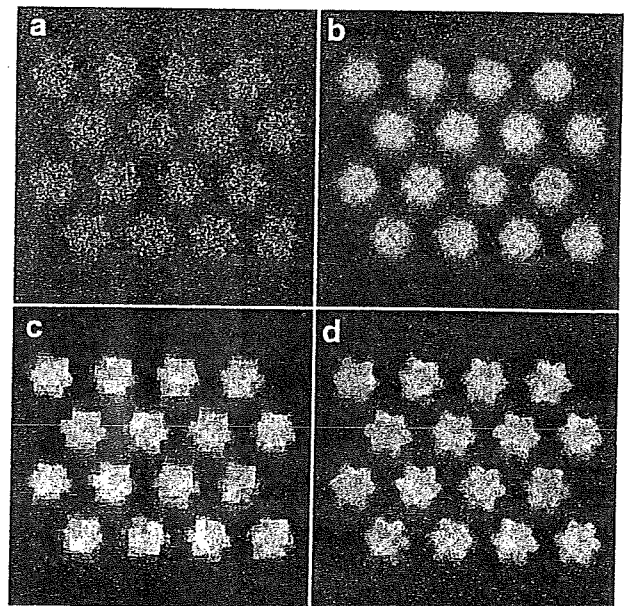


図 2 様々な平滑化処理の比較. (a) 原画像 (311×311 画素), (b) メディアンフィルタ, (c) LOCO フィルタ, (d) IRMM による平滑化フィルタ (SF) の結果.

3.2. IRMMによる特徴抽出フィルタ

さらに, top-hat 変換と呼ばれる演算も IRMM で定義した.

$$TH(f) = f - h_o \quad (16)$$

top-hat 変換は, 原画像から, それを opening した結果を差し引く演算である. opening (h_o) は, 一種の平滑化処理であり, 構造要素に比べて小さな凸部は削られる. これは, low-pass filter であり, この出力を元の画像から引き去れば high-pass filter (opening によって削られた部分が残る) となる. 構造要素のスケールを変化させるとその通過帯域が変化するという特性を活かし, 画像に含まれる特定の形状の抽出に用いられる.

図3は, 様々な大きさの構造要素で TH による処理を行った例である. 原画像 (図3a) は, 305×305 画素の画像であり, 画素値を高さとした複雑な地形を表現している. 図3bでは, 構造要素を 5×5 画素の正方形とすることにより, 5画素以下の幅をもつ凸状の領域を抽出した. 図3cでは, 25画素以下, 図3dでは, 45画素以下の幅をもつ凸状の領域を抽出した.

構造要素をパラメータとして TH を用いれば, このように原画像から特定の形状情報を選択的に抽出することが可能である. 実際の処理では, 顕微鏡などの分解能を考慮しながら抽出すべき領域の大きさを実測し, それに基づいて構造要素の大きさを決定する.

4. 光学顕微鏡で可視化された粒子の自動解析を可能にする画像処理

細胞内部に存在する分子に蛍光タグを融合して蛍光観察することにより, その局在や挙動を可視化できる. 蛍光1分子

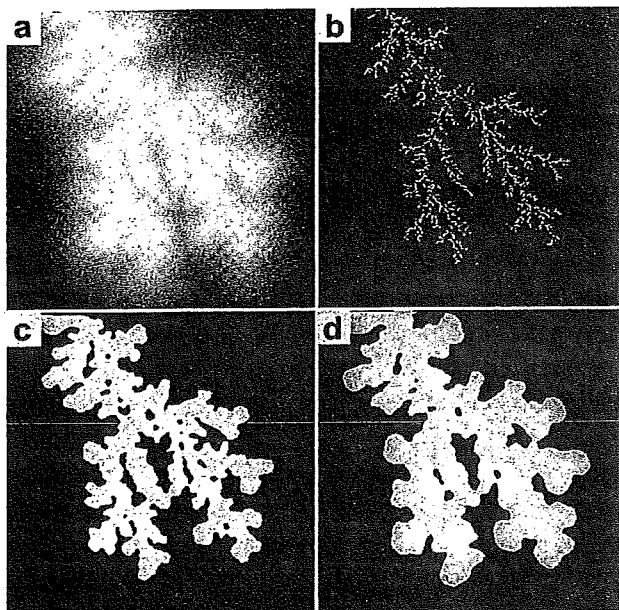


図3 IRMMによる特徴抽出フィルタ(TH)による構造抽出. (a) 原画像 (305×305 画素) から, 5画素以下 (b), 25画素以下 (c), 45画素以下 (d) の凸状の構造を抽出した.

でも孤立した輝点として観察できるが, その分子の位置の決定には個々の輝点の像を識別して抽出する必要がある. ここでは, 輝点の抽出過程を自動化するための手法を説明し, 抽出した輝点を既存の解析法に適用可能なかたちに変換する手法を述べる.

実際の画像に先立ち, モデル画像に本手法を適用した例を示す. 図4aは, 不均一な背景画像 (231×231 画素) 上に輝点のモデル像 (半径7画素のガウス分布) を配置したものである. 図中の点線は, 画素値のプロファイルを計測した位置であり, 以降の各処理による画素値の変化を図4eに示す. 図4bは, aにガウスノイズ ($\sigma=40$) を加えコントラストを低下させたものである. 原画像との S/N 比は, 12.36 [dB] であり, 画素値のプロファイルを見ても, 輝点と背景はほとんど区別がつかない. この画像に TH を用いた結果を図4cに示す. ただし, 抽出された領域を1, 他を0とする2値化を行っている. 構造要素は, 15×1 画素の線分を用いた. top-hat 変換では1階調でも差があればその領域を抽出できる. 抽出したそれぞれの輝点領域の重心位置を決定し, それを頂点に半径7画素のガウス分布を発生させて輝点を復元 (規格化) した (図4d). 頂点位置の誤差は, 画像劣化の影響により 0.88 ± 0.06 (平均値 \pm 標準偏差) 画素であった. 従来の輝点解析手法は, 輝点の点像分布関数 (point spread function) をガウス関数と仮定したテンプレートマッチングを基本とする手法が多い⁹⁾. 従って, この規格化および頂点位置の定量化は, 既存のシステムに適用する際に重要になる.

次に, これを踏まえ培養細胞中のカベオリンに蛍光抗体を付け, 光学顕微鏡で可視化した像を対象として処理した (図5). モデル画像と同様に輝点を抽出, 規格化した. 図5a, bの左側は, それぞれ別の細胞の原画像 (515×515 画素) を, そこから輝点を抽出した結果をその右側に示す. 輝点は, 非常に込み合っているため, 大きな幅を持つ構造要素では, 近接する複数の輝点をそれぞれ独立したものととして抽出できない. そこで, 構造要素は幅1画素の線状

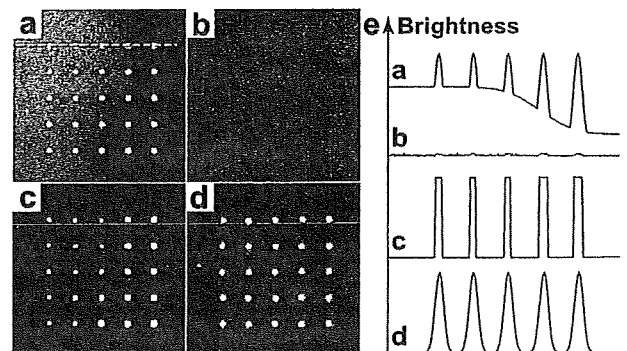


図4 輝点モデルの抽出. (a) 原画像 (231×231 画素). 画素値のプロファイルを測定した位置を点線で示す. (b) 劣化画像. (c) (b) に IRMM による特徴抽出フィルタ (TH) を施し, 輝点領域を抽出した後, 2値化した. (d) 輝点の復元 (規格化). (e) 各処理後の画素値プロファイル.

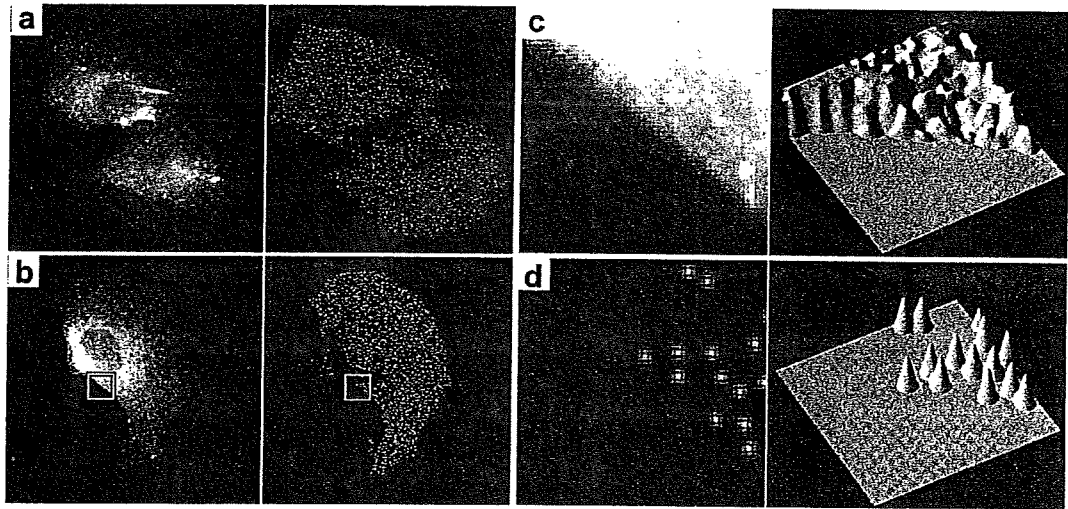


図5 光学顕微鏡画像中の輝点の抽出。(a)、(b)の左側は、カペオリンを可視化した蛍光顕微鏡像(原画像, 515×515画素)。それぞれ、右は抽出された輝点の像。(c)は、(b)の左図の矩形領域の拡大。(d)は、(b)の右図の矩形領域の拡大。それぞれの右側に、画素値を高さに変換した図を表す。

とした。実際には、あらかじめ輝点のサイズを実測し、7×1画素とした。これにより、直径が7画素以下の輝点を抽出でき、また近接している場合は、それらが1画素でも離れていれば、それぞれを独立したものとして抽出できる。最終的に輝点は、半径3画素のガウス分布として規格化した。図5bの矩形領域を拡大したものが図5c,dである。図5cが原画像、図5dが抽出された輝点の画像である。それぞれの右側に輝度を高さとして示す。背景の不均一な輝度分布の中から、輝点のみが抽出されていることがわかる。既存の輝点トラッキングシステムなどへの入力に図5dを用いれば、マッチング

のミスなどが低減することが期待でき、より効果的であると考えられる。

5. アクチン系系の解析：蛋白質複合体の電子顕微鏡画像への応用

筆者らは、精製された蛋白質の電子顕微鏡像の中から、対象蛋白質像をセグメンテーションし、あらかじめ作成された“像の見え方”のデータベース(対象蛋白質の結晶構造から構築された3Dモデルをあらゆる角度で2Dに投影した画像の辞書)とマッチングを行うという画像認識システムを構築

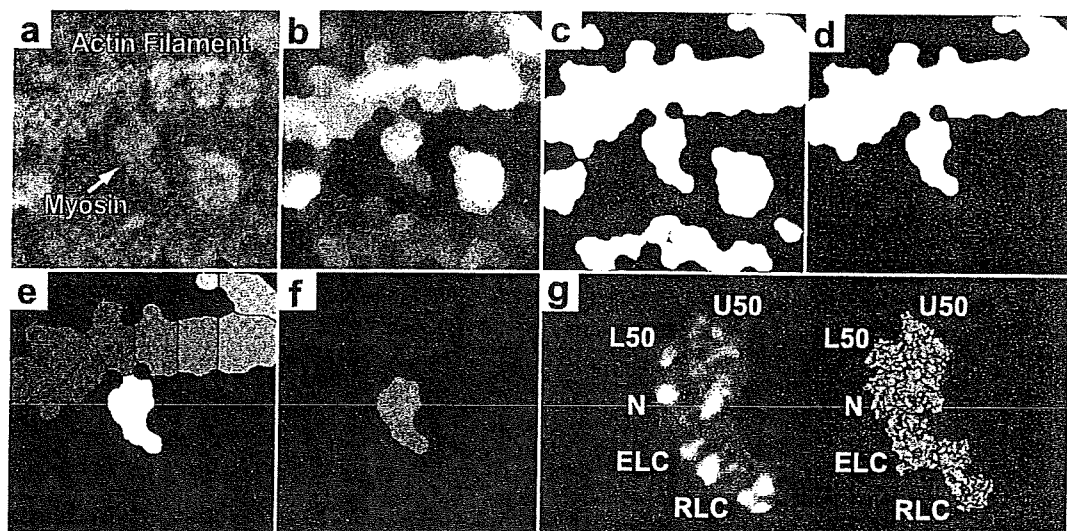


図6 蛋白質複合体への応用。(a)原画像。337×337画素。背景を含むアクチンとミオシンの複合体の電子顕微鏡像。(b)平滑化処理。(c)2値化処理。(d)複合体の領域の抽出。(e)複合体領域のセグメンテーション。(f)ミオシンの領域の抽出。(g)構造特徴(サブドメイン)を強調したミオシン像(左)と対応するモデル像(右)。主要なサブドメインを図中に示す。それぞれ、U50(L50), upper(lower) 50-kD subdomain, Nは、NH₂-terminal barrel, ELC(RLC)はessential light chain(regulatory light chain)。

した²⁾。ここでは、機能中の分子モーター蛋白質複合体（アクチン，ミオシン）を急速凍結ディープエッチレプリカ法で捉えた画像を対象に解析を行った例を示す。まず，原画像（図 6a, 337×337 画素）から，アクチンミオシンの複合体を抽出し，次に，複合体からのミオシン分子像のみをセグメンテーションする。このため，まず，原画像を平滑化処理し（図 6b, SF による。構造要素は直径 21 画素の円盤），その後，自動閾値処理⁹⁾により 2 値化した（図 6c）。

その後，最大の面積をもつ領域（すなわち複合体の領域）のみを残し，あとは削除した（図 6d）。その画像に Watershed 変換¹⁰⁾を施すことにより，複合体の領域を複数の断片にセグメンテーションした（図 6e）。各セグメントは，それぞれ異なる濃淡値で表している（ラベル処理）。この中から，ミオシンの領域を選択し，その部分をマスクとして，原画像からミオシン像を抽出した（図 6f）。この画像を，ミオシン分子のさまざまな状態の結晶構造と比較し，最もよく合致する 3D 構造とその投影角の推定を行う。ただ，今回解析したのはアクチンの滑り運動を起こしつつある反応中間体の一瞬の構造であり，その結晶構造は得られていない。そこで，既存の結晶構造をサブドメイン単位に分割し，それらの構成部品を，電子顕微鏡像にマッチングさせ，全体として 3 次元的に合致するモデルを再構築した（未発表データ）。モデル像との照合には，ミオシンのレプリカ像そのものは用いず，分子内サブドメインで構成される構造パターン抽出した特徴画像を用いた（図 6g 左側）。構造パターンは，レプリカ像の空間分解能を考慮し，1 辺が 2 nm の正方形を構造要素として TH によって抽出した。図 6g の右側は，最もよく合致する原子モデルの像である。原子モデル像との対応により，ミオシンのサブドメイン配置の同定まで可能となった。

構造パターンを抽出した TH は，4 章で輝点を抽出したフィルタと同じである。様々な大きさや形状の異なる抽出対象物でも，構造要素を変更することにより同じ手続きで抽出が可

能であることがわかる。これは，周波数選択型の線形フィルタでは実現困難な処理であり，また，このような汎用的特徴は，ロバストなフィルタリングアルゴリズムの創出を支えている。

6. おわりに

本稿では，モルフォロジーの基礎演算から，バイオイメージに適すよう拡張した IRMM 演算について説明した。そして，光学顕微鏡の輝点抽出，電子顕微鏡の蛋白質複合体に適用した例を示した。数学的基盤に裏打ちされた本画像処理理論では，フィルタの設計，処理結果の解釈などに対して客観的な議論が可能となる。解析対象のかたちを定量的に取り扱い，ノイズに埋もれた情報を顕に提示する本演算手法は，今後ますます必要になると思われる。

文 献

- 1) Serra, J.: *Image Analysis and Mathematical Morphology*, Academic Press, London, (1982)
- 2) Kimori, Y., Oguchi, Y., Ichise, N, *et al.*: *Ultramicroscopy*, 107, 25–39 (2007)
- 3) Beare, R.: *IEEE Trans. Pattern Analysis and Machine Intelligence*, 28, 1063–1074 (2006)
- 4) Angulo, J. and Serra, J.: *Bioinformatics*, 19, 553–562 (2003)
- 5) 「回転式モルフォロジーフィルタ及びそれを用いた画像処理法」出願番号：2006-280441
- 6) Maragos, P. and Schafer, R.W.: *IEEE Trans. Acoust. Speech Signal Process.*, 35, 1153–1184 (1987)
- 7) Schulze, M.A. and Pearce, J.A.: *Proc. of IEEE. Int. Conf. on Acoustics Speech and Signal Processing*, 1993, Vol. 5, p. 57
- 8) Cheezum, M.K., Walker, W.F. and Guilford, W.H.: *Biophys. J.*, 81, 2378–2388 (2001)
- 9) Otsu, N.: *IEEE Trans. Syst. Man Cybern.*, 9, 62–66 (1979)
- 10) Mayer, F. and Vachier, C.: *Math. Morphology, proc. 6th Int. Symp.*, 2002, p. 69

PART II

Electron Microscopy of Specific
Cellular Structure: The Cell
Membrane

CHAPTER 12

Three-Dimensional Molecular Architecture of the Plasma-Membrane-Associated Cytoskeleton as Reconstructed by Freeze-Etch Electron Tomography

**Nobuhiro Morone,^{*} Chieko Nakada,[†] Yasuhiro Umemura,[†]
Jiro Usukura,[‡] and Akihiro Kusumi[†]**

^{*}Department of Ultrastructural Research
National Institute of Neuroscience
National Center of Neurology and Psychiatry
Kodaira 187-8502, Japan.

[†]Membrane Mechanisms Project
International Cooperative Research Project (ICORP)
Japan Science and Technology Agency
Institute for Integrated Cell-Material Sciences and Institute for Frontier Medical Sciences
Kyoto University, Shougoin
Kyoto 606-8507, Japan.

[‡]Division of Integrated Projects
EcoTopia Science Institute
Nagoya University
Furo-cho, Chikusa,
Nagoya 464-8603, Japan.

I. Introduction

- A. General Introduction
- B. Introduction to Terminology: Membrane-Associated Part
of the Cytoskeleton (Membrane Skeleton[MSK])
- C. Introduction to the MSK: The MSK of the Human Erythrocyte Ghost