

令和 6 年 5 月 27 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K19253

研究課題名（和文）深層学習を用いたオルガネラ構造の超高効率的分析法の開発

研究課題名（英文）Development of an ultra-efficient analysis for organelle structures using deep learning

研究代表者

平林 祐介（Hirabayashi, Yusuke）

東京大学・大学院工学系研究科（工学部）・准教授

研究者番号：80447391

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）：本研究で我々は深層学習と人間による対話(Human-in-the-loop)型の画像解析プラットフォームPython-based human-in-the-loop workflow (PHILLOW)を開発し、ミトコンドリア内部立体構造クリステの詳細な可視化に成功した。そして、この手法を用い、優性遺伝性視神経萎縮症の発症と非常に高い関連が知られるOPA1タンパク質のクリステ形成制御における新たな役割を解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回開発したPHILLOWは、今後様々な深層学習を用いた画像解析に応用され、様々な研究を促進することが期待される。また、OPA1の機能の新たな理解は、優性遺伝性視神経萎縮症などの疾患におけるミトコンドリアの変異と病態の関連を探る上で重要な一歩となる。今後、本手法を用い、様々なオルガネラが関与した疾患について、原因究明の加速が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a novel, publicly available, deep learning (DL)-based image analysis platform called Python-based human-in-the-loop workflow (PHILLOW) implemented with a human-in-the-loop (HITL) algorithm. Analysis of dense, large, and isotropic volumes of Focused Ion Beam-Scanning Electron Microscopy (FIB-SEM) using PHILLOW reveals the complex 3D nanostructure of both inner and outer mitochondrial membranes and provides deep, quantitative, structural features of cristae in a large number of individual mitochondria. Unbiased clustering analysis using this newly developed algorithm unraveled a new function for the dynamin-related GTPase Optic Atrophy 1 (OPA1).

研究分野：細胞生物学

キーワード：深層学習 電子顕微鏡 オルガネラ

1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンス法や CRISPR-Cas9 法の開発により遺伝子情報解析やゲノム編集が超効率化し、疾患関連遺伝子が数多く同定されている。その結果、細胞内小器官の量や形態を調節する遺伝子が生体の恒常性維持に必要であり、それらの遺伝子の変異が病態を引き起こすことが示唆されてきた (Lee[#], Hirabayashi[#], et al., *Curr. Opin. Physiol.*, 2018)。しかし、細胞内小器官の形態解析に必須の電子顕微鏡解析は効率や一貫性が非常に低く、実際にそれら遺伝子の変異が細胞内小器官の異常を引き起こすかは未だ多くの場合明らかではなかった。

ミトコンドリアは外膜、内膜の二つの脂質二重膜からなる生体の恒常性維持に非常に重要な細胞内器官である。中でも内膜上で行われる酸化リン酸化は生体エネルギー産生に中心的役割を果たす。酸化リン酸化を限られた体積中で効率良く行う為に、内膜はクリステと呼ばれる微細構造をとりその表面積を広げる必要がある。従ってクリステ構造の詳細を定量的に解析することは極めて重要であるが、クリステ構造は非常に複雑であり電子顕微鏡の 2 次元画像の解析では、十分な情報を得ることは不可能であった。一方で、我々は最近 Focus Ion Beam (FIB) - Scanning Electron Microscopy (SEM)を用いた小胞体 ミトコンドリア接触の三次元再構築を世界に先駆けて行ない、この定量的かつ直感的な方法により当該分野に非常に大きなインパクトを与えた (Hirabayashi et al., *Science (Article)*, 2017)。従って、この手法をクリステ構造の解明に応用すれば構造の 3 次元的情報が得られるが、そのためには電子顕微鏡画像内のクリステ構造を手動でトレースしなくてはならない。しかし複雑なクリステ構造を手動によりトレースし、3 次元構造解析することは膨大な時間と労力がかかり現実的ではなかった。

2. 研究の目的

本研究では電子顕微鏡画像を用いた細胞内小器官の形態解析を超高効率かつ客観性の非常に高い解析へと変革するために深層学習 (Deep Learning) を用いた我々独自のアルゴリズムとプラットフォームを開発した。これにより、電子顕微鏡画像解析を自動化することで細胞の日常的な表現系解析に、オルガネラ間の接触やミトコンドリアのクリステ構造など細胞内微細構造の 3 次元的な定量的解析を加えることが可能になる。

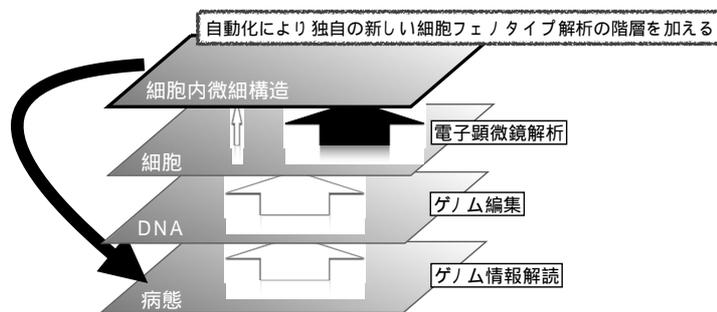


図 1 本研究の目的

近年ゲノムの解読と編集の高効率化により病態、DNA 情報、モデル細胞の確立、の連関が高速化した。細胞内微細構造の解析は非常に効率が悪く (白矢印)、本研究ではこの段階を超効率化し (黒矢印) 細胞内微細構造解析を新たな細胞解析の階層として確立する。

3. 研究の方法

本研究ではまず、クリステ構造の 3 次元再構築データを解析し、面積、体積等の算出を行った。そして、以下の 1)-4) にあける研究を行った。本研究においては細胞の遺伝子改変及び電子顕微鏡用サンプルの作成を平林、FIB-SEM による連続切片画像の取得を Humbel、連続切片画像の深層学習による解析を平林と河合が担当した。

- 1) 深層学習による推論の正確性の向上 (平林、Humbel、河合)
- 2) 大きな (数百 GB のデータ) を対象にした深層学習によるデータ処理 (平林、河合)
- 3) Lamellar および Tubular クリステの深層学習による分類および OPA1 変異細胞におけるクリステ構造の解析 (平林、河合)
- 4) in vivo の臓器におけるミトコンドリアとクリステ構造の解明 (平林、Humbel、河合)

4. 研究成果

通常の電子顕微鏡による観察ではせいぜい 100~200 ナノメートル程度の深さまでしかクリステ構造を観察することができない。また連続(断層)切片の3次元再構築により観察する手法を用いてもクリステ構造に対し切片間のステップサイズが大きすぎたり、切片の取得に多大な労力がかかったりと、クリステの全体像の把握は不可能であった。一方、FIB-SEM は安定的に 10 ナノメートル以下のステップサイズでの連続切片画像の取得を可能にし、この手法はクリステ構造の解析に非常に有用である。しかしながら、FIB-SEM 画像の3次元再構築において、電子顕微鏡画像から目的の構造を抽出する手作業が大きなボトル

ネックとなっていた。そこで、我々は、コンピュータにも認識しやすい強いコントラストを持つ膜構造の染色法の開発と、深層学習を用いることで、このボトルネックを克服することを試みた。まず、Python ライブラリ napari を用い、教師データ作成、深層学習、推論、推論の修正、を単一プラットフォームで行えるように、独自のプラットフォーム PHILLOW を開発し、ソースコードの公開により世界と共有した。そして、新たに開発した HITL-iterative 法(図2)と Three Axis Prediction (TAP) 法を導入することで(図3)、オルガネラのセグメンテーション効率を大きく改善することに成功した (Suga et al., PLOS Biology, 2023, <https://github.com/neurobiology-ut/PHILLOW>)。実際、ミトコンドリア内のクリステ構造の解析に、HITL-iterative-TAP 法を応用したところ、推論結果は人間によるセグメンテーションの精度を大きく上回っており、superhuman レベルに達していた。そこで、この方法を用いてマウス線維芽細胞株 NIH3T3 における 135 個のミトコンドリアと内部のクリステ構造を決定した。これはこれまでの研究によるミトコンドリア構造決定の数(数個程度)を大きく凌駕している。決定された構造を解析した結果、チューブ状 (Tubular) クリステの層状 (Lamellar) クリステに対する比がこれまで考えられていたよりも非常に大きいことなど、多くの新しい構造的特性を定量的に明らかにすることが出来た。さらにミトコンドリア内膜融合に働く GTPase Optic Atrophy 1 (OPA1) をノックダウンした NIH3T3 細胞の 324 個のミトコンドリアとクリステ構造を解析したところ、Tubular クリステの割合が顕著に減少していた(図4)。

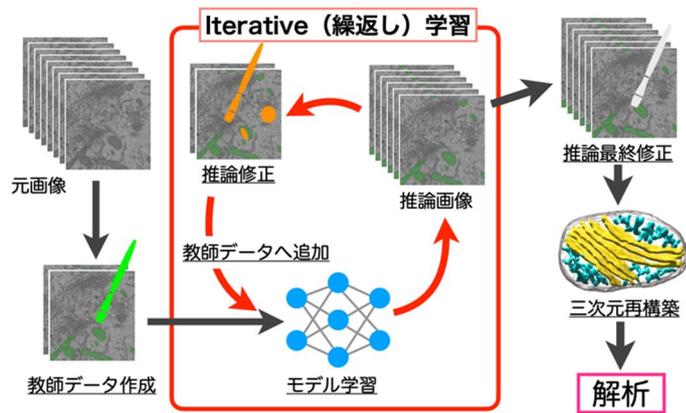
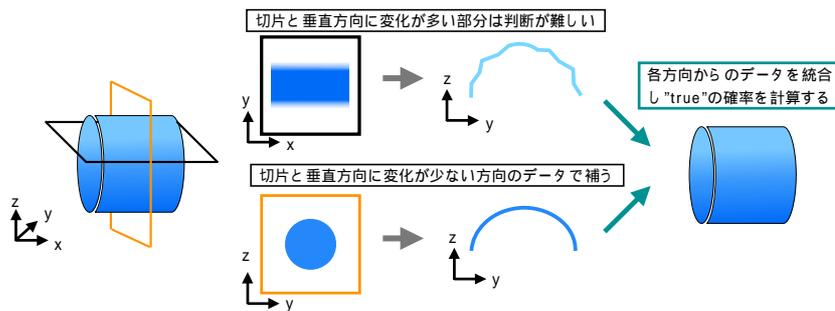


図2 HITL-iterative 法

我々の開発してきたプラットフォーム PHILLOW を用いることで、人間の介入する繰り返し学習を非常に効率良く深層学習に組み込むことに成功した。



3方向からの2次元の深層学習結果の組み合わせにより3次元的予測を行う

図3 TAP 法

これまでの xy 平面の画像のみを用いての構造予測では、垂直方向の予測の不正確性が顕著であった。TAP 法では、xy 平面の画像から作成した教師データを yz, zx 平面にも適用する。その結果、一つ一つの voxel に対し、3方向からの予測による結果が得られる。この3つの結果を統合し、各 voxel のセグメンテーションを行う。

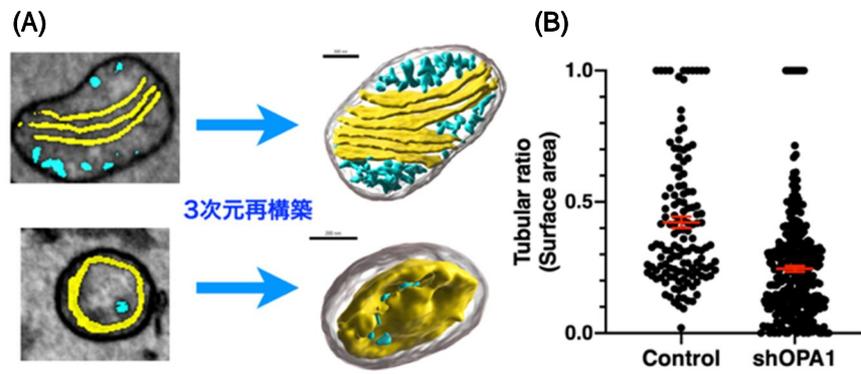


図4 深層学習を用いたクリステの構造決定と解析

(A) FIB-SEM 画像の深層学習を用いたセグメンテーション。上：コントロール、下：OPA1 KD。黄色：Lamellar クリステ、シアン：Tubular クリステ。(B) ミトコンドリアごとの Tubular クリステの割合。Mean \pm SEM。n = 135 (control), 324 (OPA1 KD)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Suga Shogo, Nakamura Koki, Nakanishi Yu, Humbel Bruno M., Kawai Hiroki, Hirabayashi Yusuke	4. 巻 21
2. 論文標題 An interactive deep learning-based approach reveals mitochondrial cristae topologies	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Biology	6. 最初と最後の頁 e3002246 ~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pbio.3002246	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 O'Hare Justin K., Gonzalez Kevin C., Herrlinger Stephanie A., Hirabayashi Yusuke, Hewitt Victoria L., Blockus Heike, Szoboszlai Miklos, Rolotti Sebi V., Geiller Tristan C., Negrean Adrian, Chelur Vikas, Polleux Franck, Losonczy Attila	4. 巻 375
2. 論文標題 Compartment-specific tuning of dendritic feature selectivity by intracellular Ca ²⁺ release.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 eabm1670
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.abm1670	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 該当する

1. 著者名 TSUBOI Masafumi, HIRABAYASHI Yusuke	4. 巻 97
2. 論文標題 New insights into the regulation of synaptic transmission and plasticity by the endoplasmic reticulum and its membrane contacts	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the Japan Academy, Series B	6. 最初と最後の頁 559 ~ 572
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2183/pjab.97.028	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 Aoyama-Ishiwatari Saeko, Hirabayashi Yusuke	4. 巻 9
2. 論文標題 Endoplasmic Reticulum?Mitochondria Contact Sites?Emerging Intracellular Signaling Hubs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Cell and Developmental Biology	6. 最初と最後の頁 653828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fcell.2021.653828	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30件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 10件）

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 ニューロンにおけるオルガネラ微細構造の制御と役割
3. 学会等名 第30回応用幹細胞医科学部門セミナー（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 哺乳類における小胞体-ミトコンドリア接触の制御機構
3. 学会等名 第15回 光塾
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 Axonal mitochondria of cortical pyramidal neurons lack mitochondrial DNA and consume ATP
3. 学会等名 The 38th International Kumamoto Medical Bioscience Symposium (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 哺乳類細胞におけるオルガネラ超微細構造とその制御機構の解明
3. 学会等名 Chemistry for Life science 研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 小胞体タンパク質PDZD8はミトコンドリア-小胞体接触形成のハブとして働く
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 Functions of Organelle Ultrastructure in neurons
3. 学会等名 第2回ニューロン研究会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 FKBP8 captures PDZD8 on the outer mitochondria surface to form ER-mitochondria contacts
3. 学会等名 Janelia Research Campus seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 光-電子相関顕微鏡技術を用いたオルガネラ微細構造制御機構と その生理的役割の解明
3. 学会等名 順天堂大学・日本電子株式会社合同形態学セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 FKBP8 captures PDZD8 on the outer mitochondria surface to form ER-mitochondria contacts
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 The PDZD8-FKBP8 protein complex tethers the ER and mitochondria
3. 学会等名 EMBO Workshop on inter-organelle contacts biology (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 光-電子相関顕微鏡技術を用いたオルガネラ微細構造制御機構とその生理的役割の解明
3. 学会等名 JEOL x NIKON 共催セミナー (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 深層学習を用いた連続電子顕微鏡画像解析によるオルガネラのクロススケール観察
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 An Interactive Deep Learning-based Approach Reveals Mitochondrial Cristae Topologies
3. 学会等名 Big Data-Driven Approaches with AI in Life Sciences (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 Functions of Organelle Ultrastructure in neurons
3. 学会等名 NeuroFrance 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 Molecular mechanisms for tethering the ER and mitochondria in mammalian cells
3. 学会等名 KSBMB International Conference 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平林 祐介, 菅 翔吾, 中西 優, 中村 航規, 柴山 光耀, Bruno Humbel, 河合 宏紀
2. 発表標題 連続電子顕微鏡画像のDeep-learningを用いた解析
3. 学会等名 日本解剖学会 総会・全国学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 哺乳類における小胞体 ミトコンドリア接触の構造解析
3. 学会等名 第128回日本解剖学会総会・全国学術集会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 連続電子顕微鏡観察によるによるオルガネラ構造イメージングと Deep-learning を用いた画像解析/Ultrastructural observation of organelles by serial electron microscopy and Deep- learning based image analysis
3. 学会等名 日本生理学会第100回記念大会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 哺乳類ニューロンにおけるオルガネラの多面的役割
3. 学会等名 名古屋大学環境医学研究所 合同カンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 大容量生物電顕画像からの深層学習を用いた情報抽出
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平林 祐介, 中西 優, 坂野 匠, 菅 翔吾, 河合 宏紀, ホンベル ブルーノ
2. 発表標題 連続切片電子顕微鏡画像解析の深層学習による解析/Analysis of serial electron microgram using deep learning
3. 学会等名 第95回生化学会大会のシンポジウム「AI・データ駆動生命科学研究の新潮流」(招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 "Functions of Organelle Ultrastructure in neurons"
3. 学会等名 INSTITUT NEUROMYOGENE Seminar (Lyon, France) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 "Functions of Organelle Ultrastructure in neurons"
3. 学会等名 Institut de Biologie de l'Ecole Normale Supérieure Seminar (Paris, France) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yusuke Hirabayashi
2. 発表標題 "A large fraction of axonal mitochondria lacks mitochondrial DNA"
3. 学会等名 EMBO Workshop "Molecular Biology of Mitochondrial Gene Maintenance and Expression" (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 河合宏紀
2. 発表標題 深層学習を用いた生物画像解析
3. 学会等名 第4回形態解析ワークショップ 2022
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 Human-in-the-loop繰り返し深層学習による電子顕微鏡画像解析
3. 学会等名 日本顕微鏡学会「生体ボリュームデータ解析研究部会 第6回研究会（招待講演）」
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 ニューロンにおける小胞体-ミトコンドリア接触の役割
3. 学会等名 第147回 Brain Clubセミナー（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 オルガネラの3次元超微細構造とその生理的役割の解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 An interactive deep learning-based approach reveals mitochondrial cristae topologies
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 平林祐介
2. 発表標題 An interactive deep learning-based approach reveals the organelle ultrastructure
3. 学会等名 EMBO EMBL Symposium, Seeing is Believing: Imaging the Molecular Processes of Life (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 廣川 信隆、板東 武彦、岡田 康志ら	4. 発行年 2022年
2. 出版社 アドスリー	5. 総ページ数 300
3. 書名 ブレインサイエンス・レビュー2022	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 アデノ随伴ウイルスベクターおよび付属器をもった皮膚組織を誘導する方法 Adeno-associated virus vectors and methods for generation of skin appendages	発明者 栗田昌和 加藤基 沈琪 平林祐介 菅 翔吾	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、63/415320	出願年 2022年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔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	河合 宏紀 (Kawai Hiroki) (20784391)	東京大学・大学院工学系研究科(工学部)・客員研究員 (12601)	
研究 分 担 者	HUMBEL Bruno (Humbel Bruno) (70810571)	沖縄科学技術大学院大学・イメージングセクション・マネージャー (38005)	

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