

令和元年6月3日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18562

研究課題名(和文)植物オルガネラの統合的フェノーム解析技術の研究

研究課題名(英文)Development of Integrated Analysis Technique for Plant Phenome

研究代表者

朽名 夏磨(Kutsuna, Natsumaro)

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・特任准教授

研究者番号：70578559

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)：植物細胞の持つ多種のオルガネラ・細胞骨格系について、顕微鏡画像からフェノーム解析を行う上で必要な画像解析手法の統合化を実現する実験系と画像処理ソフトウェアの開発に取り組んだ。また、顕微鏡画像から得られたオルガネラ・細胞骨格系のデータを規範として、細胞骨格系の動態をシミュレートするソフトウェアを開発した。材料には主としてタバコ培養細胞BY-2ならびにその形質転換体を用いた。また、国内の複数の研究機関と協力してオルガネラ・フェノーム研究で得られた顕微鏡画像を収集し分析に供した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の結果、光学的特性等が自ずと異なる複数の顕微鏡撮影系に対して、オルガネラ等を認識し個数や面積を測定する、といった細胞レベルのフェノーム解析を高精度高効率に実施するソフトウェアを開発することができた。その基礎を形づくる画像解析ソフトウェア群については国内企業によるユーザインタフェース等の改良等を受け、アップデートと提供を続けていけるような体制を整えている。

研究成果の概要(英文)：Plant cells have variety of organelle and cytoskeletal structures. To perform cellular level phenome analysis based on their microscopic images, integrated image processing software was developed in this research. Additionally, simulating software of cytoskeletal dynamics in plant cell was also developed. To collect imaging data, mainly tobacco culture cells BY-2 and transformant of BY-2 cells were observed, in addition to the microscopic images provided by other research institutions.

研究分野：生物画像解析

キーワード：植物細胞 オルガネラ 細胞骨格 顕微鏡画像 画像解析

1. 研究開始当初の背景

現在、遺伝子についてはゲノム、転写産物についてはトランスクリプトーム、タンパク質についてはプロテオーム、代謝産物についてはメタボロームといった階層で、生物種を超えた利用可能なデータフォーマットと解析手法が数多く提案されており、種内・種間・同一組織・組織間のデータマイニングが可能となっている。しかし、これら階層での遺伝子発現ネットワークや代謝ネットワークに関する解析を、個体の表現形態と結びつけるためには、細胞・組織レベルでも統合的フェノーム解析が必要である。しかし現在の所、顕微鏡の機種や生物種・観察部位の違いに阻まれている。つまり、生命科学研究者は細胞・組織レベルの解析を行うためには、その場しのぎに目視的・経手的な方法に頼るか、“インタラクティブ”ではあるものの研究従事者に高い負担をかける解析支援ソフトウェアの利用、といった工程を経ることになり、これが研究の進行全体のボトルネックとなっている。

2. 研究の目的

植物細胞のオルガネラを主に優先し、画像ベースのフェノーム解析の結果である 2~5 次元画像データ (例えば細胞の顕微鏡観察では 3 つの空間軸に加え、時間軸、さらに可視化手段による波長帯域の軸が加わると 5 次元画像データとなる) からオミクス研究を成立させるために必要不可欠な、顕微鏡の機種や生物種・観察部位に特化しない堅牢な形態形質指標を得る画像解析ソフトウェア群を開発します。また、多数の画像試料を同時に取り扱ったり、有用な情報すなわち生理学や薬理学や病理学…解析者の興味のある画像上の現象を抽出することを可能とする画像解析ソフトウェア群を開発する。

これまで実験条件ごとに、かつ定性的に語られていた細胞学的知見を、撮影条件に依らないフェノーム解析の実現により、再現性と定量性のあるオルガネラの表現形質の数値データ化に焦点を置く。これによってゲノム、トランスクリプトーム、プロテオーム、メタボローム等と同様にデータの意味ある集積(データベース化)が可能となり、バイオインフォマティクスのアプローチによる細胞学研究を開始する足掛かりを得る。

3. 研究の方法

蛍光ビーズを用いて本研究に用いる主要な各種撮像装置の光学的特性を点像分布関数 (Point-spread function) の形式で実測する。デスクトップ型明視野・蛍光顕微鏡、蛍光顕微鏡、共焦点レーザー顕微鏡など複数の撮像系を用いて、各種オルガネラ・細胞骨格などの細胞内構造の蛍光像を収集する。材料には主としてタバコ培養細胞 BY-2 ならびにその形質転換体を用いる。また、公開されているオルガネラ・フェノーム研究から得られた画像群についての収集を並行して実施する。さらに、国内の複数の研究機関に所在する研究協力者が撮像した細胞の蛍光像(細胞核、細胞膜、色素体)についても本研究への応用を打診する。ソフトウェア開発は問題定義~設計~実装~テストを本研究で実施する。研究協力者のニーズによってはソフトウェア開発における問題定義と運用を協働して行う。

4. 研究成果

細胞の蛍光像を被写体(オルガネラや細胞骨格)の画像上の蛍光パターンとして捉え、ドット状・粒状パターン、膜系パターン、内腔パターン、繊維パターンへのパターン分類を自動的に行う人工知能ソフトウェアの開発を行った。手法としては各画像をグレイスケールかつ 32 bit/pixel 幅という充分な量子化指数をもつ画像であるとみなし、当画像からテクスチャ特徴と輝度特徴および形状特徴を組み合わせた研究担当者独自に考案した特徴セットを取得、これを集団学習アルゴリズムの一つでハイパーパラメタ探索が不要かつ高速で精度の高いことが評価されつつある Random Forests 系の学習アルゴリズムの一つである、Extremely Randomized Trees 法を用いることで高いパフォーマンスを発揮できた。

細胞の蛍光像から得られた細胞内構造の時空間分布を学習データならびにバリデーションデータとして、細胞構造の動態をシミュレートする枠組みについて検討した。具体的には細胞内骨格系につき、観察の容易な BY-2 細胞を用い、高解像度高時間分解能低侵襲での経時的観察が可能な撮影系を動員し、細胞質分裂直後に特異的な細胞内構造の再配置過程を対象に観察ならびに数値実験を実施した。

BY-2 細胞以外に加えて、シロイヌナズナの子葉表皮に存在する孔辺細胞を対象として、細胞膜および葉緑体についても収集~解析対象に加えた。このうち葉緑体については突出したチューブ構造であるストロミュールについて、本研究で開発している画像処理ソフトウェア(図 1)の教師付き学習モデルに基づくパターン認識機能が自動的かつ効率的なフェノタイプピングに有効であることを確認できた。これによりストロミュールの出現頻度の推移や、出現を増減させる培養条件の探索を幅広い範囲で実施できた。また、細胞の蛍光像から得られた細胞内構造の時空間分布を学習用データならびに検証用データとして、表層微小管の動態をシミュレートするソフトウェアを開発し、細胞分裂後の表層微小管再形成過程について、顕微鏡下に観察される

実際のような再現できるか検討する数値実験を続行した。そのために、従来の細胞学的アプローチで活用されてきた細胞骨格系に関する定量的パラメタ(密度、平均長、配向角度の頻度分布など)を、計算機により模擬している仮想的な“細胞”からも測定するための実装を行った。また、実際の細胞と、仮想的な“細胞”との比較をフィードバックしてシミュレーション条件を再調整する手続きを追加した。これは、シミュレーションと実験を両輪として、効率的な科学的探究が可能になることを意味する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 15 件)

- ① Shimahara Y, [Kutsuna N](#), Hasezawa S, Kojo KH. Quantitative evaluation of stomule frequency at hourly intervals in Arabidopsis stomatal guard cell chloroplasts. *Cytologia*, 査読有, 84 巻, 2019, 31-35. DOI: 10.1508/cytologia.84.
- ② Shimahara Y, Sugawara K, Kojo KH, Kawai H, Yoshida Y, Hasezawa S, [Kutsuna N](#). IMACEL: A cloud-based bioimage analysis platform for morphological analysis and image classification. *PLOS ONE*, 査読有, 14 巻, 2019, e0212619 DOI: 10.1371/journal.pone.0212619
- ③ Abe T, [Kutsuna N](#), Kiyonari H, Furuta Y, Fujimori T, ROSA26 reporter mouse lines and image analyses reveal the distinct region-specific cell behaviors in the visceral endoderm. *Development*, 査読有, 145 巻, 2018, dev165852 DOI: 10.1242/dev.165852
- ④ Ishii Y, Maruyama S, Fujimura-Kamada, [Kutsuna N](#), Takahashi S, Kawata M, Minagawa J. Isolation of uracil auxotroph mutants of coral symbiont alga for symbiosis studies. *Scientific Reports*, 査読有, 8 巻, 2018, 3237 DOI: 10.1038/s41598-018-21499-3
- ⑤ Soga K, Yamazaki C, Kamada M, Tanigawa N, Kasahara H, Yano S, Kojo KH, [Kutsuna N](#), Kato T, Hashimoto T, Kotake T, Wakabayashi K, Hoson T. Modification of growth anisotropy and cortical microtubule dynamics in Arabidopsis hypocotyls grown under microgravity conditions in space. *Physiologia Plantarum*, 査読有, 162 巻, 2017, 135-144 DOI: 10.1111/ppl.12640
- ⑥ Akita K, Kobayashi M, Sato M, [Kutsuna N](#), Ueda T, Toyooka K, Nagata N, Hasezawa S, Higaki T. Cell wall accumulation of fluorescent proteins derived from a trans-Golgi cisternal membrane marker and paramural bodies in interdigitated Arabidopsis leaf epidermal cells. *Protoplasma*, 査読有, 254 巻, 2017, 367-377 DOI: 10.1007/s00709-016-0955-1
- ⑦ Higaki T, Takigawa-Imamura H, Akita K, [Kutsuna N](#), Kobayashi R, Hasezawa S, Miura T. Exogenous cellulase switches cell interdigitation to cell elongation in an RIC1-dependent manner in *Arabidopsis thaliana* cotyledon pavement cells. *Plant Cell Physiology*, 査読有, 58 巻, 2017, 106-119 DOI: 10.1093/pcp/pcw183
- ⑧ Iwayama K, Aisaka Y, [Kutsuna N](#), Nagano AJ. FIT: statistical modeling tool for transcriptome dynamics under fluctuating field conditions. *Bioinformatics*, 査読有, 33 巻, 2017, 1672-1680

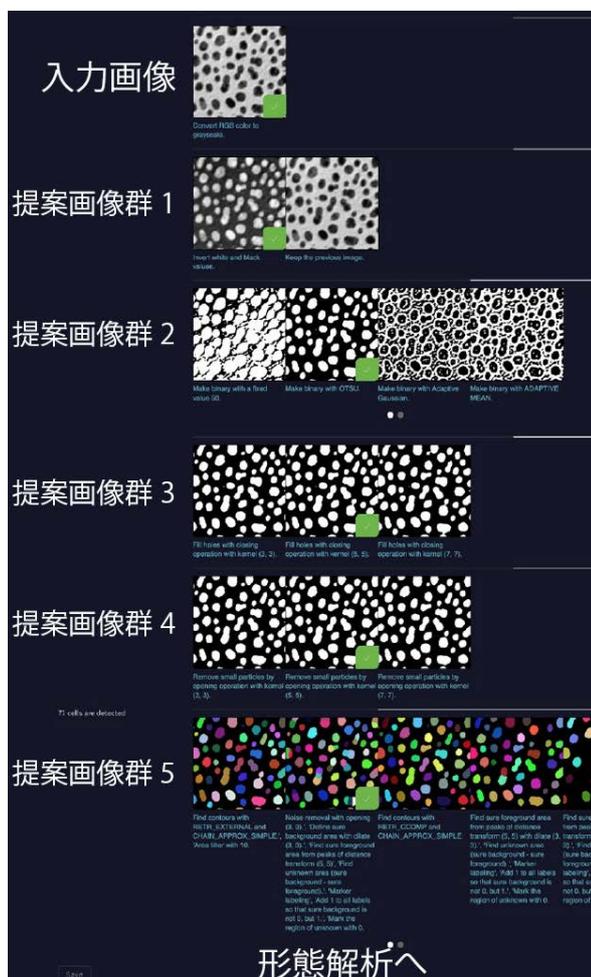


図 1 本研究の一環で開発された画像解析ソフトウェア IMACEL により入力画像から各種フィルタを多段に適用し、形態解析向きの画像データに変換する様子。

DOI: 10.1093/bioinformatics/btx049

- ⑨河野淳, 朽名夏麿, 尾上典之, 伴雄介, 佐藤明彦. ブドウ挿し木苗および幼苗へのブドウ黒とう病菌噴霧接種による抵抗性評価法の開発. 園芸学研究, 査読有, 16 巻, 2017, 391-400
DOI: 10.2503/hrj.16.391
- ⑩Jiang Y, Lei C, Yasumoto A, Kobayashi H, Aisaka Y, Ito T, Guo B, Nitta N, Kutsuna N, Ozeki Y, Nakagawa A, Yatomi Y, Goda K. Label-free detection of aggregated platelets in blood by machine-learning-aided optofluidic time-stretch microscopy. Lab on a Chip, 査読有, 17 巻, 2017, 2426-2434.
DOI: 10.1039/c7lc00396j
- ⑪Nagata K, Hashimoto C, Watanabe-Asaka T, Itoh K, Yasuda T, Ohta K, Oonishi H, Igarashi K, Suzuki M, Funayama T, Kobayashi Y, Nishimaki T, Katsumura T, Oota H, Ogawa M, Oga A, Ikemoto K, Itoh H, Kutsuna N, Oda S, Mitani H. In vivo 3D analysis of systemic effects after local heavy-ion beam irradiation in an animal model. Scientific Reports, 査読有, 6 巻, 2016, 28691
DOI: 10.1038/srep28691
- ⑫Inada N, Betsuyaku S, Shimada TL, Ebine K, Ito E, Kutsuna N, Hasezawa S, Takano Y, Fukuda H, Nakano A, Ueda T. Modulation of plant RAB GTPase-mediated membrane trafficking pathway at the interface between plants and obligate biotrophic pathogens. Plant Cell Physiol, 査読有, 57 巻, 2016, 1854-1864
DOI: 10.1093/pcp/pcw107
- ⑬Shimahara Y, Kutsuna N. Detection of image manipulation and plagiarism in life sciences research. Editorial Office News, 査読有, 9 巻, 2016, 1-12
DOI: 10.18243/eon/2016.9.4.5
- ⑭Higaki T, Kutsuna N, Akita K, Takigawa-Imamura H, Yoshimura K, Miura T. A theoretical model of jigsaw-puzzle pattern formation by plant leaf epidermal cells. PLOS Computational Biology, 査読有, 12 巻, 2016, e1004833
DOI: 10.1371/journal.pcbi.1004833
- ⑮31Nagashima T, Oami E, Kutsuna N, Ishiura S, Suo S. Dopamine regulates body size in *Caenorhabditis elegans*. Developmental Biology, 査読有, 412 巻, 2016, 128-138
DOI: 10.1016/j.ydbio.2016.02.021

[学会発表] (計 16 件)

- ①Matsumoto Sumihiro, Kutsuna Natsumaro, Nagata Shinji. Enteroendocrine peptides can regulate insect feeding behavior via controlling intestinal contraction. Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology Intercongress (国際学会), 2018 年 7 月 7 日
- ②Naoki Takata, Tatsuya Awano, Natsumaro Kutsuna, Toru Taniguchi. Feedback regulation in secondary cell wall thickening in poplar. 第 59 回日本植物生理学会年会, 2018 年 3 月 28~30 日, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- ③朽名夏麿, 島原佑基, 馳澤盛一郎. AIによる画像解析: 植物科学への応用. 日本農芸化学会 2018 年度大会 (招待講演), 2018 年 3 月 18 日, 名城大学天白キャンパス(愛知県名古屋市)
- ④島原佑基, 湖城恵, 馳澤盛一郎, 朽名夏麿. 生物画像自動分類を用いたシロイヌナズナ色素体におけるストロミユールの検出. 日本植物学会第 81 回大会. 2017 年 9 月 8~10 日, 東京理科大学野田キャンパス(千葉県野田市)
- ⑤曾我康一, 山崎千秋, 鎌田源司, 谷川直樹, 笠原春夫, 矢野幸子, 湖城恵, 朽名夏麿, 加藤壮英, 橋本隆, 小竹敬久, 若林和幸, 保尊隆享. 宇宙の微小重力環境におけるシロイヌナズナ胚軸の成長と表層微小管動態 - Aniso Tubule 宇宙実験. 日本植物学会第 81 回大会. 2017 年 9 月 8~10 日, 東京理科大学野田キャンパス(千葉県野田市)
- ⑥朽名夏麿. 人工知能による植物の効率的フェノタイプピング. 第 35 回日本植物細胞分子生物学会大会 (招待講演), 2017 年 8 月 31 日, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
- ⑦朽名夏麿. バイオメディカル画像の分類・評価のための人工知能によるアプローチ. 先進歯科画像研究会第一回学術講演 (招待講演), 2017 年 7 月 23 日, 日本大学松戸歯学部(千葉県松戸市)
- ⑧安本篤史, Yiyue Jiang, Cheng Lei, 相阪有理, 伊藤卓朗, Baoshan Guo, 小林博文, 新田尚, 朽名夏麿, 小関泰之, 中川敦寛, 合田圭介, 矢富裕. 非標識リアルタイムイメージング装置を用いた血小板凝集塊の検出法の確立. 第 39 回日本血栓止血学会学術集会, 2017 年 6 月 8~10 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)
- ⑨桧垣匠, 今村寿子, 秋田佳恵, 朽名夏麿, 三浦岳, 馳澤盛一郎. 子葉表皮細胞壁の湾曲における微小管結合タンパク質 RIC1 の役割: 細胞形態計測と力学モデルによる解析. 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月 16~18 日, 鹿児島大学郡元キャンパス(鹿児島県鹿児島市)
- ⑩朽名夏麿. 生物画像の自動評価工程をハイスループット化する能動学習技術 CARTA. 定量生

物理学の会 第8回年会(招待講演), 2017年1月8日, 岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

- ⑪阿部高也, 朽名夏麿, 清成寛, 古田泰秀, 藤森俊彦. 着床後マウス胚における細胞系譜解析. 第39回日本分子生物学会年会, 2016年12月1日, パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
- ⑫Abe T, Kutsuna N, Kiyonari H, Furuta Y, Fujimori T. マウス着床後初期胚における細胞系譜解析. 日本発生生物学会大会 秋季シンポジウム2016, 2016年10月19日, 三島市民文化会館(静岡県三島市)
- ⑬三浦岳, 桧垣匠, 朽名夏麿, 秋田佳恵, 今村(滝川)寿子, 吉村賢二. 植物表皮細胞の湾曲構造形成のメカニズム. 日本発生生物学会大会 秋季シンポジウム2016, 2016年10月19日, 三島市民文化会館(静岡県三島市)
- ⑭朽名夏麿, Radiomics 入門: 機械学習の基礎. 第44回 日本磁気共鳴医学会大会(招待講演), 2016年9月10日, 大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)
- ⑮Miura T, Higaki T, Akita K, Kutsuna N, Takigawa-Imamura H. Mechanism of jigsaw-puzzle pattern formation in plant leaf epidermal cell: modeling single cell shape by interface equation and convolution kernel. The 2016 (26th) annual meeting of the Japanese Society for Mathematical Biology (国際学会), 2016年9月7~9日, 九州大学伊都新キャンパス(福岡県福岡市)
- ⑯朽名夏麿, 生物・医用画像の自動評価のための能動的機械学習法 CARTA. 第20回 NMR マイクロイメージング研究会(招待講演), 2016年8月1日, 国立がん研究センター東病院(千葉県柏市)

[その他]

本研究で開発した画像解析ソフトウェア群の一部は以下で無償公開している。

https://dl.dropboxusercontent.com/s/pqmbdirbs19o1n/lpx_ij_plugins_.jar
(依存するライブラリを含まない)

https://dl.dropboxusercontent.com/s/2scxfuhaew857bw/lpx_ij_plugins_s.jar
(依存するライブラリ Scala, JAMA, Colt, JTransforms, LIBSVM を含む)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

以下は主な方々である。

研究協力者氏名: 馳澤 盛一郎
ローマ字氏名: Seiichiro Hasezawa

研究協力者氏名: 桧垣 匠
ローマ字氏名: Takumi Higaki

研究協力者氏名: 秋田 佳恵
ローマ字氏名: Kae Akita

研究協力者氏名: 湖城 恵
ローマ字氏名: Kei H Kojo

研究協力者氏名: 島原 佑基
ローマ字氏名: Yuki Shimahara

研究協力者氏名: 三浦 岳
ローマ字氏名: Takashi Miura

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。