

植物細胞における細胞周期自動分類法の開発

2013 年 3 月修了 先端生命科学専攻 47116370 吉田裕弥

指導教員 馳澤盛一郎 教授

キーワード：植物細胞、画像分類、細胞周期

【序論】

形態形成過程や環境応答過程における細胞周期進行の制御機構に関する研究が、高等植物を対象にして盛んに行われている。現在用いられている細胞周期判定のための方法としては、専門家の目視による細胞周期の判別と核内 DNA 量の計測や細胞周期の進行をモニターするプローブによるものが主流である。しかし、これらの方法は、主観や先入観によるバイアスが入りやすい、一度に処理できる細胞数に限りがある、機器が高価である、細胞周期の細かい時期の識別が不可能、生細胞の観察ができないといった問題があり、すべての問題を同時に解決した手法は存在しない。

本研究では植物細胞の細胞周期研究において重要な細胞周期判定の客観化、高速化および簡便化を目指し、タバコ BY-2 細胞を材料として、細胞周期の“自動分類器”の開発を試みた(図 1)。

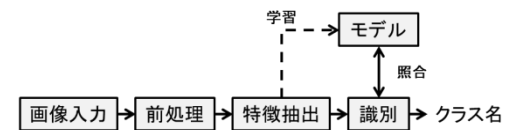


図 1 自動分類器作成の工程

コンピュータによる分類は、入力された細胞領域画像が事前に作成しておいた学習モデルとどれだけマッチングしているかを調べることによって行われる。

【結果と考察】

1. BY-GT 細胞の細胞周期進行に伴う細胞核および染色体と微小管の二重観察と画像取得

GFP-tubulin により微小管が可視化されたタバコ BY-2 細胞の形質転換株である BY-GT 細胞に対して、染色試薬 DAPI を用いて DNA を可視化した。これにより細胞核および染色体と微小管の二重観察が可能となった(図 2)。その結果、細胞周期を通して劇的に形態を変化させる細胞核・染色体と微小管に着目することにより観察画像が G1 期、S・G2 期、前期 (prophase)、前中期 (prometaphase)、中期 (metaphase)、後期 (anaphase)、終期 (telophase) の 7 クラスのいずれかであるのかを特定できるようになった。共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) を用いて、7 クラスの顕微鏡像を合計で 189 枚取得した。

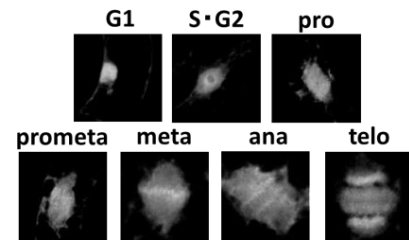


図 2 GFP-tubulin による微小管の可視化

および DAPI による細胞核・染色体の可視化

2. 分類アルゴリズムとしてランダムフォレスト法が適していた

複数の分類アルゴリズム (naive Bayes、SVM、Nearest Neighbor (NN)、CART、ランダムフォレスト) を使用し、分類精度の検証を行った (表 1)。その結果、複数の決定木を組み合わせる分類アルゴリズムであるランダムフォレスト法を用いた分類器で分類精度が最大となった。

画像枚数を増加させることにより分類精度の上昇が期待されるが、CLSM による画像取得は (1) 化学固定処理による撮影時間の限定、および (2) CLSM の撮影自体の操作時間の消費、という二点からスループットが悪かった。そこで操作が簡便で多量の画像取得に適したオールインワン型蛍光顕微鏡を本研究に用いることにした。また研究対象を細胞核および染色体が可視化された BY-HR 細胞とした。

classifier	naive Bayes	SVM	NN	CART	Random Forest
accuracy (%)	1.39	69.2	59.7	79.2	80.6

表 1 CLSM 画像を用いた場合の各分類器の分類精度

3. BY-HR 細胞の細胞周期進行に伴う細胞核および染色体の観察と画像取得

細胞周期を通して細胞核および染色体と微小管はいずれも劇的に形態を変化させるが、CLSM 画像での実験から微小管よりも細胞核および染色体から得られる情報が分類精度により強い寄与を示していた。そこで、DAPI 等の染色試薬を用いずに histone-RFP によって、生きた細胞のまま細胞核および染色体を撮影することができる BY-2 細胞の形質転換株である BY-HR 細胞を用いて観察を行った。

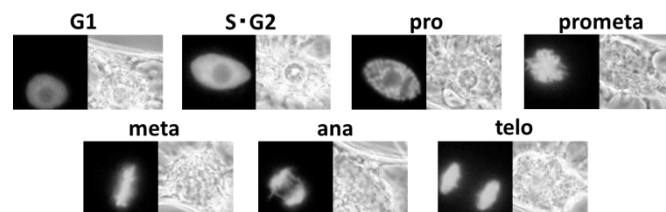


図3 histone-RFP による核・染色体の可視化

図左側：蛍光像、図右側：明視野像

蛍光顕微鏡を用いて、8,580 細胞についての蛍光像を取得した。画像中の細胞は、G1 期、S・G2 期、前期、前中期、中期、後期、終期の 7 クラスのいずれかに目視によって特定した (図 3)。

4. ランダムフォレスト法においてパラメタを E-G-f-100-q2 としたときが最適であった

ランダムフォレスト法でパラメタとして E-G-f-100-q2 を用いた場合、分類精度の高さおよび所要時間の短さの観点から最適であった (図 4)。パラメタ: E-G-f-100-q2 は、ランダムフォレスト法において、枝で用いる閾値の算出法: 「ランダム (E)」、枝における空間分割の決定に用いる指標: 「Gini 尺度 (G)」、ブートストラップによるサンプリング: 「なし (f)」、決定木の本数: 「100」、決定木の枝で考慮する次元数: 「特徴ベクトルの次元数の 50% (q2)」を表している。この場合の分類精度は最高 91.8% に達した。分類に利用した 296 種類の特徴の中でも、(1) 細胞核および染色体の輝度の標準偏差および (2) 画像中の粒子数、が分類に有効であった。

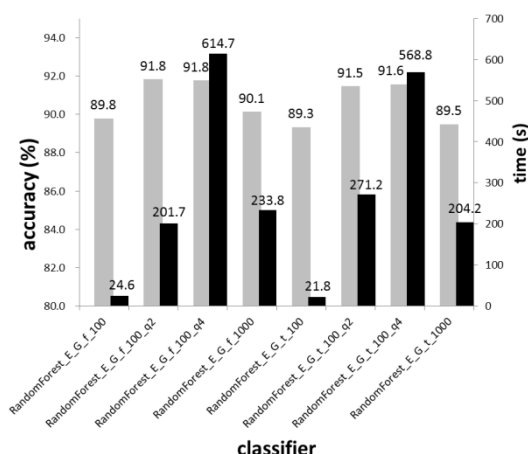


図4 蛍光顕微鏡を用いた場合の分類精度と所要時間

accuracy : 分類精度 (灰色)、time : 所要時間 (黒色)

所要時間は画像 8,680 枚 3 セットを学習・分類するために必要とする時間を表している。

【総括】

自動分類器の開発により、一般的な蛍光顕微鏡像から、植物細胞の細胞周期を詳細かつ自動的に分類することが可能となった。上記の撮影・分類条件で得られた 7 分類の分類器の精度は 91.8% であり、これはタバコ BY-2 細胞の研究者らの平均値 84.3% を凌駕している。人による判別と異なり、判別に揺らぎがないことから充分に実用性のある分類器を作成できたと言える。これまでに細胞周期の自動判定機器としてはフローサイトメーター等の製品が多用されているが、本研究のアプローチは (1) 既設の蛍光顕微鏡を使用できるため簡便で低コストである、(2) 「細胞分裂期か否か」や「核相」ではなく「細胞分裂期内の各ステージ」という詳細な区分に対応している、(3) 固定や染色等の操作が不要で生細胞のまま解析ができる、という利点がある。また目視での判定と比較して、(1) 主観によるバイアスを排除することにより分類の客観性を維持できる、(2) 膨大なデータの処理により研究を加速できるという点で優れている。既存の装置を補完する研究支援ツールとして、植物の細胞周期研究への活用が期待される。