

画像解析技術を活用した“観て測る”植物科学

檜垣 匠¹, 栗原(大窪) 恵美子²

¹熊本大学 国際先端科学技術研究機構

〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪 2-39-1

²理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Takumi Higaki¹ and Emiko Okubo-Kurihara²

Quantitative Bioimaging in Plant Science

¹International Research Organization for Advanced Science and Technology, Kumamoto University, 2-39-1 Kurokami, Chuou-ku, Kumamoto 860-8555, Japan

²RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

Keywords: Bioimage Informatics, Digital Phenotyping, Image Analysis, Machine Learning, Quantitative Evaluation

DOI: 10.24480/bsj-review.10b1.00154

人間の感覚の中でも視覚は特に重要な位置を占める。私たちは映画や写真などの映像作品を“観る”ことを楽しみ、刺激を受け、イマジネーションを膨らませる。科学的な画像データの場合でもそれは例外ではない。例えば、学会や顕微鏡メーカーの企画として「顕微鏡画像コンテスト」が催されるのは、画像データに科学研究以外の価値を見出すことができるからに他ならない。しかし、人間の視覚認知に基づく評価は定性的・主観的である側面は否めず、画像データを科学研究目的に活用するためには定量的・客観的な解析、すなわち、“観て測る”ことが不可欠であることは論を待たない。また、撮影機器の高度化に伴って多量の画像取得が容易になり、研究現場では人間の目視による画像データの評価が研究のボトルネックになる状況も生じている。そのため、生物画像解析技術を活用した画像データ評価の自動化・高速化の必要性は日増しに高まりを見せている。近年では、いわゆる AI ブームも手伝って人間の判断をコンピュータに肩代わりさせることへの興味や関心、期待の高まりも感じられる。

さて、コンピュータを使った画像データの処理や解析をいざ自分の研究テーマに取り入れるとなると、ハードルが高そうだと身構える実験系研究者の方も多いのではないだろうか？もちろん、実際に画像解析を使った実験系を新たに立ち上げるとなると、生物画像解析に関する知識や技術を要求される場面も多い。しかし最近では、画像解析技術に関する講習会や書籍、インターネット記事なども充実しており、一昔前に比べれば格段に情報収集しやすくなっている。さらに当該分野に明るい共同研究者の協力を仰ぐことができれば、画像解析技術の基礎を理解することはさほど難しいことではない。それよりも重要なことは、観察対象物の性質と撮影機器の原理を正しく理解し、取得画像から生物学的現象を正確に読み解く力、すなわち実験系研究者の「眼」である。この「眼」を持った実験系研究者が、解析技術によ

T. Higaki & E. Okubo-Kurihara-1

って画像からどのような情報を引き出せるのか把握することこそが、画像解析技術を最大限に活用するために最も効果的な方法であると考えられる。

画像は分子から生態系に至るまでの幅広い階層を対象に、形・色・密度・動きなど様々な生物学的特徴を捉えることのできる非常に強力な情報媒体である。この画像が持つ極めて高い汎用性は生物画像解析技術が広範な研究分野へ応用展開できるポテンシャルの高さを示している。その一方で、様々な解析技術や活用例が広範な研究分野に散在してしまい、全体像を捉えることが難しくなっている面も否めない。このような問題意識のもと、我々は多様な研究背景を持つ実験系研究者を対象に、植物科学分野における生物画像解析の活用事例を紹介するシンポジウムを企画した。幸いにも、日本植物学会第82回大会のシンポジウムに採択して頂き、2018年9月14日に広島国際会議場で「”観る”から”観て測る”の植物科学へ: 画像解析の基礎から定量フェノタイピングの現場まで」と題したシンポジウムを開催することができた。本シンポジウム企画を立案するにあたり、できるだけ多様な研究分野の方に足を運んで頂けるよう、研究現場の実情を様々な観点からお話し頂ける若手研究者に講演を依頼した。講演者の皆様のおかげで、学会初日の大会場にありがちな独特の硬い雰囲気をもとめないユニークな講演が続き、学際的な交流を自然と深めることができた。聴衆の皆様には、生物画像解析によってご自身の研究を飛躍的に発展させる可能性について考えて頂く一助になったと自負している。さらにありがたいことに、日本植物学会電子出版物編集委員会より本シンポジウムに基づいた本総説集を出版する機会を賜った。

上述のシンポジウムの内容と同様に、本総説集で取り扱われる学術的背景や研究対象は実に多彩である。その一方で、既存技術に対する問題意識や技術的アプローチについては共通性が読み取れるはずである。そのため、ご自身の専門分野に関連した記事だけではなく、全総説を是非まとめて読んで頂きたい。研究領域の垣根を越えてご自身の研究に役立つ”観て測る”技術のエッセンスが見つかり、それが読者の方々の研究発展のきっかけとなれば本シンポジウム・総説集の企画者としてこれ以上の喜びはない。

形態変化を指標にした青色光受容体阻害化合物の同定

栗原 (大窪) 恵美子¹, 朽名 夏磨², 栗原 志夫¹, 松井 南¹

1 理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

2 エルピクセル株式会社

〒100-0004 東京都千代田区大手町 1-6-1 大手町ビル 6F

Emiko Okubo-Kurihara¹, Natsumaro Kutsuna², Yukio Kurihara, Minami Matsui¹

Identification of cryptochrome inhibitor using phenotype-based chemical genetics

Key words: chemical biology, cryptochrome, image quantify, phenotype-based screening, photomorphogenesis

1 Center for Sustainable Resource Science, RIKEN,

Tsurumi-Ku, Yokohama, 230-0045 Japan

2 LPixel Inc., Chiyoda-Ku, Tokyo, 100-0004 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10b2.00155

1 はじめに

植物個体の形態を指標としたケミカルスクリーニングにより青色光受容体の阻害剤を同定した例を紹介する。特に原著論文(Ong et al. 2017)では触れなかった形態の抽出, 数値化, 可視化方法について解説する。

2 ケミカルジェネティクスにおけるスクリーニング

ケミカルジェネティクスとは目的の生体反応を引き起こす生理活性物質や分子プローブとなるような化合物を選抜し, それを道具として利用することにより, 複雑な生命現象の解明をめざす方法である。ケミカルジェネティクスの利点として, 低分子化合物の添加, 除去, 処理濃度などを自在に変えることで, 迅速な反応のオン/オフができることやゲノムが解明されていない生物種にも処理することができること, 遺伝学的な制限 (致死性あるいは冗長性) を補うことができるといったことが挙げられる(Toth et al. 2009)。ケミカルスクリーニングでいかに効率よく適切な候補を得られるかが, 実験の成功を決める鍵の1つである。しかし, 短期間において数千~数百万程度の化合物の反応の中から候補の選抜 (ハイスループットスクリーニング) を行うとなると, アッセイのミニチュア化や簡易化, 自動化など効率的なアッセイ系を樹立するとともに, 測定したデータについて定量的に評価する必要が生じる。

ケミカルスクリーニングの方法は大きく2つに分けられる。1つ目はターゲットベーススクリーニングである。ターゲットベーススクリーニングは、特定のターゲット分子がすでに決定しているため、化合物の結合の強さなどの解析から始める解析アプローチである。もう1つは細胞、組織、個体レベルにおいて特定の表現型を指標にした顕微鏡やデジタルカメラ画像からのスクリーニングを行うフェノタイプベーススクリーニングである。新薬開発分野においては1999年～2008年において、ターゲットベーススクリーニングより、フェノタイプベーススクリーニングのほうが画期的な化合物のヒット率が高いという報告もあり(Swinney and Anthony 2011)、改めて有力な方法として認識され、注目されている。フェノタイプベーススクリーニングは統計的な処理を考慮しても数十～数百細胞といった小規模からの解析が可能でかつ非破壊で行うことができる。さらに、画像からは形態、局在、膜透過性、細胞毒性など多くの情報を取り出すことができる(Futamura et al. 2017)。また、想定した標的分子詳細な作用機構が不明であってもよく、偏りが無いアプローチともいえよう。植物分野の研究においてもフェノタイプベースのスクリーニングにより植物ホルモン、細胞壁、膜交通や導管要素、気孔形成関連など実に多くの低分子が同定されている(Dejonghe and Russinova 2017)。一方、フェノタイプベーススクリーニングは表現型として評価可能なアウトプットを見出すことが前提であり、時間や効率を含む安定的なアッセイ系の樹立に工夫を要する。また、ターゲットを決定していないため、すなわち最終ステップとして、ターゲット同定をしなければならず、ここで困難に直面することも多い。どちらも長所と短所を理解して、選択する必要がある。本総説ではフェノタイプベーススクリーニングに焦点を当て、処理したシロイヌナズナを青色光非感受性にできる化合物を選抜するとともに、それがクリプトクロムの阻害剤であることを同定した。実際の実験の流れとともに画像の利用を紹介する。

3 光形態形成を指標とした青色光受容体阻害剤の単離

3-1 青色光と光形態形成

植物にとって光は光合成によるエネルギー源であるだけでなく、環境の情報を感知するための情報源としても重要な役割を担っている(Jiao et al. 2007)。植物は光波長に応じて異なる光受容体を通して光を感知するが、その光の波長、強さなどに適応して、種子の発芽や胚軸の生長、気孔の発達や開閉、光周期、花芽形成など様々な発生、生長過程が制御されている(Galva and Fankhauser 2015, Kami et al. 2010)。この光によって誘導される形態変化を伴う一連の応答を光形態形成という(Kendrick and Kronenberg 1994)。通常、暗所では発芽後、光を求めて胚軸の伸長が起こる。一方で、光条件下では植物の胚軸の伸長は抑制され、子葉の拡大やエチオプラストから葉緑体への変換が促進される(Wang et al. 2014)。光を受容できない変異体などでは、暗条件で育成した野生株のように形態は胚軸が長くなり、子葉が小さくなる。光の中でも、青色光は脱黄化、花芽形成、避陰反応など農業で重要な数多くの生長・発達の過程を制御している。青色光の情報伝達機構が解明されれば、青色光形態形成の制御だけでなく、農業への応用にも貢献するツールになると期待できる。

3-2 形態変化を指標にした青色光受容阻害剤の単離

植物は青色光を受容すると伸長が抑制される。もし、青色光の受容が阻害されるならば、この伸長抑制が起らなくなるはずである。統計的処理が可能であり、なるべく個体同士が重ならない画像を取得するために、シロイヌナズナの種子を5-7個に限定してウェルに播種した後、種々の低分子化合物を添加し、青色光下で3日間培養した。画像は蛍光顕微鏡に電動ステージを取り付け作製した自動撮影顕微鏡を用いて取得し、9枚の画像をタイリング（画像連結）することにより、ウェル全体が写るように調整した。ウェル全体の顕微鏡画像を撮影することにより、胚軸の1細胞の形態を抽出することができるだけでなく、発芽率の算出や化合物の効果などを統計的に測定することができる。画像撮影結果の一例を図1に示す。エルピクセル株式会社により開発された画像解析プログラムによって、スクリーニング結果の定量解析をおこなった。画像処理により元画像から測定に不要であるウェル領域を消去し、植物個体全体、胚軸・根、子葉、種子の候補領域を抽出した（図2）。抽出した各画像データにおいて面積や周長、複雑度や異形度など22種の定量値を計測した。さらに形態について把握しやすくするために、コントロールの値の平均値、標準偏差をもとに、それぞれの形態に対しての偏差値を計算し、平均値を50とした場合、それぞれのデータがどのような位置にあるかを求めた。今回は胚軸面積と子葉面積の2種のパラメータについて偏差値を用いて、結果を散布図に示した（図3）。1次スクリーニングにおいて、候補となるのは、青色光に非感受に特徴的な形態（平均より胚軸が長く、子葉が小さい）を示す図3の左上領域にプロットされることが期待される。2次スクリーニングでは1次スクリーニングで選抜した候補の中から、青色光にのみ非感受性を示し、他の単色光の赤、遠赤色光には感受性となる化合物に候補を絞り込んだ。その結果、低濃度で青色光にのみ影響する化合物として3B7N（3-bromo-7-nitroindazole）を同定した(Ong et al. 2017)。

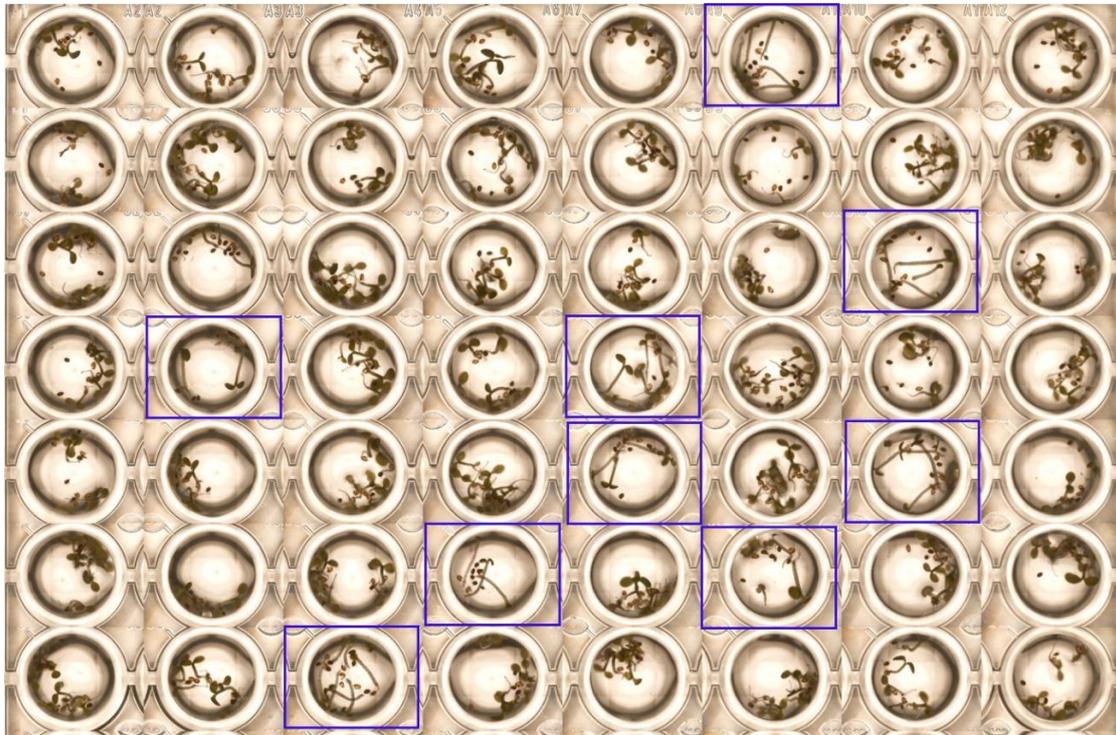


図1 自動撮影顕微鏡による画像撮影例. 左1列がコントロールの植物個体. 青色の枠線で囲んだウェル内の個体では胚軸が伸長している.

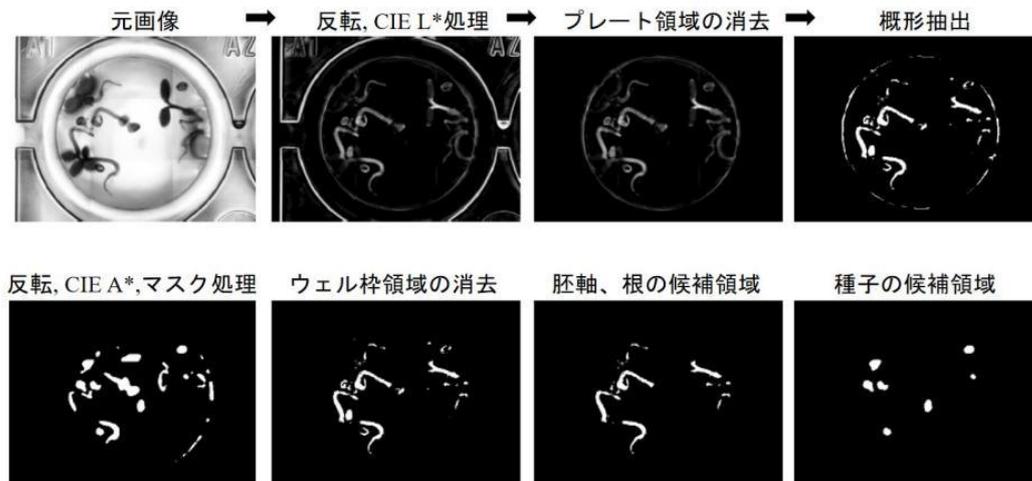


図2 画像処理による植物の特定領域の抽出の概略図.

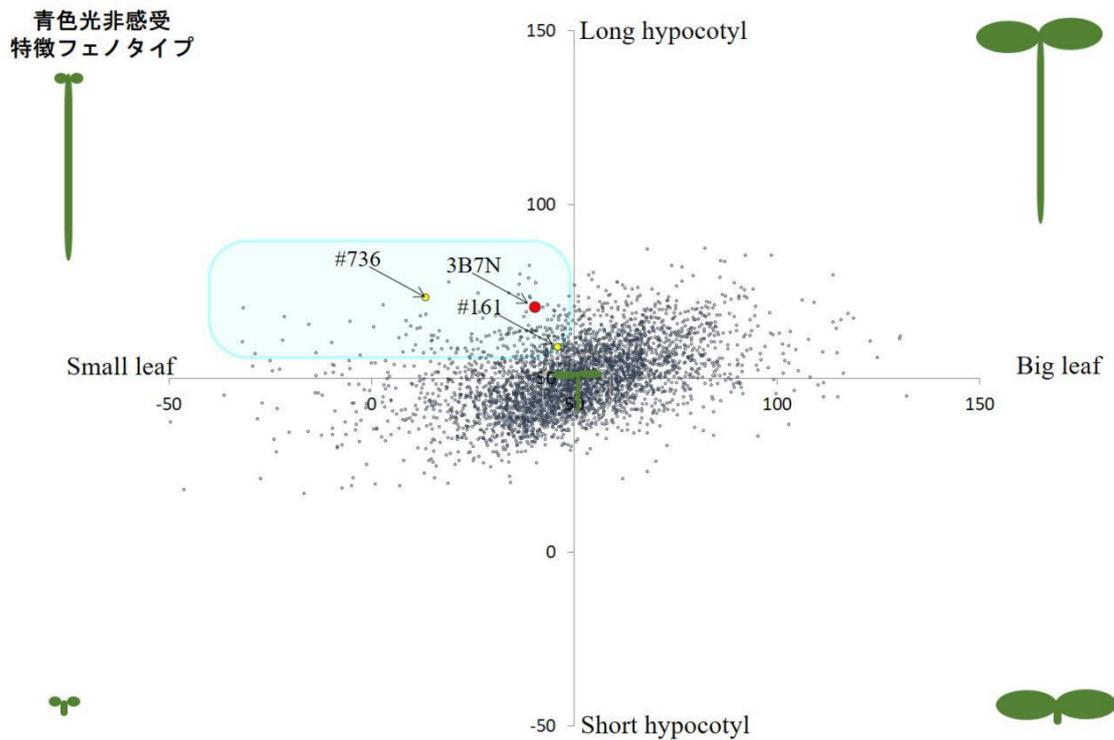


図3 画像定量値による散布図. 左上領域に胚軸が長く、子葉の小さい青色光非感受に特徴的な形態を示すものがプロットされる. 値はそれぞれ偏差値として示す. 3B7N, #161, #736 は目視においても顕著に差異を認めるものであった.

4 青色光受容阻害剤 3B7N の機能解析, ターゲット同定まで

まず、化合物の機能を示すのに必要な構造を明らかにするために、化合物の側鎖の位置や構造を変化させることで化合物の構造と形態変化との関連（活性相関）を明らかにし、作用を引き起こすのに重要な構造を決定した。次に、3B7Nによる胚軸伸長に光受容体由来する光シグナル伝達系が関わっているかどうかを明らかにするために、様々な光受容体変異体に3B7Nを添加し、評価を行った。その結果、青色光受容体クリプトクロムの変異体である *cry1*, *cry1cry2* でのみ3B7Nを添加しても青色光下で野生型と比較してさらなる胚軸伸長は見られなかった。また、光シグナル下流の *HY5* 遺伝子の変異体 *hy5* に3B7Nを添加するとさらに伸長を起こすことから3B7Nは青色光受容体であるクリプトクロムを介した光シグナル経路に影響を及ぼしていることが推測された。

また、青色光下で3B7Nを添加し、野生株と *cry1cry2* 変異体を生育させ、マイクロアレイ解析を行った。主成分分析の結果、3B7Nを処理した野生型と3B7Nを処理した *cry1cry2* 変異体ともに非常に近い遺伝子発現傾向を示したことから3B7Nの作用へのクリプトクロムの関与が示唆された。つまり、クリプトクロムが3B7Nの直接のターゲットであると推測された。

3B7Nの直接のターゲットがクリプトクロムであることを証明するために、3B7Nを結合させたアガロースビーズとクリプトクロムの1つであるCRY1タンパク質との結合実験を行った。その結果、3B7NはCRY1と直接結合することが明らかになった (Ong et al. 2017)。また最近、他の研究グループによる報告では3B7NがCRYのATP結合サイトに入り込むことにより機能を阻害していることが明らかにされた (Orth et al. 2017)。

5 青色光受容体クリプトクロム (CRY) と 3B7N

クリプトクロム (CRY) は植物において青色光の受容体である (Ahmad and Cashmore 1993)。青色光下において活性化されると脱黄化、避陰反応 (Van Gelder et al. 2003)、開花時期 (Guo et al. 1998, El-Din El-Assal et al. 2001)、気孔形成や開閉 (Mao et al. 2005, Kang et al. 2009) など色々な光形態形成を制御している。CRYは二量体を形成し機能する (Sang et al. 2005)。シロイヌナズナにはCRY1、CRY2、CRY3の3つのCRY遺伝子が存在する。その中でも主に形態形成に関わる青色光受容体として機能するのがCRY1、CRY2の2つである (Ahmad and Cashmore 1993, Guo et al. 1998, El-Din El-Assal et al. 2001)。CRY1とCRY2の配列は似ているが、これらは、共通の役割とそれぞれ別の役割があり、主にCRY1は芽生えの伸長抑制に、CRY2は開花時期の制御に関わっている。クリプトクロムがどのようにしてこのような分けられた反応を起こすのかについては不明な点も多い。この受容体の作用を制御することができれば、これら種々の反応の制御が可能になり、基礎的にも応用的にも重要に道具となると期待できる。

6. おわりに

ここではフェノタイプベーススクリーニングによる一例を示した。この例のようにスクリーニングの成功のためには、まずハイスループットなアッセイ系の確立が必須といえるだろう。植物の場合、顕微鏡画像には収まりきらないような個体の大きさも問題となり、RIPPS (RIKEN Integrated Plant Phenotyping System) のようなよりマクロな撮影装置の構築が有用となるかもしれない (Fujita et al. 2018)。さらに、スクリーニングの結果、目的の化合物が同定できたとしても、その分子レベルでの作用点 (ターゲット) の同定に至るにはさまざまな困難が立ちはだかると考えられる。3B7Nとクリプトクロムの関係のように多様な科学的アプローチから如何にターゲット候補を絞り込んでいくかが成功への鍵となるだろう。

ケミカルジェネティックスのアプローチは、シロイヌナズナのようなゲノム情報が豊富なモデル植物だけではなく、ゲノム情報の乏しい作物にも適応することが可能である。また、致死性あるいは冗長性といった遺伝学的な制限を打破することも可能で、これまでずっと不明であったABAのレセプターとしてPYR/PYLファミリーが同定されABAシグナル経路の研究がめざましく前進したように (Park et al. 2009, Ma et al. 2009)、大きなブレークスルーを生み出せるアプローチ法である。以上のように、ケミカルジェネティックスには新たな事象を明らかにできる可能性が秘められている。

謝辞

本稿で紹介した研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金（挑戦的萌芽研究 25560421 ケミカルフェノミクスによる植物のサイズを制御する低分子化合物の探索）による支援を受けて行ったものである。

引用文献

- Ahmad, M. & Cashmore, AR. 1993. Hy4 gene of *A.thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366: 162-166
- Dejonghe, W. & Russinova, E. 2017. Plant Chemical Genetics: From Phenotype-Based Screens to Synthetic Biology. *Plant Physiol.* 174: 5-20
- El-Din El-assel, S., Alonso-Blanco, C., Peeters, AJ., Raz, V. & Koornneef, M. 2001. A QTL for flowering time in Arabidopsis reveals a novel allele of CRY2. *Nat Genet.* 29: 435-440
- Fujita, M., Tanabata, T., Urano, K., Kikuchi, S. & Shinozaki, K. 2018. RIPPS: A plant phenotyping system for quantitative evaluation of growth under controlled environmental stress conditions. *Plant Cell Physiol.* 59: 2030-2038
- Futamura, Y., Yamamoto, K. & Osada, H. 2017. Phenotypic screening meets natural products in drug discovery. *Biosci Biotechnol Biochem.* 81: 28-31
- Galvao, V. C. & Fankhauser, C. 2015. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Curr. Opin. Neurobiol.* 34: 46-53
- Guo, H., Yang, H., Mockler, TC. & Lin, C. 1998. Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science.* 379: 1360-1363
- Kan, CY., Lian, HL., Wang, FF., Huang, JR. & Yang, HQ. 2009. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. 21: 2624-2641
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P. & Fankhauser, C. 2010. Light-regulated plant growth and development. *Curr Top Dev Biol.* 91:29-66.
- Kendrick, R. E. & Kronenberg, G. H. M. (1994). *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed. K. A. (Publishers, ed.), Kluwer, Dordrecht.
- Jiao, Y., Lau, O. S. & Deng, X. W. 2007. Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nat Rev Genet.* 8: 217-230
- Ma, Y., Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A. & Grill, E. 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. 324: 1064-1068
- Mao, J., Zhang, YC., Sang, Y., Li, QH. & Yang, HQ. 2005. A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proc Natl Acad Sci USA.* 102: 12270-12275
- Ong, WD., Okubo-Kurihara, E., Kurihara, Y., Shimada, S., Makita, Y., Kawashima, M., Honda, K., Kondoh, Y., Watanabe, N., Osada, H., Cutler, SR., Sudesh, K. & Matsui, M. 2017. Chemical-induced inhibition of blue light-mediated seedling development caused by disruption of upstream signal transduction involving cryptochromes in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 58: 95-105
- Orth, C., Niemann, N., Hennig, L., Essen, LO. & Batschauer, A. 2017. Hyperactivity of the

- Arabidopsis* cryptochrome (cry1) L407F mutant is caused by a structural alteration close to the cry1 ATP-binding site. *J Biol Chem.* 292: 12906-12920
- Park, SY. *et al.* 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/ PYL family of START proteins. *Science.* 324: 1068-1071
- Sang, Y., Li, QH., Rubio, V., Zhang, YC., Mao, J., Deng, XW. & Yang, HQ. 2005. N-terminal domain-mediated homodimerization is required for photoreceptor activity of *Arabidopsis* CRYPTOCHROME 1. *17: 1569-1584*
- Swinney, D. C. & Anthony, J. 2011. How were new medicines discovered? *Nat Rev Drug Discov.* 10: 507-519
- Toth, R. & van der Hoorn, R. 2009. Emerging principles in plant chemical genetics. *Trends in Plant Science* 15: 81-88
- Van Gelder, RN., Wee, R., Lee, JA. & Tu, DC. 2003. Reduced pupillary light responses in mice lacking cryptochromes. *Science.* 299: 222
- Wang, X., Wang, Q., Nguyen, P. & Lin, C. 2014. Cryptochrome-mediated light responses in plants. *Enzymes.* 35: 167-189

自動植物フェノタイピングシステム"RIPPS"の開発と植物環境応答解析

藤田 美紀, 篠崎 一雄

理化学研究所 環境資源科学研究センター 機能開発研究グループ

〒305-0074 茨城県つくば市高野台 3-1-1

Miki Fujita, Kazuo Shinozaki

Development of "RIPPS", an automated phenotyping system for evaluation of environmental stress Response

Key words: environmental stress, imaging, in-house plant phenotyping system

RIKEN Center for Sustainable Resource Science,

3-1-1 Koyadai, Tsukuba, Ibaraki, 305-0074, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10b3.00156

1. はじめに

近年のシークエンス技術の高度化により、ゲノム情報の解析スピードと精度は大幅に向上し、モデル植物にとどまらず、様々な植物種の全ゲノム情報が入手可能となっている。これら大量の配列情報を用いて遺伝子の機能解明を進め、有用因子を見つけ出すためには、大量の遺伝子型に対応する形質情報が必要である。このためには、形質を数値化あるいは特性分類できる、ハイスループットで再現性の高い表現型解析（フェノタイピング）技術が重要となる。最近、急速に進化した画像解析技術により表現型解析の新展開が進んでいる。また、形質の発現は、遺伝子と環境の相互作用によって規定されることから、環境条件に関しても数値化による把握あるいは精密な制御による均一化を行う必要がある。

植物におけるフェノタイピングは、細胞や器官レベルから個体、群落など、様々なレベルで進められているが、本稿では、植物個体を対象としたハイスループット解析のための室内型全自動植物表現型解析システム RIPPS (RIKEN Integrated Plant Phenotyping System) (Fujita et al. 2018)の開発と、これを用いた精密環境制御下における植物の環境応答と成長に関する解析について紹介する。

2. 自動フェノタイピングシステム RIPPS の開発

野外におけるフェノタイピングにおいては、生育環境情報を気象データやフィールドサーバーなどで収集した計測データにより把握し解析に利用するが、試験環境条件のコントロールおよび再現が困難であるのに対し、室内型のフェノタイピングにおいては、様々な環境条件を繰り返し再現できるメリットがある。これまでに、フランス国立農学研究所(INRA)の PHENOPSIS (Granier et al. 2006)および Phenoscope (Tisne et al. 2013)、ベルギーのフランダースバイオテクノロジー研究機関(VIB)の WIWAM (Lefebvre et al. 2009)、ドイツのレムナテック社のスキャナライザー (Rajendran et al. 2009)、理化学研究所の RIPPS (Fujita et al. 2018)など、様々なシステムが開発されている(Granier and Vile 2014; Humplik et al. 2015)。これらハイスループットで集約的な表現型解析システムは、様々な自動手法を組み合わせ、非破壊的に、植物の成長・形態および生理機能を解析することで、植物の一生を通じて成長や強靱性の

複雑さを再現性を持って示すことができる。これらの一例として、理化学研究所における全自動表現型解析システム RIPPS について解説する。

筆者ら理化学研究所の研究グループは、乾燥や高塩濃度などの環境ストレスに対する植物の耐性獲得機構の研究を行っている。乾燥ストレス応答の解析は、マンニトールやポリエチレングリコールなどを添加した高浸透圧培地により、乾燥状態を擬似的に再現するプレートを用いる方法も多く利用されているが(Verslues et al. 2006)、湿度変化に対する気孔の応答や蒸散量変化を解析するには、土壌を用いた鉢植え植物解析が適している。しかしながら、土壌を用いた乾燥試験は、培地などの方法に比べて困難な点が多い。培養室内の栽培棚や育成チャンバーにおける鉢植え植物の栽培試験においては、温度や湿度および光量のコントロールが可能な環境であっても、光の強さや空調の風むらなど、局所的な環境条件が異なっており、この微小な環境差異が試験経過に影響して、正しい結果が得られなくなる場合が少なくない。このような問題を避けるために、各試験区の反復数を増やし、サンプルをランダムに配置して、定期的に位置を移動するなどの対策を行うが、長期間の生育試験においては膨大な労力がかかるだけでなく、植物に接触あるいは障害ストレスがかかる場合もある。さらに、乾燥応答などを解析する際には、土の水分含量を把握し均一に維持するために、定期的な計量と給水の作業も加わり、手動では大量のサンプルを解析することが困難である。このような背景のもと、我々は、大量の植物を自動で育成し、画像取得により植物生長の経時変化を追うためのシステムを七ヶ高也博士（理化学研究所、現在はかずさ DNA 研究所）と(株)テックスと共同で開発した。

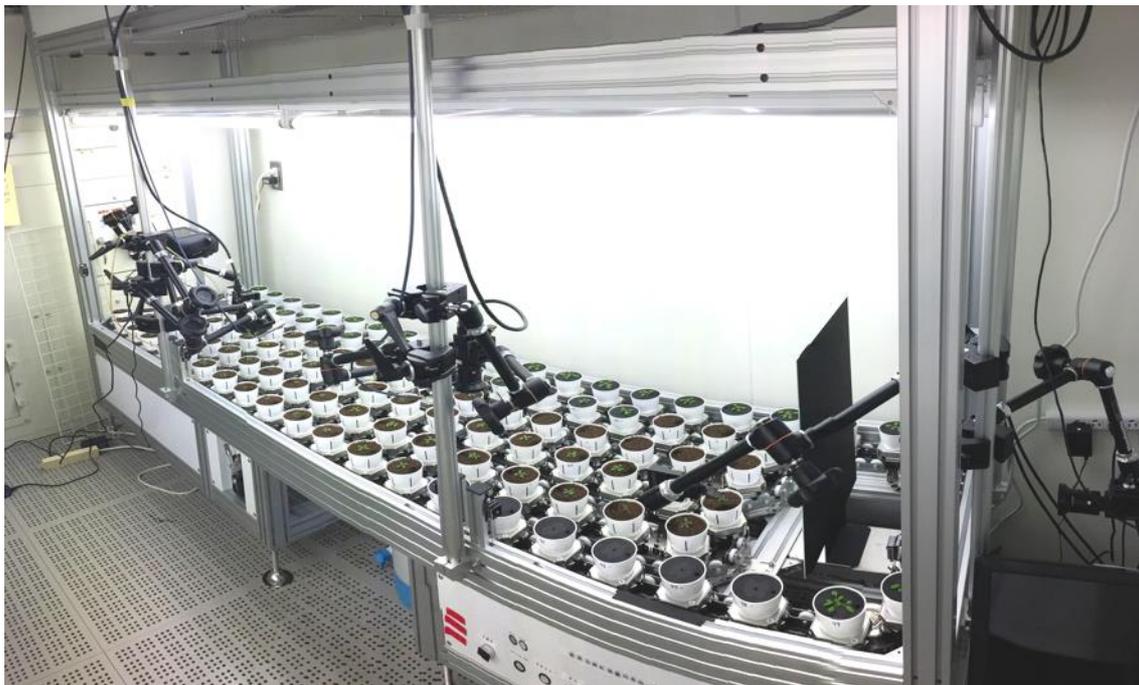


図 1 全自動表現型解析システム RIPPS (RIKEN Integrated Plant Phenotyping System)

RIPPS (RIKEN Integrated Plant Phenotyping System) と名付けたこのシステムは、120 ポットの植物をベルトコンベアで搬送しながら育成を行う (図 1)。給水ポイントに停止した植物ポットは、上昇してくる天秤によって自動的に計量され、予めポット毎に設定した重量に達するまで給水が行われる。同時に、カメラの前に停止した植物は、自動的に画像取得が行われる。一連の動作が終わると、コンベアが 1 ステップ進み、次のポットの計量給水が行われる。1 ポットあたり約 1 分で計量動作が行わ

れ、約2時間で120ポットが一周する。この搬送システムにより、精密な土壌水分の制御と、植物成長の経時変化の記録ができるだけでなく、上述したポット位置によるサンプル間の微小環境の偏りをなくし、供試植物の生育条件を均質化することが可能になった。

RIPPSの照明装置は、任意の日長設定に加え、光強度をゼロから上限 $120 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ まで無段階に調整できる。また、任意の位置にカメラシステムを設置・増設することが可能となっている。さらに、RIPPS装置は、個別の培養室に設置してあり、温度は 15°C から 35°C 、湿度は40%から85%まで、時間単位での制御が可能となっている。

3. RIPPS 画像解析システム

現行のRIPPSは、経時変化を追った画像解析を行うために、RGB・モノクロ、および赤外線、3種類のカメラを搭載している(図2)。カラー画像を取得するためのRGBカメラに加え、夜間画像の取得のために、暗所での植物生長に影響を与えない950 nmのLED照明を付属したモノクロカメラを搭載している。上面の画像からは、葉の色調および葉面積の経時変化を、側面の画像からは、避陰反応などの縦方向の形状変化も経時的に解析することが可能である。

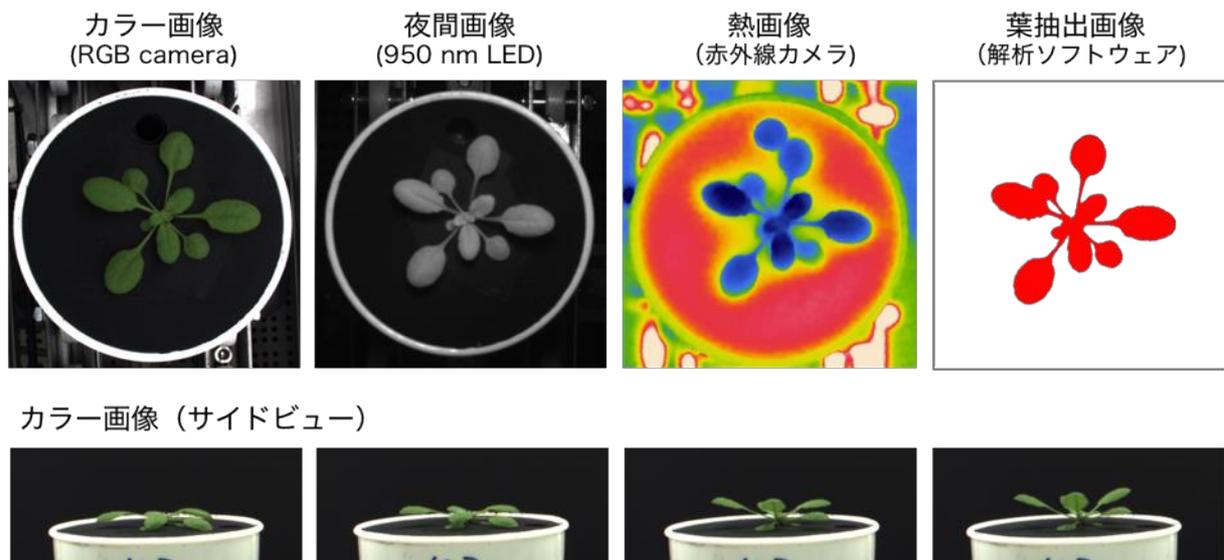


図2. RIPPS に搭載したカメラによるサンプル取得画像および画像解析ソフトウェアによる葉の抽出画像。側面の画像からは葉の上下運動が観察できる。

赤外線カメラによる葉の熱画像は、気孔の開閉を予測するツールとしてよく用いられている (Hashimoto et al. 2006; Merlot et al. 2002)。これは、気孔からの蒸散に伴い、気化熱が奪われて葉温が低下することから、葉温と蒸散量が高い相関を示すためである (Merlot et al. 2002)。RIPPSに赤外線カメラを搭載し、葉温の経時変化を追うことにより、土壌水分環境の変化に対する気孔の応答を、非破壊かつ高い時間分解能で解析することが可能となる。さらに、我々は、株式会社エルピクセルと共同して、可視カメラより得られた画像から葉の投影面積やロゼット径などを算出するソフトウェアを開発した。また、赤外線カメラより得られた熱画像から、葉面の平均温度を算出するソフトウェアの開発も行った。

前項で触れたように、RIPPS へのカメラ搭載は、移動や増設を自由に行うことができる。可視カメラを増設することで、画像解析の時間分解能を上げる、あるいは、植物体を立体的に捉えるための3D画像構築を行うことも可能となる。さらに、リモートセンシングなどで用いられている様々な分光測定法(中路, 2009)を取り入れることで、植物の生理状態をより詳細に解析することができる。例えば、植物の生産性とストレス状態の指標として用いられる光合成活性の非破壊計測法には、パルス振幅変調(PAM: pulse amplitude modulation)によるクロロフィル蛍光の測定(園池, 2009)や、カロチノイド色素の変化を反映し光化学系IIの活性とも関連のある光化学反射率(PRI: Photochemical Reflectance Index)の計測(Penuelas et al. 1995)などがある。さらに、近赤外における水の吸収帯の深さを指標化することにより、葉の水分含量を予測する方法も試みられている(Penuelas et al. 1997; Seelig et al. 2008)。近年では、数十から数百バンド以上の波長分解能を持つハイパースペクトルカメラを利用したイメージング技術が発達し(叶 & 酒井 2015)、糖分やミネラルの組成や量を推定する手法が開発されつつある(Suzuki et al. 2008)。モデル植物の遺伝学研究にも、ハイパースペクトルカメラの利用が進められている(Matsuda et al. 2012)。このような様々なイメージングシステムを組み合わせることで、RIPPS のより強力な定量的表現型解析ツールへの発展が期待できる。

4. RIPPS を用いたストレス耐性試験

RIPPS を用いた環境応答解析として、様々な土壤水分条件下での生育試験と塩ストレス耐性試験の例を紹介する。RIPPS では、1ポット毎に土壤水分含量を設定し、ポット重量を指標にして50 μl 単位の給水調節を行うことができる(図3)。乾燥区では、より早く目標水分含量に達するために、スリット入りのポット

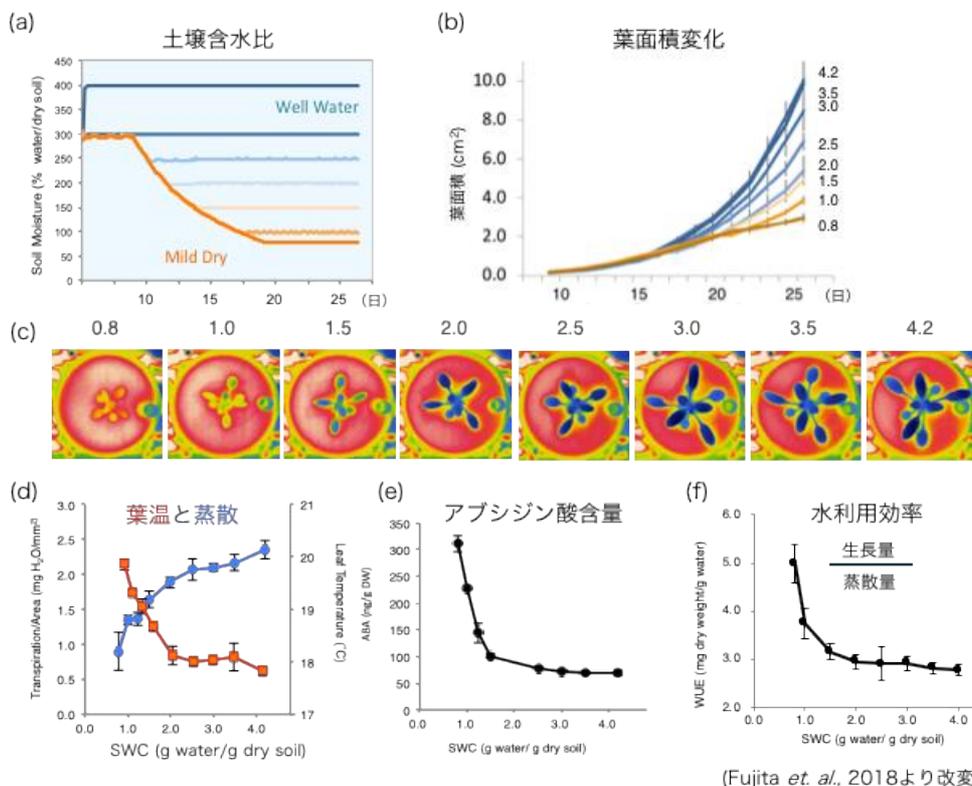


図3. 様々な土壤水分条件下での生育試験。(a)土壤含水比, (b)葉面積変化, (c)20日目植物の赤外線画像, (d)単位面積あたりの蒸散量と葉温の関係, (e)25日目植物のABA含量, (f)水利用効率

を利用している(図4a)。これらの技術により、任意のレベルの土壤水分状態を再現することが可能となり、手動では困難であった中間的なストレス状態、例えば、気孔の開度が中程度の状態(図3c)を観察することができるようになった。また、前項で解説したように、葉温で気孔の開閉および蒸散量を予測するだけでなく、重量変化を指標に、実際の植物の蒸散量計測を行うことができる。シロイヌナズナのような小さな植物体の場合、蒸散量算出においてポットの土表面からの蒸発が無視できないため、土を覆う必要がある。我々は、ポット内径に隙間なくフィットするスチロール製のカバーと、より口径の小さいプラスチックカバー(図4b)を用いて水分蒸発を防いでいる。さらに、植物を植えていないポットを同じ土壤水分条件で搬送し、給水口や鉢底からの蒸発分を差引くことで、植物からの正味の蒸散量を算出している。スチロールカバーは、土表面からの水分の蒸発を防ぐだけでなく、温度も遮断するため、赤外線カメラによる葉温観察におけるバックグラウンドの安定化にも役立っている。

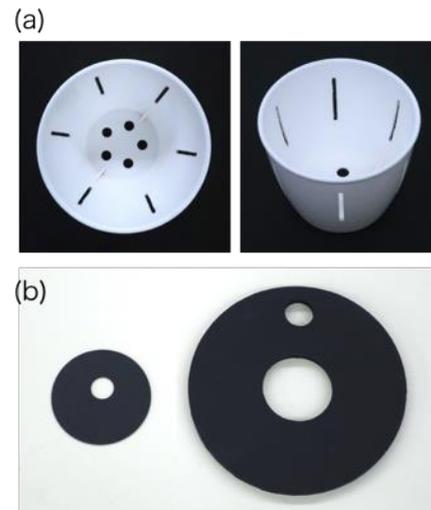


図4. (a) スリット入りポット
(b) ポットカバー

塩ストレス耐性試験(図5)では、あらかじめ決まった濃度の塩水を加えておき、土壤水分含量を維持することにより、水の蒸発による塩濃度の変化を抑え、塩濃度を一定に保つことができる。野生型のシロイヌナズナに比べて、塩排出ポンプ欠損変異体である *sos1* 変異体(Shi et al. 2000; Wu et al. 1996)においては、有意に高塩濃度における生育阻害が観察された(図5)。

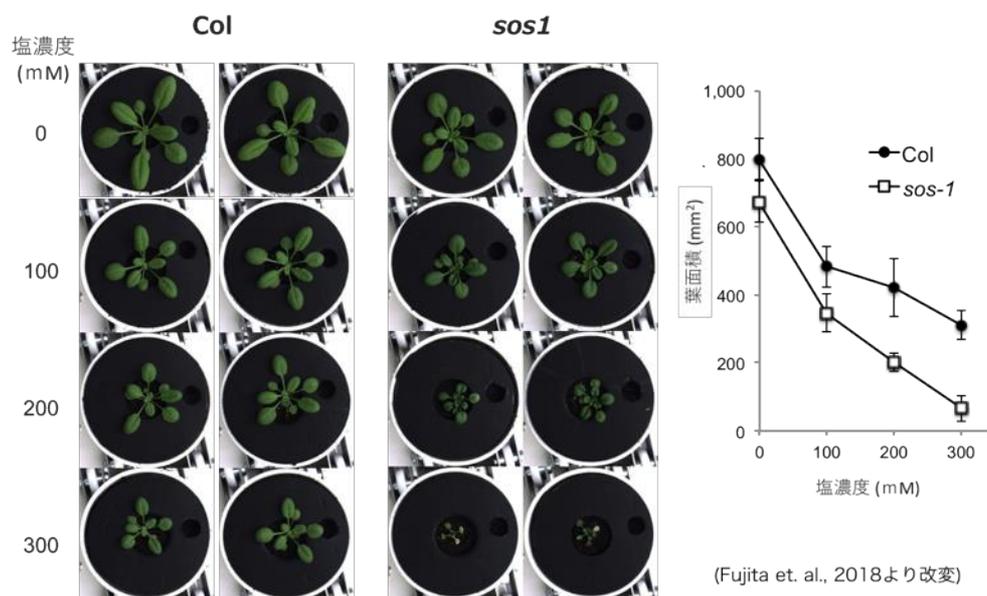


図5. RIPPS を用いた塩ストレス耐性試験. 野生型(Col)と塩排出ポンプ欠損変異体(*sos1*)の比較

このように、土壤水分を微妙に制御することができる RIPPS の特質を利用して、再現性の高い精緻な乾燥ストレスや塩ストレス試験をハイスループットに行うことができるようになった。また、高い時間分解能をもつ時系列データを得られることから、環境変動に対する植物の生理的变化を、より詳細に解析し理解することが可能になった。

5. おわりに

RIPPS で解析できるのは、モデル植物のシロイヌナズナにとどまらない。これまでに、単子葉植物のイネ科のモデル植物であるブラキポディウムに加えて、双子葉植物のコマツナやスーパーフードとして知られるキヌア(図6)などの作物を供試した定量的な表現型解析においても、RIPPS でしか解き明かせなかった精度の高い興味深い成果が出てきはじめています。このように、今後は、さまざまな植物種へと適用を広げていくことにより、圃場や植物工場、温室などさまざまな農業の現場で生産されている作物生産に貢献していくことが期待できます。

RIPPS は、均一な条件で植物を生育させ、成長の経時変化を追うことができるため、トランスクリプトームやメタボロームなどのオミクス解析を組み合わせた統合解析や、植物の成長や環境耐性を高める化合物の探索(ケミカルスクリーニング)、多数の系統間比較による QTL 解析やゲノムワイド関連解析(GWAS)などのゲノム解析を行うことにより、植物の成長および環境応答のメカニズムの理解や有用遺伝子の発見が加速されると期待できます。また、RIPPS によって得られる、生育環境条件や蒸散量変化などの高次情報が付随した、様々な時系列画像の解析データを利用することで、植物の生長、環境応答に関わる数理モデルの構築を行い、作物の環境変動応答予測や最適



図6. RIPPS を用いたキヌアの成長解析

系統選抜などに役立つことも可能となる。さらに、今後、非破壊で植物の内部状態を把握できる画像装置などを RIPPS に搭載することにより、環境ストレス条件でのマーカーになる画像診断技術の開発などに利用できるだけでなく、多様な画像解析を機械学習と組み合わせることで、これまで見えてこなかった様々な環境条件での植物の成長に関する新しい生命現象を捉えられると期待できます。

謝辞

本研究の共同研究者である七夕高也博士(かずさ DNA 研究所)および浦野 薫博士(理化学研究所)に感謝申し上げます。キヌア種子は、国際農林水産業研究センターの藤田泰成博士に分譲いただいた。また、RIPPS の設計製作を行った(株)テックス、画像解析ソフトウェアの開発を行ったエルピクセル株式会社、RIPPS 部品加工およびポットスリット加工機の製作を行った理化学研究所技術基盤支援チーム、およびポットカバー製作を行った(株)トンボ、(株)東京プレジジョンに感謝の意を表す。本研究は、生研センター農食事業、文部科学省補正予算、理化学研究所 独創的研究提案「共生の生物学」、日本学術振興会・科学研究費補助金(基盤B特設分野 16KT0031 植物トリプトファン代謝系を利用した炭疽病菌と共棲菌の同時制御技術の開発)による支援のもとで行った。

引用文献

- Fujita, M., Tanabata, T., Urano, K., Kikuchi, S. and Shinozaki, K. 2018. RIPPS: A Plant Phenotyping System for Quantitative Evaluation of Growth Under Controlled Environmental Stress Conditions. *Plant and Cell Physiology* 59: 2030-2038.
- Granier, C., Aguirrezabal, L., Chenu, K., Cookson, S.J., Dauzat, M., Hamard, P., et al. 2006. PHENOPSIS, an automated platform for reproducible phenotyping of plant responses to soil water deficit in *Arabidopsis thaliana* permitted the identification of an accession with low sensitivity to soil water deficit. *New Phytol* 169: 623-635.
- Granier, C. and Vile, D. 2014. Phenotyping and beyond: modelling the relationships between traits. *Curr Opin Plant Biol* 18: 96-102.
- Hashimoto, M., Negi, J., Young, J., Israelsson, M., Schroeder, J.I. and Iba, K. 2006. *Arabidopsis* HT1 kinase controls stomatal movements in response to CO₂. *Nat Cell Biol* 8: 391-U352.
- Humplik, J.F., Lazar, D., Husickova, A. and Spichal, L. 2015. Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses - a review. *Plant Methods* 11.
- 叶 旭君 & 酒井 憲司 2015. ハイパースペクトルイメージングの農業への応用. 映像情報メディア学会誌 69-5: 464-469.
- Lefebvre, V., Kiani, S.P. and Durand-Tardif, M. 2009. A focus on natural variation for abiotic constraints response in the model species *Arabidopsis thaliana*. *Int J Mol Sci* 10: 3547-3582.
- Matsuda, O., Tanaka, A., Fujita, T. and Iba, K. 2012. Hyperspectral Imaging Techniques for Rapid Identification of *Arabidopsis* Mutants with Altered Leaf Pigment Status. *Plant and Cell Physiology* 53: 1154-1170.
- Merlot, S., Mustilli, A.C., Genty, B., North, H., Lefebvre, V., Sotta, B., et al. 2002. Use of infrared thermal imaging to isolate *Arabidopsis* mutants defective in stomatal regulation. *Plant Journal* 30: 601-609.
- 中路達郎 2009. 葉群の分光反射と分光反射指数. *Low temperature science* 67: 497-506.
- Penuelas, J., Baret, F. and Filella, I. 1995. Semiempirical Indexes to Assess Carotenoids Chlorophyll-a Ratio from Leaf Spectral Reflectance. *Photosynthetica* 31: 221-230.
- Penuelas, J., Pinol, J., Ogaya, R. and Filella, I. 1997. Estimation of plant water concentration by the reflectance water index WI (R900/R970). *Int J Remote Sens* 18: 2869-2875.
- Rajendran, K., Tester, M. and Roy, S.J. 2009. Quantifying the three main components of salinity tolerance in cereals. *Plant Cell and Environment* 32: 237-249.
- Seelig, H.D., Hoehn, A., Stodieck, L.S., Klaus, D.M., Adams, W.W. and Emery, W.J. 2008. The assessment of leaf water content using leaf reflectance ratios in the visible, near-, and short-wave-infrared. *Int J Remote Sens* 29: 3701-3713.
- Shi, H., Ishitani, M., Kim, C. and Zhu, J.K. 2000. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 6896-6901.

- 園池公毅 2009. クロロフィル蛍光と吸収による光合成測定. *Low temperature science* 67: 507-524.
- Suzuki, Y., Tanaka, K., Kato, W., Okamoto, H., Kataoka, T., Shimada, H., et al. 2008. Field mapping of chemical composition of forage using hyperspectral imaging in a grass meadow. *Grassland Science* 54: 179-188.
- Tisne, S., Serrand, Y., Bach, L., Gilbault, E., Ben Ameer, R., Balasse, H., et al. 2013. Phenoscope: an automated large-scale phenotyping platform offering high spatial homogeneity. *Plant Journal* 74: 534-544.
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. and Zhu, J.K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J* 45: 523-539.
- Wu, S.J., Ding, L. and Zhu, J.K. 1996. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell* 8: 617-627.

遺伝解析に価値ある画像解析～イネ科の葉形態を例に～

坂本莉沙

日本学術振興会特別研究員 (DC)

東京大学大学院 農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 博士課程

〒113-8657 東京都文京区弥生 1-1-1 東京大学 農学部 1 号館 328

Lisa SAKAMOTO

Picture-based phenotyping of sorghum leaves for multi-trait QTL analysis

Key words: *phenotyping, QTL analysis, image acquisition, biometrics, image segmentation*

JSPS Research Fellow

Department of Agricultural and Environmental Biology, Graduate School of Agricultural and Life Sciences, The University of Tokyo

DOI: 10.24480/bsj-review.10b4.00157

1. 量的形質の遺伝解析をする。～QTL解析～

1-1. 量的形質の品種改良

新しい有用な品種を作ることは農業上重要である。新しい品種を作るには異なる優良な農業関連形質をもつ品種同士を掛け合わせ、目的の表現型を持つ品種を作ることが一般的である。改良したい形質が質的形質の場合、交配後代を見れば形質関連遺伝子の数や、表現型と遺伝型の対応がわかり効率的に改良できる。問題となるのは目的形質が量的形質の場合である。なぜなら、量的形質では、主導遺伝子だけでなく微動遺伝子による支配、あるいは環境変動の影響を大きく受けるため、多くの場合交配後代で表現型が分離しない。このような場合、質的形質の場合とは異なり、表現型と遺伝子型の対応が容易につかないため、量的形質の改良は一般的に容易ではない。

1-2. QTL解析の原理

量的形質に関わる遺伝様式を理解するために QTL 解析を活用することが出来る。交配集団を用いた QTL 解析では交配後代の表現型とゲノムワイド DNA 多型マーカーとの関連を検定する。つまり、統計学的な検定により有意に表現型と関連しているゲノム領域 (Quantitative trait locus, QTL) を探索することになる。QTL 解析についての詳細な説明は鶴飼 (2000) や Broman *et al.* (2009) を参照してほしい。このように、QTL 解析は交配集団を用意し、集団のゲノムワイド DNA 多型マーカーと対応する表現型値があれば行うことができる。近年、次世代シーケンサーの登場によりゲノムワイド DNA 多型マーカー情報の取得はそれほど大きな課題ではなくなりつつある。一方、各系統の表現型情報をどのように取得するかは、依然として大きな課題である。表現型の計測はフェノタイピング (phenotyping) と呼ばれ、より優れたフェノタイピング技術の開発に向けた研究が近年盛んに行われている (Li *et al.* 2014, Cobb *et al.* 2013, Kim *et al.* 2017)。

L. Sakamoto-1

1-3. QTL解析のための表現型計測

各個体の表現型を計測するのは容易ではない。例えば、止め葉の長さに関わる QTL が知りたいとする。止め葉は穂が出る直前の葉で、最後まで光合成をして穂に栄養を送るとされているため大変重要である。しかし、大抵の作物は年に 1 回しか栽培できず、毎年秋に計測作業が集中してしまう。その上、止め葉の長さを調べるには穂が出てから枯れるまでの限られた期間に長さを測る必要がある。また、統計的な検出力や組替え価などを考慮すると数百系統を計測する必要がある。つまり、短い期間に数百系統の計測を終わらせる必要がある。このため、とにかく作業効率を高めなければ表現型計測を目的数こなすことができない。計測作業効率を高める表現型計測のことを *high-throughput phenotyping* と言う (Araus and Cairns 2013, Andrade-Sanchez *et al.* 2014, Chen *et al.* 2014)。

また、そもそも表現型の評価自体難しいこともある。例えば、葉が赤くなる病害の抵抗性に関わる QTL が知りたいとする。その際、我々は葉の赤さを評価する必要がある。しかし、病害による葉の赤さというのは斑ら、スポット状に現れるため、葉面積、色の濃さ、部位などが関連する複雑な表現型となる。このため、総合的に評価するために達観で病害程度をスコアリングすることが多い。しかし、それでは葉の赤い部分の面積なのか、赤い部分の全体に対する割合なのか、赤色の濃さなのか曖昧なまま評価がなされてしまう。つまり、総合的かつ客観的な評価を行うことは難しい。表現型を明確に定義して網羅的に計測することを *high-resolution phenotyping* と言う (Crowell *et al.* 2014, Crowell *et al.* 2016)。

このような現状を踏まえて表現型の評価に画像解析を活用しようという研究が盛んになっている。*high-throughput phenotyping* も *high-resolution phenotyping* も画像解析を活用した研究が多い。画像解析を活用したフェノタイピングは *image-based phenotyping* と呼ばれる。

2. 表現型計測に画像解析を活用する。

本章では具体的な研究例をもとに表現型計測の手順とコツを紹介する。本研究ではソルガム (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) の葉形態に関わる QTL の検出を目的とした。ソルガムは世界五大穀物の一つのイネ科作物である。他の穀物が育ちにくい乾燥した土地でも生育することや茎に糖を蓄積することからバイオ燃料材料の可能性があることなどから近年再注目されている作物の一つである。材料はソルガムのモデル品種 BTx623 とタカキビの組換え自殖系統 209 系統、登熟期の各系統 1 個体を使用した。これは岡山大学資源植物科学研究所で 2016 年、2017 年にガラス温室でポット栽培されていたものである。ソルガムの葉はトウモロコシと良く似た 50 cm~1 m のコンブ状の葉で主茎に 5~10 枚展開する。ソルガムの主茎の葉を順番に全て切り取り、表現型計測をした。

2-1. 表現型計測の手順

作業手順の概要を述べる。まず、画像を取得する。カメラの位置による画像の大きさを補正し、そこから葉のみを抽出する。葉のみの画像から表現型計測を行い、QTL 解析を行う。

2-1-1. 画像取得

撮影装置として巨大な三脚 (高さ 1.5m 以上) にカメラを真下に向くように取り付けた (Fig

L. Sakamoto-2

1)。今回、カメラは Canon の一般的な一眼レフカメラ (EOS kiss X5) を使用した。このカメラの後続機は 8 万円程度で購入できる。カメラとパソコンを接続してパソコン上のカメラ操作アプリ (EOS Utility) を使用して三脚上のカメラのシャッターを切った。EOS Utility は Canon の Web ページ

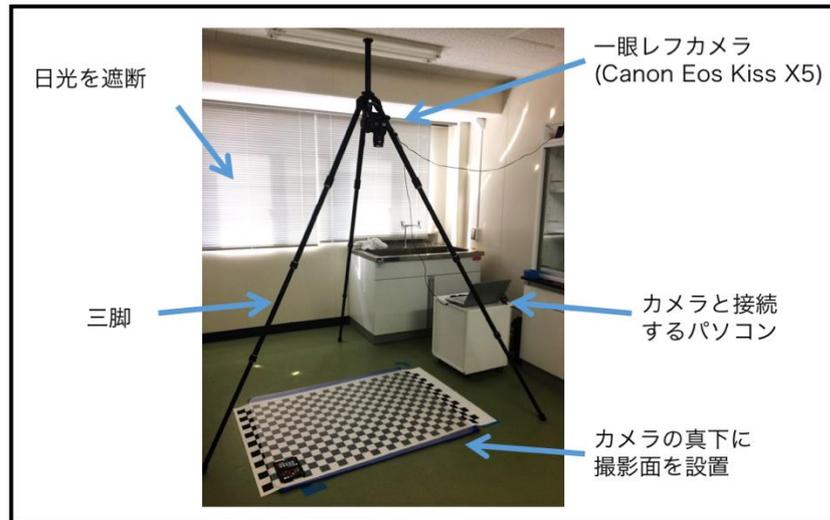


Fig 1 撮影装置

から無償でダウンロードできる。このアプリを使用すると、どのように撮影されるかをパソコン上で見ながらシャッターを押すことができる。また、カメラをコンセント給電しながら撮影できるようにし、バッテリー交換不要にした。この撮影装置により、三脚の下にあらかじめ並べておいた葉を設置すれば撮影を行うことができる。さらに、葉を切り取る人、並べる人、撮影する人など分業を行うことができ、アルバイトを雇い人手を増やせば高速に画像取得をすることができる。今回の計測では 7 人 3 日間で 200 個体以上計測ができた。

今回の画像取得作業と通常の手計測作業を比較しよう。手計測をする際、計測のマニュアルをもとに多くの人手で分担することが多い。しかし、マニュアルに載っていない事態が多発し、現場が混乱し、うまく計測作業が進まないことがある。例えば、葉の長さや幅を計測するだけでも、「葉の先が 2 つに分かれている葉はどうするのか?」「幅の計測が人によって一番太い部分か真ん中か違って計測していたことが休憩時に発覚」などの問題が発生する。これは計測マニュアルの表現型の定義が曖昧であったり、定義の例外が出たりするせいである。しかし、今回のように画像解析を活用する場合は作業の時はとりあえず写真だけとっておけばよく、表現型については後で写真を見ながら考えることができる。実際、今回の撮影作業時に大きな混乱はなかった。ただ、シャッターを切る人は画像解析に慣れている人が行い、画像解析に耐えうるクオリティか確認しながら作業を進めるのが良いだろう。

撮影条件は以下のように整えた (Fig 2)。上位葉 (穂に近い葉) から下位葉 (地際に近い葉) まで左から順に葉先が上に、葉元が下になるようにならべた。葉を並べる際は葉同士が重ならないようにし、葉が丸まらないように葉の裏をテープで止めている。背景を青で統一し、一枚の写真に 1 個体とした。どの写真がどの系統かわかるように系統名をホワイトボードに書き、写真に入れた。スケールがわかるものとして赤い直径 2 cm のシールを背景に貼った。葉が波打つのを抑えるために透明な板を重石として乗せている。

今回、このような撮影条件にしたのは撮影条件の基本である「情報の消失が少なくなるようすること、条件を整えて条件を全写真で統一すること」と撮影状況のバランスを加味した結果である。今回の撮影条件でうまく行くのか、予め数枚写真で予備実験して条件検討しておく方が良いだろう。その際、自らの画像解析スキルに合わせた撮影条件にしておくことが重

要である。

まず、情報の消失が少なくなるようにするには並べること、スケールを入れることが大切である。今回は上位葉から下位葉を並べた。これにより葉の位置についての情報が写真にあることになる。スケールは定規だけでなく、画像処理上使いやすい円の直径や、チェッカーボード（市松模様）を使って欲しい。画像処理では線を扱うのは難しく、定規のメモリは線であるためである。また線に太さがあるため、正確に長さを測るのに向かない。色味の解析をする場合はカラースケールを入れるのを忘れないで欲しい。今回は写真番号と系統の対応関係の情報が無くならないように写真の中に系統名を入れた。画像解析の技術がない場合は無理に系統名を入れなくてもいいが、写真の中に入れてしまったほうがリスクは少ないように思われる。

また、条件を整えて条件を全写真で統一する理由は画像解析をしやすくするためである。それに加えて後から別の表現型を計測したくなった場合にも有効である。今回、著者はカメラのホワイトバランス設定をオートにしてしまい、色味の条件が写真によってやや異なっている。これにより、色の濃さの解析がやや難しくなった。カメラの設定はオートにせず、マニュアルで設定して全写真で統一したほうがよい。しかし、場合によっては条件を統一できない場合がある。野外での撮影は光の強さが変わるため、シャッタースピード等をオートにして写真の白飛び（光を感知しすぎて写真の一部が白く潰れてしまうこと）を防ぐ方がいいだろう。画像解析の煩雑さを増すが白飛びすると表現型を取り出すことすらできなくなるのでそれよりは良い。条件を統一するほど計測は煩雑になり、画像解析は簡単になり、表現型計測は精密になると言う関係性にあることを心に止めて、最適な条件を検討すべきだろう。

画像取得の際に著者が考慮する具体的な項目は、どの機材で画像を取得するか、個体あたりの計測時間、分業のしやすさ、背景色、光源、機材設定（レンズ、ズーム、シャッタースピード、絞り、ISO、ホワイトバランス、フラッシュ、画像サイズ、画像の保存形式）、スケールを何にするか、どう並べるか、自力で画像解析可能か、計測したい表現型がきちんと写真から確認できるか、である。

撮影機材は主に一般的に流通しているカメラかスキャナのどちらかを使用している。カメラは今回のように大型のものも瞬時に画像取得することができ、持ち運びもスムーズである。また、レンズや設定を適切に調節することで様々な大きさ、厚みを持つ撮影対象にも対応が簡単である。しかし、レンズの魚眼効果により画像の端に歪みが生じたり、ピクセル数と実際の大きさの対応を後付けする必要があるったり、照明や撮影設定を調節しないと色の解析が難しいなどの問題がある。スキャナはdpiの情報があるため、大きさの補正を必要とせず、魚眼効果による歪みもなく、光源もスキャナと一体となっている

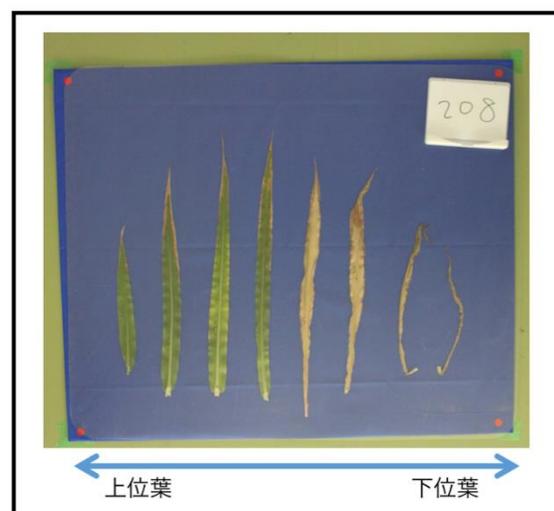


Fig 2 撮影条件
ホワイトボードに書いてある数字は系統名を示す。
背景の角にある赤丸は直径2cmのスケールである。
上位葉から下位葉まで左から順に葉を並べた。

ため、画像解析がしやすい。しかし、読み取り面から離れるとボケるため厚みのある場合は適さず、大きすぎると読み取り時間がかかる。カメラに比べて持ち運びに適さない機材が多いのも難点である。

光源は種類と位置に注意する。太陽光は時間とともに変化するのでそれに応じた画像の補正が必要になってくる。人工光は写真内に光の反射や影が発生しない位置におく。光の反射は画像解析を困難にするので反射しやすい素材を画像に入れないことも大事である。

画像の保存方式はできるだけ情報を保持できるものを選ぶ。画像の保存形式には画像を圧縮する形式 (JPEG 形式など) と圧縮しない形式 (TIFF 形式など) がある。圧縮すると輪郭部分が曖昧になるので圧縮しない形式を勧める。また、センサーの情報をそのまま保存する RAW データも保存できるならした方がよい。今後さらに現像方法が良くなってより良い画像を得られる可能性があるからである。

シャッタースピード、絞り、ISO はそれぞれが関連する重要なカメラ設定である。この 3 つをうまく調節してブレがなく、解析対象にピントが合い、黒つぶれも白飛びもない画像が取れるように調節する。

画像取得に関して補足的な内容にはなるが、撮影画像は数百枚にのぼり、管理方法が問題となる。どの画像が何を写したものが分からなくなることをのまないようにしたい。著者は画像のファイル名を「撮影年度_系統番号.tiff」となるように名前の変換表を作り、プログラムによる一括変換を行った。ピンボケなど撮影に失敗した写真は「reject 撮影年度_系統番号.tiff」としてファイル名で区別がつくようにした。その後の画像解析に使用する写真を 1 つのフォルダにいった。これにより、画像解析で一括処理がしやすくなり、ファイル名と表現型値を表データとして出力すると系統と表現型値の対応がつくようになった。数百枚を手動で名前変更をすると表記揺れ、タイプミスが発生するので避けたい。

2-1-2. 画像処理による表現型値の取り出し

三脚の高さが変わると写真によって 1 cm あたり何ピクセルかバラバラになる。よって、画像処理による大きさの補正を行った。MATLAB の Camera Calibrator Toolbox を利用した。三脚を動かすたびに交点間距離が 50 mm のチェッカーボードを撮影した。そして、チェッカーボードの交点間が 150 ピクセルになるようにホモグラフィ変換 (Hartley and Zisserman 2003) を作った。どの画像がどの位置の三脚だったかに対応したホモグラフィ変換を行い、全ての画像で 150 ピクセルを 50 mm として扱うことができるようにした。もしこのような画像解析を行う技術がないのであれば三脚を絶対に動かさず、完全に真下を向くようにしてカメラで撮影するか、スキャナーで dpi の設定を固定にしてスキャンするのがよい。スケールとして入れている赤い直径 2 cm のシールが画像上で 600 ピクセルになっていることを確認した。600 ピクセルからどれくらいずれているかを見れば今回の実験の精度を確認できる。このように目的の画像解析をする前に画像の補正を行うことを画像の前処理と呼ぶ。今回は行っていないが、レンズの魚眼効果の補正、照度の補正、色味の補正、部分切り出しなどを必要に応じて前処理する。撮影条件と求める測定精度によってこれらの前処理の必要性が決まる。

量的形質を取り出すための画像解析は目的の部分以外を黒くしたマスク画像から行うのが一般的である。画像上のどのピクセル部分がどのオブジェクトに対応しているかを処理する

ことを画像のセグメンテーションという。画像のセグメンテーションをして目的以外を黒くすればマスク画像ができる。画像のセグメンテーションは画像解析の一大分野であり次々に新しいセグメンテーション手法が提案されている。画像の特徴によってうまくいくセグメンテーション手法は異なるので「画像 セグメンテーション」で Web 検索して色々な手法を理解して実践すると良いだろう。今回は MATLAB の Image Processing Toolbox を利用し色の閾値処理によってセグメンテーションした。背景が青色であるため青いピクセルに囲まれているオブジェクトが葉であるとするのでマスク画像を作成した。

マスク画像作成には 3 つのポイントがある。1 つ目は処理の仕方である。画像処理は全ての画像に同じ処理を for 文で行うと一番労力がかからない。そのためには撮影時に全写真で条件を統一した部分を軸にして解析するとうまく行くことが多い。条件を統一しているので同じ処理によって同じ効果を得られる可能性が高いからである。今回の場合、緑色やベージュ色が葉であるとしてしまうと葉の赤い着色がある部分が背景とされてしまう。遺伝解析を行う際は表現型にバリエーションがあるため全てのバリエーションに対応した処理を考えるのはやや難しい。できるだけ例外が発生しないような処理を考えるとうまく行くことが多い。統一した処理をするのが難しい場合はグラフカット手法 (Rother *et al.* 2004) による半自動セグメンテーションを活用するのがいいだろう。マスク画像作成がうまくいかない場合は画像の前処理を行うと良い場合もある。それでもうまくいかない場合は Adobe Illustrator などのペイントソフトで手動で領域指定するか、画像を撮影し直すのが良い。何枚かうまくいかない程度であればそれらは欠測値として扱う。2 つ目はマスク画像の精度である。マスク画像の精度は目的によって許容できるものが異なる。面積を求めたいのであれば先端等がやや欠けていてもおおよそ面積は誤差の範囲で変わらないので問題ない。輪郭を求めたいのであれば、先端が欠けると輪郭形状としては大きな違いとなるので許容できない。3 つ目は目視による確認である。マスク画像を作成できたら、まずは人間の目でどのような表現型があるかを確認すると良い。マスク画像には背景などの余計な情報がなく、全ての個体を同じ条件下で高速に何度でもみることが出来るからである。普段は気がつかなかったバリエーションに気がついたり、明らかに異常な個体がないかチェックしたりできる。

本研究では high-resolution phenotyping を目指し、明確な定義で網羅的に計測をした。まず、葉一枚ずつの解析を可能にするため個葉ごとに別々の画像として保存した。具体的にはオブジェクト解析 (Haralick *et al.* 1992) によって自動的に個葉を検出し、左から順に、つまり止葉から順に 1 から番号を振り保存した。2016 年は合計で 1845 枚の葉があった。保存した葉一枚の画像から欲しい表現型値を取り出した。まず、葉一枚の画像を上下に分割し、葉の上半分の葉先の表現型を取り出す場合と、下半分の葉元の表表現型を取り出す場合と、分割せずに一枚の葉全体から表現型を取り出す場合の 3 通りを適用した。これを葉のどの部分から表現型を取り出したかと呼ぶことにする。次に、色の閾値を設定し、閾値を超えた部分のピクセル数を面積とした。全ての色のピクセル数を葉面積、緑色のピクセル数を緑面積、緑色以外のピクセル数を枯面積、赤色のピクセル数を赤面積とした。また、葉面積から緑面積を葉面積で割ったものを緑割合、赤面積を葉面積で割ったものを赤割合とした。また、緑割合が 10%に満たない葉は枯れていると判定した。これにより、葉一枚ごとの表現型値を得ることができたが、QTL 解析を行うには系統ごとの表現型値を得る必要がある。今回は 1 系統

1 個体であるので個体内の合計なのか平均なのかといった統計量を求めることで葉一枚ごとの表現型値から系統ごとの表現型値を求めた。さらに、その際に枯れていると判定した葉を取り除くか、のぞかずに全ての葉を使うかの2通りを適用した。また、止め葉の表現型値なのか、止め葉以外の葉の表現型値なのか、止め葉も含めて全ての葉を使うのかの3通りも適用した。以上のように表現型を計測したため、形質数が掛け算方式に増えた。何年の栽培か、枯葉を含めるか、止め葉を含めるか、葉のどの部分か、どの色のピクセル数または割合か、個体内の合計なのか平均なのかといった統計量によって表現型が評価された。つまり、2016年の枯葉を除く主茎の葉全ての一枚全部の葉面積の合計、つまり2016年の枯葉を除く総葉面積というふうに表現型が取り出された。全部で490形質であった。

今回のように画像解析を活用することで網羅的に表現型を計測することができる。しかし、それでも今回の画像解析では計測できなかった表現型がある。例えば光合成効率や受光体制について興味がある場合は今回の計測では主茎と葉の角度の情報がない。今回は破壊調査で葉を切り取ったからである。主茎と葉の角度の情報を画像取得段階で失っているため画像解析をしても計測することができない。画像の撮影の際にどのような情報消失が起きてしまうのかがあらかじめ分かっているならば画像解析以外の手法で（大抵の場合は手作業で）計測することを勧める。対照的にうまく表現型計測ができたものもある。一枚の葉の画像を上半分、下半分に分割するだけで葉先と葉元に分割することができたのは全ての葉で向きを揃えておいたからである。葉先と葉元に分割したのはどの肥料が不足するかによっては先から枯れるか、元から枯れるかが変わると知っているからだ。つまり、葉先と葉元では異なる情報を持っていることを知っている。生育した植物を見て植物がどんな情報を持っているか考えてそれらが失われないように撮影し、画像解析で表現型を取り出すことが大切である。情報が失われないようにするにはランダムにしないで揃えて並べるのが基本である。著者はこれができるのは日頃から植物に接している人、植物に造詣が深い人だと考えている。植物の表現型にどんな意味があるのか。これをよく理解しているからこそより良い表現型計測をできる。

2-2. 画像解析の長所

ここで、表現型計測に画像解析を活用する利点について述べる。今回の画像解析では特殊なことはしていない。画像処理の入門書に書いてある処理しかしていない。その上、プログラミングも Web で手に入るサンプルコードをつなぎ合わせて入力を今回の写真に変えるぐらいしかしていない。「画像解析は敷居が高い」と思う読者もいるかもしれないが、それはすでに手元にある画像で画像解析を行おうとするからである。自らが画像解析を行うことを前提として自ら写真をとれば画像解析は簡単にできる。というよりも自らの画像解析スキルでできる範囲の画像を取得するように心がけるようにすべきである。自分のスキルに合わせて柔軟に取り入れられるのが画像解析のいいところである。

達観による評価と今回の表現型計測を比較する。達観による評価では難しいほど多数の表現型を評価することができた。また、達観では区別の難しい緑面積と緑色割合を別々のものとして評価することができた。葉一枚一枚の緑色割合と緑面積の散布図 (Fig 3) をみるとこの2つは全く異なる表現型であることがわかる。また、面積や割合をスコアリングではなく

連続値で絶対評価することができた。画像解析を活用することでレゾリューションの高い計測が可能となる。

今回の計測でかかったコストについて見る。計測の際にかかるコストとして葉を切って並べるのに7人の人手を必要としたが、計測期間は3日で済む。カメラや三脚も特殊なものを使用していないので他の実験への汎用性が高く、価格も安い。また、画像解析も今回はそこまで特殊な解析をしていないので通常の Mac mini で解析できる。画像解析ソフトは有料の MATLAB を使用しているが、無料の open CV を使用しても問題ない。MATLAB を使用しているのは公式のサンプルコードやアプリが充実しており、プログラミング労力コストが低く済むからである。画像解析を活用した表現型計測のコスト的なハードルは低いといえる。

3. 計測した表現型を解析する。

画像解析を使うことでたくさん計測ができたが、これは生データを手に入れたということであってこれがすなわち結果というわけでない。データ解析をして結果を見て考察しなくてはならない。これは基本的な事だが、実験計画作成段階で使用予定の解析手法についての基本的な知識は得ておいたほうが良い。適用できる条件や手法の限界、必要とする生データの形式を理解する事で解析可能な生データを得ることができる。今回の研究では 209 行 490 列の表現型データと 209 行 1799 列のゲノムワイド DNA 多型マーカーの関連を解析する。しかし、どのように解析したらいいのだろうか？ここからは大量の表現型データを手に入れた後の解析方法について紹介する。今回はたくさん計測をしたいということで画像解析をした。しかし、たくさん計測するという事は一体どういうことなのだろうか？

まず、たくさん「個体」を計測する場合である。これは high-throughput phenotyping の発想である。表データでは行数を増やすことに当たる。すると統計学的な検出力の向上と計測の労力の削減につながる。もしも high-throughput phenotyping によって測定誤差が増えるのであればそれによる統計学的な検出力の低下と天秤にかける必要がある。

次に、たくさん「表現型」を計測する場合である。これは high-resolution phenotyping の発想である。表データでは列数を増やすことに当たる。すると検定回数が増え、多重比較の問題が発生する。また、解析結果の数が増え、考察が大変になる。さらに、相関の強い形質をたくさん計るだけとも見ることができデータを水増ししているだけとも見て取れる。いい結果となった表現型だけを論文にすることは統計学的に推奨されない。つまり、たくさん表現型を測定する場合は何らかの工夫をする必要がある (Granier and Vile 2014)。このようなたくさん表現型を解析する解析は多変量解析、オーム解析、オミックス解析と呼ばれる。一般的に多変量解析は勉強

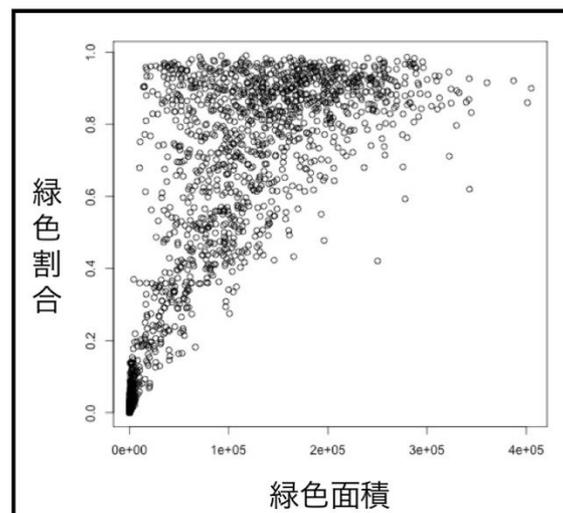


Fig 3 葉ごとの緑色割合と緑色面積
各点は葉1枚を示す。画像解析によって得られた葉全てをプロットした。縦軸は各葉の緑色面積を、横軸は各葉の緑面積を表す。

して使えるようになることも実際のデータに適用して解析することも難易度が高めである。その上、個体数が限られている場合はさらに難易度が上がる。もしも **high-resolution phenotyping** をしようとしている場合は統計学がわかる人が研究チームにいないと生データを解析することすら困難、論文化しようとしても解析の問題点を指摘される事態になる。

形質が複数ある時の QTL 解析手法を調べたところ、そのような手法はあったが (Topp *et al.* 2013, Alimi *et al.* 2013, Li *et al.* 2006) 条件検討の結果、今回の事例では使うことができなかった。実はこれは著者が予想していなかった事態である。大抵の QTL 解析では複数の形質について議論されることが常であるので今回の事例にあった既存手法はすでにあると思込んでいた。そこで、著者は手法を開発することにした。もし作れない場合はどうすればいいのだろうか？それには 3 つの行動が考えられる。一つ目は気合を入れて数多くの結果を見て解釈することである。つまり、時間と労力で解決を図る行動である。二つ目は表現型相関の結果を見て相関が高い形質があれば片方を捨てたり、主成分分析等を使用したりして次元削減することである。つまり、問題の原因であるたくさんの表現型を減らすことで解決を図る行動である。三つ目は専門家に助けを求めることである。つまり、多変量解析を専門とする人に相談することである。また、先行研究の著者らに相談するも良いだろう。あるいは、視野を広げて異分野である統計学や情報学系の研究者や会社を頼ることも考えていだろう。また、専門家と組むことで誤った解析、解釈をするリスクを大幅に回避できる。有名な統計学者 R. A. フィッシャーの言葉に「実験が終わってしまった後で統計学者に相談をするのは、検死解剖をどのように行なえばよいかを尋ねるようなものだ」というものがある。生データの取り方によって使える多変量解析手法が変わるので、できれば実験計画作成段階から専門家に相談してほしい。本当は日頃からコツコツと多変量解析の勉強をして手法適用、開発ができるようにすることが望ましいだろう。生データを取得してから多変量解析の学習をすると論文化するまでに莫大な時間がかかるので勧めない。生データを取得してからはその時点で持っている知識で既存手法を簡単に改良する程度にとどめたい。

今回の研究では著者が提案する QTL 解析手法で 15 領域の QTL を検出することができ、それぞれがソルガムの葉形態に対してユニークな効果を持つことが確認できた。詳細な QTL 解析手法については現在論文執筆中であるためここでは述べない。

4. まとめ

画像解析を活用し主観を挟むことなく大量の表現型の計測を行うことができた。データの質と量を画像解析で高めることができる。そのためには入念な撮影条件の設定、データ解析の素養が不可欠であると言えよう。

謝辞

本稿で紹介した研究を遂行するにあたり東京大学大学院農学生命科学研究科の岩田洋佳准教授には指導教官として数々のご指導をいただいた。また同研究科の鐘ヶ江弘美特任助教、石森元幸博士には遺伝解析の具体的な方法やソルガムの遺伝子やデータベース等をご指導いただいた。また同研究科の藤本優准教授、高梨秀樹助教、堤伸浩教授にはソルガムの表現型についてのアドバイス、ソルガムの遺伝子についての情報提供、計測計画の作成、計測方法

についてご指導いただいた。岡山大学資源植物科学研究所の坂本亘教授，大西紀和助教，小童谷利恵氏には組替え自殖系統の作出と栽培，ソルガムの表現型についてのアドバイス，ソルガムの遺伝子についての情報提供していただいた。九州大学大学院，JST・PRESTOの野下浩司博士には画像取得のコツ，画像解析の手法についてご指導いただいた。明治大学農学部的小林正明博士，矢野健太郎教授には組替え自殖系統のDNA多型マーカーを提供していただいた。本稿で紹介した研究はJST,CREST「葉緑体機能改変によるステイグリーン植物の創出」(JPMJCR11B2)および「高速ジェノタイピングを利用したエネルギー作物のテーラーメイド育種技術の開発」(JPMJCR12B5)およびJSPS，科研費，特別研究員奨励費「作物形態の定量化とゲノムとの関連の解析」(17J05431)の支援を得て遂行した。

引用文献

- Andrade-Sanchez, Pedro, Michael A. Gore, John T. Heun, Kelly R. Thorp, A. Elizabete Carmo-Silva, Andrew N. French, Michael E. Salvucci, and Jeffrey W. White. 2014. Development and Evaluation of a Field-Based High-Throughput Phenotyping Platform. *Functional Plant Biology* 41 (1): 68–79.
- Araus, José Luis, and Jill E. Cairns. 2014. Field High-Throughput Phenotyping: The New Crop Breeding Frontier. *Trends in Plant Science* 19 (1): 52–61.
- Cobb, Joshua N, Genevieve Declerck, Anthony Greenberg, Randy Clark, and Susan McCouch. 2013. Next-Generation Phenotyping: Requirements and Strategies for Enhancing Our Understanding of Genotype – Phenotype Relationships and Its Relevance to Crop Improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 126:867–887.
- Crowell, S., A. X. Falcao, A. Shah, Z. Wilson, A. J. Greenberg, and S. R. McCouch. 2014. High-Resolution Inflorescence Phenotyping Using a Novel Image-Analysis Pipeline, PANorama. *Plant Physiology* 165 (2): 479–95.
- Crowell, S., Pavel Korniliev, Alexandre Falca, Abdelbagi Ismail, Glenn Gregorio, Jason Mezey and Susan McCouch. Genome-wide association and high-resolution phenotyping link *Oryza sativa* panicle traits to numerous trait-specific QTL clusters. *Nature Communications*. 7:10527
- Granier, Christine, and Denis Vile. 2014. ScienceDirect Phenotyping and beyond: Modelling the Relationships between Traits. *Current Opinion in Plant Biology* 18: 96–102.
- Kim, Song Lim, Nita Solehati, In Chan Choi, Kyung Hwan Kim, and Taek Ryouon Kwon. 2017. Data Management for Plant Phenomics. *Journal of Plant Biology* 60 (4): 285–97.
- Li, Lei, Qin Zhang, and Danfeng Huang. 2014. A Review of Imaging Techniques for Plant Phenotyping. *Sensors* 14:20078–111.
- Li, Renhua, Shirng-wern Tsaih, Keith Shockley, Ioannis M Stylianou, Jon Wergedal, Beverly Paigen, and Gary A Churchill. 2006. Structural Model Analysis of Multiple Quantitative Traits. *Plos Genetics* 2 (7): e114.
- Rother, C., Kolmogorov, V., Blake, A. 2004. “GrabCut” — Interactive Foreground Extraction using Iterated Graph Cuts. *ACM Transaction on Graphics* 70(2): 109-131.
- Topp, Christopher N, Anjali S Iyer-pascuzzi, Jill T Anderson, Cheng-ruei Lee, and Paul R Zurek. 2013. 3D Phenotyping and Quantitative Trait Locus Mapping Identify Core Regions of the Rice Genome

- Controlling Root Architecture. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 110 (18): E1695-E1704
- Wubs, M, N A Alimi, M C A M Bink, J A Dieleman, E Heuvelink, J Magan, R E Voorrips, et al. 2013. Genetic and QTL Analyses of Yield and a Set of Physiological Traits in Pepper. *Euphytica* 190:181–201.
- Younes, Mamoun, Lia V. Lechago, Jacqueline R. Somoano, Moni Mosharaf, and Juan Lechago. 1996. Wide Expression of the Human Erythrocyte Glucose Transporter Glut1 in Human Cancers. *Cancer Research* 56 (5): 1164–67.

気孔画像データベース LIPS の拡充

檜垣 匠

熊本大学 国際先端科学技術研究機構
〒860-8555 熊本県熊本市中央区黒髪 2-39-1

Takumi Higaki

Renewal of the LIPS database

Keywords: Cytoskeletons, Guard Cells, Image database, Organelle, Stomata
International Research Organization for Advanced Science and Technology, Kumamoto
University, 2-39-1 Kurokami, Chuou-ku, Kumamoto 860-8555, Japan
DOI: 10.24480/bsj-review.10b5.00158

1. はじめに

これまで筆者らはライブセルイメージングと顕微鏡画像解析技術を駆使して、気孔開閉運動における細胞内構造の動態に関する研究に取り組んできた。シロイヌナズナ孔辺細胞におけるアクチン繊維の共焦点画像を多量に取得し、画像処理によってアクチン繊維が織り成す高次構造（配向、束化、密度）を定量評価したところ、気孔開閉に応じてアクチン繊維構造がダイナミックに変化することを見出した (Higaki *et al.* 2010, 檜垣 *et al.* 2011, Shimono *et al.* 2016)。植物細胞においてアクチン繊維はさまざまな細胞内構造の動態を制御しているため、アクチン繊維の他にも気孔開閉に伴ってダイナミックな挙動を示す細胞内構造の存在が示唆された。そのような細胞内構造を見出すため、各種の細胞内構造が蛍光標識されたシロイヌナズナの形質転換ラインを利用して画像解析に基づく網羅的な統計的局在解析を実施した (Higaki *et al.* 2012)。その結果、小胞体など複数の細胞内構造が気孔開閉運動に応じた局在変化を示すことが明らかになった。この各種細胞内構造の統計的局在解析の詳細については、既に和文誌「バイオイメージング」において「植物の孔辺細胞をモデルとした蛍光タンパク質の統計的局在解析」という総説をオンライン公開しているので、ご興味を持たれた方は是非そちらの和文総説もご一読頂きたい (檜垣 2014)。

さて、上述した研究の過程で撮影条件を標準化して多様な細胞内構造の共焦点顕微鏡画像を多数取得した。このように撮影条件が標準化された顕微鏡画像データセットは本来の研究目的の範疇を超えて、より広範な生物画像解析学研究的の推進（例えば、画像分類ソフトウェアの開発や性能評価）に有益と考えられた。そこで、取得画像群を顕微鏡画像データベース LIPS (Live Images of Plant Stomata) として纏め、筆者が当時在籍していた東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻・馳澤盛一郎研究室のウェブサーバで公開してきた (Higaki *et al.* 2013)。最近、馳澤教授の退職と筆者の異動に伴い、本データベースを移設するとともに、新たな処理画像と検索機能を付してウェブページのデザインも刷新した。新しい LIPS データベースは <https://www.higaki-lab.net/lips/> (熊本大学の当研究室のホームページのトップ画面にもリンクを貼っているのでご覧頂ければ幸いです) にて運用している。そこで本稿では、新しい LIPS データベースについて概説し、その画像解析への適用例を紹介する。

T. Higaki-1

2. LIPS データベース

LIPS データベースでは 18 種類の蛍光プローブ (表 1) によって各種細胞内構造が蛍光標識されたシロイヌナズナ孔辺細胞の明視野および蛍光の連続光学切片像 (原画像) に加えて、9 種類の処理画像を公開している (図 1)。原画像はすべて播種後 4-5 週目の成熟葉の背軸側表皮組織を剥離し、スピニングディスク式共焦点顕微鏡を用いて 100 倍の油浸対物レンズで取得したものである。より詳細な植物の栽培条件や画像の撮影条件の詳細は原著論文を参照されたい (Higaki *et al.* 2012, 2013)。なお、植物の栽培から画像の取得に至るすべての工程は筆者ひとりで行ったものである。そのため、顕微鏡画像が持つ属人性 (朽名 2014) の観点からも本データベース画像は高度に標準化された画像データセットであるといえる。なお、営利目的でない限り、本データベースの画像はすべて無償で自由に利用できる。

表 1. LIPS データベース画像の可視化対象.

蛍光プローブ	細胞内構造	参考文献
HistoneH2B-RFP	細胞核	Hayashi <i>et al.</i> 2007
GFP-tubulin	微小管	Abe and Hashimoto 2005
GFP-EB1	微小管プラス端	Mathur <i>et al.</i> 2003
GFP-ABD2	アクチン繊維	Higaki <i>et al.</i> 2010
GFP-mTn	アクチン繊維, 細胞核	Saito <i>et al.</i> 2005
Mt-GFP	ミトコンドリア	Nelson <i>et al.</i> 2007
CT-GFP	葉緑体	Holzinger <i>et al.</i> 2007
自家蛍光	葉緑体	-
GFP-PIP2a	細胞膜	Cutler <i>et al.</i> 2000
GFP-ER	小胞体	Gardner <i>et al.</i> 2009
YFP-inserted MFP2	ペルオキシソーム	Tian <i>et al.</i> 2004
ARA6-GFP	エンドソーム	Goh <i>et al.</i> 2007
GFP-VAMP727	エンドソーム	Ebine <i>et al.</i> 2008
ERD2-GFP	ゴルジ体シス槽, 小胞体	Boevink <i>et al.</i> 1998; Takeuchi <i>et al.</i> 2002
XYLT-YFP	ゴルジ体メディアル槽, 小胞体	Dirnberger <i>et al.</i> 2002
ST-mRFP	ゴルジ体トランス槽, 液胞内腔, アポプラスト	Robinson <i>et al.</i> 2008; Akita <i>et al.</i> 2017
GFP-VAM3	液胞膜	Uemura <i>et al.</i> 2004
GFP- δ TIP	液胞膜, 小胞体	Cutler <i>et al.</i> 2000

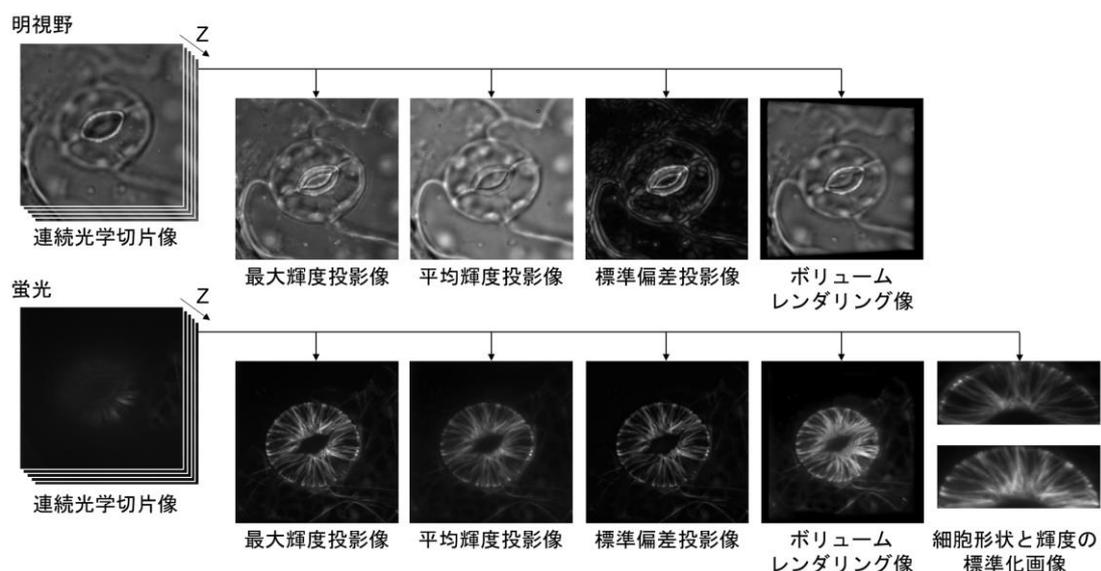


図 1. LIPS データベースで公開している画像の種類. 例として微小管の画像を示した.

LIPS データベースの検索画面 (図 2) では、画像の種類 (図 2, Image Type; 11 種類から単一選択) (図 1) と蛍光プローブ (図 2, Probes; 18 種類から複数選択可) (表 1) を選択できる。また、すべての画像には気孔開度の計測値が付されており、気孔開度による絞り込みもできる (図 2, Stomatal aperture)。任意の条件を設定して、画面下の「Search」をクリックすれば検索結果が表示される (図 3, 4)。このとき表示される該当画像の順序は画像 ID (撮影時の順序に基づくもので生物学意味は乏しい) と気孔開度 (Aperture) (開度の低い順) の 2 種類から選ぶことができる (図 2, Order By)。このような気孔開度に基づく画像の絞り込み・整列機能は、気孔開閉と細胞内構造の関連を調べる場合に有益と考えられる。

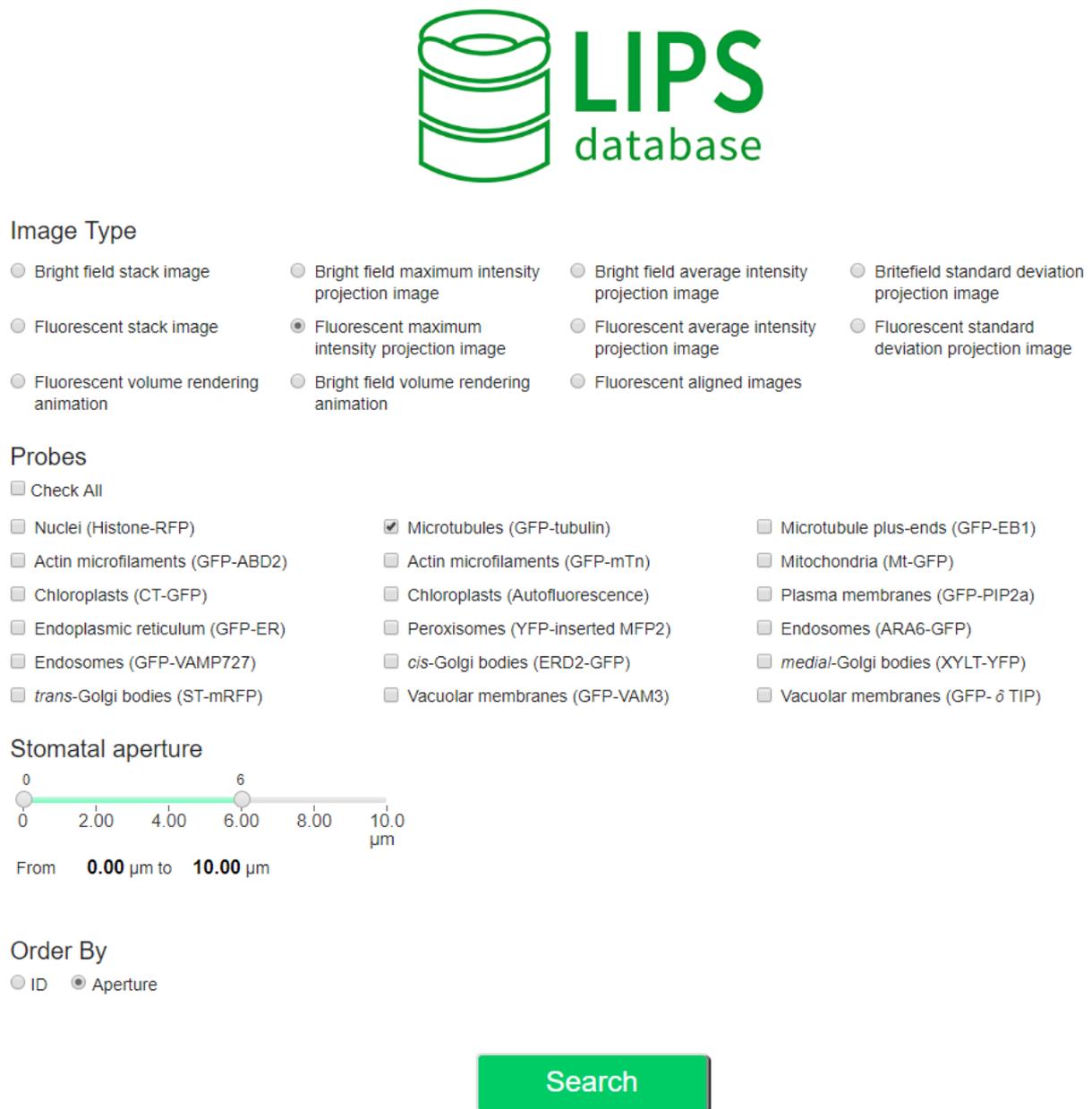


Image Type

- Bright field stack image
- Bright field maximum intensity projection image
- Bright field average intensity projection image
- Britefield standard deviation projection image
- Fluorescent stack image
- Fluorescent maximum intensity projection image
- Fluorescent average intensity projection image
- Fluorescent standard deviation projection image
- Fluorescent volume rendering animation
- Bright field volume rendering animation
- Fluorescent aligned images

Probes

Check All

- Nuclei (Histone-RFP)
- Microtubules (GFP-tubulin)
- Microtubule plus-ends (GFP-EB1)
- Actin microfilaments (GFP-ABD2)
- Actin microfilaments (GFP-mTn)
- Mitochondria (Mt-GFP)
- Chloroplasts (CT-GFP)
- Chloroplasts (Autofluorescence)
- Plasma membranes (GFP-PIP2a)
- Endoplasmic reticulum (GFP-ER)
- Peroxisomes (YFP-inserted MFP2)
- Endosomes (ARA6-GFP)
- cis*-Golgi bodies (ERD2-GFP)
- Endosomes (XYLT-YFP)
- Endosomes (GFP-VAMP727)
- trans*-Golgi bodies (ST-mRFP)
- Vacuolar membranes (GFP-VAM3)
- Vacuolar membranes (GFP- δ TIP)

Stomatal aperture

0 2.00 4.00 6.00 8.00 10.0 μ m

From **0.00 μ m** to **10.00 μ m**

Order By

ID Aperture

Search

図 2. LIPS データベースの検索画面。

検索結果として表示されるサムネイル画像の下には虫眼鏡のアイコンが表示される（図 3, 4）。この虫眼鏡アイコンをクリックすればウェブブラウザ上で高解像度の画像を閲覧・確認することができる。投影像あるいは標準化画像（いわゆる XY 画像）の場合、サムネイル画像の左上に表示されるチェックボックスにチェックを入れ、画面下の「Download」をクリックすれば、選択画像の TIFF ファイルがダウンロードされる（図 3）。連続光学切片像あるいはボリュームレンダリング像（いわゆる XYZ 画像）の場合、サムネイル画像の下に表示される「GIF」あるいは「TIFF」のアイコンをクリックすれば、該当の画像が GIF アニメーションファイルあるいはマルチページ TIFF ファイルとしてダウンロードされる（図 4）。

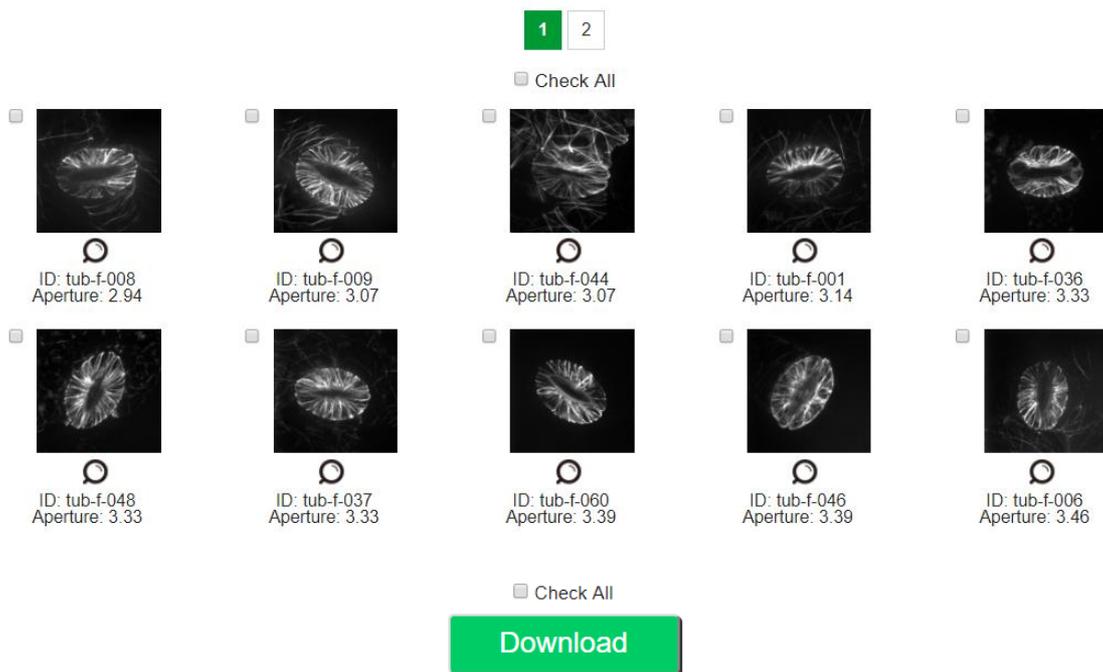


図 3. LIPS データベースにおける投影像の検索結果の一例.

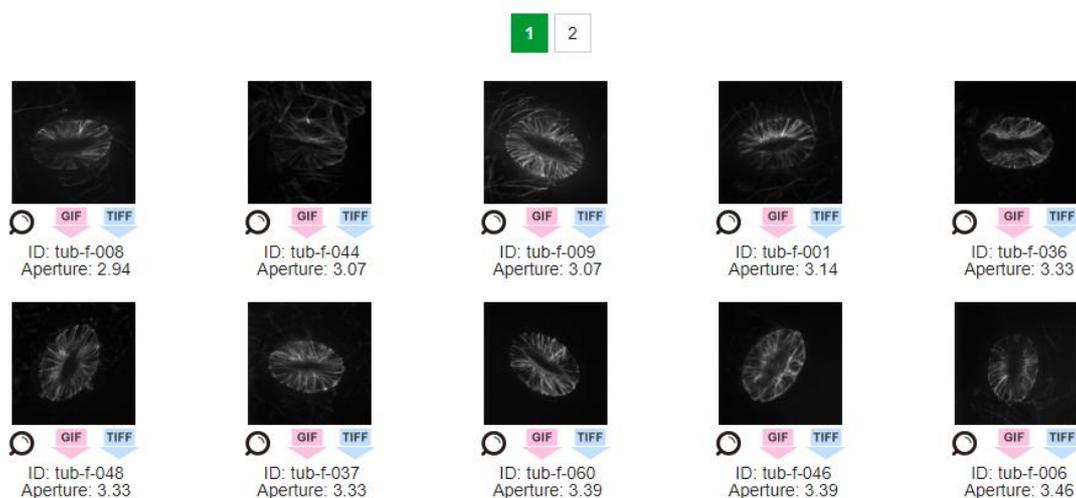


図 4. LIPS データベースにおけるスタック画像の検索結果の一例.

3. LIPS データベース画像のクラスタリングと分類

最後に LIPS データベースを用いた画像解析の一例を紹介したい。筆者らの研究グループは生物・医用画像の汎用的な分類に有用な画像特徴量セット Kbi296 を報告している (Kutsuna *et al.* 2012)。この画像特徴量セットに基づいて 18 種類の蛍光プローブの最大輝度投影像 930 枚を階層的クラスタリングしたところ (図 5, 樹形図), エンドソームやゴルジ体といった顆粒状構造, 細胞核や葉緑体といった球状構造, 微小管やアクチン繊維といった骨格構造, 小胞体や液胞膜といった巨大な膜系構造, といったように類似の構造体がまとまって分布することが確認された (図 5, 模式図と代表画像)。さらに, 画像群を 18 クラスに分類したところ (図 5, C1-18), 各クラスには同じ蛍光プローブの画像が高頻度に出現することも確認できた (図 5, 行列)。以上の結果は画像特徴量セット Kbi296 が蛍光標識された細胞内構造の分類・認識に有用であることを示唆している。

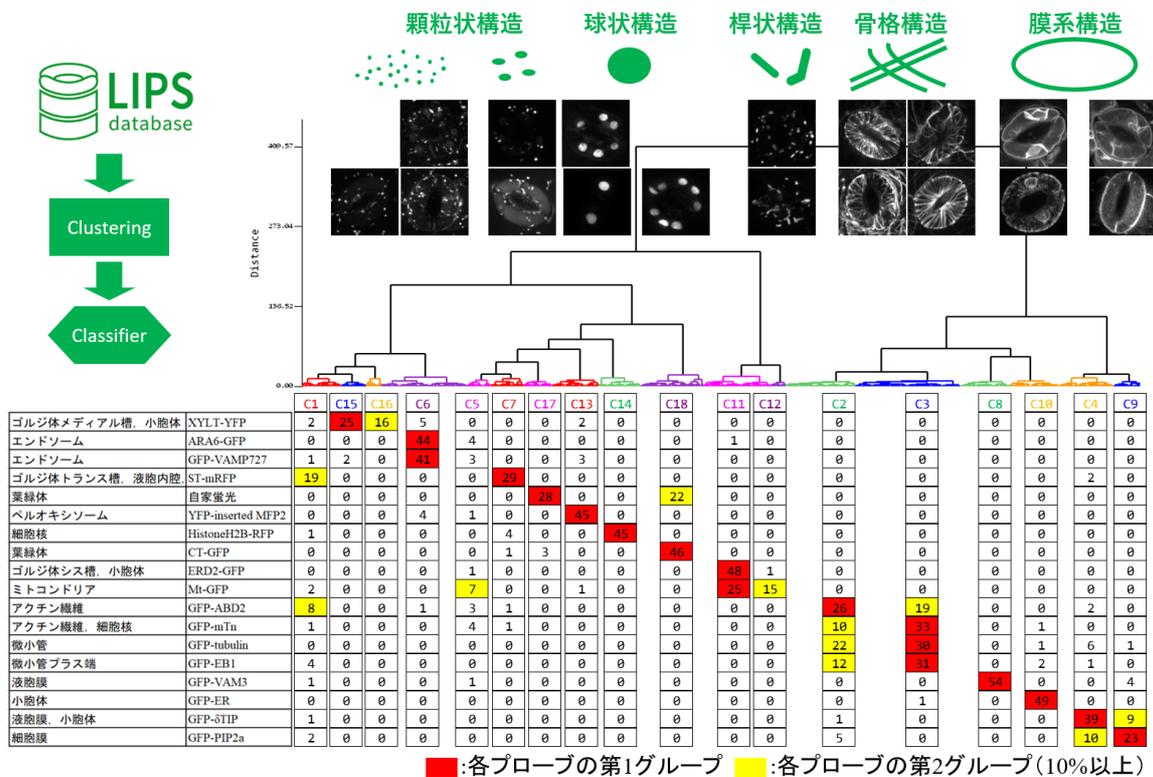


図 5. LIPS データベース画像のクラスタリング解析例。行列内の数字は画像数をあらわす。

4. おわりに

本稿ではリニューアルした LIPS データベースについて解説するとともに, 簡単ではあるが各種細胞内構造のクラスタリングおよび分類といった”オルガネラワイド”な解析例を紹介した。もちろん, 個別の細胞内構造に特化した画像解析にも適用できるので, まずはご興味をお持ちの細胞内構造の画像をウェブ上で眺めて頂き, 自由な発想で本データベースをご活用頂ければ幸いです。実際, 細胞骨格構造の抽出アルゴリズムの検証のために本データベース画像が使用された例も報告されている (Basu *et al.* 2015)。今後も, 本データベースが当該分野の発展のために利用されればこれ以上の喜びはない。

謝辞

本研究の共同研究者である東京大学大学院新領域創成科学研究科の馳澤盛一郎教授と朽名夏磨特任准教授に感謝申し上げます。また、新しい LIPS データベースのロゴマークは東京大学大学院新領域創成科学研究科の秋田佳恵特任研究員にデザインして頂いた。本研究はキヤノン財団の「産業基盤の創生」研究助成プログラム、日本学術振興会・科学研究費補助金挑戦的研究(萌芽)(17K19380)、新学術領域研究(研究領域提案型)(18H05492)の支援を受けた。

引用文献

- Abe, T. & Hashimoto, T. 2005. Altered microtubule dynamics by expression of modified alpha-tubulin protein causes right-handed helical growth in transgenic *Arabidopsis* plants. *Plant J.* 43:191–204.
- Akita, K., Kobayashi, M., Sato, M., Kutsuna, N., Ueda, T., Toyooka, K., Nagata, N., Hasezawa, S. & Higaki, T. 2017. Cell wall accumulation of fluorescent proteins derived from a *trans*-Golgi cisternal membrane marker and paramural bodies in interdigitated *Arabidopsis* leaf epidermal cells. *Protoplasma* 254:367–377.
- Basu, S., Liu, C. & Rohde, G. K. 2015. Localizing and extracting filament distributions from microscopy images. *J. Microsc.* 258:13–23.
- Boevink, P., Oparka, K., Cruz, S. S., Martin, B., Betteridge, A. & Hawes, C. 1998. Stacks on tracks: the plant Golgi apparatus traffics on an actin/ER network. *Plant J.* 15:441–447.
- Cutler, S. R., Ehrhardt, D. W., Griffiths, J. S. & Somerville, C. R. 2000. Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 97:3718–3723.
- Dirnberger, D., Bencur, P., Mach, L. & Steinkellner, H. 2002. The Golgi localization of *Arabidopsis thaliana* beta1,2-xylosyltransferase in plant cells is dependent on its cytoplasmic and transmembrane sequences. *Plant Mol Biol.* 50:273–281.
- Ebine, K., Okatani, Y., Uemura, T., Goh, T., Shoda, K., Niihama, M., Morita, M.T., Spitzer, C., Otegui, M.S., Nakano, A. & Ueda, T. 2008. A SNARE complex unique to seed plants is required for protein storage vacuole biogenesis and seed development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20:3006–3021.
- Gardner, M. J., Baker, A. J., Assie, J. M., Poethig, R. S., Haseloff, J. P. & Webb, A. A. 2009. GAL4 GFP enhancer trap lines for analysis of stomatal guard cell development and gene expression. *J Exp Bot.* 60:213–226.
- Goh, T., Uchida, W., Arakawa, S., Ito, E., Dainobu, T., Ebine, K., Takeuchi, M., Sato, K., Ueda, T. & Nakano, A. 2007. VPS9a, the common activator for two distinct types of Rab5 GTPases, is essential for the development of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 19:3504–3515.
- Hayashi, T., Sano, T., Kutsuna, N., Kumagai-Sano, F. & Hasezawa, S. 2007. Contribution of anaphase B to chromosome separation in higher plant cells estimated by image processing. *Plant Cell Physiol.* 48: 1509–1513.
- Higaki, T., Kutsuna, N. & Hasezawa, S. 2013. LIPS database with LIPService: a microscopic image database of intracellular structures in *Arabidopsis* guard cells. *BMC Plant Biol.* 13:81.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Hosokawa, Y., Akita, K., Ebine, K., Ueda, T., Kondo, N. & Hasezawa, S. 2012.

- Statistical organelle dissection of *Arabidopsis* guard cells using image database LIPS. *Sci. Rep.* 2: 405.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Sano, T., Kondo, N. & Hasezawa, S. 2010. Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells. *Plant J.* 61:156–165.
- Holzinger, A., Buchner, O., Lutz, C. & Hanson, M. R. 2007. Temperature-sensitive formation of chloroplast protrusions and stromules in mesophyll cells of *Arabidopsis thaliana*. *Protoplasma* 230:23–30.
- Kutsuna, N., Higaki, T., Matsunaga, S., Otsuki, T., Yamaguchi, M., Fujii, H. & Hasezawa, S. 2012. Active learning framework with iterative clustering for bioimage classification. *Nat Commun.* 3:1032.
- Mathur, J., Mathur, N., Kernebeck, B., Srinivas, B. P. & Hulskamp, M. 2003. A novel localization pattern for an EB1-like protein links microtubule dynamics to endomembrane organization. *Curr Biol.* 13: 1991–1997.
- Nelson, B. K., Cai, X. & Nebenfuhr, A. 2007. A multicolored set of *in vivo* organelle markers for co-localization studies in *Arabidopsis* and other plants. *Plant J.* 51:1126–1136.
- Robinson, D. G., Langhans, M., Saint-Jore-Dupas, C. & Hawes, C. 2008. BFA effects are tissue and not just plant specific. *Trends Plant Sci.* 13:405–408.
- Saito, C., Morita, M. T., Kato, T. & Tasaka, M. 2005. Amyloplasts and vacuolar membrane dynamics in the living graviperceptive cell of the *Arabidopsis* inflorescence stem. *Plant Cell* 17:548–558.
- Shimono, M., Higaki, T., Kaku, H., Shibuya, N., Hasezawa, S. & Day, B. 2016. Quantitative evaluation of stomatal cytoskeletal patterns during the activation of immune signaling in *Arabidopsis thaliana*. *PloS One* 11:e0159291.
- Takeuchi, M., Ueda, T., Yahara, N. & Nakano, A. 2002. Arf1 GTPase plays roles in the protein traffic between the endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus in tobacco and *Arabidopsis* cultured cells. *Plant J.* 31:499–515.
- Tian, G. W., Mohanty, A., Chary, S. N., Li, S., Paap, B., Drakakaki, G., Kopec, C.D., Li, J., Ehrhardt, D., Jackson, D., Rhee, S.Y., Raikhel, N.V. & Citovsky, V. 2004. High-throughput fluorescent tagging of full-length *Arabidopsis* gene products in planta. *Plant Physiol.* 135:25–38.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R. L., Nakano, A., Takeyasu, K. & Sato, M. H. 2004. Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Struct Funct.* 29:49–65.
- 朽名夏磨 2014. 生物画像解析—その植物科学研究への関わり— 新学術領域研究「植物の環境感覚: 刺激受容から細胞応答まで」 ニュースレター 8:12–16.
- 桧垣匠 2014. 植物の孔辺細胞をモデルとした蛍光タンパク質の統計的局在解析 バイオイメージング 23:6–10.
- 桧垣匠, 朽名夏磨, 馳澤盛一郎 2011. 顕微鏡画像の定量評価と自動分類から気孔開閉運動の仕組みを探る 生物の科学 遺伝 65:80–85.

ハイパースペクトルイメージングと画像解析による 微細藻類モニタリングシステムの開発

大貫慎輔¹, 大田修平^{1,2}, 河野重行³, 大矢禎一¹

¹ 東京大学大学院新領域創成科学研究科先端生命科学専攻

〒277-8562 千葉県柏市柏の葉 5-1-5 東京大学 新領域生命棟 101

² 国立環境研究所生物・生態系環境研究センター

〒305-8506 茨城県つくば市小野川 16-2

³ 東京大学フューチャーセンター推進機構 〒277-0871 千葉県柏市若柴元堂 178-3

Shinsuke Ohnuki¹, Shuhei Ota^{1,2}, Shigeyuki Kawano³, and Yoshikazu Ohya¹

Research and development of the monitoring system for micro algae by the image analysis and the hyperspectral imaging techniques

Key words: Image analysis, Hyperspectral imaging, Machine learning, *Haematococcus pluvialis*, Astaxanthin

¹ Department of Integrated Biosciences, Graduate School of Frontier Sciences, The University of Tokyo, 5-1-5 Kashiwanoha, Kashiwa, Chiba 277-8562, Japan

² Center for Environmental Biology and Ecosystem Studies, National Institute for Environmental Studies, Tsukuba, Ibaraki, 305-8506, Japan

³ Future Center Initiative, The University of Tokyo, Wakashiba, Kashiwa, Chiba, 277-0871, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10b6.00159

1. はじめに

微細藻類は食品に利用されているほか、近年はバイオ燃料の生産も期待されている。単細胞緑藻類である *Haematococcus pluvialis* はその一つであり、赤い色素であるアスタキサンチンを細胞内に蓄積する(Kobayashi et al., 1997)。アスタキサンチンには高い抗酸化作用があり、健康食品や化粧品などに利用されているが生産コストが高く、アスタキサンチン生産効率の向上のためには培養条件の最適化および適切な性質を持った *H. pluvialis* の育種が不可欠である。そこで本研究では、*H. pluvialis* の生育状況をモニターするシステムを開発した(Ohnuki et al., 2013)。本システムは、RGB (赤・緑・青) カラー明視野顕微鏡画像から細胞形態を 25 の観点で定量する画像解析部と、定量した 25 の形態情報から生育状況を抽出する多変量解析部からなる。本システムでは培養中の *H. pluvialis* において、(1)アスタキサンチンの量の推定、(2)遊走子の判定、および(3)細胞形態の経時変化の把握が可能である。さらにハイパースペクトルカメラと組み合わせることによって、150 色のスペクトル画像からアスタキサンチンだけでなくクロロフィルやルテインおよびベータカロテンの細胞内分布を高い精度で定量化することが可能になった(Nogami et al., 2014)。本稿では、画像解析部のアルゴリズムを解説し、最近の研究例や他の微細藻類への応用例を紹介する。

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-1

2. *H. pluvialis* の産業利用と生活環

H. pluvialis は緑藻で普段緑色をしているが、強光などのストレスによって色素を蓄積し、赤色に変化する(Kobayashi et al., 1997)。この赤色の色素は主にカロテノイドの一種であるアスタキサンチンである。アスタキサンチンは基礎化粧品や健康食品などに利用されており、抗酸化性の機能性色素として注目を集めている。アスタキサンチンの生産には、*H. pluvialis* が利用されており、アスタキサンチンを高蓄積する培養条件などの研究は数多くあるものの、基礎的知見については十分であるとは言い難い。

H. pluvialis は富栄養などの好条件で胞子を形成し分裂増殖した後、発芽して鞭毛細胞を形成する一方で、飢餓や強光などのストレス環境でアスタキサンチンを蓄積したシスト細胞へと変化する(Wayama et al., 2013)。培養液中で細胞形態や色素量は変化するため、生産管理だけでなく生理学的な研究においても、細胞の特徴を測定することは重要である。本研究では、このように様々な細胞の状態をモニターすることが可能な画像解析システムの開発を行った。

3. 画像解析による微細藻類のモニタリングシステム

本研究で開発したモニタリングシステムは、画像解析部と多変量解析部によって構成されている。画像解析部は更に、顕微鏡画像から細胞の形状を認識し計測する技術(画像解析プログラム HaematoCalMorph)と、可視光領域のスペクトル情報をピクセルごとに計測するハイパースペクトルイメージング技術によって構成される(図1)。第3章では、細胞の認識と形状を計測するアルゴリズムに焦点を当てて解説する。ハイパースペクトルイメージング技術については第4章で解説する。



図1. 微細藻類モニタリングシステムの概要

本システムは、画像解析部と多変量解析部によって構成される。画像解析技術とハイパースペクトルイメージング技術そして多変量解析技術の3つの技術を組み合わせて開発した。

3-1. 画像解析プログラム HaematoCalMorph

画像解析部のうち、顕微鏡画像中の細胞を認識し細胞の形態を計測する部分は、Java ベースのプログラムである HaematoCalMorph が担う(Ohnuki et al., 2013)。本項では HaematoCalMorph の画像解析アルゴリズムについて解説する(図2)。

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-2

HaematoCalMorph は、まず入力された RGB カラー画像 (図 2 A) を各チャンネル (図 2 B-D) に分離しノイズ除去などの前処理を行う。その後、輝度勾配の急激な変化に基づいて、輝度の局所的な境界線 (図 2 E) と大域的な境界線 (図 2 F) をそれぞれ Canny 法(Canny, 1986)と二値化で検出し、細胞の境界線を絞り込んで画像を各領域に分割する (図 2 G)。

次に、分割した領域から細胞領域を検出する (図 2 I-J, 図 3)。入力画像の赤チャンネル (図 3 A) を Canny 法で検出した境界線で分割 (図 3 B) すると、細胞内の輝度は暗くばらついていてのに対して、背景の輝度は明るく均一であることがわかる (図 3 C)。そこで、各領域の輝度の平均 (図 3 D) と分散 (図 3 E) を計算すると、それぞれの領域が背景か細胞かを判別する指標となる (図 3 F)。つまり、輝度の平均値と分散で二次元展開すると (図 3 G)、平均値が大きく分散が小さいほど背景で、平均値が小さく分散が大きいほど前景 (=細胞領域) に相当し、この間に閾値を設定することで背景と細胞領域を判定している。

閾値などは、偽陽性をなるべく抑えるように調整した。判定精度を測定するために、32 枚の顕微鏡画像を HaematoCalMorph で解析した結果と、目視により判定・分類した結果を突き合わせた。その結果、HaematoCalMorph が細胞と判定した 245 領域中の、目視でも細胞と判定された割合 (陽性的中率) は 99%と非常に高く、目的にかなったものができた。一方で、目視で判定した 625 細胞中の、HaematoCalMorph が正しく細胞として認識した割合 (認識率) は 61%であった。正しく認識できなかった細胞の殆どはピントが外れている細胞や、胞子または凝集細胞であった。

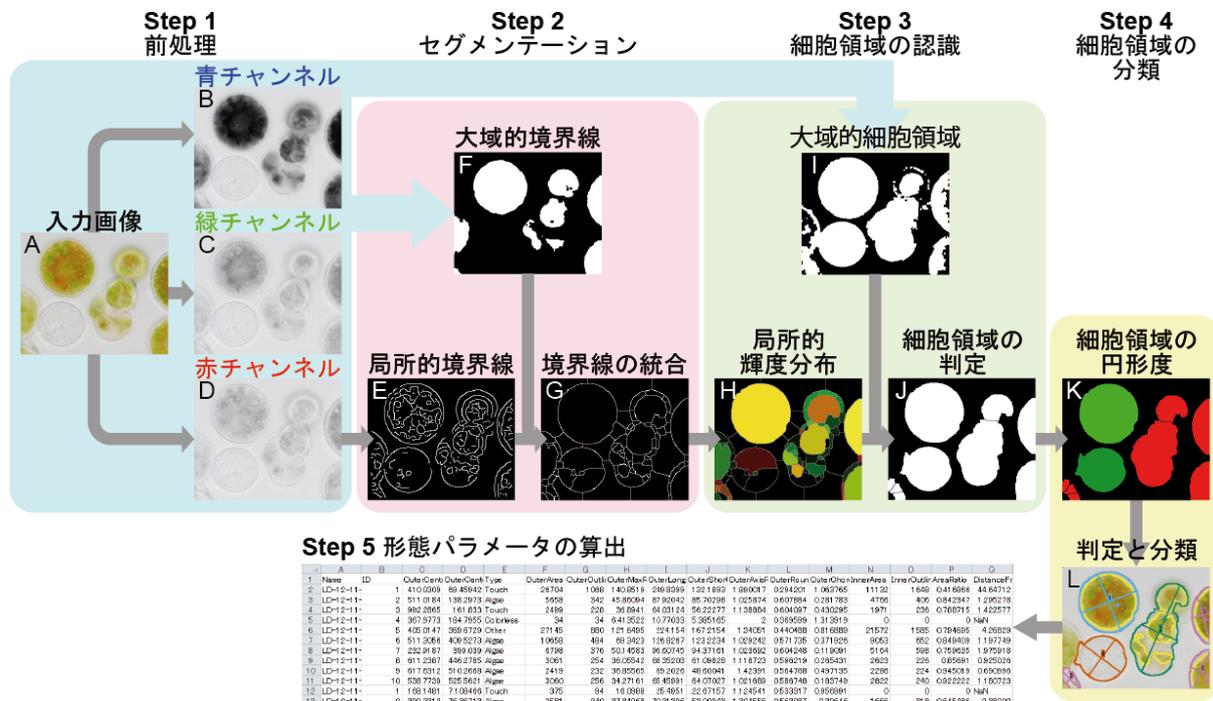


図 2. HaematoCalMorph における画像処理のフローチャート

画像処理のプロセスは5つのステップに分けられる。A~Lの画像はそれぞれ、(A)入力されたカラー画像、(B)入力画像の青色チャンネル、(C)入力画像の緑色チャンネル、(D)入力画像の赤色チャンネル、(E)Canny法によ

て検出された局所的境界線, (F)大域的輝度分布の二値化によって検出された色素領域, (G)局所的境界線 E と大域的境界線 F を統合して得られた境界線, (H)各領域の輝度の平均値と分散 (緑: 低輝度, 赤: 高分散), (I)大域的輝度分布の二値化により推定されたおよその細胞領域, (J)局所的輝度分布 H と大域的細胞領域 I を統合して判定された細胞領域, (K)各細胞領域の円形度 (緑: 高円形度, 赤: 低円形度), (L)各細胞領域を分類して色分けされた出力画像。

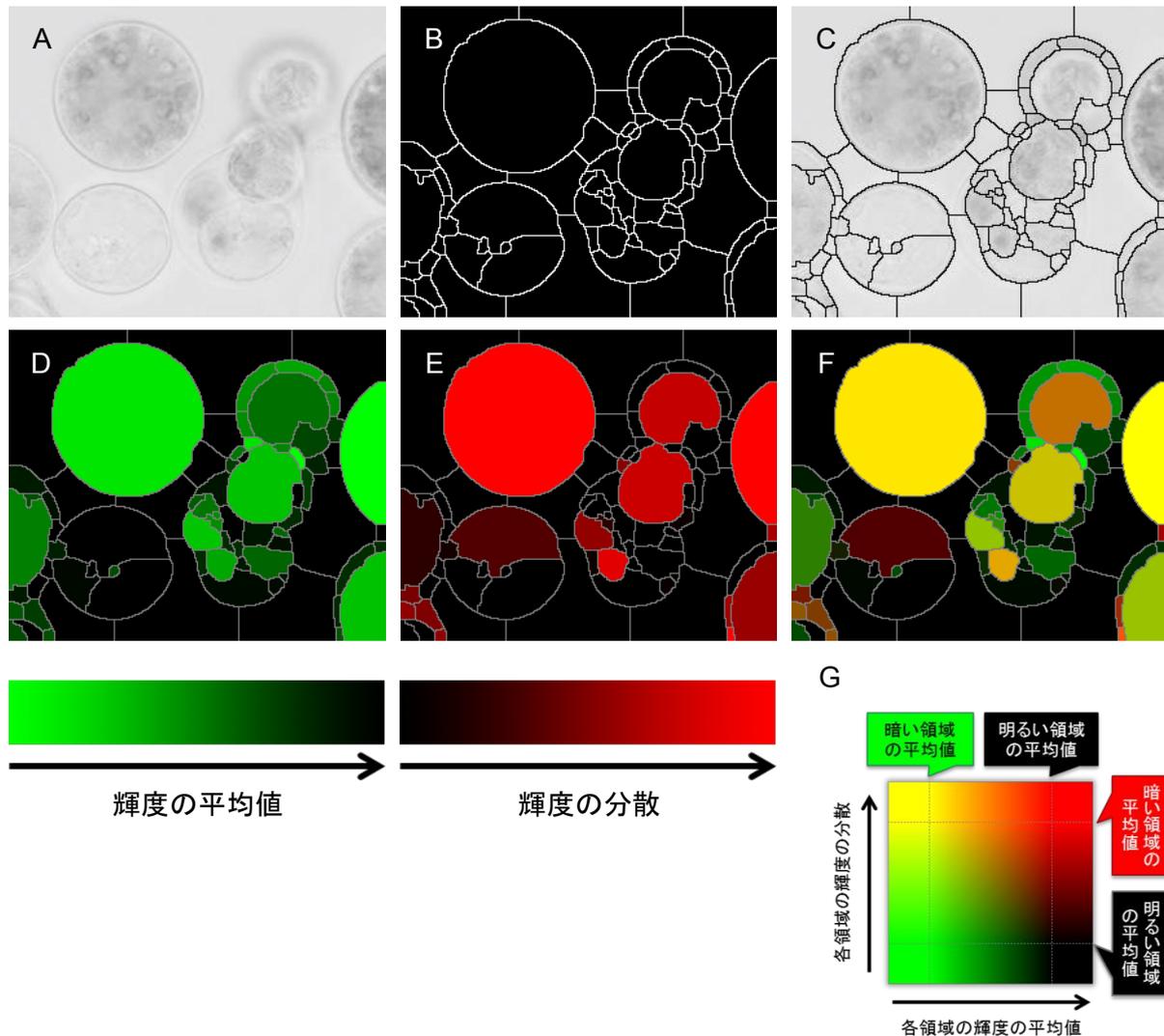


図 3. 細胞領域の判定アルゴリズム

(A) 入力画像の赤チャンネル, (B)赤チャンネル画像から検出された境界線, (C)赤チャンネル画像と境界線の重ね合わせ画像, (D)各領域の輝度の平均値のヒートマップ, (E)各領域の輝度の分散のヒートマップ, (F)各領域の輝度の平均値と分散ヒートマップの重ね合わせ画像, (G)輝度の平均値と分散の二次元展開図。

細胞の領域が判定できたら、HaematoCalMorph は各細胞領域を分類し、細胞ごとに特徴量を計測して出力する (図 2 K-L, 図 4)。HaematoCalMorph は個々の細胞を 4 つのカテゴリに分類する。まず、色素領域がある丸い細胞を Algae (図 4 水色)、色素領域がない細胞を colorless (図 4 赤色) として分類する。次に、凝集や胞子形成によって、輪郭が円形でない領域は other (図 4 緑色) として分類し、解析対象から外す (図 4)。画像の縁に接している細胞も正しい測定ができないので touch (図 4 紫色) と分類し、最後に HaematoCalMorph は個々の細胞の形態やピクセル輝度値などを測定し、サンプルごとに平均値や個数に集計して出力する (図 2 Step 5)。現在のバージョンでは、およそ 55 種類の特徴量を出力するが、モニタリングの実証実験には主にサンプルごとの平均値である 25 パラメータを使用している (表 1)。

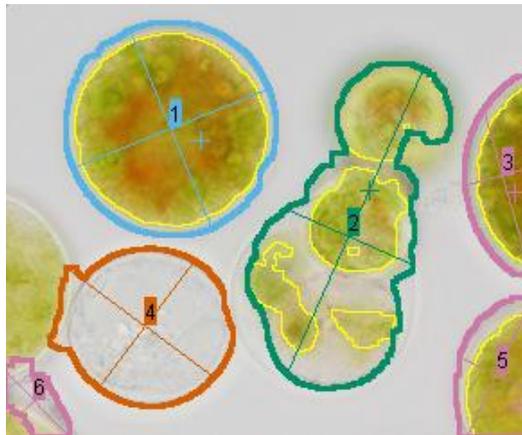


図 4. HaematoCalMorph による細胞領域の分類

HaematoCalMorph は細胞領域を 4 種類に分類し、色分けして表示された画像を出力する。

水色：緑藻細胞 (Algae)

赤色：無色の細胞領域 (colorless)

緑色：その他の細胞領域 (other)

紫色：画像の端に触れている細胞領域 (touch)

表 1. HaematoCalMorph が出力する形態パラメータの内訳

カテゴリ	個々の細胞の値	サンプル毎の平均値	合計
形態情報	13	13	26
色素情報	12	12	24
細胞数	-	5	5
合計	25	30	55

3-2. 画像解析によるモニタリングシステムの実証実験

HaematoCalMorph を使用して微細藻類の生育をモニターできるかどうか調べるために、*H. pluvialis* を 25°C で培養し、12 時間ごとに 100 $\mu\text{mol photons m}^{-2} \text{s}^{-1}$ の明るさで光を照射する明暗(LD)条件と、24 時間明るいままの明明(LL)条件の 2 つの条件で培養した。これを 2 週間続けて経時的にサンプリングし、細胞数と色素量および顕微鏡画像を取得した。

得られた形態データのダイナミクスを調べるために、主成分分析を行ったところ、累積寄与率 51% で第一主成分が時間依存的変化を示し、しかもこれは LL 条件と LD 条件で異なっていた (図 5 A)。時間依存的に変化する形態的特徴としては、長軸の長さや細胞の大きさなどがあつた (図 5 B-D)。また緑色の色素は LL 条件と LD 条件で異なっていた (図 5 C)。これらのことから経時変化と条件依存的変化の特徴を捉えることが可能であることがわかった。

次に機械学習による遊走子の判別と追跡を行った。接種後 2 日程度たった細胞には、遊走

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-5

子の他に、鞭毛が消失して運動性を失ったパルメロイド細胞も観察された。遊走子はサイズが小さく細長い傾向があるので、この特徴を捉えられるかどうか形態データと機械学習を組み合わせて遊走子の判別を試みた。平均値の 25 パラメータ全てを使用してランダムフォレストを行ったところ約 90% の高い精度で遊走子を判別し追跡することができた (図 5 E)。

最後に、重回帰による色素量の測定を行った。DMSO で抽出する従来法と RGB 輝度の重回帰で検量線を描いたところ、決定係数 0.975 の高い精度で色素量を測定することができた (図 5 F)。これらの結果から、HaematoCalMorph を使用して微細藻類の生育をモニターできることがわかった。

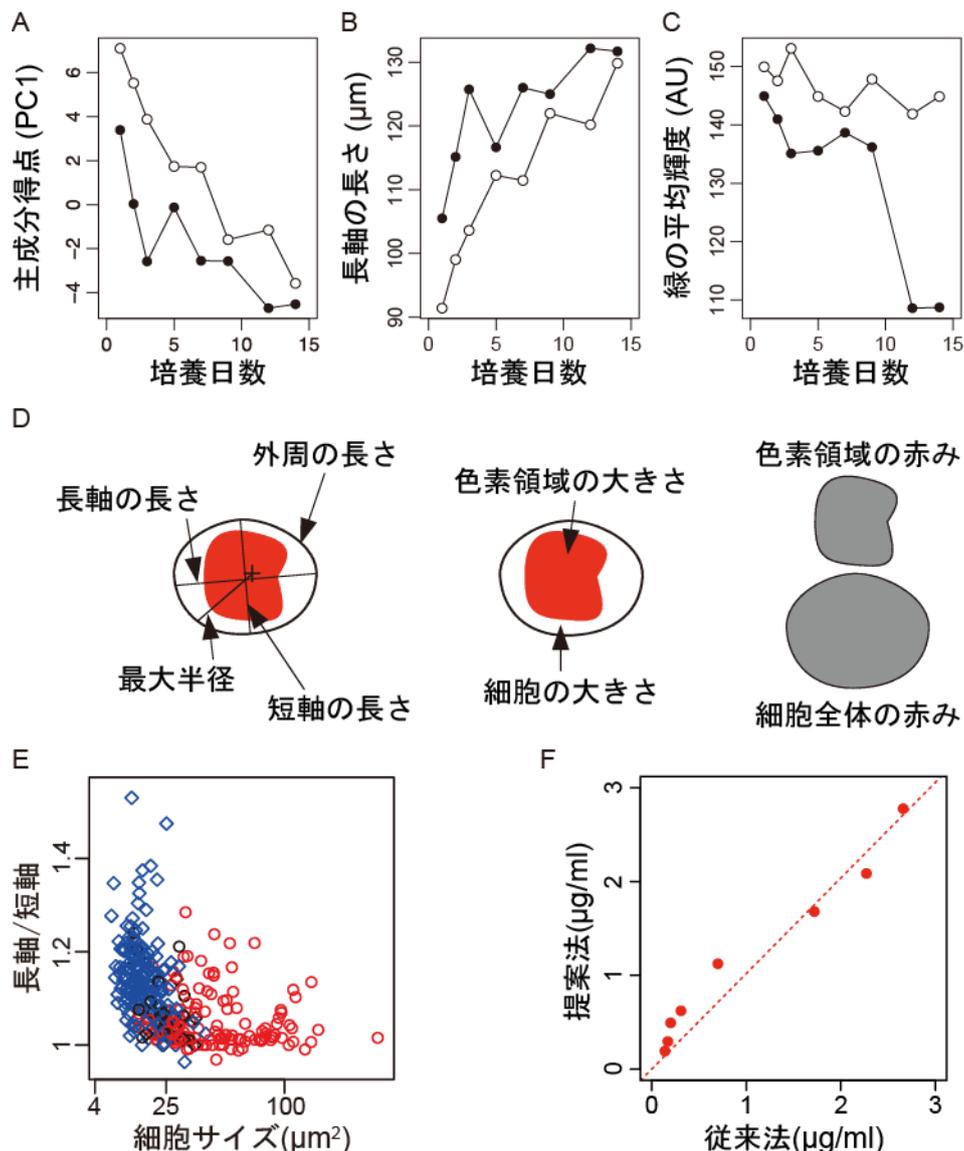


図 5. HaematoCalMorph による微細藻類モニタリング

(A)主成分分析によって得られた PC1 得点と培養日数の関係。黒丸は LD, 白抜丸は LL を示す。(B と C)長軸の長さ(B)と緑の輝度の平均値(C)と培養日数の関係。(D)PC1 と主成分負荷量 0.95 以上の強い相関があった形態パラメータの模式図。楕円は細胞を表し、赤い領域は細胞内の色素領域を示す。

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-6

細胞内の十字は細胞の中心を表す。(E)ランダムフォレストによる遊走子の判別。341 細胞の形態データ 25 パラメータを学習データとして使用してランダムフォレストで分類器を作成し、得られた分類器で同数のテストデータを分類した結果を示す。ひし形と白抜き丸はそれぞれ遊走子とパルメロイド細胞（またはシスト細胞）を示す。(F)クロロフィルとカロテノイドの含有量の推定。決定係数 $R^2 = 0.975$ 。

3-3. 画像解析プログラムの他の微細緑藻への応用

緑藻は緑から赤色を呈することから青色から緑色の波長に光の吸収帯を持つが、HaematoCalMorph は色素による影響の少ない赤色の波長の画像をベースにして細胞を認識するため、HaematoCalMorph の画像解析アルゴリズムは *H. pluvialis* 以外の単細胞微細藻類に応用可能である。例えば *Parachlorella kessleri* への応用例では、撮影環境に由来するノイズを除去する修正を加えるなどの最小限の調整のみで、細胞を認識することができた (図 6)。現行バージョンの HaematoCalMorph は円形度を測定して丸い細胞のみを形態計測の対象にしているため、細胞集団を形成する藻類や円形でない藻類には向かないが、これらは計測する対象の形状パターンを円形以外の適切な形に修正することによって対応可能となる。

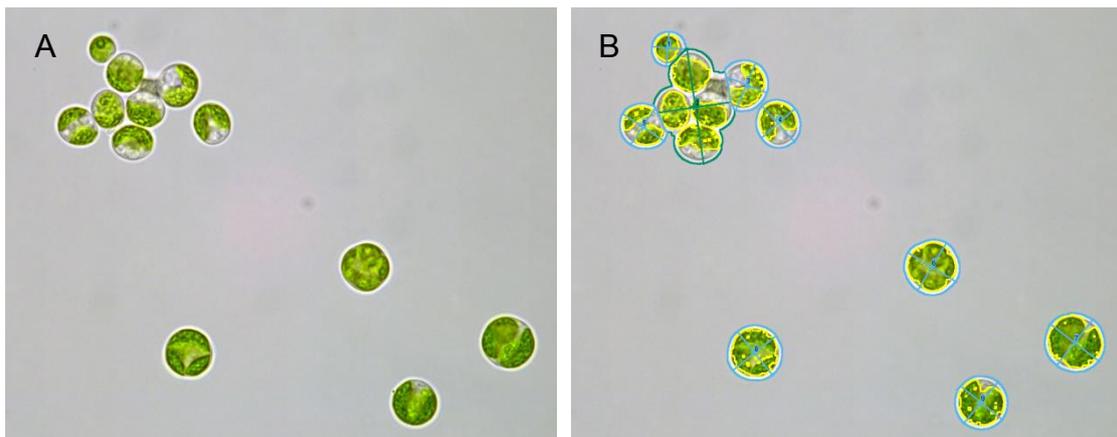


図 6. *Parachlorella kessleri* の顕微鏡画像解析

(A) 画像解析前の顕微鏡写真。(B) 画像解析後の顕微鏡写真。細胞の分類による色分けの凡例は図 4 と同じ。

4. ハイパースペクトルイメージングによる細胞内色素の含有量と分布の推定

H. pluvialis が産生するカロテノイドはアスタキサンチンだけではない。例えば、アスタキサンチンはベータカロテンから生合成され、ベータカロテンはリコピンから生合成される。またリコピンからはルテインも合成される(Lao et al., 2017)。そこで、私たちはこれらの他の色素や細胞内の蓄積状態も詳細にモニタリングするために、ハイパースペクトルイメージング技術と画像解析技術を組み合わせた。

ハイパースペクトルイメージングでは、対物レンズとカメラの間に分光器を挟むことで二次元の顕微鏡画像を分光し、光の波長ごとに顕微鏡画像を取得することが可能である (図 7)。

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-7

二次元の顕微鏡画像を同じ視野で可視光の波長 1 nm ごとに取得すればキューブ状の画像が得られる。この大きな画像データを画像解析技術と組み合わせることで *H. pluvialis* の細胞の波長情報をより詳細に解析する画像解析システムを開発した。

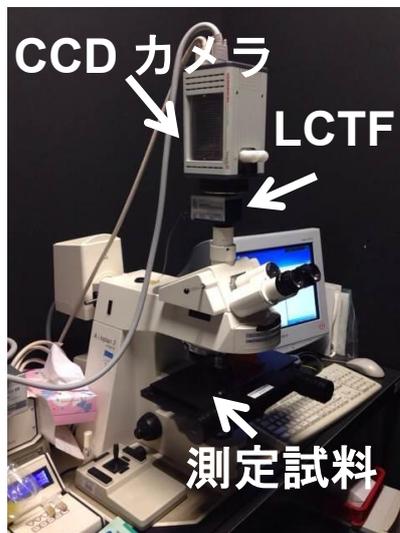


図 7. ハイパースペクトル顕微鏡

本研究で使用したハイパースペクトル顕微鏡は、通常の正立顕微鏡と CCD カメラの間に液晶チューナブルフィルター(LCTF)を挟むだけの簡単な構造である。LCTF は USB で PC に接続され、画面上から透過する波長を 1 nm 単位で指定可能である。透過させる波長を一定時間で連続的に変化させながら、同じタイミングでカメラのシャッターを切る仕組みは、Micro-Manager で LCTF と CCD カメラを同時に制御することによって実現した。

開発したシステムは、取得したハイパースペクトル画像から直接ピクセルごとの含有色素量を測定する。次に HaematoCalMorph で細胞領域を認識する。これにより細胞ごとの色素量と形態を定量する。そして最後に培養液全体の色素量を推定する。つまり、ピクセルレベル、細胞レベル、培養液レベルで色素量を推定することが可能である。

4-1. 色素量の推定法

ピクセルレベルで色素量を推定する場合、得られた画像中の各ピクセルが持つ吸光スペクトル情報に対して、各色素(アスタキサンチン、ベータカロテン、ルテイン、クロロフィル a, クロロフィル b)のモル吸光係数を説明変数とする重回帰分析のモデル式を使用して non-negative least square (Lawson and Hanson, 1995) という拘束条件付きの最小二乗法で近似する。各色素のモル吸光係数は、予め精製標品を使用して吸光スペクトルを取得した(図 8 右下図)。例えば図 8 (左上画像の黄点) に示すピクセルにおいて得られた吸光スペクトル(図 7 左下図)を使用した場合、アスタキサンチンはモル吸光係数の 0.008 倍、ベータカロテンはゼロ倍、ルテインはゼロ倍、クロロフィル a は 0.009 倍、クロロフィル b は 0.005 倍という係数が求まり、これらを全て足すことで、観測したスペクトルを近似することができる(図 7 左下図, 太実線)。これによって得られた係数が、図 8 のピクセル(黄点)における各色素の相対濃度である。同様の解析を全てのピクセルについて行うことで、色素の分布を濃淡で知ることができる(図 8 上段)。本法で得られる色素量が実際の色素量と相関があるかどうか調べるために、培養液レベルの色素濃度を計算し、DMSO 抽出したアスタキサンチンとクロロフィル a および b の色素量と比較したところ、決定係数 R^2 はそれぞれ 0.94, 0.94, 0.88 となり、高い精度で推定できることがわかった。

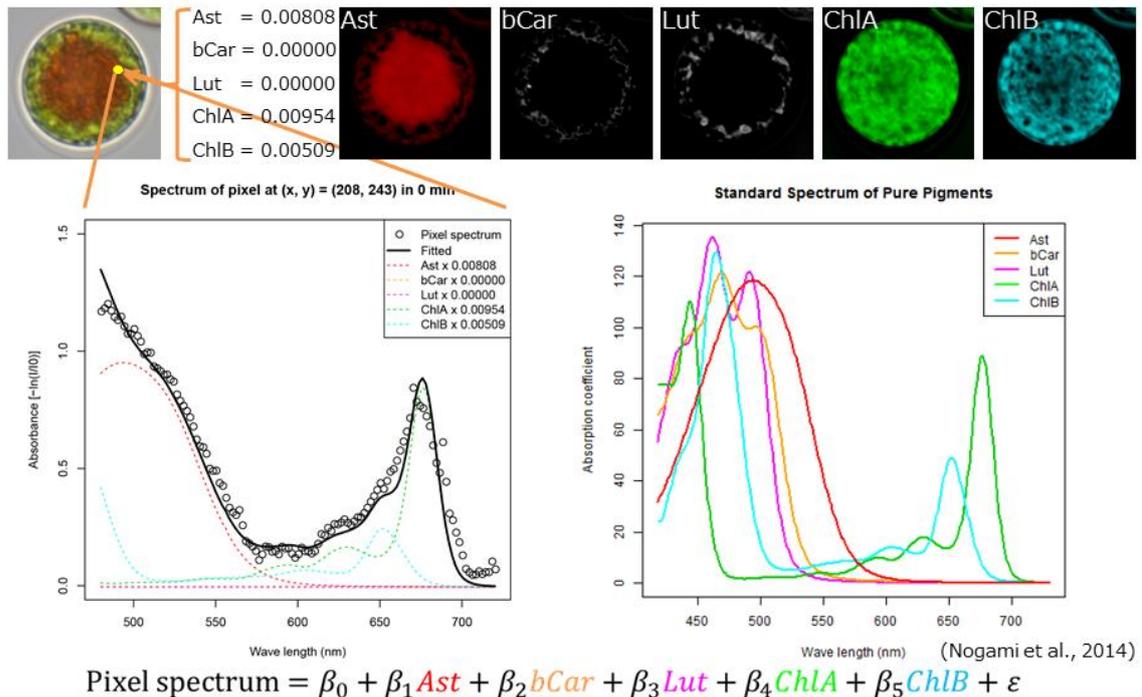


図 8. ハイパースペクトル画像による細胞内色素分布の推定

Ast, bCar, Lut, ChlA, および ChlB は、それぞれアスタキサンチン、ベータカロテン、ルテイン、クロロフィル a、クロロフィル b を示す。上段の色素分布は、各ピクセルで推定された色素の相対濃度を表すグレースケールのヒートマップを疑似カラーで着色した。

4-2. 培養中の細胞の色素量の変化

ハイパースペクトル画像を使用して、微細藻類の生育をモニターできるかどうか調べるために、培養中の細胞における各色素の経時変化を追跡した (図 9)。その結果、クロロフィルは接種後すぐに減少し、その後 3 日で回復した。これは遊走子の出現と関連していた。また、アスタキサンチンも接種後すぐに減少し、その後 2 週間程度で回復した。これはシスト細胞の出現と関連していた。ベータカロテンとルテインは特に LL 条件でほぼゼロであった。これは、アスタキサンチンやルテインの生産に必要なリコピンがアスタキサンチンを生産するために消費されたためではないかと考えられた。これらのことから、ハイパースペクトル画像を使用して、微細藻類の生育をモニターできることがわかった。

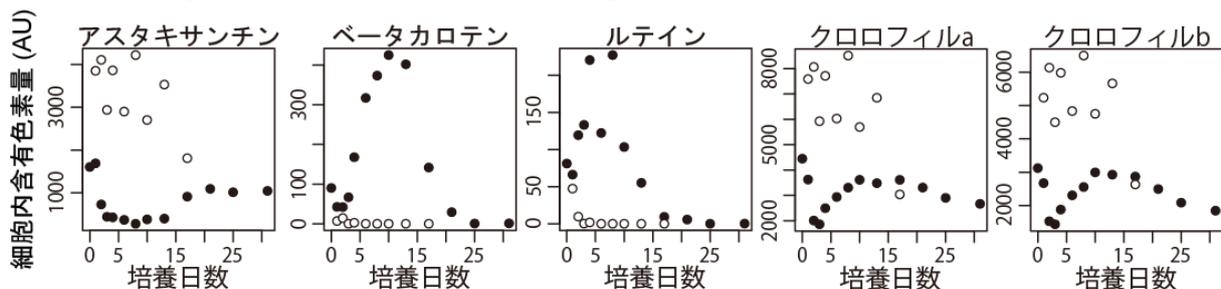


図 9. 細胞内色素含有量の経時変化

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-9

LD 条件と LL 条件で培養した細胞を経時的にハイパースペクトルカメラで撮影し、アスタキサンチンとベータカロテン、ルテイン、クロロフィル a およびクロロフィル b の色素量を non-negative least square で推定した。黒塗丸と白抜丸はそれぞれ LD と LL を示す。

次に、様々な細胞のアスタキサンチンとクロロフィルの比の分布を観察した (図 10)。緑色の細胞はゼロ付近にピークがありアスタキサンチンが少ないことがわかった。遊走子では比の分布で値が大きい細胞が少数あることがわかり、遊走子の一部にはアスタキサンチンが局在している細胞があった。中間体は明るい部分と暗い部分が混在し、アスタキサンチンとクロロフィルの比の分布に二峰性がみられた。シスト細胞はゼロ以外の場所にシャープなピークが観察され、アスタキサンチンが均一に分布していた。これらのことから、細胞内の色素分布は細胞の状態によって異なることがわかった。

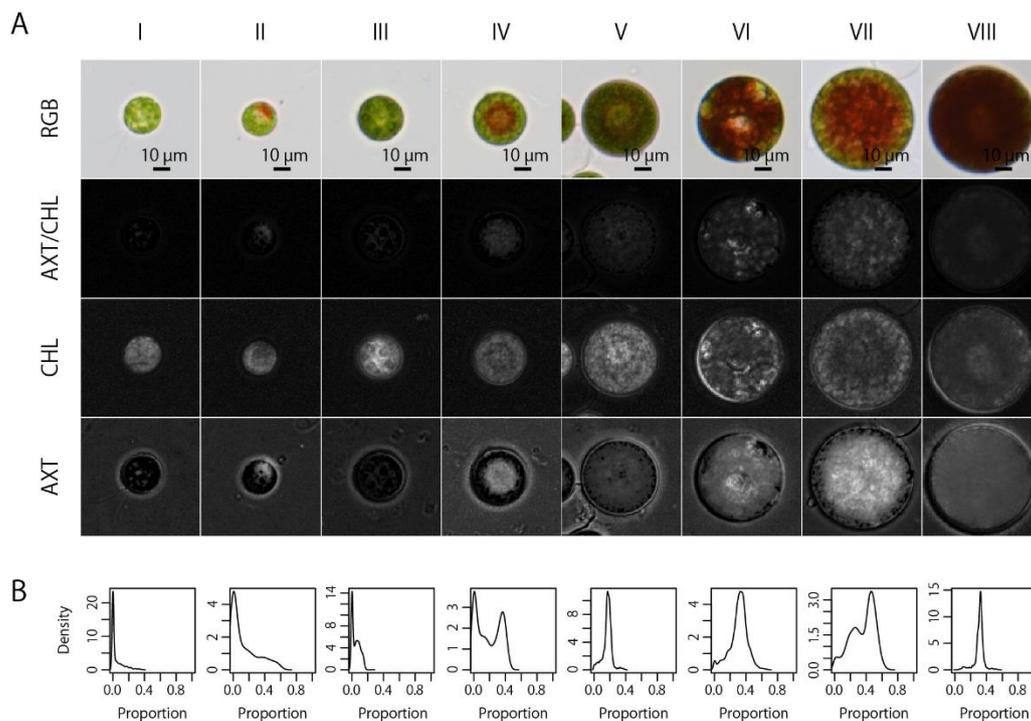


図 10. アスタキサンチンとクロロフィルの細胞内における分布

(A) 様々な状態の *H. pluvialis* 細胞。アスタキサンチン(AXT)とクロロフィル(CHL)の細胞内部分と比(AXT/CHL)をグレースケールで示す。遊走子(IとII)、緑色パルメロイド細胞(IIIとIV)、中間細胞(VとVI)およびシスト細胞(VIIとVII)を示す。(B) AXT/CHL の密度分布。

4-3. 細胞内におけるアスタキサンチンの挙動

赤い色素が細胞の中心付近に局在している中間細胞を明条件下におくと、約 10 分で赤い色素が中心から全体に広がり、シスト細胞を暗条件下におくと、約 30 分で赤い色素が中心に局在し、アスタキサンチンを含む赤い色素の細胞内分布は 10 分~30 分で劇的に変化する (Ota

S. Ohnuki, S. Ota, S. Kawano, & Y. Ohya-10

et al., 2018)。そこで各時間点において細胞をハイパースペクトルカメラで撮影し、色素分布を観察したところ、クロロフィルの分布は殆ど変化していなかったが、アスタキサンチンの分布は劇的に変化していた (図 11)。

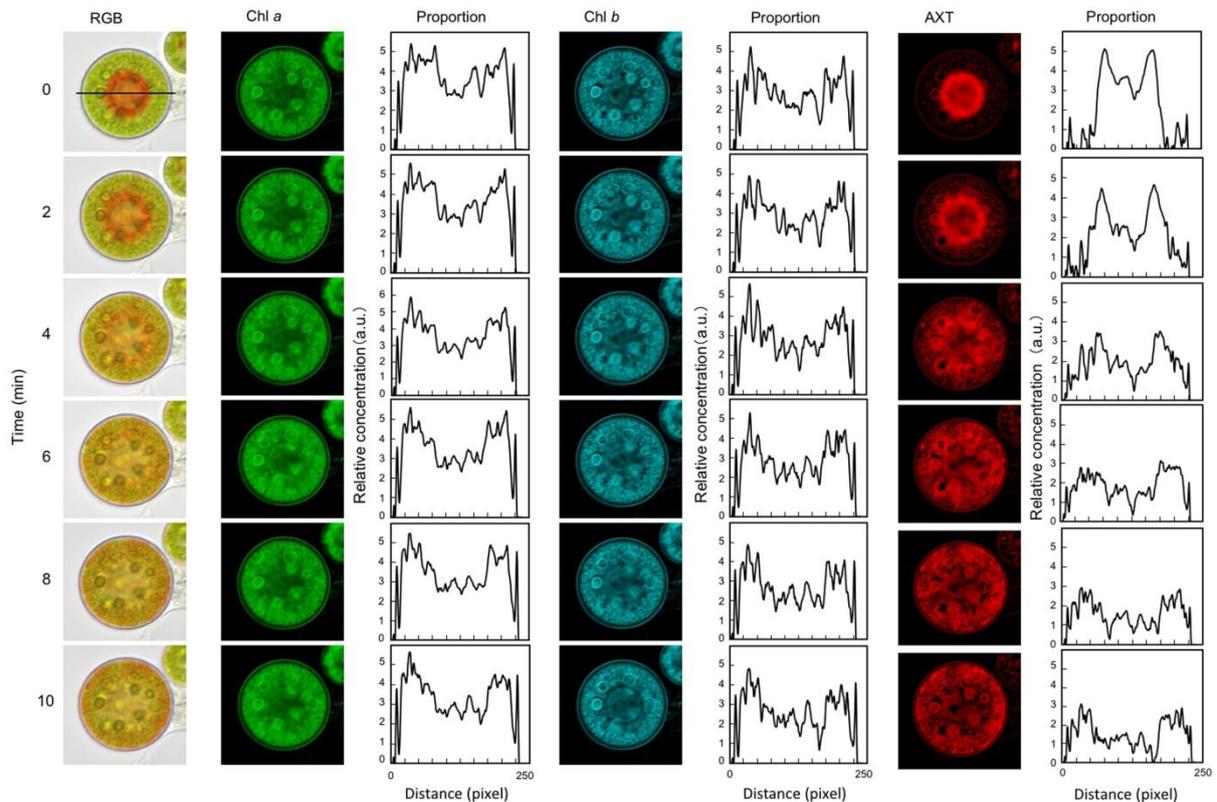


図 11. 細胞内のクロロフィルとアスタキサンチンの動態

顕微鏡画像と相対濃度の分布は 2 分間隔で縦に並べた。相対濃度の横軸は細胞の中央付近における画像上の位置を示す。RGB と Chl a, Chl b, および AXT は、それぞれカラー顕微鏡画像とクロロフィル a の色素分布、クロロフィル b の色素分布およびアスタキサンチンの色素分布。

アスタキサンチンの局在変化には、二つの仮説が考えられている。一方は葉緑体とともに運ばれる可能性(仮説 1)と、もう一方は油滴とともに運ばれる可能性(仮説 2)である(Peled et al., 2012)。本研究では、クロロフィルの分布に変化がなかったことから、仮説 1 は支持されなかった。一方で、仮説 2 については、潰すと赤い油滴が出てくる (図 12A) ことや、蛍光顕微鏡による油滴とアスタキサンチンの共局在の観察 (図 12B) から、仮説 2 が支持された。また、ルテインとベータカロテンはピレノイド付近に局在が観察された (図 12C)。これらの結果と、アスタキサンチンが小胞体 (ER) でベータカロテンから生成されることが知られている(Chen et al., 2015)ことから、アスタキサンチンの合成は、まずピレノイド付近でルテインとベータカロテンが生産され、ER でベータカロテンからアスタキサンチンになったあと、油滴となって運ばれていると考えられた (Ota et al., 2018)。

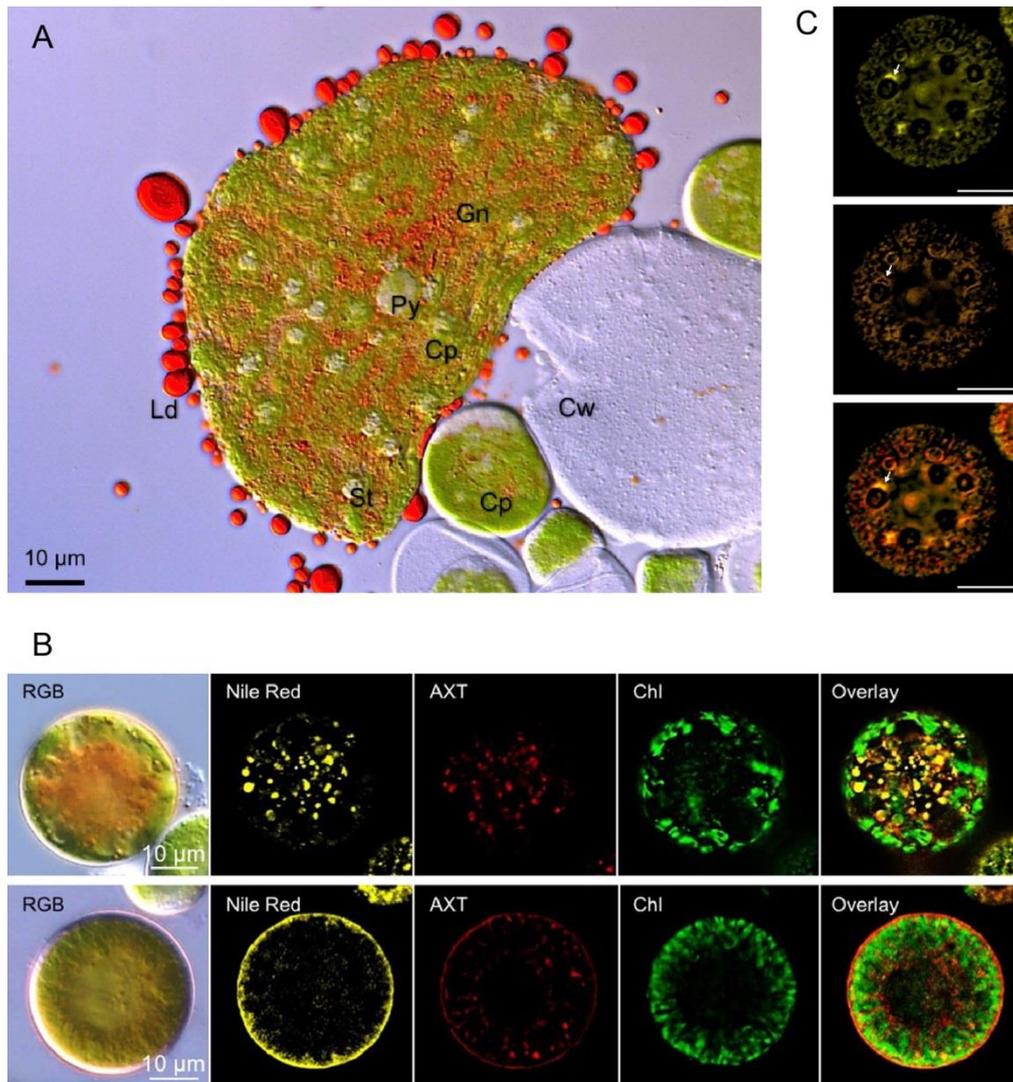


図 12. アスタキサンチンと油滴およびルテインとリコピンの細胞内局在
 (A) 潰したシスト細胞の顕微鏡写真。Cp, 葉緑体; Cw, 細胞壁; Gn, クロロプラストの隙間ネットワーク; Ld, 油滴; St, デンプン粒; Py, ピレノイド。(B) 光照射前 (上段) と光照射 10 分後 (下段) における油滴とアスタキサンチンおよび葉緑体の蛍光顕微鏡写真。RGB: 明視野画像, Nile Red: 油滴蛍光, AXT: アスタキサンチン蛍光, Chl: 葉緑体自家蛍光, Overlay: 重ね合わせ画像。(C) 強光下におけるルテインとベータカロテンの細胞内局在。上からルテイン, ベータカロテン, 重ね合わせ画像を示す。画像は図 11 における光照射後 10 分後の細胞と同じ。スケールバーは 80 ピクセル (= 11.9 μm)。Ota et al. (2018) を改変。

5. おわりに

本研究で我々は, HaematoCalMorph と統計解析を組み合わせて培養中の *H. pluviialis* の状態を捉えることが可能な微細藻類モニタリングシステムを開発した。HaematoCalMorph とハイパースペクトルイメージング技術を組み合わせることによって, 培養液中の細胞に含まれる

色素量の変化を詳細に把握することが可能になった。開発した技術を使用して、細胞内の色素動態を観察することで、アスタキサンチンの細胞内における挙動の新たな仮説を提案するに至った。

視覚情報は極めて多くの情報を保有しているが、それらを定量的情報として取り出す点に難しさがある。本研究では、細胞を経時的に撮影することで得られた顕微鏡画像を画像解析することによって、時間的空間的な視覚情報を得ただけでなく、可視光領域のハイパースペクトル画像を取得することによって高密度な色覚情報も活用した。これらの技術は更に改良が可能である。例えば、現行バージョンの HaematoCalMorph では 55 パラメータの形態的特徴を設定しているが、パラメータの数を更に増やすことによって、より多くの視覚情報を意味的に取り出すことが可能となる。また、本研究では可視光領域でスペクトル画像を取得したが、色素には紫外領域に吸収帯を持つものも多く、また赤外領域の波長からはラマンスペクトルを得ることが可能であることから、スペクトル画像を撮影する波長領域を更に拡大することによって、視覚では捉えることのできない領域の情報も活用可能となる。画像解析とハイパースペクトルイメージングの組み合わせは、植物の様々な色素の動態を詳細に捉えることを可能にする解析技術と言えるだろう。

6. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究の遂行にあたり、都筑幹夫先生、野上識博士（東京大学）並びに森田彩氏に多大な協力を頂きました。都筑先生に *Parachlorella kessleri* の顕微鏡写真(図 6) をご提供していただきました。この場をお借りして心から感謝の意を表します。本研究は JST, CREST および日本学術振興会の支援を受けたものである。

7. 引用文献

- Canny, J. 1986. A computational approach to edge-detection. *IEEE Trans. Pattern Anal. Machine Intell.* 8: 679–698.
- Chen G, Wang B, Han D, Sommerfeld M, Lu Y, Chen F, Hu Q. 2015. Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in *Haematococcus (Chlorophyceae)*. *Plant J.* 81: 95-107.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N. & Tsuji, Y. 1997. Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *J. Ferment. Bioeng.* 84: 94–97.
- Lao YM, Jin H, Zhou J, Zhang HJ, Cai ZH. 2017. Functional Characterization of a Missing Branch Component in *Haematococcus pluvialis* for Control of Algal Carotenoid Biosynthesis. *Front Plant Sci.* 2;8:1341.
- Lawson, C. & Hanson, R. 1995. Solving Least Squares Problems. *Society for Industrial and Applied Mathematics, Philadelphia, PA*, 351.
- Nogami, S., Ohnuki, S. & Ohya. 2014. Y. Hyperspectral imaging techniques for the characterization of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 50, 939–947.
- Ohnuki, S., Nogami, S., Ota S., Watanabe K., Kawano S., & Ohya Y. 2013. Image-based monitoring

- system for green algal *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) cells during culture. *Plant Cell Physiol.* 54: 1917–1929.
- Ota, S., Morita, A., Ohnuki, S., Hirata, A., Sekida, S., Okuda, K., Ohya, Y., & Kawano, S. 2018. Carotenoid dynamics and lipid droplet containing astaxanthin in response to light in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Sci. Rep.* 4: 5617.
- Peled E, Pick U, Zarka A, Shimoni E, Leu S, Boussiba S. 2012. Light-induced oil globule migration in *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *J. Phycol.* 48: 1209-1219.
- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A. and Kawano, S. 2013. Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS One* 8: e53618.

深層学習の利活用による植物表現型解析技術の展望

大倉史生^{1,2}・野下浩司^{1,3}・木下俊則^{4,5}・戸田陽介^{1,4,6}

¹JST さきがけ、〒332-0012 埼玉県川口市本町4丁目1-8

²大阪大学産業科学研究所複合知能メディア研究分野
〒567-0047 大阪府茨木市美穂が丘8-1

³九州大学理学研究院大学院理学研究院生物科学部門
〒819-0395 福岡県 福岡市西区 元岡774番地

⁴名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所
〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

⁵名古屋大学理学研究科 〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町

⁶アグリエア株式会社 〒432-8011 静岡県浜松市中区城北3丁目5番1号

Fumio Okura^{1,2}, Koji Noshita^{1,3}, Toshinori Kinoshita^{4,5}, Yosuke Toda^{1,4,6}

Perspectives of Plant Phenotypic Analysis Utilizing Deep Learning

Keywords: Deep Learning, Machine Learning, Plant Phenotyping

¹Japan Science and Technology Agency, 4-1-8 Honcho, Kawaguchi, Saitama 332-0012, Japan

²Department of Intelligent Media, The Institute of Scientific and Industrial Research, Osaka University, 8-1 Mihogaoka, Ibaraki, Osaka, 567-0047, Japan

³Department of Biology, Faculty of Science, Kyushu University, 744 Motoooka, Nishi-ku, Fukuoka 819-0396, Japan

⁴Institute of Transformative Bio-Molecules (WPI-ITbM), Nagoya University, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, Japan

⁵Division of Biological Science, Graduate School of Science, Nagoya University, Chikusa-ku Nagoya 464-8602, Japan

⁶AgriHeir Co. Ltd, 3-5-1 Johoku Naka-ku Hamamatsu, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.10b7.00160

1. はじめに

近年、画像解析など様々な分野において深層学習の活用が進んでいる。深層学習のルーツであるニューラルネットワークは1940年代から研究が行われてきたが、様々な技術的困難から流行・衰退を繰り返してきた。2000年代後半以降、事前学習の有用性などのいくつかの技術的ブレイクスルーと計算資源の飛躍的進歩を背景に、大規模なニューラルネットワークの最適化が可能となったことから、様々な分野での応用が広がっている。特に、植物表現型解析の主要な技術要素である画像解析においては、畳み込み演算を行うフィルタの学習を伴う畳み込みニューラルネットワーク (convolutional neural network: CNN) の活用が進んでいる。CNNの初出は1980年代に遡る (LeCun et al. 1989; Fukushima and Miyake 1982) が、従来の (深

層学習を用いない)手法による画像分類と比較して精度を圧倒的に改善し CNN ブームの幕開けを告げたのは 2012 年に提案された AlexNet (Krizhevsky et al. 2012) である。コンピュータの計算能力の進歩と歩調を合わせるように、CNN の構造 (層の数や接続関係) も巨大化し続けている。AlexNet が 8 層のネットワークであったのに対し、2014 年に提案された GoogLeNet (Szegedy et al. 2015) は 22 層で分岐を含む構造をなし、翌年提案された ResNet (He et al. 2016) はループ構造を含む最大 152 層のネットワークを用いて人間による画像分類を超える精度を達成した。

大量の入出力データからネットワーク内のパラメータを学習することで、手作業での特徴設計なしに画像解析を実現できる手軽さを持つなどの利点から分野を問わず活用されつつある。植物表現型解析の分野においても、植物の葉の画像から 14 種の疾病を検出する手法が 99% の識別精度を達成する (Mohanty et al. 2016) など、深層学習を用いた植物表現型の解析への応用は数多く報告されている。しかし、層の増加や構造の複雑化は、CNN による判断根拠の理解を難しくしている。深層学習がある種の「ブラックボックス」である¹といわれ、特に基礎科学の分野において深層学習の活用を敬遠する一因となっている。

有効活用するにせよ、あえて使わないにせよ、多くの分野で深層学習と関わりが避けられなくなっている。その意味で、深層学習が本分野に何をもたらしたのか、その到達点を知っておくことは重要であろう。本稿では、特に画像を用いた植物表現型解析における応用事例を紹介し、深層学習の植物科学における応用可能性の一端を明らかにするとともに、その技術的限界と今後の展望を考察する。

2. 気孔開度定量自動化による表現型スクリーニングの実現

植物の気孔開口制御は個体の成長と環境ストレス応答において重要な役割を担う。光条件下において、植物は気孔を開口させることによって光合成に必要な二酸化炭素を取り込むと同時に、蒸散を通じて地下部から地上部への栄養転流を促進する。一方、乾燥条件下では気孔を閉鎖させることによって水分損失を抑制する。気孔開閉制御の分子機構を明らかにすると同時に、植物の光合成活性および乾燥ストレス耐性の人為制御を目指し、著者らは気孔開口を制御する化合物の探索およびその分子機能の解析を進めてきた (Toh et al. 2018)。前報においては、一般に表現型スクリーニングと呼ばれる手法を採用した。具体的には、候補化合物を葉に処理した後、一定時間後気孔の開口度 (気孔開度) を測定することによって化合物の生理活性を評価するという方法である。しかしながら、化合物処理した植物の葉の表面を顕微鏡で 1 枚 1 枚撮影し、気孔開度を手作業で測定せざるを得なかったため、大量の化合物評価は困難であるという問題点があった。

¹ これは程度問題であり、従来の機械学習も似たような意味で「ブラックボックス」である。

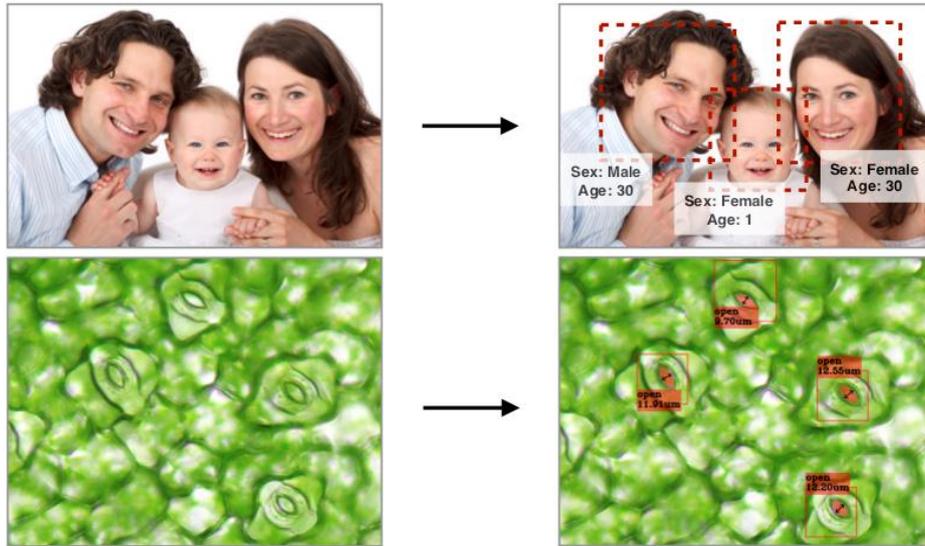


図1 顔認証技術をもとにした気孔開度測定技術²

そこで筆者らは、画像解析による気孔開度測定を自動化する手法を確立した。本節の詳細については (Toda et al. 2018) を参照されたい。本手法は、深層学習を活用した顔認識技術 (Taigman et al. 2014) などをベースにしている。顔認識技術の一例においては、まずは事前定義された特徴量を利用する機械学習モデルを用いて画像内における顔の場所を検出し、次にその顔から「年齢」や「表情」といった情報を深層学習によって識別する (図1 上段)。それと同様に本手法では、気孔の場所を特定した後、各々の開閉状態を識別する。閉鎖していると識別された気孔の開度を 0 と一律に扱う一方、開口していると識別された気孔を含む領域のみ、画像二値化を経た定量的計測プロセスが実行される (図1 下段)。

本技術の導入により、これまで手作業に依存していた定量解析の自動化が可能となったと同時に、「何割の気孔が開口していた、または閉鎖していた」といった、定性的な人の評価基準を模倣させることが可能となった。特筆すべきは、解析速度が手動に比べ 80 倍向上したことであり、日常的な定性・定量的表現型スクリーニングの実行が大幅に易化した。このように、他分野における深層学習を活用した技術を基にして、植物画像解析のモジュールに利用することで、人手が必要な解析作業を自動化が実現する一例として紹介した。

3. 深層学習と三次元復元による枝の三次元構造推定

詳細な植物表現型解析、特に枝の一本一本レベルで植物の三次元形状・構造を解析することが可能になれば、分枝過程の定量化や剪定の最適化など、育種や栽培管理における新たな応用が見えてくる。しかし、植物は細い枝、同色の葉、遮蔽の多さなどから、三次元形状の復元が非常に難しい対象である。特に、枝構造を再現するには、葉などによる枝の遮蔽を適切

² 本図で使用されている人物像にはクリエイティブ・コモンズ 1.0 ライセンスが付与されており、<http://publicdomainpictures.net> から援用した。なお、各顔に割り振られた性別や年齢は、本来ならば深層学習による推論で得られる値であるが、ここでは筆者が定めたランダムな値で意味はない。

に補完する必要がある。いかにして「見えない部分」を推定するかは、植物科学分野のみならず、情報科学、特に画像解析・コンピュータビジョン分野においても非常に挑戦的な課題である。

提案手法は、複数の視点から撮影された植物画像（多視点植物画像）を入力とした三次元枝構造の推定手法である。深層学習による画像変換（image-to-image translation）と呼ばれる手法を用いて、各画像で葉などに隠された枝の存在確率を推定し、推定された枝確率を用いて三次元復元することにより、見えない枝も含めた枝の構造を再構成する。なお、本節で述べる手法の詳細については (Isokane et al. 2018) を参照されたい。

3-1. 画像変換：画像をつくる深層学習

本手法で活用するのは、画像変換と呼ばれる技術である。画像変換は、入力画像に含まれる物体情報などを保持したまま、その「ドメイン」を変換する（例えば線画から写真など）手法である。画像変換に類する技術は深層学習の登場以前から活発な研究が行われてきた (Efros and Freeman 2001; Darabi et al. 2012)。画像のテクスチャに着目した変換や色、スタイルの変換がその例であり、画像の矩形小領域（パッチ）ごとに変換画像を生成し合成する手法が多く試みられ、Adobe Photoshop 等にも画像修復の手法として搭載されている。

他方、本研究で用いるのは Pix2Pix (Isola et al. 2017) と呼ばれる深層学習を利用した画像変換手法である。本手法は、conditional generative adversarial networks (cGAN) と呼ばれるネットワークを活用する。入出力画像の正解ペア群を事前に学習データとして与えると、生成器が画像生成を行い、生成された画像と入力画像が正しいペアであるかどうか判別する CNN である識別器と「競い合う」ことにより学習が進む。識別器は、一般的な CNN が画像全体を畳み込むのとは異なり、画像のパッチを入力とする CNN を用い、与えられた入力・出力パッチペアが本物かどうかを判定する。この方法は、「深層学習以前」の画像変換が活用していた考え方に近い手法である。深層学習はあくまで優秀な最適化器であり、良いシステムの構築には「深層学習以前」の知識の蓄積も重要であることを示す例として興味深い。

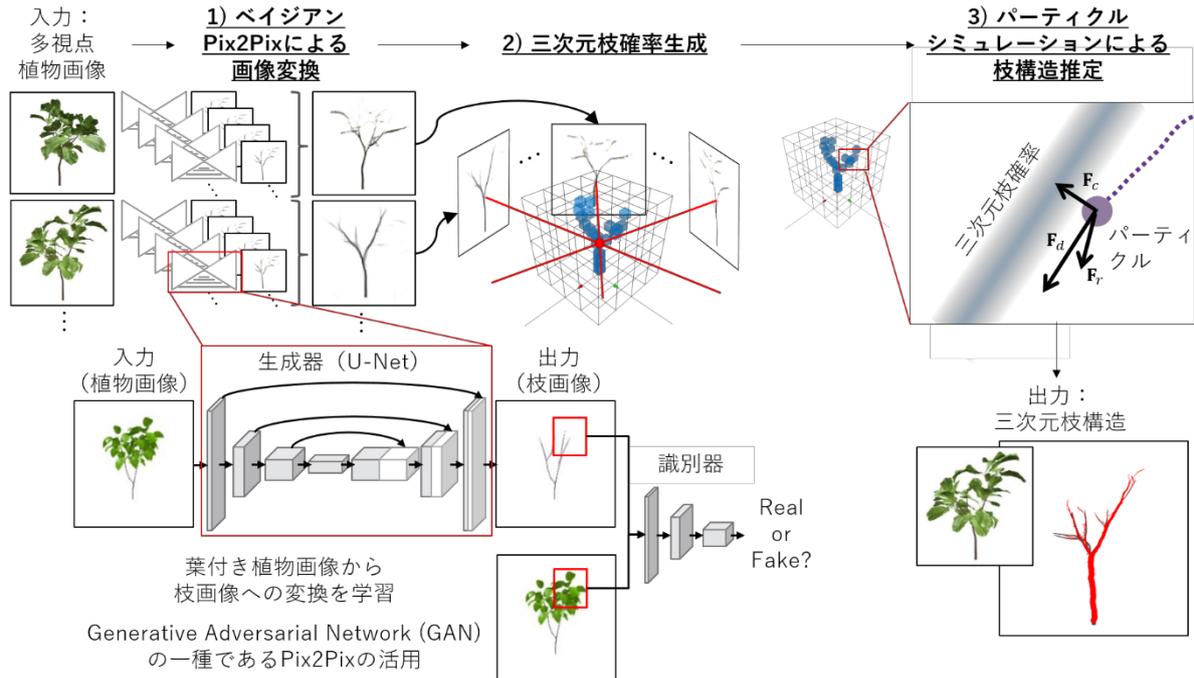


図2 深層学習による画像変換を用いた枝の三次元構造復元 (Isokane et al. 2018)

3-2. 枝の三次元構造復元への画像変換の活用

では、いかにして画像変換を枝の三次元構造復元に活用するのか。手法の流れを図2に示す。本手法は、複数の視点から撮影された植物画像（多視点植物画像）を入力とし、葉に隠れた部分も含め、枝の三次元構造を復元する。そのために、各画像上で深層学習を用いた画像変換 (Isola et al. 2017) を使い、葉付きの植物画像から枝の存在確率を推定する。各画像上での枝の存在確率は、従来の多視点画像を用いた三次元復元 (structure from motion: SfM (Wu 2013)) によって推定されたカメラ位置・姿勢を用いて3次元空間上における枝存在確率に変換できる。本研究では、この三次元枝確率に基づき、従来、CG分野で研究されてきた樹木の自動モデリングと同様の枠組みで枝構造を推定する。

提案手法の精度および有効性を検証するための三次元復元実験を行った。画像変換ネットワークの学習のために、CG植物生成ツール (Palubicki et al. 2009) を用いて10本のCG植物を作成し、葉付き・枝のみの状態で各72視点からの撮影を行った。ネットワークの学習に用いた画像とは異なるCG画像を入力として枝形状の推定を行うと、提案手法の枝位置の誤差は、植物の高さに対しおよそ1%~2%であり、良好な精度を示した。また、復元に用いる視点数を減らした場合や、葉の色・形が異なる植物種を入力画像とした場合にも有効であった。

本節では、「見えない枝」を復元する植物の三次元枝構造復元手法を紹介してきた。見た目・形状・構造が複雑（葉による遮蔽、枝の細さ、構造のバリエーションの多さ）な植物は、植物科学のみならず、情報科学分野においても非常に挑戦的かつ興味深い研究対象である。詳細な構造推定手法の開発は未だ途上であり、初期評価の段階である。今後は、植物表現型解析の実応用に即した手法として改良することが重要である。

4. 深層学習の病害虫診断への応用と判断根拠の可視化

前節までに述べたように、深層学習の活用は、植物表現型解析の分野において「これまでできなかった」応用を実現し、画像解析手法の可能性を大幅に広げた。一方で、深層学習の広まりは、植物科学も含めた基礎科学分野において「これまで簡単にできたことができない」状況を生み出している。「深層学習はブラックボックスであり、判断根拠が人の目で判断できない」という問題であり、これは基礎科学において致命的な問題となり得る。

他方、深層学習の「ブラックボックス」の中身を明らかにしようとする研究も活発に行われている。特に、画像解析に広く用いられる CNN の計算過程を、人が理解できる形に可視化する手法が多く提案されている (Selvaraju et al. 2017; Ghosal et al. 2018)。しかし、多くの手法は ImageNet データセット (Russakovsky et al. 2015) (一般的な物体を集めた 1000 カテゴリからなる画像データセット) を実験対象として開発されており、特定の物体 (植物) を対象として適用した場合にどのような特性を示すのかは明らかにされていない。そこで本節では、葉の病害虫診断を例として、CNN 可視化手法の特性および活用可能性を議論する。

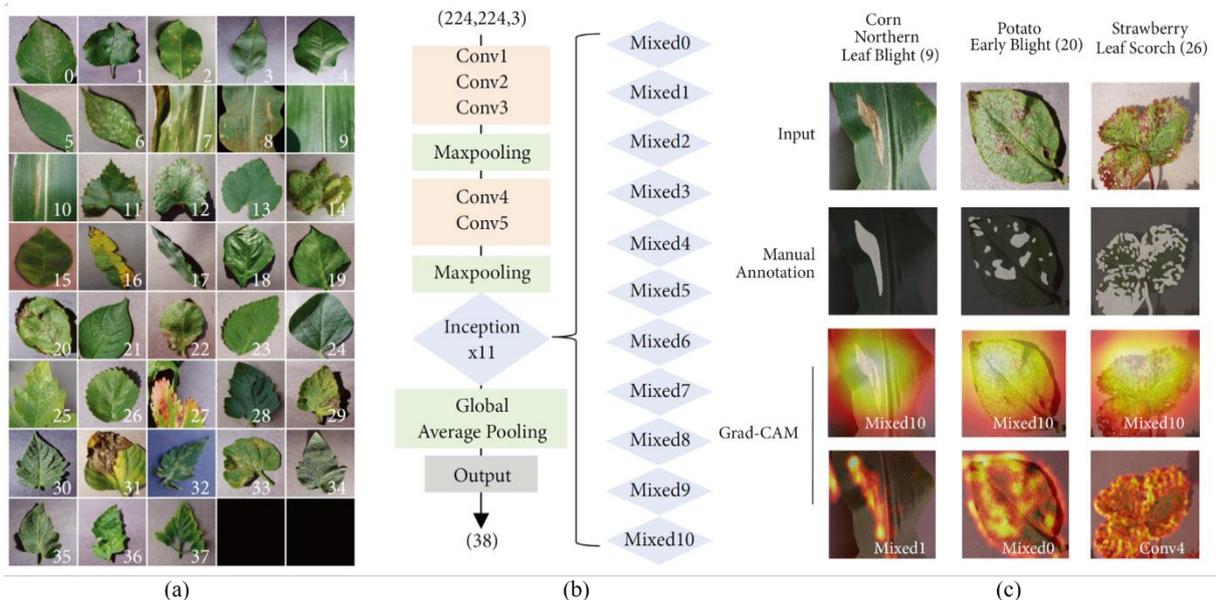


図3 CNNによる葉の病害虫診断と判断根拠の可視化 (Toda and Okura 2019)

本節では、InceptionV3 (Szegedy et al. 2016) と呼ばれる CNN を用いた葉の病害虫診断ネットワークを学習し可視化する。学習には、葉の画像データセットである PlantVillage (Hughes and Salathé 2015) を用いる。本データセットは、各画像に健康および様々な疾病に対応する 38 のラベル (図 3(a)参照) が付与されている。InceptionV3 は、図 3(b)に示すようなネットワークであり、各 Inception モジュール (Mixed) は分岐構造を含む畳み込み層である。

図 3(c)に、CNN の可視化手法でも特に広く用いられる、ヒートマップによる可視化手法の一つである Grad-CAM (Selvaraju et al. 2017) による可視化結果を示す。他の手法群も含めた網羅的な比較は (Toda and Okura 2019) を参照されたい。Grad-CAM は、各ニューロンの重要度を可視化する手法の一つであり、CNN の畳み込み層に適用した場合、画像中の位置に対応づいた重要度のヒートマップとして可視化ができる。図 3(c)より、Grad-CAM による可視化は

比較的浅い層 (Conv4 から Mixed1) で実際の病害領域に対応した領域がハイライトされていることがわかる。深い層 (Mixed10) においては、畳み込みの繰り返しにより解像度が低下し、詳細な位置の特定は難しい。

一般に、ImageNet データセット等の広く様々な物体カテゴリを含むようなデータセットを用いた場合の Grad-CAM の可視化能力は浅い層で下がる (つまり、浅い層では画像の判別に有効な高レベル特徴が抽出できていない) ことが知られているが、従来の知見とは異なり、葉の病害虫画像を対象とすると、浅い層での特徴抽出が非常に有効であった。これは、葉の病害虫などの見た目が色の明暗やテクスチャなどの低レベル画像特徴によく現れており、比較的少ない回数の畳み込みで抽出できたためであると考えられる。

本可視化結果を用いると、ネットワークの浅い層のみを用いて再学習し、同程度の分類精度を維持したままパラメータ数 (学習にかかる時間・メモリの量に関わる) を削減することができる。本実験条件においては、Mixed6 以降の畳み込みを削除した場合、精度を下げないまま 75% のパラメータを削減できた。従来、深層学習の研究においてパラメータ削減を自動で行う方法は数多く提案されている (Han et al. 2015) が、可視化に基づく直感的な削減手法は、植物科学等の専門的知見をネットワークの設計に活用し得る、新たな指針を与えるかもしれない。

5. おわりに

本稿では、深層学習の植物表現型解析、特に植物画像解析への応用例を紹介してきた。各節で述べたように、情報科学においてこれまで広く扱われてきた一般的な対象と比較して、植物は特異な部分が多い。第 3 節で述べたように、植物の形状・テクスチャ・遮蔽の特性は情報科学分野においても非常に挑戦的である。また、第 4 節における葉の病害診断においては、病害虫の見た目の特性が異なることにより、一般的な物体認識タスクと深層学習による判断過程に相違が見えてきた。

深層学習ライブラリのコモディティ化や、可視化技術の進展により、植物科学分野においても深層学習の参入障壁は飛躍的に低くなってきている。しかし、各タスクに機械学習を活用するにあたり、どのようなモデルを選択するのか、そして、出てきた結果をどのように解釈するのかは、深層学習登場以前と比較し重要になっている。例えば、本稿で取り上げた CNN や GAN 以外にも文章や動画といった系列データを扱う再帰型ニューラルネットワーク (RNN) や 試行錯誤から自律的に学習することを目指す強化学習に用いられる Deep Q-Network (DQN) など異なるネットワーク構造も提案されている。目的に応じて適切なネットワークや学習アルゴリズム (場合によってはハードウェアも) を選択する必要がある、そもそも深層学習的な手法が必要かも検討の余地はあるだろう。また、深層学習は優秀な最適化器にすぎず、大量の学習データを与え当該タスクで高い精度を達成したとしても、その結果を解釈するのは (可視化手法などの手助けを借りるにしても) 人類である。人工知能が人間の仕事を奪う、などと盛んに叫ばれているが、物事の解釈こそが重要になる基礎科学分野においては、深層学習の登場によって、それを解釈する役目—人類が持つ専門的知識の重要性—は以前より高まっているともいえる。植物科学者が、強力な深層学習の力を借りつつ、その過程や結果と

自身の専門性を組み合わせ、新たな知見を創出することが、植物科学における新たなワークフローの一つとなるかもしれない。

2019年3月、日本における植物表現型解析研究の進展を加速するため、本稿著者らを含む有志が立ち上げ人となり、2019年3月に日本植物フェノタイピングネットワーク (Japanese Plant Phenotyping Network: JPPN)³を設立した。植物表現型解析は、植物科学において特に情報科学や画像解析が応用されやすい分野である。今後は植物表現型解析に関する情報交換やワークショップ、チュートリアルなどを行なっていく予定であるが、実際に解析をおこなっている（もしくは困難に直面している）植物学会員の皆様からの提案・フィードバックは、こうしたコミュニティの健全な発展に有益であろう。

謝辞

本総説で紹介した研究は、JST さきがけ「情報科学との協働による革新的な農産物栽培手法を実現するための技術基盤の創出」JPMJPR17O5 (戸田), JPMJPR17O3 (大倉), JPMJPR16O5 (野下) および、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究 15H05956 (木下), JSTALCA JPMJAL1011 (木下) の支援を得て遂行した。

引用文献

- Darabi, S., Shechtman, E., Barnes, C., Goldman, D.B. & Sen, P. 2012. Image melding: Combining inconsistent images using patch-based synthesis. *ACM Trans. Graph.* 31(4): Article No. 82.
- Efros, A.A. & Freeman, W.T. 2001. Image quilting for texture synthesis and transfer. In: *Proc. SIGGRAPH2001*. pp. 341–346. ACM.
- Fukushima, K. & Miyake, S. 1982. Neocognitron: A self-organizing neural network model for a mechanism of visual pattern recognition. In: Amari, S. & Arbib, M. A. (eds.) *Competition and Cooperation in Neural Nets*. pp. 267–285. Springer, Berlin Heidelberg.
- Ghosal, S., Blystone, D., Singh, A.K., Ganapathysubramanian, B., Singh, A. & Sarkar, S. 2018. An explainable deep machine vision framework for plant stress phenotyping. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 115(18): 4613–4618.
- Han, S., Pool, J., Tran, J. & Dally, W. 2015. Learning both weights and connections for efficient neural network. In: *Proc. 2015 Conf. Neural Information Processing Systems (NIPS)*. pp. 1135–1143.
- He, K., Zhang, X., Ren, S. & Sun, J. 2016. Deep residual learning for image recognition. In: *Proc. 2016 IEEE Conf. Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. pp. 770–778. IEEE.
- Hughes, D. & Salathé, M. 2015. An open access repository of images on plant health to enable the development of mobile disease diagnostics. *arXiv preprint arXiv:1511.08060*.
- Isokane, T., Okura, F., Ide, A., Matsushita, Y. & Yagi, Y. 2018. Probabilistic plant modeling via multi-view image-to-image translation. In: *Proc. 2018 IEEE Conf. Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. pp. 2906–2915. IEEE.
- Isola, P., Zhu, J.-Y., Zhou, T. & Efros, A.A. 2017. Image-to-Image Translation with Conditional

³ <https://www.plant-phenotyping.jp/>

F. Okura, K. Noshita, T. Kinoshita & Y. Toda-8

- Adversarial Networks. In: *Proc. 2017 IEEE Conf. Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. pp. 5967–5976. IEEE.
- Krizhevsky, A., Sutskever, I. & Hinton, G.E. 2012. ImageNet classification with deep convolutional neural networks. *Commun. ACM* 60(6): 84–90.
- LeCun, Y., Boser, B., Denker, J.S., Henderson, D., Howard, R.E., Hubbard, W. & Jackel, L.D. 1989. Backpropagation applied to handwritten zip code recognition. *Neural Comput.* 1(4): 541–551.
- Mohanty, S.P., Hughes, D.P. & Salathé, M. 2016. Using deep learning for image-based plant disease detection. *Front. Plant Sci.* 7:1419.
- Palubicki, W., Horel, K., Longay, S., Runions, A., Lane, B., Měch, R. & Prusinkiewicz, P. 2009. Self-organizing tree models for image synthesis. *ACM Trans. Graph.* 28(3): Article No. 58.
- Russakovsky, O., Deng, J., Su, H., Krause, J., Satheesh, S., Ma, S., Huang, Z., Karpathy, A., Khosla, A., Bernstein, M., Berg, A.C. & Fei-Fei, L. 2015. ImageNet large scale visual recognition challenge. *Int. J. Comput. Vision* 115(3): 211–252.
- Selvaraju, R.R., Cogswell, M., Das, A., Vedantam, R., Parikh, D. & Batra, D. 2017. Grad-CAM: Visual explanations from deep networks via gradient-based localization. In: *Proc. 2017 IEEE Int. Conf. Computer Vision (ICCV)*. pp. 618–626. IEEE.
- Szegedy, C., Vanhoucke, V., Ioffe, S., Shlens, J. & Wojna, Z. 2016. Rethinking the inception architecture for computer vision. In: *Proc. 2016 IEEE Conf. Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. pp. 2818–2826. IEEE.
- Szegedy, C., Wei Liu, Yangqing Jia, Sermanet, P., Reed, S., Anguelov, D., Erhan, D., Vanhoucke, V. & Rabinovich, A. 2015. Going deeper with convolutions. In: *Proc. 2015 IEEE Conf. Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. pp. 1–9. IEEE.
- Taigman, Y., Yang, M., Ranzato, M. & Wolf, L. 2014. DeepFace: Closing the gap to human-level performance in face verification. In: *Proc. 2014 IEEE Conf. Computer Vision and Pattern Recognition (CVPR)*. pp. 1701–1708. IEEE.
- Toda, Y. & Okura, F. 2019. How convolutional neural networks diagnose plant disease. *Plant Phenomics* Article ID 9237136, 14 pages.
- Toda, Y., Toh, S., Bourdais, G., Robatzek, S., Maclean, D. & Kinoshita, T. 2018. DeepStomata: Facial recognition technology for automated stomatal aperture measurement. *BioRxiv* 10.1101/365098.
- Toh, S., Inoue, S., Toda, Y., Yuki, T., Suzuki, K., Hamamoto, S., Fukatsu, K., Aoki, S., Uchida, M., Asai, E., Uozumi, N., Sato, A. & Kinoshita, T. 2018. Identification and characterization of compounds that affect stomatal movements. *Plant Cell Physiol.* 59(8): 1568–1580.
- Wu, C. 2013. Towards linear-time incremental structure from motion. In: *Proc. 2013 Int. Conf. 3D Vision (3DV)*. pp. 127–134.