

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

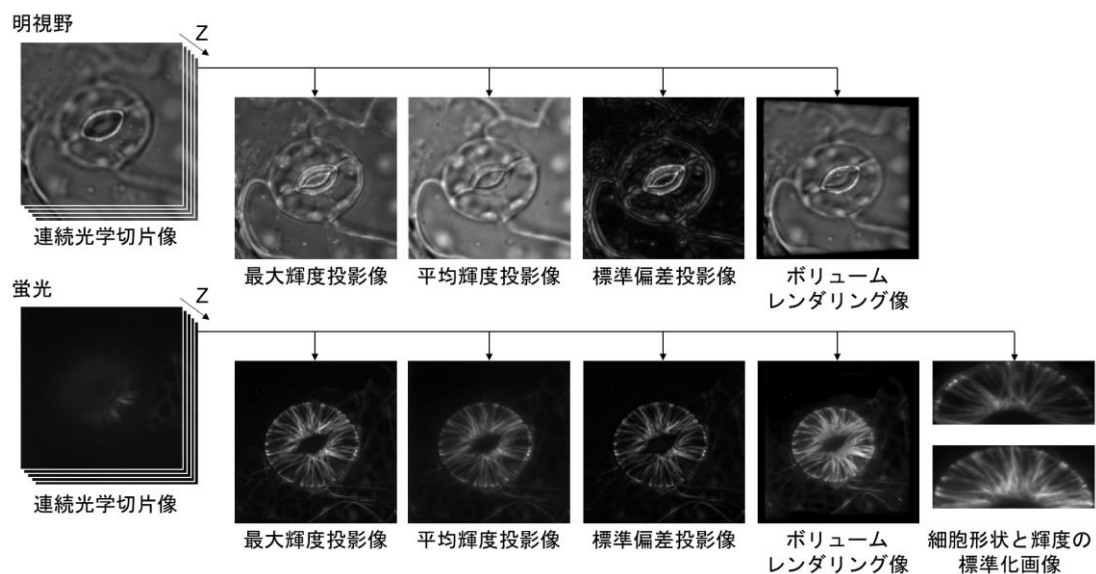


図 1. LIPS データベースで公開している画像の種類. 例として微小管の画像を示した.

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。

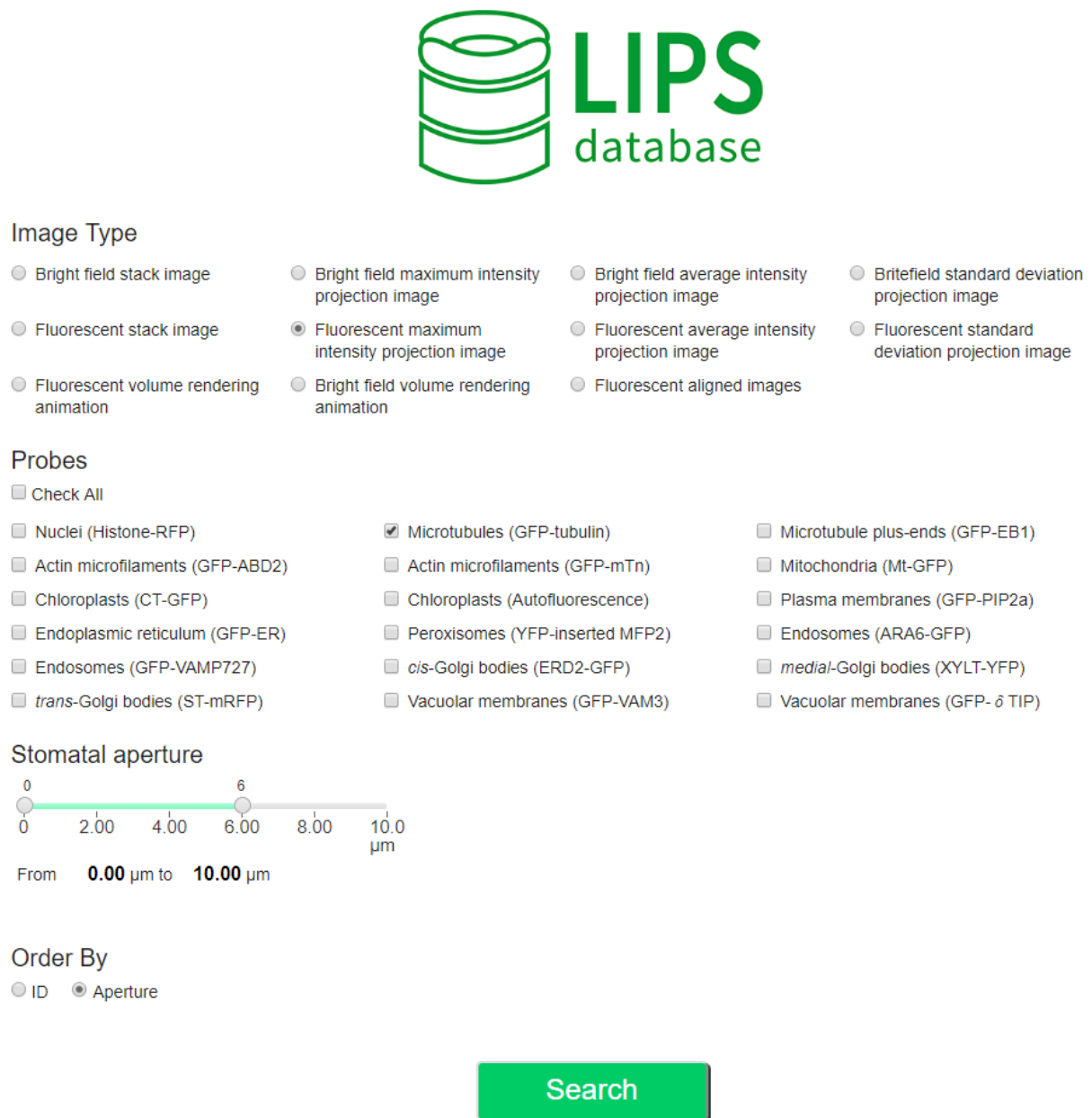


Image Type

- 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)
- medial*-Golgi bodies (XYLT-YFP)
- Endosomes (GFP-VAMP727)
- Vacuolar membranes (GFP-VAM3)
- Vacuolar membranes (GFP- δ TIP)
- trans*-Golgi bodies (ST-mRFP)

Stomatal aperture

0 6 10.0
0 2.00 4.00 6.00 8.00 10.0
 μm

From **0.00 μm** to **10.00 μm**

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）。

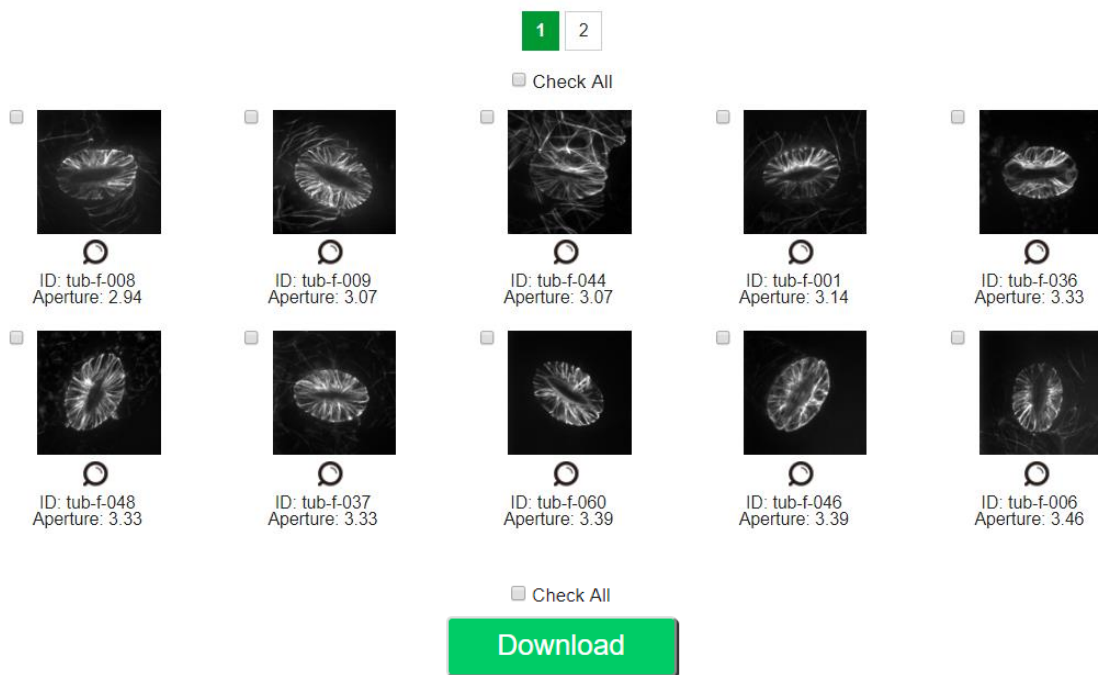


図 3. LIPS データベースにおける投影像の検索結果の一例.

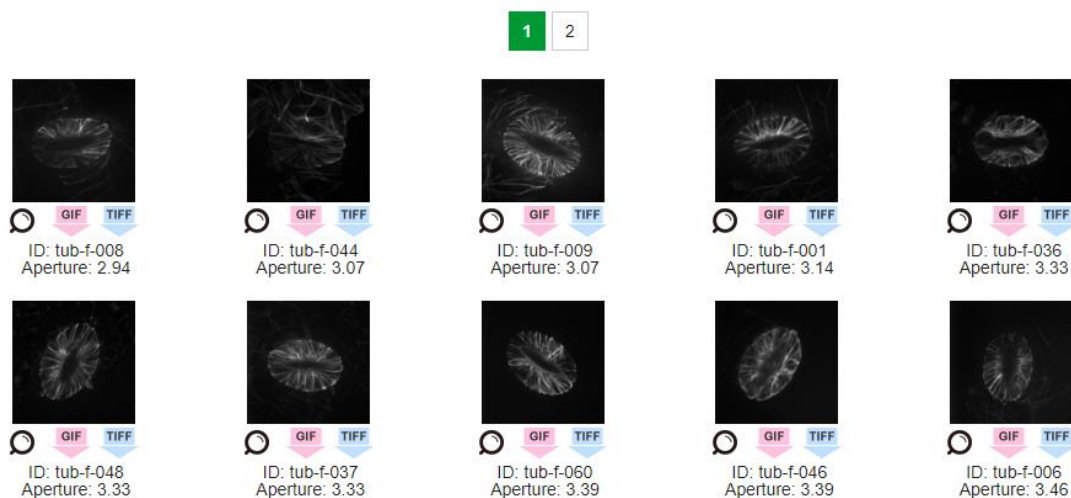


図 4. LIPS データベースにおけるスタック画像の検索結果の一例.

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。

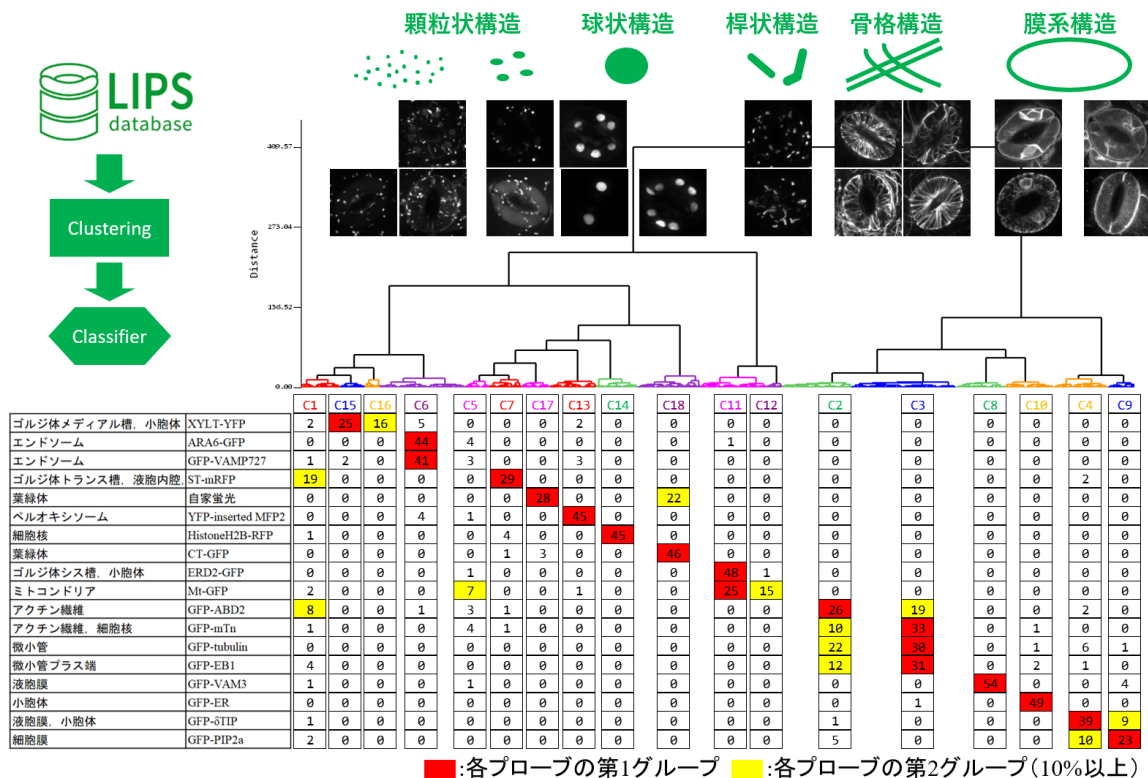


図 5. LIPS データベース画像のクラスタリング解析例。行列内の数字は画像数をあらわす。

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ある。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。本研究はキャノン財団の「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.