

機械学習を用いた細胞内タンパク質局在推定

重根 桂

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス領域 分子医学細胞生物学研究室

(末次 志郎 教授)

先端科学技術研究科 博士論文要旨

所属研究室 (主指導教員)	分子医学細胞生物学研究室 (末次教授)		
学籍番号	2021017	提出	2023/01/13
氏名	重根 桂		
題目	機械学習を用いた細胞内タンパク質局在推定		

細胞は分裂周期や細胞周囲の環境に応答し、様々な微細構造を取る。これらの細胞構造は F-アクチンと呼ばれる細胞骨格タンパク質によって主に決定される。ラメリポディアは、細胞移動に関与するアクチン依存性細胞内構造の 1 つであり、主に Wiskott-Aldrich 症候群タンパク質 (WASP) ファミリーのバープロリン相同タンパク質 2 (WAVE2) と膜リモデリング I-BAR ドメインタンパク質 IRSp53 によって生成される。接着斑は、ビンキュリンタンパク質を含み、ラメリポディアの形成と細胞移動を促進する別のアクチンベースの構造である。対照的に、微小管はアクチンとは異なる制御機構を持つことが知られているので、細胞内機序において F-アクチンとの協調は、ビンキュリン、IRSp53、WAVE2 などと比べると弱いと考えられる。従来研究では細胞内のタンパク質の局在は、蛍光タンパク質によるタグ付けを利用した免疫蛍光染色法によって観察されており、機械学習を用いた細胞内タンパク質局在の分析はなされていない。本研究では、細胞骨格タンパク質の局在情報を元にほかのタンパク質の局在推定を行うために、畳み込みニューラルネットワーク (CNN) を用いた。WAVE2、IRSp53、ビンキュリン、および微小管とペアになった F-アクチンの画像を使用して CNN の学習を行い、局在推定を試みた。生成された WAVE2、IRSp53、およびビンキュリンの画像は、実際の画像と非常によく似ていたが、対照的に、F-アクチン画像から生成された微小管画像は、微小管の特徴である中央体からの放射状の局在パターンを生成できていなかった。これは、F-アクチンの顕微鏡画像がアクチン関連タンパク質の局在に対してより多くの情報を提供することを示唆している。まとめると、この研究 CNN による画像変換が、機能的に関連するタンパク質の局在を予測できることを示唆しており、この研究を応用することで未知のタンパク質間の相関関係の解明等に寄与できると考えられる。

目次

1 章 序論	4
2 章 材料と方法.....	8
3 章 結果	11
3-1 Swiss3T3 細胞における F-アクチン並びに WAVE2 染色画像の取得	11
3-2 Pix2pix によるエポック数毎の画像生成推移	13
3-3 Pix2pix による F-アクチン染色画像からの WAVE2 染色画像の生成	15
3-4 MAE 並びに MS-SSIM を用いた pix2pix 生成画像の評価	17
3-5 Pix2pix による生成画像における細胞構造領域ごとの SSIM の比較	19
3-6 Pix2pix による F-アクチン染色画像並びに WAVE2 染色画像からの IRSp53 染色画像生成	21
3-7 MAE 並びに MS-SSI による生成された IRSp53 染色画像の評価	23
3-8 ビンキュリン局在予測への応用.....	25
3-9 チューブリン局在予測への応用	27
4 章 考察	29
5 章 参考文献.....	33

序論

近年様々な研究分野において機械学習を用いた解析がなされている^[1]。機械学習とはデータ群をもとに機械、例えばコンピューターなどが自動的に学習を行い、それらデータ群の中に潜むルールやパターンを解明する手法のことである。この機械学習における代表的な指標としてディープラーニング(深層学習)が挙げられる。機械学習は大まかに教師あり学習、教師なし学習、強化学習の三種類に分類される。教師あり学習とは、あらかじめ正解・不正解のラベル付けが行われたデータ群を用いて学習を行うことで、正解データ群と不正解データ群の分類を試みる手法のことである。適用例としては犬の画像と猫の画像を用いた二値分類問題や株価予測における上昇トレンドの予測などの回帰問題に用いられている。対照的に教師なし学習はラベル付けが行われていないデータ群を用いた学習を行う。これによりデータ自体の特徴を明らかにするのが目的である。この手法はクラスタリングと呼ばれるグループ分けに用いられることや、工場の生産等における異常検知において用いられている。強化学習はある目的が与えられ、目的に対する最終的な成果を最大化するために試行錯誤し最適化を繰り返していく学習方法である。これは自動運転などの分野や AlphaGo などのゲーム AI に用いられている。

バイオサイエンスにおける研究においても、様々な機械学習応用がなされている。例えば細胞画像の分類等への適用が挙げられる^[1-3]。明視野細胞画像データセットを用いた機械学習によるマウス細胞とヒト細胞及びそれらの耐放射線細胞と親細胞の判別を行って研究や^[4]、抗がん剤であるパクリタキセルで処理された乳がん細胞と未処理の乳がん細胞の判別などが機械学習によって行われた^[5]。また、連続する細胞画像を用いた学習によって、細胞自体が将来的にどの方向に移動するかを予測する方向予測などの研究もおこなわれている^[6]。これらの研究結果は、機械学習を用いることで、機械学習モデルが細胞画像から細胞特性に関連する優位な情報を抽出し、何らかの予測を行えることを示している。また、機械学習は細胞画像を基にした細胞種の分類だけでなく、タンパク質の局在化予測にも適用されている。例えばインシリコラベリングとして知られる方法では、明視野細胞画像及び特定のマーカータンパク質の染色画像の画像ペアを用いた機械学習により、推定染色画像を生成して、核、神経細胞、生細胞を自動的にラベリングすることが試みられた^[7]。また、明視野細胞画像からのゴルジ体や小胞体などの細胞内小器官の自動セグメンテーションなどの研究もなされている^[8]。

機械学習がバイオ分野にもたらすものとして望まれているものは、医療分野での貢献である。例えば組織切片や採取した細胞サンプルを元にした解析、また MRI の画像を元にした診断などで医療従事者の診断を補助するような仕組みが望ましい。実際の応用に近い研究の例として、モデル神経疾患細胞が治療薬に応答する際の細胞形態変化に注目し、細胞集団の中から薬剤に応答した細胞だけを AI を用いて自動的に判別する *in silico* FOCUS がある^[45]。この技術を用いることで、通常の診断では困難であった治療薬の効果、つまり病気のモデル細胞

が正常な形の細胞に変化する度合を高感度かつ安定的に評価することができ、この技術を元に従来よりもより効率の高い疾患治療薬の探索ができるようになった。その他にも、すでに分化した細胞を、iPS 細胞などの未分化細胞を介さずに別の種類の細胞へと変換するダイレクトリプログラミングを誘導する因子を機械学習を用いて特定する研究がなされている^[46]。この研究で皮膚由来の細胞から脳や心臓、腸などの細胞へと直接変換できる因子の予測に成功元細胞や標的細胞に関わる生体分子のマルチオミクスデータや細胞間の系統関係情報を機械学習アルゴリズムで統合することにより、ダイレクトリプログラミングを誘導する転写因子を高精度に予測することにも成功した。これにより通常実験ではコストや時間の面で困難であった転写因子の予測を短時間低コストで行えるようになったことと将来的な再生医療等の応用が期待できる。これらの研究のように、機械学習の膨大なデータの処理能力や自動化等の特性を活かし今後の研究における更なる応用が望まれている。

教師なし学習の手法の一つに敵対的生成ネットワーク (Generative Adversarial Network, GAN) がある。GAN は画像生成の方法の 1 つである。GAN の主な特徴としてあげられるのが generator と discriminator 二つのモデルを内部に有することである。Generator に対してランダムノイズ z を与えることで、generator はひとまず目的の画像に近いような画像 $g\text{-img}$ を生成する。Discriminator に対しては本物の正解画像 $r\text{-img}$ と generator によって生成された $g\text{-img}$ を与え、どちらが本物の画像 $r\text{-img}$ であるかを予測するような二値分類タスクを与える。学習が進むごとに generator は discriminator をだませるような画像を作れるように精度が向上していき、対照的に discriminator は $g\text{-img}$ を見破れるように精度が向上していく。このように二つのモデルを'敵対'させることでお互いの精度を向上させ、最終的に学習を終えた generator を用いることで目的画像の自動生成を試みる^[9]。GAN を用いた研究として、実際には存在しない人間の顔や部屋の画像を、ランダムノイズを入力として生成することに成功している^[10]。

GAN を利用した手法の一つに pix2pix が挙げられる^[11]。pix2pix はなんらかの相関関係を持つ画像ペアを用いた学習を行い、最終的に一方の画像からもう一方の画像の生成を試みる。Pix2pix においてはランダムノイズ z の代わりに入力画像を用いる。これまでの研究で、pix2pix は航空画像からの地図画像生成、白黒画像からのカラー画像生成、MRI のような医学画像から臓器箇所のラベリングなど、さまざまな種類のペア画像の生成に成功している。

細胞生物学における pix2pix を利用した研究の一つに、明視野細胞画像に対する細胞膜と核の自動ラベリングがある^[12]。この研究におけるラベリングは、膜と核の領域のアノテーション画像及び実際の細胞画像のペアを使用してモデルをトレーニングすることで実現された。また、細胞核に対する generator と核に対する generator をそれぞれ別個のものを用いることで、さらに精度が向上することが発見された。このように従来の細胞研究における pix2pix 利用は細胞画像に対するラベリングなどに留まっており、細胞内に存在するタンパク質に焦点を当てた応用はなされていない。

細胞は、F-アクチンを含む細胞骨格を変化させることにより、有糸分裂周期、周囲の環境、およびその他のさまざまな状況に基づいて形状を変化させる^[13, 14]。細胞内では、F-アクチンはさらに高次の構成に組み立てられ、環境に応答した細胞構造の形成を行う。この構成は主に、Cdc42、RhoA、Rac1 などの Rho ファミリーの低分子量 GTP アーゼによって決定される^[15, 16]。例えば、Rac1 は WAVE2 を介して F-アクチンの分岐を誘導する^[17-21]。Rac1 の活性化は、Sra1 / PIR121、WAVE2、Nap1、Abi1 / 2、および HSPC300 / BRICK からなる調節複合体の WAVE2 のコンフォメーション変化を誘発し、枝分かれ F-アクチン内の Arp2/3 複合体の活性化をもたらす^[22-25] (図 2A) 枝分かれ上の F-アクチン重合によって細胞膜が押され、ラメリポディアと呼ばれる扇形の細胞構造が形成される。ラメリポディアは、癌細胞の浸潤や転移の際に形成され、移動などの細胞運動に不可欠な構造の 1 つと見なされている^[28, 29]。IRSp53 は、WAVE2^[24, 26]を介して、このラメリポディアの形成に関与している。その他にも細胞が基底部分と接着する際には、接着斑と呼ばれる細胞構造が形成される。ビンキュリンと呼ばれるタンパク質は接着斑にあるタンパク質であり、F-アクチンに接続することでメカノトランスダクションに関与していると言われて^[27]。細胞の形態が変化するほかの例として細胞分裂があるが、アクチンとは異なる制御機構を持つことが知られているので、細胞内機序において F-アクチンとの協調は、ビンキュリン、IRSp53、WAVE2 などと比べると薄いと考えられる。

この研究では、細胞構造を示す画像である F-アクチンの染色画像を入力画像とし、WAVE2、IRSp53、ビンキュリン、及び微小管の特定タンパク質局在予測を試みた。予測のために pix2pix モデルを用い、F-アクチン並びに予測したいタンパク質の染色画像ペアとしてモデルに与え学習を行った。この学習を行うことで、pix2pix は F-アクチン染色画像と特定タンパク質染色画像の相関関係を学び、入力である F-アクチン染色画像を元に特定タンパク質の染色画像を出力する画像変換が可能になり、生成された画像を元に局在予測が可能となる。本研究における学習の結果、与えられた画像ペアを元にトレーニングされた pix2pix モデルは、F-アクチンの染色画像を入力することで、ラメリポディア関連タンパク質である WAVE2 と IRSp53 の染色画像の生成に成功した。また、生成された WAVE2 染色画像においては、ラメリポディアのみではなく細胞間接着に対する予測も同様に可能であった。また、生成された画像と実際の画像を比較したところ、細胞構造の種類ごとに生成の精度が異なることが判明した。ラメリポディア以外にも、接着斑と呼ばれる細胞構造に局在するタンパク質ビンキュリンに対しても予測が可能であった。対照的に、F-アクチンと微小管の染色画像ペアを用いた学習を行った場合には、pix2pix は F-アクチン染色画像から微小管の染色画像を正確に生成することができなかった。これは、F-アクチンと WAVE2、IRSp53 及びビンキュリンとの相関関係に比べ、F-アクチンと微小管の細胞内機序における相関関係が低いためであると考えられる。これらのことから、pix2pix を用いた画像変換による細胞内タンパク質局在予測は、二つのタンパク質同士が細胞内で機能的に関連している場合において、タンパク質の染色画像を高い精度で

生成し局在予測をすることができることを示しており、対照的に細胞内における機能的な関連が薄い場合は局在予測が困難であることを示している。

材料と方法

細胞培養

Plat-E、Swiss 3T3、および U251 細胞は、10%ウシ胎児血清 (FCS) およびペニシリン-ストレプトマイシン (PS) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) (Nacalai Tesque、08459-64) を用い、5%CO₂ インキュベーター(37°C)内で培養を行った。Plat-E、Swiss 3T3、および A549 細胞は、それぞれ 4、3、および 2 日ごとに継代した。

レトロウイルスを介した遺伝子導入

Swiss3T3 細胞に pMX-Myc-Rac1-CA ベクターをトランスフェクトした^[18]。まず、Plat-E 細胞を 10%FCS/PS を含む DMEM の 12 ウェルプレートで一晩培養した。トランスフェクションには、1.6 μ g のベクターを含む 100 μ L の Opti-MEM と 1 μ L の 293 フェクショントランスフェクション試薬 (Thermo Fisher) を含む 100 μ L の Opti-MEM を混合し、室温で 20 分間複合体を形成させた後、0.8ml の培地で Plat-E 細胞に添加した^[50]。48 時間後、培養上清を 0.22 μ m フィルターを使用してろ過し、8 μ g/mL の濃度のポリブレンを含む 1.2ml 培地で細胞に添加した。24 時間後、培地を 10%FCS/PS を含む新しい DMEM に交換した。さらに 24 時間後、細胞をカバースリップ (マツナミ) を含む 24 ウェルプレートに再播種し、さらに 48 時間培養した。

GFP-IRSp53 を発現する IRSp53 ノックアウト U251 細胞株は、CRISPR/Cas9 を介したゲノム編集を使用して確立した。IRSp53 (CCATGGCGATGAAGTTCCGG) の 2 番目のエクソン (29 番目のアミノ酸残基) をターゲットとするガイド RNA は、サーバー <http://crispr.mit.edu>^[41]を使用して設計され、pX330 ベクターに挿入した。これは細胞にトランスフェクトされてからクローン化された^[42]。GFP-IRSp53 および lifeact-mCherry の発現は、上記のようにレトロウイルスを使用して実行され、次に、蛍光活性化セルソーターを使用してクローンが単離された。

Swiss3T3 および U251 細胞の免疫蛍光染色

細胞を PBS 中の 4%パラホルムアルデヒドで室温で 20 分間固定した。続いて、細胞を、穏やかに振とうしながら、室温で 20 分間、PBS 中の 0.5%トリトン X-100 で透過性にした。次に、細胞を PBS 中の 0.1%Triton X-100 (PBS-T) で洗浄した。その後 3%ウシ血清アルブミンと 10%ヤギ血清を含む PBS を加え、穏やかに振とうしながら 1 時間細胞をブロッキングした。次に、細胞を PBS-T で洗浄した。一次抗体、ウサギ抗 WAVE2 抗体 (Cell Signaling、# 3659S)、マウス抗ビンキュリン (SIGMA、V 9131)、およびマウス抗アルファチューブリン (SIGMA、クローン DM1A) を 100、200、および希釈した。ブロッ

キング溶液中でそれぞれ 500 倍、穏やかに振とうしながら 1 時間インキュベートした後、PBS-T で 3 回洗浄した。二次抗体である AlexaFluor488-ヤギ抗ウサギまたはマウス IgG 抗体（高度に交差吸収、Thermo Fisher）は 400 倍に希釈され、F-アクチン検出用のローダミン-ファロイジン（Thermo Fisher）はブロッキング溶液で 1,000 倍に希釈し用いて、暗所で穏やかに振とうしながら 1 時間インキュベートした。次に、細胞を PBS-T で洗浄し、Prolong Diamond Antifade Mountant with DAPI（Thermo Fisher）を使用してスライドガラスにマウントし、室温で一晩固化させた後、4°C で保存した。Swiss3T3 細胞は、W-View Gemini（Hamamatsu Photonics）を備えた IX81 蛍光顕微鏡（OLYMPUS）を使用して観察した。U251 細胞は、FV1000 共焦点顕微鏡（オリンパス）を使用して観察した。

Conditional GAN

本研究の目的は、F-アクチンに基づいて WAVE2 の条件付き分布を決定することであった。pix2pix 条件付き GAN^[12] を使用することで、パッチ弁別器は画像のマルコフ性を敵対的損失として捉え、変換された画像が高い空間周波数を維持できるようにした。この敵対的学習の公式は以下に示す。

$$\hat{G} = \arg \min_G \max_D \mathcal{L}_{GAN}(G, D) + \lambda \mathcal{L}_{L1}(G), \quad (1)$$

ここで、generator G は F-アクチン x の画像を WAVE2 画像 y に変換した。これは以下に示す式のように、識別器 D が抗体染色によって「実際の」WAVE2 画像と区別できない F-アクチンの画像を変換するようにトレーニングされている。

$$\begin{aligned} \mathcal{L}_{GAN}(G, D) = & \mathbb{E}_{x, y \sim p_{data}(x, y)} [\log D(x, y)] \\ & + \mathbb{E}_{x \sim p_{data}(x), z \sim p_z(z)} [\log(1 - D(x, G(x, z)))]. \end{aligned} \quad (2)$$

敵対的損失に加えて、「偽の」WAVE2 画像と「本物の」WAVE2 画像の類似性である条件付き損失が次のように導入された。

$$\mathcal{L}_{L1}(G) = \mathbb{E}_{x, y \sim p_{data}(x, y), z \sim p_z(z)} [\|y - G(x, z)\|_1], \quad (3)$$

この式における z はランダムノイズを示す。

本研究では主にこのフレームワークに従い、generator と discriminator のネットワークを拡張した。本研究では、不確実性の推定のために、generator をベイジアン U-Net^[31] に置き換えた。スペクトル正規化^[43] は、最適化を安定させるためにパッチ弁別器に適用された。推論フェーズでは、予測分布は次のように表される。

$$\mu[y] = \mathbb{E}_{z \sim p_z} G(x, z), \quad \text{var}[y] = \mathbb{E}_{z \sim p_z} (G(x, z) - \hat{y}), \quad (4)$$

ここで、 μ と var は、それぞれ平均と分散を示している。

WAVE2 および F-アクション画像は 256×256 ピクセルにダウンスケールされ、[1-99] パーセンタイルの強度が[-1, 1]にマッピングされるように正規化された。データ拡張は、画像サイズの[-10, +10]%の変換、[-10, +10] $^\circ$ の回転、[-10, +10]%のスケール、せん断変換などの空間変換に基づいて適用された。せん断角が[- $\pi/16$, + $\pi/16$] rad で、水平方向と垂直方向に反転された。カーネルサイズは4ピクセル、つまり約 $1.9 \mu\text{m}^2$ であった。各ネットワークの詳細やトレーニング方法など、使用されたコードは https://github.com/yutahi/bayesian_unet で入手できる。

Estimation error

画像生成結果は、MAE と SSIM に基づいて評価された。MAE は、各ピクセルの輝度値の絶対誤差を示し、次のように表される。

$$\text{MAE}(f_i, y_i) = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^n |f_i - y_i|, \quad (5)$$

ここで、 f_i と y_i は、それぞれ真の値と予測値を示す。

SSIM は、明るさ、コントラスト、構造の観点から、周囲のピクセルの平均、分散、共分散の類似性を示す。個々のピクセルだけでなく、周囲のピクセルとの相関関係を組み込んだ指標となっている。SSIM は次のように表される。

$$\text{SSIM}(x, y) = \frac{(2\mu_x\mu_y + C_1)(2\sigma_{xy} + C_2)}{(\mu_x^2 + \mu_y^2 + C_1)(\sigma_x^2 + \sigma_y^2 + C_2)}, \quad (6)$$

ここで、 x と y はそれぞれ ground truth (WAVE2) と予測画像、 μ は平均ピクセル値、 σ はピクセル値の標準偏差、 σ_{xy} は x と y の間の共分散、 $C_1 = (0.01 \times L^2)$ 、 $C_2 = (0.03 \times L^2)$ 、 L は画像の動的範囲である^[44]。この研究では、8ビット画像を使用した。したがって、 $L=255$ である

ラメリポディア領域は、Labelme^[36] (<https://github.com/wkentaro/labelme>) を使用して SSIM 計算用に手動で注釈を付け、ラメリポディアで SSIM 値を抽出した。

結果

Swiss3T3 細胞における F-アクチン並びに WAVE2 染色画像の取得

Pix2pix を用いた細胞内タンパク質局在予測のために、swiss3T3 細胞に対する顕微鏡を用いた細胞画像取得を行った。ラメリポディアの形成は Rac1 の活性化により誘導されるため^[30]、構成的に活性な Rac1 変異体を swiss3T3 細胞に導入して、ラメリポディアの形成を誘導した。PFA を用いて細胞を化学固定した後、細胞をファロイジンと WAVE2 抗体で染色し、それぞれ F-アクチンと WAVE2 を可視化したサンプルを作成した。その後サンプルを顕微鏡を用いて撮影することで細胞の染色画像を取得した（図 1）。図に示されているように、F-アクチン染色画像において、rac1 の過剰発現によって形成誘導されたラメリポディア構造が形成されている細胞のエッジ部分の箇所と、WAVE2 染色画像において WAVE2 が局在している箇所が一致していることがわかる。このことからラメリポディア構造形成箇所において、F-アクチン-WAVE2 間において局在が相関していると考えられ、pix2pix による F-アクチン染色画像からの WAVE2 予測は可能であると考えた。同様の手法で F-アクチン並びに WAVE2 の染色画像を 722 ペア撮影し取得した。

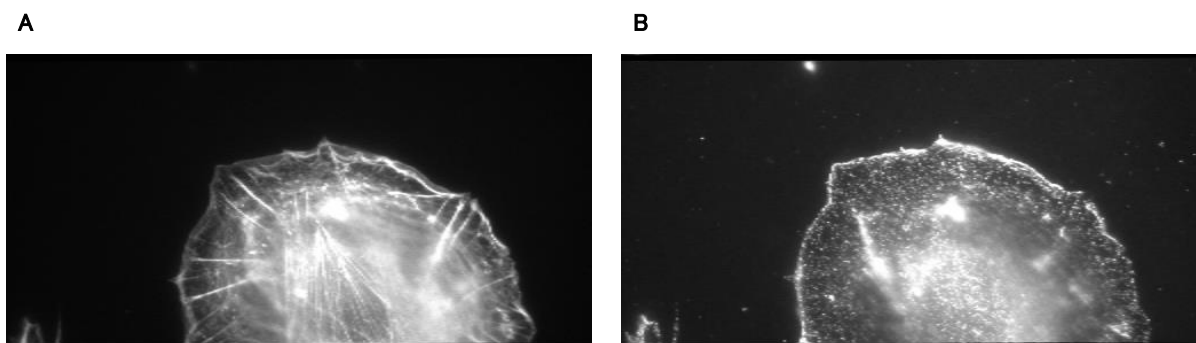


図 1. Swiss3T3 細胞における F-アクチン染色画像と WAVE2 染色画像

(A) Rac1 の活性型を発現する Swiss3T3 細胞における F-アクチンの染色画像。F-アクチンはローダミン-ファロイジンによって染色された。ラメリポディアは、細胞の端に形成された扇形の構造である。

(B) Rac1 の活性型を発現する Swiss3T3 細胞における WAVE2 の染色画像。

Pix2pix によるエポック数毎の画像生成推移

Pix2pix による細胞骨格タンパク質 F-アクチンの染色画像を用いた細胞内タンパク質局在の予測を行った。前述の細胞データセット 772 ペアを用い、データ全体を 4 つのサブセットに分割した 4 分割交差検定によってモデルの評価を行った。各サブセットにおいて、トレーニングセットは 579 枚の画像で構成され、そのうち 15% を検証セットとして用い、残りの 193 枚の画像はテストセットとして用いた。学習におけるのエポック数、つまり学習自体の反復回数は 200,000 回であり、反復回数が増えるにつれて、生成された WAVE2 画像と実際に顕微鏡によって取得された WAVE2 染色画像の類似性が高まっていった (図 2D)。しかし画像の類似性自体は 100,000 回程度で向上が頭打ちとなった。最終的に生成された WAVE2 の染色画像は、抗体染色によって得られたものに近い画像であった。

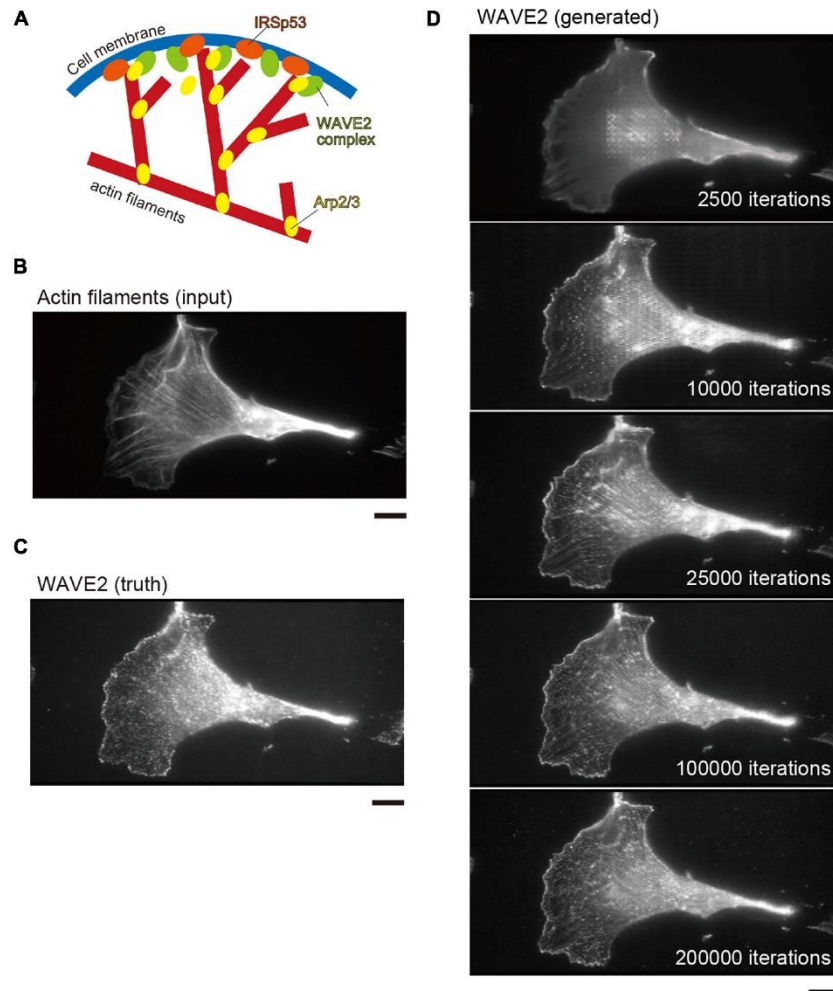


図 2. Swiss3T3 細胞におけるラメリポディアと WAVE2 の局在

(A) 膜状仮足での F-アクチンの構成と WAVE2 の局在の概略図。Rac1 が活性化されると、タンパク質複合体の WAVE2 が活性化され、分岐 F-アクチン形成のための Arp2/3 複合体が活性化される。IRSp53 は、細胞膜での Rac1 による活性化のために WAVE2 と協調する。

(B) Rac1 の活性化型を発現する Swiss3T3 細胞における F-アクチンの入力画像。F-アクチンはローダミン-ファロイジンによって染色された。ラメリポディアは、細胞の端に形成された扇形の構造である。

(C) B と共に免疫蛍光染色された実際の WAVE2 画像であり、WAVE2 がラメリポディアの端に蓄積していることを示している。

(D) WAVE2 画像生成のエポックごとの進捗状況。画像は 2,500 回の反復 (1 エポック) ごとに表示されており、反復回数は画像に示されている。画像の生成は、機能のないグレー画像から始まる。

各画像のスケールバーは $10 \mu\text{m}$ である。

Pix2pix による F-アクチン染色画像からの WAVE2 染色画像の生成

実際に pix2pix モデルによって生成された WAVE2 染色画像の例を図 3 に示す。生成画像を見ると WAVE2 の局在は細胞の端ではっきりと生成されており、ラメリポディア形成箇所への顕著な局在を示している (図 3A-C)。また、ラメリポディアのサイズに関係なく、pix2pix モデルは WAVE2 の局在を予測していることがわかった (図 3A-C)。また、先行研究により WAVE2 はラメリポディアだけでなく、ラメリポディアのマイクロスパイクと呼ばれる突起状の構造や糸状仮足の先端などの F-アクチンの他の細胞内構造にも局在しているが (図 3A) [32, 33]、pix2pix モデルは、図 2A の破線の四角で示されているように、ラメリポディアのマイクロスパイク構造での WAVE2 の局在も予測できていることがわかった。加えて、WAVE2 は細胞間接着においても機能を果たし、その箇所にも局在することが分かっている [34, 35]。Ground truth 画像において 2 つの細胞は互いに接触しており、細胞間接着構造の形成箇所に WAVE2 が局在していたが (図 3D)、この WAVE2 の局在も生成画像における細胞間接触の間で大まかな予測がなされていた。 (図 3D)。これらは各細胞画像において確認されており、pix2pix による全体的な WAVE2 局在の予測結果は、抗体染色によって検出された実際の WAVE2 局在と非常に類似しているように見えた。これらの結果をまとめると、これらの事実は、pix2pix がラメリポディアだけでなく、F-アクチン画像から他の細胞構造においても WAVE2 の局在を予測できることを示唆している。

図 3A-D で示した Absolute error のヒートマップは、各ピクセルにおける生成された WAVE2 染色画像と実際の WAVE2 染色画像の輝度の絶対値の差を示している。細胞のエッジにおけるラメリポディア部分においてはバックグラウンドよりも値が大きかったことが分かった。次に不確実性 (Uncertainty) を用いた評価を行った。この指標は予測結果の堅牢性に基づいており、ネットワーク層のモンテカルロドロップアウトと組み合わせた U-net アーキテクチャに基づき、ベイズ畳み込みニューラルネットワーク (ベイジアン CNN) を使用して正常に推定された [31]。ネットワーク層をドロップアウト (脱落) することにより、推論ごとに異なる出力が発生するが、発生確率の高い結果に関しては不確実性が低くなる。つまり画像生成段階において一部の情報を脱落させても、同じ結果が出力されやすいかどうかを見た指標である。WAVE2 局在の予測における不確実性は、ラメリポディアにおいて高い結果となり、バックグラウンドにおいて低い結果となった (図 3A-D)。

実際の WAVE2 画像と生成画像の類似性にもかかわらず、エラーは WAVE2 局在箇所のピクセルでより高かった。バックグラウンドよりも WAVE2 局在箇所のピクセルで絶対誤差及び不確実性が高かったことから、WAVE2 局在箇所の強度がピクセル解像度によって予測されているものではないと考えられた。その代わりに予測はより定性的なものであり、生成画像の WAVE2 局在は入力に用いた F-アクチンのテクスチャーを反映しているものであると考えた。

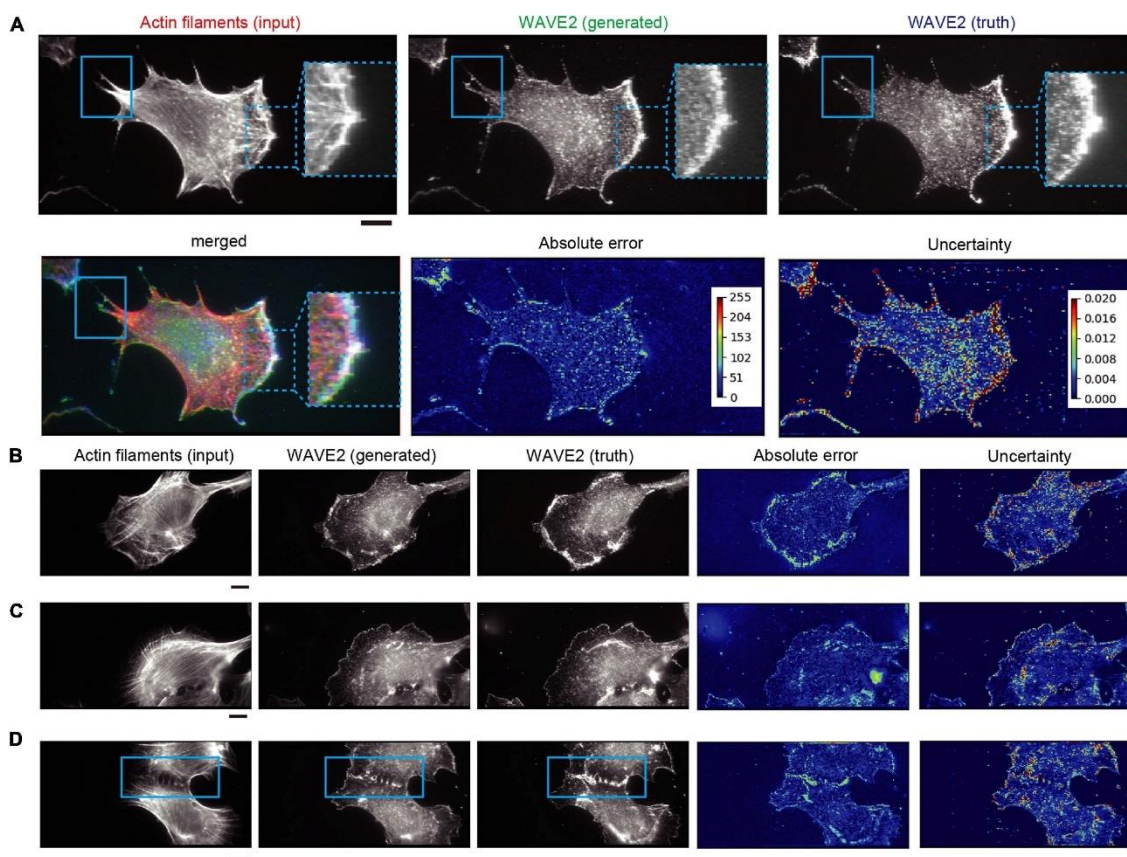


図 3. Swiss3T3 細胞における F-アクチンからの WAVE2 画像の生成

(A) F-アクチン画像からの pix2pix による WAVE2 画像の生成結果。細胞は F-アクチンについてはファロイジンで染色され、固定および透過処理後に WAVE2 抗体で染色された。入力画像 (F-アクチン画像)、出力画像 (生成された WAVE2 画像)、ground truth 画像 (WAVE2 免疫染色画像)、絶対誤差画像、および不確実性画像を示した。ラメリポディアのマイクロスパイクは破線の四角でマークされ、ラメリポディアの外側の突起は実線の四角でマークされています。絶対誤差は、各ピクセルにおける輝度値の差を表す。画像生成の不確実性は、畳み込みニューラルネットワークのさまざまな「ドロップアウト」に基づく生成結果の変動、つまり各ピクセルでの生成のロバストさを表す。絶対誤差と不確実性の値が高くなると、ヒートマップの色は赤に近くなる。F-アクチン、WAVE2 (generated)、および WAVE2 (ground truth) の合成された画像も示した。

(B、C) 様々なサイズのラメリポディアを持つ細胞の WAVE2 画像の生成。

(D) 長方形でマークされた細胞間接着を形成した細胞の WAVE2 画像の生成。

MAE 並びに MS-SSIM を用いた pix2pix 生成画像の評価

次に、画像生成結果の評価を行った。性能評価には平均絶対誤差(Mean Absolute Error, MAE)、不確実性(Uncertainty)並びにマルチスケール構造類似性(MS-SSIM)を用いた。MAE は、2 画像間におけるピクセル値の絶対値の差の平均である。したがって、MAE が小さいほど、2 つの画像の類似性が高いことを示している。MS-SSIM は、ピクセル値の分散に基づいた指標である。画像内における小領域ごとの共分散を計算し最終的に画像全体の平均値を計算する。したがって、SSIM が高いほど、人間によって知覚される画像の品質の類似性が高いことを示している。生成された WAVE2 染色画像と実際の WAVE2 染色画像との MAE を計算すると、二画像間の MAE の値は、実際の F-アクチン染色画像と実際の WAVE2 染色画像間の MAE より低い値となった。また、同様に生成された WAVE2 染色画像と実際の WAVE2 染色画像の間の SSIM は、実際の F-アクチン染色画像と実際の WAVE2 染色画像の間よりも高く、pix2pix モデルによる画像変換を通じてより良い表現である WAVE2 染色画像に近い画像へと変換されたことが分かった。(図 4A および B)。

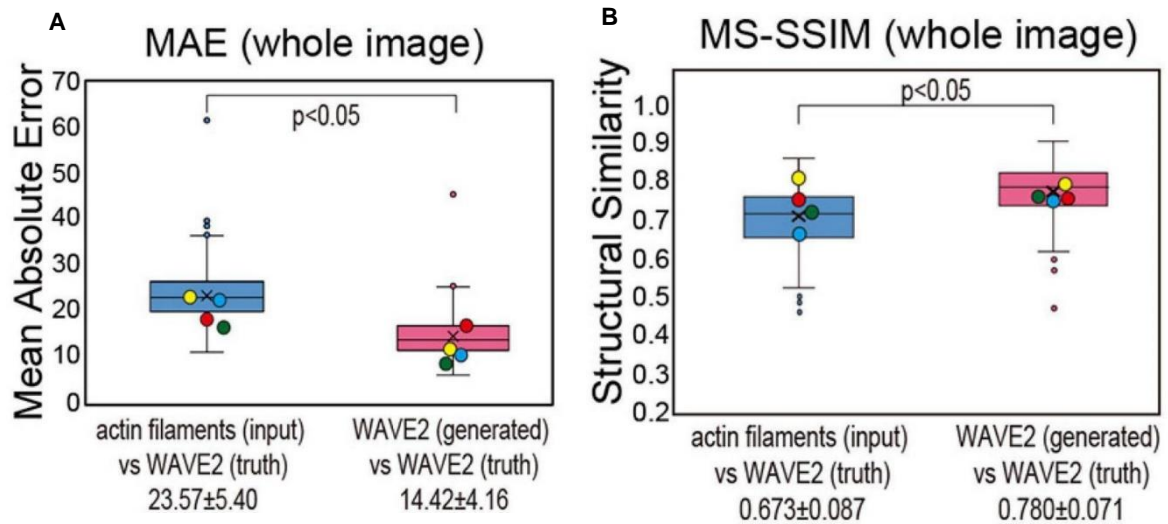


図 4.pix2pix による WAVE2 生成画像の評価

(A) 生成された WAVE2 画像と実際の WAVE2 画像間、および F-アクチンと実際の WAVE2 の画像間の平均絶対誤差 (MAE) の箱ひげ図。定量化は 4 分割交差検定を使用してすべての画像に対して実行した ($n = 772$)。平均値は下部に示す。

(B) 生成された WAVE2 画像と実際の WAVE2 画像間、および F-アクチンと実際の WAVE2 の画像間のマルチスケール構造類似性指標 (MS-SSIM) の箱ひげ図。定量化は、4 分割交差検定を使用してすべての画像に対して実行された ($n = 772$)。データポイントは、A-D で生成された画像の MS-SSIM 値を表す。平均値は下部に示した。

A、B において、黄色、赤、青、および緑の円は、それぞれ図 3A~D の画像の値を示す。

Pix2pix による生成画像における細胞構造領域ごとの SSIM の比較

次に、pix2pix モデルが細胞構造情報を元に細胞内の WAVE2 局在を予測する際に、ピクセルレベルと画像レベル全体の間である、細胞内レベルでの WAVE2 局在、つまり細胞構造の種類ごとに WAVE2 局在予測精度に差異が生じるかを調査した。SSIM マップと呼ばれる小領域の SSIM を表示したものを生成するために、11×11 ピクセルウィンドウごとに SSIM が計算した。計算結果の一例として、図 3C に対応する代表的な分析を図 2G に示した。次に、実際の WAVE2 の画像（図 5A）に Labelme^[36]を使用して手動でアノテーションを行い、各細胞構造ごとの領域を指定した（図 5B）。比較のためにアノテーションした領域はラメリポディア領域、細胞間接着領域、並びに特定の細胞構造が存在しない領域である。これにより、画像の一部がポリゴンで囲まれ、領域情報が JSON ファイル形式で保存された。この JSON ファイルの情報を元に、SSIM マップの特定領域の平均 SSIM を計算し比較した。WAVE2 が局在している箇所で、手動でアノテーションを付けたラメリポディアおよび細胞間接着の SSIM を、他の細胞領域の SSIM と比較したところ、ラメリポディアおよび細胞間接着部位の平均 SSIM は、非ラメリポディア領域の平均 SSIM よりも高かった（図 5C）。この結果は GAN が細胞構造情報を元に意味のある WAVE2 局在予測に基づいて画像を生成したことを示唆した。また、ラメリポディア構造と細胞間接着の比較においては、ラメリポディア領域の SSIM の値が高く、pix2pix は入力情報と強く相関するものに対して、より良い精度の予測をすることができると考えた。

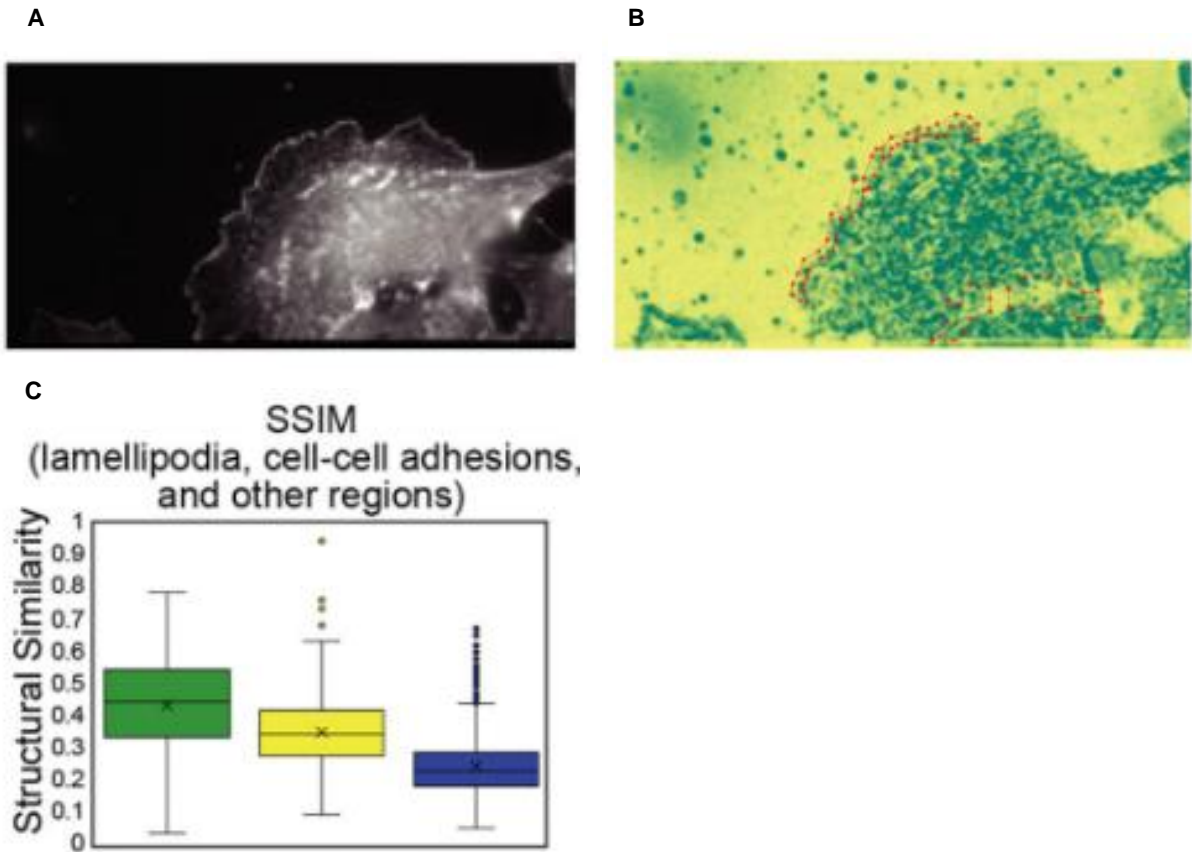


図 5. WAVE 2 染色画像生成における各細胞構造ごとの SSIM 比較

(A) Rac1 の活性型を発現する Swiss3T3 細胞における F-アクチンの染色画像。F-アクチンはローダミン-ファロイジンによって染色された。

(B) A の画像に対応する代表的な SSIM マップ。各 11×11 ピクセルウィンドウでの構造的類似性を示している。ラメリポディアの領域は多角形でマークされている。

(H) 1,926 ペアのラメリポディア、細胞間接着、およびその他の細胞領域からの SSIM 値の箱ひげ図。統計的有意性は、2 標本の等分散両側スチューデントの t 検定によって $p < 0.05$ で示された。

Pix2pix による F-アクチン染色画像並びに WAVE2 染色画像からの IRSp53 染色画像生成

Pix2pix によるタンパク質局在予測が他のタンパク質に対しても応用できるかを調査するために、神経膠腫 U251 細胞と WAVE2 の別のレギュレーターである IRSp53 を使用して pix2pix モデルをトレーニングした^[24, 26]。IRSp53 ノックアウト U251 細胞を調製し、GFP-IRSp53 の安定した発現により IRSp53 の発現を回復させた。次に、細胞を mCherry でタグ付けされた lifeact (lifeact-mCherry) でさらに安定して標識し、F-アクチンを可視化した^[37]。これらの U251 細胞を血清中で培養し、Rac1 を強制的に活性化することなくラメリポディアを観察するために細胞を固定した。次に、lifeact による F-アクチン、GFP による IRSp53、および抗体染色による WAVE2 の画像を顕微鏡を用いて取得した。これらの画像を用いて pix2pix を使用した画像変換のためのトレーニングを行い、F-アクチン (lifeact) の染色画像から WAVE2 の染色画像への変換、F-アクチンの染色画像から IRSp53 の染色画像への変換、IRSp53 染色画像から WAVE2 染色画像への変換を試みた。画像生成は、4 分割交差検定によって推定された。合計 100 枚の画像を取得し、そのうち 75 枚をトレーニングセットとして用いた。75 枚の画像は 90 度のステップでの回転と垂直および水平方向の反転によって 7 倍にデータ拡張を行い、合計 525 枚の画像で構成されるトレーニングデータセットが作成した。そのうち 15% が検証セットとして使用された。残りの 25 枚の画像はデータ拡張を行わずテストセットとして用いた。学習におけるエポック数は 200,000 回であった。

このデータセットを用い pix2pix による画像変換を試みた。生成された画像は WAVE2 並びに IRSp53 の特徴的な局在パターンを再現しており、lifeact を用いた F-アクチン染色画像が WAVE2 と IRSp53 の染色画像を生成できることを示した (図 6A, B)。また、IRSp53 染色画像と WAVE2 染色画像のペアを pix2pix モデルに与え学習を行うことで、IRSp53 染色画像から WAVE2 染色画像に変換することに成功した (図 6C)。このことから、pix2pix による染色画像変換は必ずしも細胞構造情報を用いなくとも、入力画像と目的画像の間に相関関係、例えば IRSp53 と WAVE2 のような細胞機序において相互作用しているタンパク質ペアならば予測をすることができると結論づけた。

ただし、F-アクチン染色画像からの WAVE2 局在予測や、F-アクチン染色画像からの IRSp53 局在予測において、核周辺の染色など、一部の特徴は予測されなかった (図 6A-B)。これは入力画像にこれら特定のタンパク質の局在に予測のための十分な情報が含まれていないこと示唆される。またこれらのタンパク質ペアにおける出力結果は細胞種によって異なる可能性が考えられる。

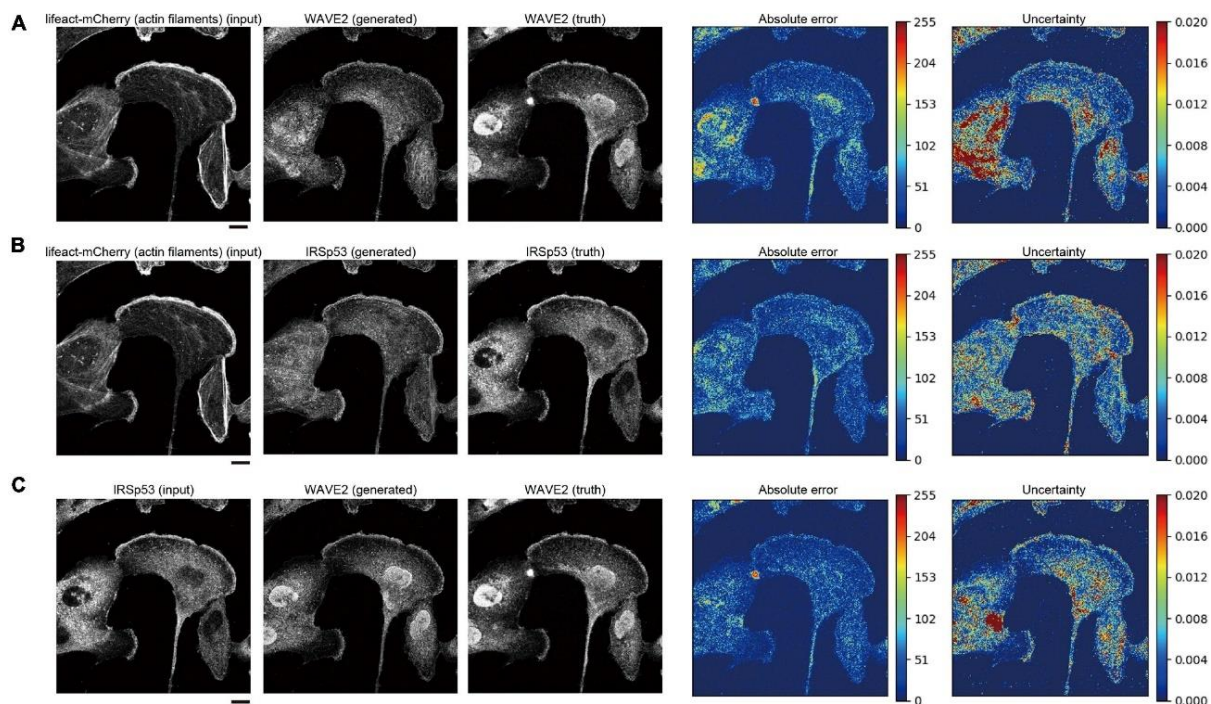


図 6. IRSp53 を発現する U251 細胞における F-アクチンからの WAVE2、F-アクチンからの IRSp53、及び IRSp53 からの WAVE2 画像生成

(A) lifest-mCherry によって視覚化された F-アクチン画像からの WAVE2 画像の生成。
GFP タグ付き IRSp53 および lifest-mCherry を再発現する IRSp53 ノックアウト U251 細胞は、固定および透過処理後に WAVE2 抗体で染色された。

(B) F-アクチンで染色された画像からの IRSp53 画像の生成。

(C) IRSp53 で染色された画像から WAVE2 画像への画像生成。

MAE 並びに MS-SSI による生成された IRSp53 染色画像の評価

生成された画像を MAE 並びに MS-SSIM によって評価した。実際の染色画像と生成された染色画像の間の MAE 値は、F-アクチン染色画像からの WAVE2 染色画像生成、F-アクチン染色画像からの IRSp53 染色画像生成、並びに WAVE2 染色画像からの IRSp53 染色画像の生成において、すべてのペアで入力画像と実際の染色画像の間の MAE 値よりも低かった（図 7A）。また、MS-SSIM においても、実際の染色画像と生成された染色画像の間における MS-SSIM 値は、すべてのペアにおいて入力画像と実際の染色画像の間の MS-SSIM 値よりも高かった（図 7B）。よって pix2pix モデルはラメリポディアにおける WAVE 並びに IRSp53 の局在予測を行えていると見なした。

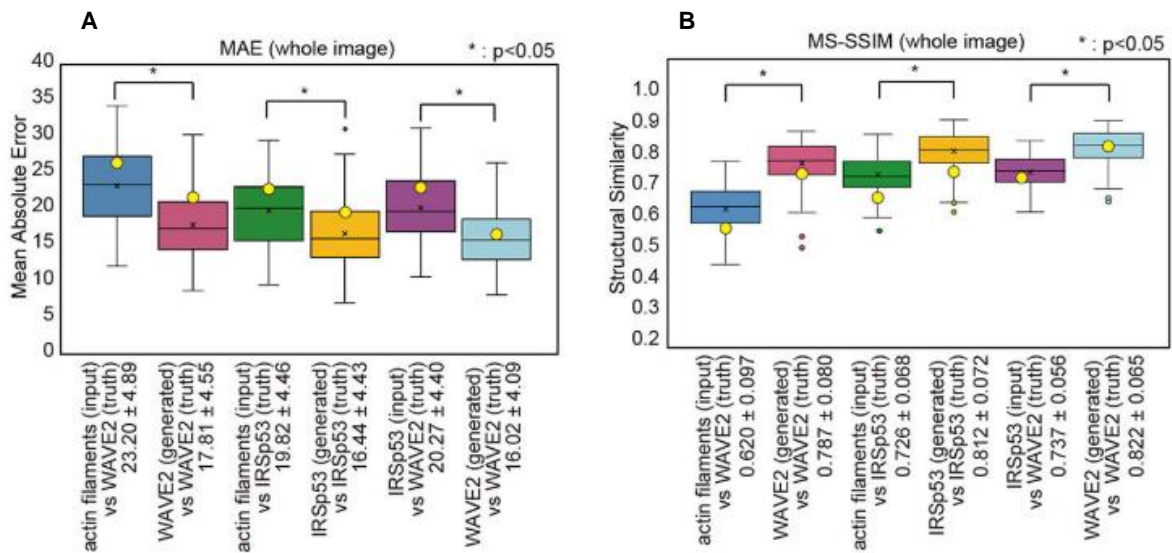


図 7. IRSp53 を発現する U251 細胞における F-アクチンからの WAVE2、F-アクチンからの IRSp53、及び IRSp53 からの WAVE2 画像生成

(A) 4 分割交差検定 (n = 100) での画像全体の MAE の箱ひげ図。

(B) 4 分割交差検定 (n = 100) での画像全体の MS-SSIM の箱ひげ図。データポイントは、図 4A~C で生成された画像の MS-SSIM 値を表す。D、E の黄色い円は、A~C の画像の値を示している。統計的有意性は、2 標本の等分散両側スチューデントの t 検定によって p < 0.05 (*) で示された。

Pix2pix のビンキュリン局在予測への応用

Pix2pix による細胞内タンパク質局在予測が、ラメリポディア以外の細胞構造に関連する他のタンパク質分子に適用できるかどうかを調べるために、ビンキュリンというタンパク質に注目した。U251 細胞を血清中で培養し、細胞を固定した。次に F-アクチン並びにビンキュリンに対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、染色画像を顕微鏡を用いて取得した。これらの画像を用いて pix2pix を使用した画像変換のためのトレーニングを行った。画像生成は、4 分割交差検定によって推定された。合計 100 枚の画像を取得し、そのうち 75 枚をトレーニングセットとして用いた。75 枚の画像は 90 度のステップでの回転と垂直および水平方向の反転によって 7 倍にデータ拡張を行い、合計 525 枚の画像で構成されるトレーニングデータセットが作成した。そのうち 15% が検証セットとして使用された。残りの 25 枚の画像はデータ拡張を行わずテストセットとして用いた。学習におけるエポック数は 200,000 回であった。

実際に染色画像の生成を行ったところ、生成された画像はビンキュリンの細胞接着斑における局在の特徴をよく反映しており、このことから pix2pix モデルは F-アクチン画像からビンキュリン画像を生成することができると結論づけた (図 6A)。これらの予測結果は、MAE と MS-SSIM の値 (図 8B、C) によって評価された。

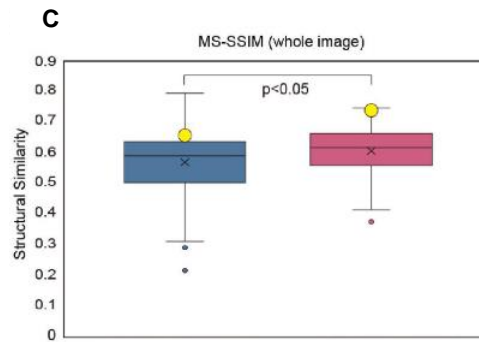
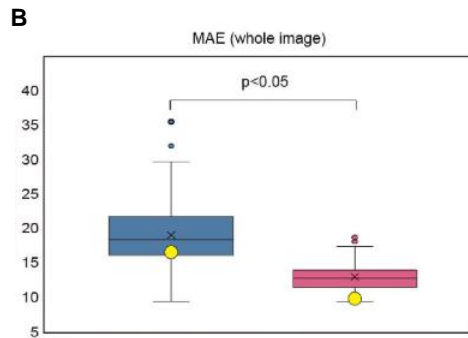
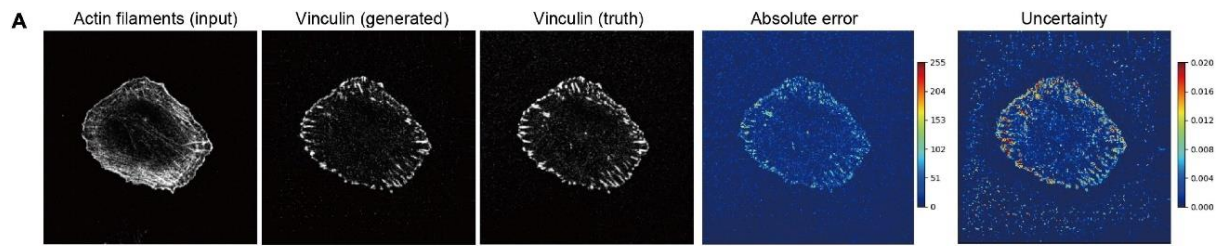


図 8. U251 細胞でのビンキュリン画像の生成

(A) F-アクチンで染色された画像からのビンキュリン画像の生成。U251 細胞は、固定および透過処理後に、F-アクチン用のファロイジンおよび抗ビンキュリン抗体で染色された。

(B) A の 4 分割交差検定における画像全体の MAE の箱ひげ図 (n = 100)。

(C) A (n = 100) の 4 分割交差検定における画像全体の MS-SSIM の箱ひげ図。データポイントは、A で生成された画像の MS-SSIM 値を表す。

Pix2pix のチューブリン局在予測への応用

Pix2pix による染色画像変換が F-アクチンに強く関連しない他の分子に適用できるかどうかを調べるために、チューブリンというタンパク質に注目した。U251 細胞を血清中で培養し、細胞を固定した。次に F-アクチン並びにチューブリンに対する抗体を用いて免疫蛍光染色を行い、染色画像を顕微鏡を用いて取得した。これらの画像を用いて pix2pix を使用した画像変換のためのトレーニングを行った。画像生成は、4 分割交差検定によって推定された。合計 100 枚の画像を取得し、そのうち 75 枚をトレーニングセットとして用いた。75 枚の画像は 90 度のステップでの回転と垂直および水平方向の反転によって 7 倍にデータ拡張を行い、合計 525 枚の画像で構成されるトレーニングデータセットが作成した。そのうち 15% が検証セットとして使用された。残りの 25 枚の画像はデータ拡張を行わずテストセットとして用いた。学習におけるエポック数は 200,000 回であった。

画像生成の結果、pix2pix モデルは F-アクチン画像からチューブリンのような画像を生成したが、チューブリンの特徴的な分布の形状である放射状の局在パターンを再現することができなかった (図 9)。MAE と MS-SSIM による評価は、これまでの例と同じように生成された画像は、入力画像と実際のチューブリン画像間よりも近しい画像であるという結果を出した。しかしながら細胞生物学的観点で考えた場合に、放射状の位置特定などが行えていないことから、これら二つの指標はセル全体の機能を反映していない可能性があり、画像間の類似性を評価するためのインデックスのさらなる開発が将来的に必要であると考えられる。これらの結果から、2 つの分子が強い相関関係を欠いている場合、pix2pix の予測精度は低下すると結論付けた。

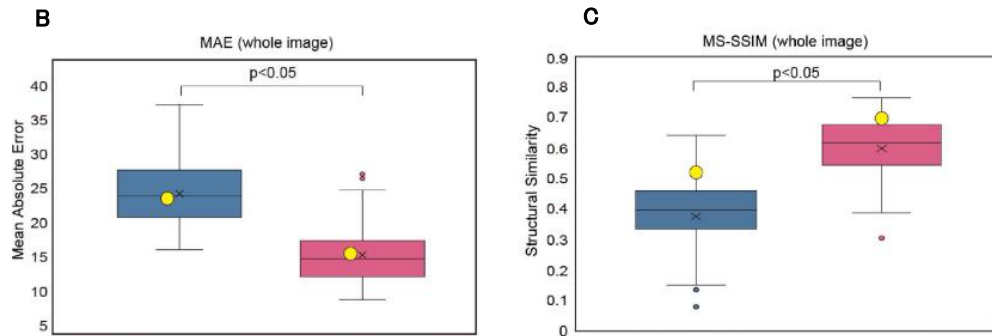
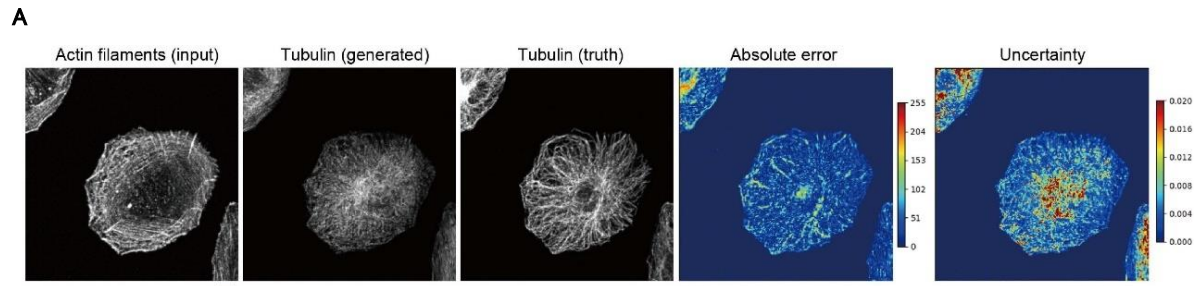


図 9. U251 細胞でのビンキュリンおよびチューブリン画像の生成

(A) F-アクチンで染色された画像からのチューブリン画像の生成。U251 細胞は、固定および透過処理後に、F-アクチン用のファロイジンおよび抗 α -チューブリン抗体で染色された。

(B) D の 4 分割交差検定における画像全体の MAE の箱ひげ図 (n = 100)。

(C) D の 4 分割交差検定における画像全体の MS-SSIM の箱ひげ図 (n = 100)。データポイントは、D で生成された画像の MS-SSIM 値を表します。

各画像のスケールバーは $10 \mu\text{m}$ である。

考察

この研究では、機械学習法である pix2pix を介した画像翻訳を使用して細胞内タンパク質の局在を予測した。Pix2pix は GAN を利用したアルゴリズムの一種であり、WAVE2、IRSp53、およびビンキュリンは、ラメリポディアの確立された調節因子である。したがって、pix2pix を利用した画像生成によるこれらの局在箇所への予測が可能であることは、アクチン細胞骨格構造の入力画像を元に、ラメリポディアに対し様々な情報の注釈を自動的に付けられることを示唆している。例えば、細胞生物分野の専門家は、ラメリポディアの F-アクチンと非ラメリポディアの F-アクチン構造を簡単に区別できるが、画像を見慣れていない人にとっては、ラメリポディアをはっきり区別することが難しい場合がある。また専門家であったとしても、顕微鏡画像における判断結果は研究者ごとによって異なる。本研究における pix2pix を利用した画像生成を行うことで、少なくとも画質が類似している場合、メソッドは同等の結果を再現することができると考えられる。さらに、コンピューター等の計算速度が十分であれば、この方法を使用して生細胞に対するラメリポディア形成箇所へのラベル付けや、ラメリポディアの形成されている量を定量化できると考えられる。

本研究において、WAVE2 局在の予測はラメリポディアのサイズに関係なく行うことができた (図 3)。本研究で用いた画像生成アルゴリズムは 4 ピクセル×4 ピクセルの小領域ごとの特徴を元に画像生成を行うアルゴリズムを用いており、実際の細胞におけるサイズに換算するとこの領域は約 $1.9\mu\text{m}^2$ に相当する。したがって、特定タンパク質局在におけるこのサイズを超える連続的な特徴を予測することは困難であると予想され、ラメリポディアにおける F-アクチンの特徴はこの領域内にあると考えられる。そのため、本研究における WAVE2 の局在予測については、さまざまなサイズのラメリポディアを予測することができたと考える。また、細胞間接着に対しても予測を行うことができたため、同じようにこの領域内に F-アクチンの特徴が含まれていると考えられる。しかしながら、各細胞構造における SSIM 比較において、細胞間接着の値がラメリポディアよりも低かったことから、細胞間接着の特徴はこの領域内に必ずしも収まらない可能性が考えられる。また、ラメリポディアにおける IRSp53 局在予測や、接着斑におけるビンキュリン予測が可能であったことから、これらの特徴も F-アクチン染色画像の領域内に含まれていると考えられる。

本研究では F-アクチンの局在から微小管の局在予測を試みた。しかし、この予測において、生成された画像における微小管の局在は、中央体からの放射状の局在パターンを再現できていなかった。正確な予測ができなかった原因として、前述の領域内に微小管に対する特徴が含まれていなかったことが考えられる。あるいは、予測が可能であった WAVE2、IRSp53、ビンキュリンなどの F-アクチンのレギュレーターとは対照的に、微小管は F-アクチンと細胞内機序において直接的なリンクがされていないため、入力における F-アクチン染色

画像に、微小管に関連する情報が不足していることから、十分な予測が行えなかったと考えることもできる。これらのことから、pix2pix は 2 タンパク質間に十分な相関関係があるタンパク質ペアに対してのみ、予測を行える可能性がある。

本研究ではラメリポディア、細胞間接着、及び接着斑に関連するタンパク質の局在予測を行ったが、pix2pix は 2 タンパク質間に十分な相関があれば予測が行えるため、その他の細胞構造関連タンパク質に関しても予測することができると考えられる。例えばフィロポディアが挙げられる。フィロポディアは細胞のエッジ部分から突出する突起状構造であるが、コフィリンやコータクチンなどのタンパク質が多く局在する。このことからフィロポディア局在箇所を元にこれらのタンパク質局在を予測できる可能性があると考えられる。

本研究における pix2pix モデルの損失関数は MAE である。よって染色画像における細かな構造より画像全体が生成画像とどれだけ近しいかによって生成された画像が評価される。微小管の放射状の局在パターンはラメリポディアや接着斑と異なり細胞内部に主に局在することから、モデルが学習する際に、特徴的な局在のパターンを学習するのではなく、細胞内部に円滑的に局在する画像を生成し、全体の MAE を低下させるよう学習した可能性が考えられる。このことから、学習における損失関数の変更、例えば SSIM などの画像の構造に注目したものをを用いることで、特徴的な局在のパターンを再現できる可能性がある。

Swiss3T3 細胞における F-アクチン染色画像からの WAVE2 染色画像生成において、予測された WAVE2 の局在を SSIM で比較したところ、ラメリポディア形成箇所が最も SSIM が高く、次点で細胞間接着、予測が最もうまくいかなかったのが細胞構造非形成箇所であった。ラメリポディア箇所が最もうまく予測できた原因として、この細胞構造が細胞のエッジ部分に存在することが考えられる。Pix2pix に用いる入力画像には細胞以外のバックグラウンドの情報も含まれており、モデルは画像全体を見て学習を行う。そのため細胞内部の構造と比較し、画像生成の際にバックグラウンドの情報も加味することのできる細胞エッジ部分の構造が比較的予測しやすいことが考えられる。しかしながら細胞間接着の構造が同じく細胞内部の細胞構造非形成箇所と比較し SSIM の値が高くなったことから、F-アクチンと WAVE2 間の相関関係が強い箇所程うまく予測できているという可能性も考えられる。予測の強さと細胞内機序におけるタンパク質間相関関係の強さの関連に関しては今後調査を行う必要があるが、もしこの仮定が正しければ生成画像と実画像間の SSIM はタンパク質間の相関関係の強さを測る指標として用いることができる可能性がある。

本研究では画像生成アルゴリズムの pix2pix を用いた。Pix2pix は generator と discriminator を対立させ学習を行うことで高品質の画像を生成する GAN のアルゴリズムを利用した手法であるが、pix2pix ではないその他の GAN モデルを用いても同等の局在予測が行える可能性がある。例えば、TransGAN^[47] は CNN ではなく transformer というエンコーダーとデコーダーを組み合わせたモデルをベースとした構造をしており、大局的な構造を捉えた画像生成に優れている。また styleGAN^[48] は低画像に対応した画像の学習から始め、徐々に高画

像の画像を学習していく progressive growing という手法をとることで、従来 GAN と比較しより高解像な画像の生成に成功している。さらに pix2pix においても、generator の構造に変化を加えた pix2pixHD と呼ばれるモデルが存在する。Pix2pixHD は residual block と呼ばれる構造で低解像度の画像を学習し、その後 residual block の入力側と出力側に高解像度用の画像学習モデルを付け加えた構造をしており、これによって従来 pix2pix により高解像な画像の生成を行うことができる。これらのモデルを用いることでタンパク質局在予測の精度に差異が起こるかどうかは今後調査する必要がある。

本研究において用いた細胞は Swiss3T3 細胞と U251 細胞である。Swiss3T3 細胞はマウス繊維芽細胞で、これは細胞構造研究におけるモデル細胞である。U251 細胞はヒト神経膠腫細胞である。細胞の種類によって形成される細胞構造の性質は異なるため、どのような細胞種に対して予測ができるのかを検討する必要がある。また同一細胞であっても、変異による形態異常などで通常と局在パターンが異なる可能性がある。変異細胞を含むデータセットでも学習を行うことで同様に予測ができるかどうかは今後調査の必要がある。

実際の染色画像と pix2pix によって予測された画像の違いが、相互に独立した局在と機能に起因する場合、pix2pix はタンパク質間の相関関係とは独立した機能を発見するためのツールとして使用できる可能性がある。細胞において、WAVE1 の核局在化が報告されているように、U251 細胞における F-アクチン染色画像からの WAVE2 染色画像生成において、WAVE2 の核部分における染色の予測の失敗は、実際に WAVE2 の F-アクチン非依存性機能を示唆している可能性がある (図 5) [38]。ただし、WAVE2 の核染色は非特異的染色を表す可能性もある。このような WAVE2 の核染色は、Swiss3T3 細胞では観察されなかった。これは、U251 細胞の核 WAVE2 が非特異的染色の結果である可能性があることを意味する (図 5)。もしくは、WAVE2 の核における機能は U251 細胞と swiss3T3 細胞の間で異なる可能性がある。

本研究によって、細胞内局在において相関関係をもつタンパク質ペア、例えば F-アクチンと WAVE2 のようなペアの染色画像を用い、モデルを訓練することで一方の局在からもう一方の局在を予測することが可能であることが分かった。機械学習による分子局在の予測は、細胞の人工的な染色と見なすことができる。通常の実験において抗体による標識染色は、2-3 種類のタンパク質に限定されているが、この技術を用いることで、同一細胞に対して、1 回の細胞染色で無制限の数のタンパク質の局在を予測できる。実際にはこれらの予測結果が正しいかどうかを、実験で補完する必要があるが、細胞内の分子局在の予測は、タンパク質とその機能の局在パターンとの関連を分析するときに、研究の方向性を探すのに少なくとも役立つと考えられる。

本研究で行った局在予測のためには、細胞の種類に応じたトレーニングが必要であると考えられる。また生成された画像は、その細胞固有の特徴的な局在パターンを反映している可能性がある。生成された画像と実際の画像の間の WAVE2 局在におけるこれらの不一致は、

学習に用いる画像枚数が不十分であることや、細胞染色の際に非特異的な場所が染色されてしまう等のランダム性が原因である可能性がある。したがって、予測された画像と実際の画像の違いが、観察された分子のペアの機能に起因するというこれらの考えを証明するには、さらなる調査が必要になる。

本研究において、細胞構造情報である F-アクチン染色画像を元に、その画像に含まれる情報を機械学習モデルを用いて抽出し、ラメリポディア関連タンパク質の局在など様々な予測を行うことに成功した。このことから、細胞構造情報は、他タンパク質の局在情報に加え、細胞の運動に関する情報を潜在的に含んでいると考えられる。このことから、細胞構造情報を元に様々な予測を行えると考えられる。例えば細胞の運動予測が挙げられる。細胞が運動する際にはラメリポディアの形成や細胞の後部の縮退などの細胞構造変化を必ず伴う。機械学習を元に細胞構造情報からラメリポディアの形成量や形成箇所等を元に運動方向の予測を行うことができると考えられる。また、convLSTM^[49]などのタイムラプス画像を元に時系列を予測する機械学習手法を用いることで、細胞構造の変化の推移から、将来的に細胞がどちらの方向に動くかの予測や細胞形態がどのように変化するかを予測できると考えられる。

参考文献

1. Moen E, Bannon D, Kudo T, Graf W, Covert M, Van Valen D. Deep learning for cellular image analysis. *Nat Methods*. 2019;16(12):1233-46. Epub 2019/05/28. doi: 10.1038/s41592-019-0403-1. PubMed PMID: 31133758.
2. Camacho DM, Collins KM, Powers RK, Costello JC, Collins JJ. Next-Generation Machine Learning for Biological Networks. *Cell*. 2018;173(7):1581-92. Epub 2018/06/12. doi: 10.1016/j.cell.2018.05.015. PubMed PMID: 29887378.
3. Brent R, Boucheron L. Deep learning to predict microscope images. *Nat Methods*. 2018;15(11):868-70. Epub 2018/11/01. doi: 10.1038/s41592-018-0194-9. PubMed PMID: 30377365; PubMed Central PMCID: PMC6322918.
4. Toratani M, Konno M, Asai A, Koseki J, Kawamoto K, Tamari K, et al. A Convolutional Neural Network Uses Microscopic Images to Differentiate between Mouse and Human Cell Lines and Their Radioresistant Clones. *Cancer Res*. 2018;78(23):6703-7. Epub 2018/09/27. doi: 10.1158/0008-5472.Can-18-0653. PubMed PMID: 30254144.
5. Kobayashi H, Lei C, Wu Y, Mao A, Jiang Y, Guo B, et al. Label-free detection of cellular drug responses by high-throughput bright-field imaging and machine learning. *Sci Rep*. 2017;7(1):12454. Epub 2017/10/01. doi: 10.1038/s41598-017-12378-4. PubMed PMID: 28963483; PubMed Central PMCID: PMC5622112.
6. Nishimoto S, Tokuoka Y, Yamada TG, Hiroi NF, Funahashi A. Predicting the future direction of cell movement with convolutional neural networks. *PLoS One*. 2019;14(9):e0221245. Epub 2019/09/05. doi: 10.1371/journal.pone.0221245. PubMed PMID: 31483827; PubMed Central PMCID: PMC6726366.
7. Christiansen EM, Yang SJ, Ando DM, Javaherian A, Skibinski G, Lipnick S, et al. In Silico Labeling: Predicting Fluorescent Labels in Unlabeled Images. *Cell*. 2018;173(3):792-803.e19. Epub 2018/04/17. doi: 10.1016/j.cell.2018.03.040. PubMed PMID: 29656897; PubMed Central PMCID: PMC6309178.

8. Pärnamaa T, Parts L. Accurate Classification of Protein Subcellular Localization from High-Throughput Microscopy Images Using Deep Learning. *G3 (Bethesda)*. 2017;7(5):1385-92. Epub 2017/04/10. doi: 10.1534/g3.116.033654. PubMed PMID: 28391243; PubMed Central PMCID: PMC5427497.
9. Goodfellow I, Pouget-Abadie J, Mirza M, Xu B, Warde-Farley D, Ozair S, et al., editors. Generative adversarial nets. *Advances in neural information processing systems*; 2014.
10. Alec R, Luke M, Soumith C. Unsupervised representation learning with deep convolutional generative adversarial networks. Under review as a conference paper at ICLR 2016. 2016.
11. Sagawa Y, Hagiwara M. Face Image Generation System using Attributes Information with DCGANs. *Transactions of Japan Society of Kansei Engineering*. 2018;17(3):337-45.
12. Isola P, Zhu J-Y, Zhou T, Efros AA, editors. Image-to-image translation with conditional adversarial networks. *Proceedings of the IEEE conference on computer vision and pattern recognition*; 2017.
13. Tsuda H, Hotta K, editors. Cell Image Segmentation by Integrating Pix2pixs for Each Class. *Proceedings of the IEEE Conference on Computer Vision and Pattern Recognition Workshops*; 2019.
14. Gunning PW, Ghoshdastider U, Whitaker S, Popp D, Robinson RC. The evolution of compositionally and functionally distinct actin filaments. *J Cell Sci*. 2015;128(11):2009-19. Epub 2015/03/20. doi: 10.1242/jcs.165563. PubMed PMID: 25788699.
15. Pollard TD, Borisy GG. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell*. 2003;112(4):453-65. PubMed PMID: 12600310.
16. Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*. 2001;81(1):153-208. Epub 2001/01/12. doi: 10.1152/physrev.2001.81.1.153. PubMed PMID: 11152757.

17. Hall A. Rho GTPase and the actin cytoskeleton. *Science*. 1998; 279: 509-14.
18. Suetsugu S, Miki H, Takenawa T. Identification of two human WAVE/SCAR homologues as general actin regulatory molecules which associate with Arp2/3 complex. *Biochem Biophys Res Commun*. 1999;260(1):296-302.
19. Miki H, Suetsugu S, Takenawa T. WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *The EMBO journal*. 1998;17(23):6932-41. doi: 10.1093/emboj/17.23.6932. PubMed PMID: 9843499; PubMed Central PMCID: PMC1171041.
20. Suetsugu S, Yamazaki D, Kurisu S, Takenawa T. Differential roles of WAVE1 and WAVE2 in dorsal and peripheral ruffle formation for fibroblast cell migration. *Dev Cell*. 2003;5(4):595-609. PubMed PMID: 14536061.
21. Machesky LM, Insall RH. Scar1 and the related Wiskott-Aldrich syndrome protein, WASP, regulate the actin cytoskeleton through the Arp2/3 complex. *Curr Biol*. 1998;8(25):1347-56. Epub 1999/01/16. doi: 10.1016/s0960-9822(98)00015-3. PubMed PMID: 9889097.
22. Bear JE, Rawls JF, Saxe CL, 3rd. SCAR, a WASP-related protein, isolated as a suppressor of receptor defects in late Dictyostelium development. *J Cell Biol*. 1998;142(5):1325-35. Epub 1998/09/10. doi: 10.1083/jcb.142.5.1325. PubMed PMID: 9732292; PubMed Central PMCID: PMCPMC2149354.
23. Chen Z, Borek D, Padrick SB, Gomez TS, Metlagel Z, Ismail AM, et al. Structure and control of the actin regulatory WAVE complex. *Nature*. 2010;468(7323):533-8. Epub 2010/11/26. doi: nature09623 [pii]10.1038/nature09623. PubMed PMID: 21107423.
24. Innocenti M, Zucconi A, Disanza A, Frittoli E, Areces LB, Steffen A, et al. Abi1 is essential for the formation and activation of a WAVE2 signalling complex. *Nat Cell Biol*. 2004;6(4):319-27. PubMed PMID: 15048123.

25. Suetsugu S, Kurisu S, Oikawa T, Yamazaki D, Oda A, Takenawa T. Optimization of WAVE2 complex-induced actin polymerization by membrane-bound IRSp53, PIP(3), and Rac. *J Cell Biol.* 2006;173(4):571-85. Epub 2006/05/17. doi: 10.1083/jcb.200509067. PubMed PMID: 16702231; PubMed Central PMCID: PMCPMC2063866.
25. Ismail AM, Padrick SB, Chen B, Umetani J, Rosen MK. The WAVE regulatory complex is inhibited. *Nat Struct Mol Biol.* 2009;16(5):561-3. Epub 2009/04/14. doi: 10.1038/nsmb.1587. PubMed PMID: 19363480; PubMed Central PMCID: PMCPMC2716658.
26. Miki H, Yamaguchi H, Suetsugu S, Takenawa T. IRSp53 is an essential intermediate between Rac and WAVE in the regulation of membrane ruffling. *Nature.* 2000;408(6813):732-5. Epub 2000/12/29. doi: 10.1038/35047107. PubMed PMID: 11130076.
27. Ziegler WH, Liddington RC, Critchley DR. The structure and regulation of vinculin. *Trends Cell Biol.* 2006;16(9):453-60. Epub 2006/08/09. doi: 10.1016/j.tcb.2006.07.004. PubMed PMID: 16893648.
28. Ridley AJ. Life at the leading edge. *Cell.* 2011;145(7):1012-22. Epub 2011/06/28. doi: S0092-8674(11)00652-0 [pii]10.1016/j.cell.2011.06.010. PubMed PMID: 21703446.
29. Takenawa T, Suetsugu S. The WASP-WAVE protein network: connecting the membrane to the cytoskeleton. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(1):37-48. Epub 2006/12/22. doi: 10.1038/nrm2069. PubMed PMID: 17183359.
30. Ridley AJ, Paterson HF, Johnston CL, Diekmann D, Hall A. The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling. *Cell.* 1992;70(3):401-10. Epub 1992/08/07. doi: 10.1016/0092-8674(92)90164-8. PubMed PMID: 1643658.
31. Hiasa Y, Otake Y, Takao M, Ogawa T, Sugano N, Sato Y. Automated Muscle Segmentation from Clinical CT using Bayesian U-Net for Personalized Musculoskeletal Modeling. *IEEE Transactions on Medical Imaging.* 2019:1-. doi: 10.1109/TMI.2019.2940555.

32. Nozumi M, Nakagawa H, Miki H, Takenawa T, Miyamoto S. Differential localization of WAVE isoforms in filopodia and lamellipodia of the neuronal growth cone. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 2):239-46. Epub 2002/12/17. doi: 10.1242/jcs.00233. PubMed PMID: 12482910.
33. Nakagawa H, Miki H, Nozumi M, Takenawa T, Miyamoto S, Wehland J, et al. IRSp53 is colocalised with WAVE2 at the tips of protruding lamellipodia and filopodia independently of Mena. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 12):2577-83. Epub 2003/05/08. doi: 10.1242/jcs.00462. PubMed PMID: 12734400.
34. Nishimura T, Ito S, Saito H, Hiver S, Shigetomi K, Ikenouchi J, et al. DAAM1 stabilizes epithelial junctions by restraining WAVE complex-dependent lateral membrane motility. *J Cell Biol.* 2016;215(4):559-73. Epub 2016/11/04. doi: 10.1083/jcb.201603107. PubMed PMID: 27807130; PubMed Central PMCID: PMC5119936.
35. Yamazaki D, Oikawa T, Takenawa T. Rac-WAVE-mediated actin reorganization is required for organization and maintenance of cell-cell adhesion. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 1):86-100. Epub 2006/12/14. doi: 10.1242/jcs.03311. PubMed PMID: 17164293.
36. Russell BC, Torralba A, Murphy KP, Freeman WT. LabelMe: a database and web-based tool for image annotation. *International journal of computer vision.* 2008;77(1-3):157-73.
37. Riedl J, Crevenna AH, Kessenbrock K, Yu JH, Neukirchen D, Bista M, et al. Lifeact: a versatile marker to visualize F-actin. *Nat Methods.* 2008;5(7):605-7. Epub 2008/06/10. doi: 10.1038/nmeth.1220. PubMed PMID: 18536722; PubMed Central PMCID: PMC2814344.
38. Miyamoto K, Gurdon JB. Transcriptional regulation and nuclear reprogramming: roles of nuclear actin and actin-binding proteins. *Cell Mol Life Sci.* 2013;70(18):3289-302. Epub 2013/01/01. doi: 10.1007/s00018-012-1235-7. PubMed PMID: 23275942; PubMed Central PMCID: PMC3753470.
39. Suetsugu S, Miki H, Takenawa T. Distinct roles of profilin in cell morphological changes: microspikes, membrane ruffles, stress fibers, and cytokinesis. *FEBS Lett.*

1999;457(3):470-4. Epub 1999/09/03. doi: 10.1016/s0014-5793(99)01086-8. PubMed PMID: 10471831.

40. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Experimental hematology*. 2003;31(11):1007-14. Epub 2003/10/31. PubMed PMID: 14585362.

41. Hsu PD, Scott DA, Weinstein JA, Ran FA, Konermann S, Agarwala V, et al. DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature biotechnology*. 2013;31(9):827-32. Epub 2013/07/23. doi: 10.1038/nbt.2647. PubMed PMID: 23873081; PubMed Central PMCID: PMC3969858.

42. Mashiko D, Fujihara Y, Satouh Y, Miyata H, Isotani A, Ikawa M. Generation of mutant mice by pronuclear injection of circular plasmid expressing Cas9 and single guided RNA. *Sci Rep*. 2013;3:3355. Epub 2013/11/29. doi: 10.1038/srep03355. PubMed PMID: 24284873; PubMed Central PMCID: PMC3842082.

43. Miyato T, Kataoka T, Koyama M, Yoshida Y. Spectral normalization for generative adversarial networks. *arXiv preprint arXiv:180205957*. 2018.

44. Wang Z, Bovik AC, Sheikh HR, Simoncelli EP. Image quality assessment: from error visibility to structural similarity. *IEEE transactions on image processing*. 2004;13(4):600-12.

45. Imai Y, Lida M, Kanie K, Katsuno M, Kato R. Label-free morphological sub-population cytometry for sensitive phenotypic screening of heterogenous neural disease model cells. *Scientific report*. 2022;12 Article number; 9296.

46. Eguchi R, Hamano M, Iwata M, et al. TRANSDIRE: data-driven direct reprogramming by a pioneer factor-guided trans-omics approach. *Bioinformatics*. 2022;38(10):2839-46.

47. Yifun J, Shiyu C, Zhangyang W. TransGAN: Two pure transformers can make one strong GAN, and that can scale up. *arXiv preprint arXiv:210207074*. 2021.

48. Tero K, Samuli L, Timo A. A style-based generator architecture for generative adversarial networks. arXiv preprint arXiv:181204948. 2019.
49. Xingjian S, Zhouong C, Hao W, Dit-Yan Y. Convolutional LSTM network: A machine learning approach for precipitation nowcasting. arXiv preprint arXiv:150604214. 2015.
50. Kitamura T, Koshino Y, Shibata F, Oki T, Nakajima H, Nosaka T, et al. Retrovirus-mediated gene transfer and expression cloning: powerful tools in functional genomics. *Exp. Hematol* 2003; 31:1007–1014.