



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Concentration and Brightness Imaging for Fluorescent Molecules in Cells: Statistical Image Analysis by Empirical Bayes Method [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	福島, 綾介
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第14607号
Issue Date	2021-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/82758
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Ryosuke_Fukushima_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 福島 綾介

審査担当者	主 査	教 授	金 城 政 孝
	副 査	教 授	芳 賀 永
	副 査	准 教 授	中 岡 慎 治
	副 査	講 師	北 村 朗

学 位 論 文 題 名

Concentration and Brightness Imaging for Fluorescent Molecules in Cells: Statistical Image Analysis by Empirical Bayes Method
(細胞内蛍光分子の濃度と輝度分布定量：経験ベイズ法による統計的画像解析)

博士学位論文審査等の結果について（報告）

生細胞蛍光イメージングは標的分子を蛍光標識することで、生細胞内における標的分子の局在と分布を画像化でき、細胞内の動的な変化を観測できる利点がある。しかし、蛍光イメージングから蛍光分子の濃度を定量することは困難である。これは蛍光強度が濃度のみならず、励起光強度やレンズなどの光学素子、光検出器の感度に依存するからである。本研究では、蛍光イメージングによって得られた画像群に対する統計解析から濃度を定量する手法の開発を行った。

第一章：序論では研究背景と従来法である N&B 解析について詳細に述べた。N&B 解析は濃度の推定を可能にするだけでなく、Particle Brightness 比の計算によって標的分子のオリゴマー形成状態を推定することも可能である。次に解析方法に関して、従来法で仮定される統計モデルと推定方法を記述した。統計モデルで仮定した条件を満たすために必要な蛍光画像の取得条件とパラメーター推定に影響を及ぼしうる外的要因に関して述べた。

第二章ではデットタイムによる推定バイアスの低減法について述べた。デットタイムとは光検出器の特性であり、蛍光検出において、ある光子検出後に、一過的に光子が検出できなくなる時間のことである。この章では、従来法と同様に MoM に基づきながらもデットタイムによる影響を低減可能な Two Detector-N&B (TD-N&B) について記述した。TD-N&B は蛍光をハーフミラーにより分岐し 2 つの光検出器により同時測定し、2 つの蛍光信号の共分散を推定することで実現できる。緑色蛍光タンパク質 (Enhanced Green Fluorescent Protein; EGFP) の溶液を用いた実験によって、その効果を実証した。

第三章では光子検出の確率分布と最尤推定について記述した。この章では従来よりも発展的な統計モデルとパラメーター推定に最尤 (Maximum Likelihood; ML) 推定を採用した ML-N&B について記述した。前述の TD-N&B ではデットタイムの影響を低減できるが、この統計モデルにより、デットタイムの影響を完全に排除できる。最尤推定とは観測した光子検出データと統計モデルにより定義される尤度関数を最大化するようにパラメーターを決定する方法である。最尤推定では高次のモーメントも活用されるため、推定精度の向上が確認された。

第四章では経験ベイズ法と事後最大確率推定とパラメーター推定に経験ベイズ法 (Empirical Bayes Method; EB) と事後最大確率 (Maximum a Posteriori; MAP) 推定を採用した EB-MAP-N&B について記述した。本手法の統計モデルでは、隣り合うピクセル同士のパラメーターは似通った値になると仮定した。この仮定は本研究の実験条件において妥当である。この予測を記述するハイパーパラメーターの決定には経験ベイズ法による周辺尤度の最大化を用いた。

第五章では MoM、ML、EB-MAP の比較を行った。数値シミュレーションと実際に EGFP 溶液を用いた実験、HeLa 細胞にタンデム結合型オリゴマーEGFP を発現させた実験を行い、推定の正確度と精度にどの程度の差が生じるか評価した。これらの結果より、EB-MAP は Particle Number と Particle Brightness 比の推定において従来法より優れていることが明らかになった。

第六章においては結論と将来展望を述べた。本研究で示した統計モデルの改善により精度改善が期待できるだけでなく、研究分野として更なる発展も期待できることを結論した。

本研究により、経験ベイズ法と最大事後確率推定を組み合わせた EB-MAP-N&B を開発した。本手法は空間分布を画像として可視化できるため、細胞内で不均一な分布や凝集状態を示す場合にも適用可能である。特に、細胞内シグナル伝達における多量体形成や様々な病態に関連するタンパク質凝集形成において、分子の反応機構や機能制御の理解に広く貢献できると考えられる。

よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。