

ソフトウェアの紹介

二次元電気泳動画像解析ソフト CancerD2 について

岸本通雅

京都工芸繊維大学名誉教授

二次元電気泳動画像を迅速かつ正確にコンピューターにより解析することは、がんマーカーの検出やバイオプロセスの検証など様々な局面でプロテオーム解析に大きく貢献します。ここで紹介するコンピューターソフトウェア CancerD2 はまさに上記目的を達成するために開発されたもので、これを用いることにより 2 枚の二次元電気泳動画像を迅速に解析できます。

解析の対象となる画像は 256 階調 (8 bit) のグレースケールで bmp ファイルとして保存されている必要があります。それ以外の形式のファイルは解析できませんので市販の画像処理ソフト (Photoshop, Paintshop 等) を用いて bmp ファイルに変換して下さい。また 1000x1000 ピクセルまでの画像データなら処理できますが、それ以上になりますと画像同士が重なったり、処理時間がかかりすぎるなど、多くの弊害が生じてきます。したがって一枚当たりの大きさとしてデフォルトの 600×800 ピクセル程度を推奨します。(もし大きな画像データの取り扱いをご要望される方が多ければ、今後開発を検討致します)。

一般的に二次元電気泳動画像はバックグラウンドの濃淡もあり、画像が互いにゆがんでいたりしますのでそれらをうまく補正し、画像中にあるタンパク質スポットをうまく対応づける必要があります。またスポットの領域とバックグラウンドとの境界をどのように決めるのかといった問題も生じてきます。そこで本ソフトではまずデフォ

ルト値でその境界の濃度レベルを決めておき、2つの画面のスポットを抽出します。もしスポットが少なすぎたり、逆にバックグラウンドまでスポット領域としてしまった場合は、バーを動かすことにより境界の濃度レベルを変更します。

適当にスポットが両画面に現れたら、画像を補正し自動でスポットをマッチングするための基準となるスポット対を5～7組選びます。スポット対はできるだけ偏りのないよう選んで下さい。具体的な操作手順は操作マニュアル（CancerD2の使い方）をご覧ください。その後選んだスポット対を基準にして、右の画面を修正して対応するスポットがうまく重なるよう画像を補正します。その上でバックグラウンドを正確に消去する操作をおこないます。ここではファジー消去とローリングボール法による消去を選択できるようになっていますが、これまでの経験からローリングボール法を用いた方がスポットとバックグラウンドがうまく分かれます。さらにノイズ処理をおこなってスポット領域とバックグラウンド領域の定義を行った後、下記の画像処理本番に入ります。

まず各スポットの領域を決めていきます。その際二つのスポットがつながっていると自動分割しその境界を定める操作を行います。次にスポットのナンバリングを行い、各スポットの重心を算出します。さらに2つの画像を照らし合わせて同じ位置のタンパク質スポットは同じ番号になるよう、右の画像のスポット番号を変更します。その上で各スポットのボリューム値を算出し、スポット番号、重心座標と共にテキストファイルとして記録します。ここまではすべて自動で行います。その上で後述するように手動による補正を行って最終結果を算出します。

次にその結果が予備的に表示されます。画面上にスポットの境域を示した画像や各スポットのボリューム値を棒グラフで示したものが表示されます。それぞれの画面でオプションとして手動補正ができるようになっていますが、原則としてこの段階での手動補正は行わないで下さい。この段階では予備的にこのような画面が出てくること

を確認するにとどめ、次の段階で手動補正を行ないます。

表示倍率指定のダイアログが表示されますので適当な倍率を指定すると、補正しやすい画面が現れます。指定したスポット対によって自動的に画像補正を行っているとはいえ、異なったスポットを同じ物としたりノイズをスポットと間違えたりすることもありますので、その場合には手動で補正します。補正できる項目は、スポット番号の訂正、スポット番号の消去、新たなスポット領域の作成、スポットの領域の拡大と縮小などです。しかし、このソフトは元々自動的に解析をするために開発しましたので、細かく手動で補正する操作には向いていないようです。例えば手動操作はいろいろな種類の細かいミスが発生させますが、そこまで詳しく考えてミスに対応できるように作っていません。最悪の場合プログラムが止まってしまうこともあります。そのため途中で計算結果を記憶できるようになっています。やり直す場合、はじめからやり直すのではなく、途中の計算結果記憶ポイントから開始できるよう作られています。

スポットの補正が終わったら最後に二つの画像間でスポットボリューム値の相関図を作成します。相関係数が1に近い場合、同じ傾向を持った画像であると考えられます。また相関図では横軸に左の画像のスポットボリューム値、縦軸に右の画像のスポットボリューム値をとっていますので、各データポイントの座標は対応するスポットボリュームの値で決定されます。またデータポイントをマウスでクリックすると、対応するもとのスポット画像が表示されます。したがって横軸上、縦軸上のスポットは対応するスポットのないスポットを示しており、それをクリックすることにより特異タンパク質の画像を確認することができます。

このソフトウェアでは多くのスポットが存在しても速やかに解析することが

可能です。なお解析の各段階でコンピューター画面の中央にダイアログが表示されますから、ダイアログの表示に注意しながら操作を行えば、指導マニュアルを読み返すことなく操作ができるようになっています。

なおもし操作上の疑問点や誤動作等を見つけられましたら、その動作がどの段階なのかはっきりさせるためダイアログのタイトルバーに表示されている画面の番号および操作マニュアルの記載ページを確認して、学会までメール等でお知らせください。すぐには返答できないケースもありますが、できるだけ迅速に対応したいと思います。