

〔特集：最新の電気泳動技術〕

二次元電気泳動画像解析ソフト cancerd2 の開発

岸本 通雅

京都工芸繊維大学工芸科学研究科生物分子工学部門

Development of image analysis software cancerd2 for two-dimensional electrophoresis.

Michimasa Kishimoto

E-mail: kishimoto@chem.kit.ac.jp

(受付 2014 年 6 月 5 日, 受理 2014 年 6 月 12 日)

はじめに

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する。コンピュータープログラム cancerd2 はまさに上記目的を達成するために開発したもので、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・比較できる。

解析の対象となる画像は 256 bit のグレースケールで、適当な大きさの bmp ファイルとして保存されている必要がある。それ以外の形式のファイルの場合は、市販されている画像処理ソフト(Photoshop, Paint Shop 等)を用いて bmp ファイルに変換する必要がある。また、1M pixel までの画像データなら処理できるが、それ以上だと画像同士が重なったり、計算時間がかかりすぎたりするなど多くの弊害が生じてくるので、画像の一部分のみを解析する等の工夫が必要である。画像1枚当たりの大きさとしてはデフォルトの 600×800 ピクセル程度が推奨される。

画像処理の概略

一般的に、二次元電気泳動画像はバックグラウンドが濃淡になり、画像が互いにゆがんだりすることがあるので、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る。また、スポットの領域とそれ以外の領域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くる。そこで cancerd2 ではまず適当にその境界の色をビット数(通常はデフォルトでよい)で決めておき、解析対象である2画面のスポットを抽出する。もし出てくる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認識したりした場合は、境界の色を、バーを動かすことにより変更する。

(準備段階 インストール、各種ファイルのコピーなど)

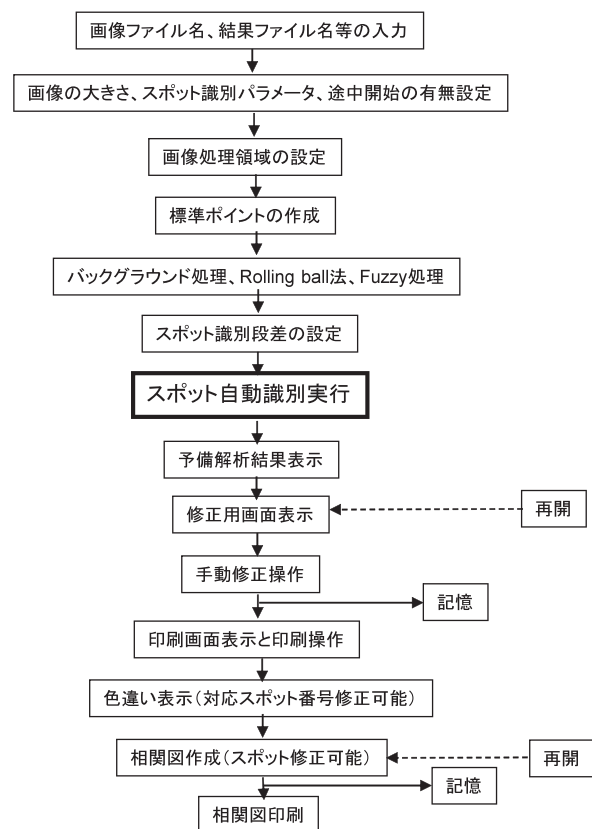


図1 cancerd2 を用いた二次元電気泳動画像処理操作のフローチャート

スポットが両画面にほどよく現れたら、画像を修正するための基準となるスポット対を5組程度、画面中でできるだけ偏りのないようにマウスを使って手動で選ぶ。その後、選んだス

ポット対を基準にして、右画面のデータを補正して選択したスポット対がうまく重なるよう、画像が自動修正される。その上でバックグラウンドをより正確に消去する操作を行う。ここではファジー消去とローリングボール法¹⁾を用いた方法を選択できるが、これまでの経験からローリングボール法を用いた方が、バックグラウンドがうまく消去できるようである。さらに簡単なノイズ処理を行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る。

まず各スポットの領域が自動的に決められていく。その際2つのスポットがつながっていたりすると自動分割し、その境界を定める操作も行われる。次にスポットのナンバリングから各スポットの重心も算出される。さらに2つの画面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、右の画面のスポット番号が決定される。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に記録される。ここまではすべて自動で行われる。その上で、後述するように手動補正を行って最終結果を算出する。

まずこれまでの結果が予備的に表示される。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る。この段階で自動処理の結果を確認し、次の段階の手動補正の目安を立てる。次に表示倍率指定のダイアログが示されるので、適当な倍率を指定する。すると編集しやすい画面が現れるので、その後手動補正を以下のように行う。いろんなタイプのスポットがあるので、自動処理のみでは、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、画像からはみ出た場合スポットがないと判断するので手動補正を検討する必要がある。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・縮小などである。

スポットの補正が終わったら最後に2枚のスポットの相関図を作成する。相関係数が1に近い場合、同じ傾向をもった画像であると考えられる。また、相関図では、横軸に左の図面のスポットボリューム値、縦軸に右の図面のスポットボリューム値をとっているため、各データポイントの座標は対応するスポットのボリューム値で決定される。また、データポイントをマウスでクリックすると、対応する元のスポット画像が表示される。従って、相関図において横軸上、縦軸上のスポットはどちらかの画像に対応するスポットがないタンパク質を示しており、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る。このプログラムでは、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ある。なお解析の各段階でコンピューター画面にダイアログが表示されるから、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自然と正しい操作ができるようになっている。

以上述べた画像処理操作の流れを図1のフローチャートにまとめた。

応用例

ここでは遺伝子組み換えを行ったことによる大腸菌内のタンパク質組成への影響を、二次元電気泳動によって調べた結果を示す。使用した菌株は大腸菌 BL21(DE3)株で、それにプラスミドベクターpET 22b(+)を塩化カルシウム法によって導入した。導入操作によってタンパク質の分布に影響が出るかどうかを、二次元電気泳動とこのプログラムで調べたのである。まずコントロールとして、図2に導入する前の菌株のふたつのコロニーからとった試料を二次元電気泳動にかけた結果を示す。図2の横軸は1個目の試料から得られたスポットボリューム値をとり、縦軸は2個目の試料から得られたスポットボリューム値である。従って、対応するスポット対のボリューム値を座標として、データがプロットされている。相関係数は0.965とほぼ1に近く、同じ菌株のコロニーから得られた試料はほぼ同じタンパク質の分布を示すことがわかる。

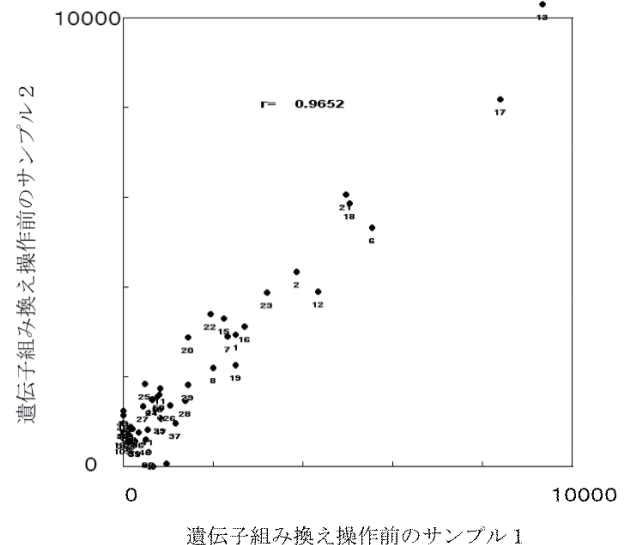


図2 大腸菌の同一菌株の2コロニーから採取した試料の二次元電気泳動タンパク質スポットの相関

図3には遺伝子導入前と後のタンパク質スポットの相関図を示す。この場合の相関係数は0.8845であり、若干タンパク質の分布に差が出た結果となった。

以上のように、本法は細胞中のタンパク質の分布を網羅的に解析し、細胞全体の様子を観察するのにも有効であるが、特異的なタンパク質スポットを見いだしてPMF法によってタンパク質を同定し、生化学・医療等の研究に必要な情報

を提供することにも役立つ。

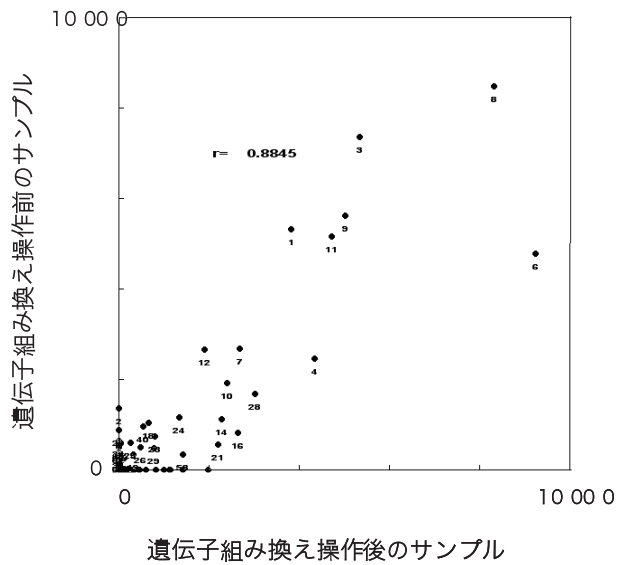


図3 遺伝子組み換えによる大腸菌タンパク質スポットへの影響

補 足

cancerd2 は、元来染色画像の経時変化を解析するために開発された画像解析用プログラム²⁾に改変を加え、2枚の画像のみを取り扱えるように機能を限定し、さらにスポットボリューム値の相関を求めたり、手動による変更機能を強化するように考慮して作成したプログラムである。

謝 辞

本プログラムは、戸田年総先生のご厚意により試用して頂き、戸田先生には、デバッグ、マニュアル作成作業でご助力頂きました。この共同作業により、本プログラムはかなり使いやすくなりました。戸田先生には厚く御礼申し上げます。

文 献

- 1) Sternberg SR. Biomedical image processing. Computer. 1983;16:22-34.
- 2) Kishimoto M, Tatsumi Y, Tamesui N, Kumada Y, Horiuchi J, Okumra K. Dynamic analysis of the silver staining gel image of 2-DE for protein quantification. J Electrophoresis. 2010;51: 1-7.