

ゲノムスキャニング 2次元電気泳動像解析のための スポット検出とパターン照合

5 R - 1

渡辺弥寿夫* 中沢政幸** 高橋友康* 堀岡雅清* 林崎良英***

*金沢工業大学 **石川職業能力開発短期大学校 ***理化学研究所筑波ライフサイエンスセンター

1.はじめに

ゲノム解析は、現在世界的な規模で精力的に進められており、中でも、ゲノムマッピングの高速化技術の開発は、重要なテーマの一つである。現在すでに実用に供しているゲノムDNA解析システムがあるが、その電気泳動像の画像解析は、サザン法¹⁾やPCR(Polymerase Chain Reaction)法²⁾などに基づくものであり、原理的に1次元の信号処理を行っているので、サイズの大きいゲノムに対して解析の高速化は期待できない。そこで、近年、林崎が中心となってゲノムスキャニングの画期的な方法、RLGS(Restriction Landmark Genomic Scanning)法が開発され、2000~3000の多数の座位について一度にスキャニングすることができ、複数のゲノムDNAに適用して、欠失・増幅・転座などの変化を検出できる可能性が見出された。これは、まず、ゲノムDNAを制限酵素で切断し、その末端をラジオアイソトープで直接放射標識した後、それを2次元電気泳動法で展開・分類し、オートラジオグラフィを行う方法である。^{3) 4)}

ところが、オートラジオグラフィで得られたX線フィルム上の数千のスポットを読みとる作業は現在、人手で目視に頼っているため、読みとり速度は遅く、人為的なミスも入る。そこで、RLGSパターン的高速自動解析システムの開発を目指して、RLGSパターンの画像処理における基本的課題およびユーザインタフェースについて検討を行った。

2. RLGSパターンの画像解析における基本的課題

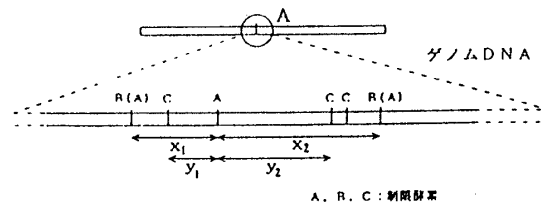
RLGS(Restriction Landmark Genomic Scanning)法は、制限酵素の認識配列をゲノムDNA上のランドマークとして利用するという原理に基づいている。図1は、RLGS法の概略を示しており、以下のステップより成る。

- (1) ブロッキング：精製過程におけるニックやギャップを除去し、誤った標識を阻止。
- (2) ランドマーク切断：(1)の方法で前処理したDNAをrare-cutter酵素(100kbp以上のサイズを生じる制限酵素A)で切断。

- (3) ランドマーク標識：切断面をラジオアイソトープで標識。このステップは場合により制限酵素B(数~数十kbpのサイズを生じる酵素)でさらに切断。
- (4) 1次元分画：薄いアガロースゲルによる1次元目の電気泳動。
- (5) DNAのゲル中での切断：一次元泳動したDNAを制限酵素C(10kbp以下のサイズを生じる)で切断。
- (6) 2次元分画：ポリアクリルアミドゲルによる2次元目の電気泳動。
- (7) オートラジオグラフィ

このような過程から図2のような2次元電気泳動像が得られる。ひとつのスポットは、染色体上のひとつの座位に相当し、図1におけるスポット①、②の位置座標(x,y)は、各々、制限酵素BのサイトからAのサイトの距離、制限酵素CのサイトからBのサイトの距離に依存して決まる。また、スポットの濃度zは、ゲノムのランドマークのコピー数を反映している。従って、画像読み取りで第一に必要なことは、スポットの位置座標と濃度(x,y,z)を求めることである。

また、健全な場合とそうでない場合では、スポットが消失したり、スポット濃度が小さくなって、画像パターンの差異が見られ、何らかの遺伝子の異常が起き



1. ブロッキング
2. ランドマーク切断 (A)
3. ランドマーク標識
4. DNAの切断 (B)
5. DNAの切断 (C)
6. 二次元分画
7. オートラジオグラフィ

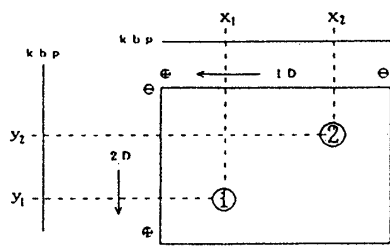


図1 RLGS法の概略

Spot Detection and Pattern Matching in Analysis of Two-dimensional Electrophoresis Autoradiogram Images for Genome Scanning

Yasuo Watanabe*, Masayuki Nakazawa**, Tomoyasu Takahashi*, Masakiyo Horioka*, Yoshihide Hayashizaki***

*Kanazawa Inst. of Tech., **Ishikawa Polytechnic College,

***Tsu kuba Life Science, Inst. of Physical and Chemical Research

ている。そこで、画像読取りで第二に必要なことは、スポットの微かな差異が見られる複数のRLGSパターンを照合して識別することである。ただし、たとえ同一のDNA断片であっても、RLGSパターンが全く重なって一致することはなく、非線形な歪みやスポット形状・濃度の変動を伴うことを考慮する必要がある。

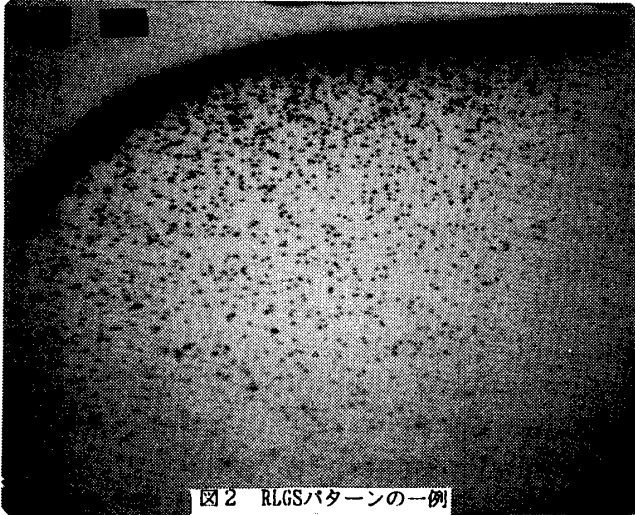


図2 RLGSパターンの一例

3. RLGSスポットの検出と照合

詳細は文献⁵⁾に譲るが、次のような処理手順で図3.aのようにスポットが検出される。ただし、画像の中心付近に見える三角形は目視照合のためのものであり、処理の対象としない。

- (1) X線フィルムスキャナによる画像入力
- (2) 平滑化処理
- (3) グラジエント&リングオペレータによるスポット検出

さらに、スポットの照合は、部分間で、ドロネー網(Delauney Net)と相対隣接グラフ RNG(Relative Neighbourhood Graph)により行う⁵⁾。図3.b,cは図2.

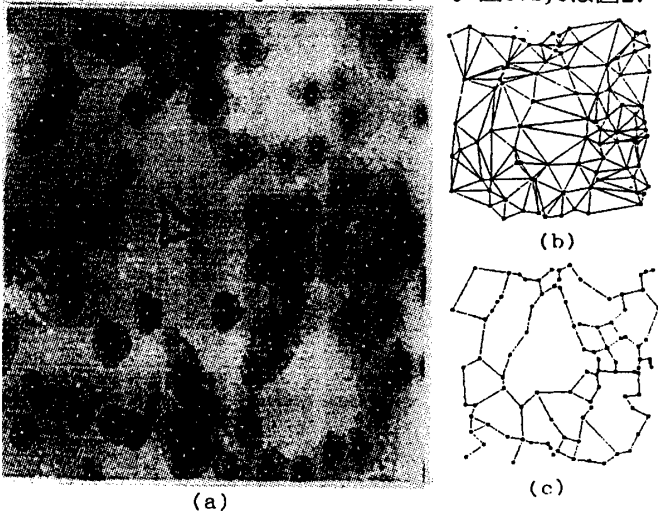


図3 スポット検出と照合のためのグラフ

- (a) スポット検出結果
- (b) ドロネー網, (c) RNG

の部分画像から検出されたドロネー網とRNGである。ここで、RLGSパターンの照合をユーザが画面で、確認するためオーバレイを行い、誤った照合がある場合、ユーザが変更できる機能を付加した。これは、2枚の画像の一方を代表的なスポット位置を頂点とする3角形に分割し、他方の対応する3角形に局所的に線形変換するものである。図4.はbの画像をaの画像に対応させるために線形変換した画像をcに示したものである。

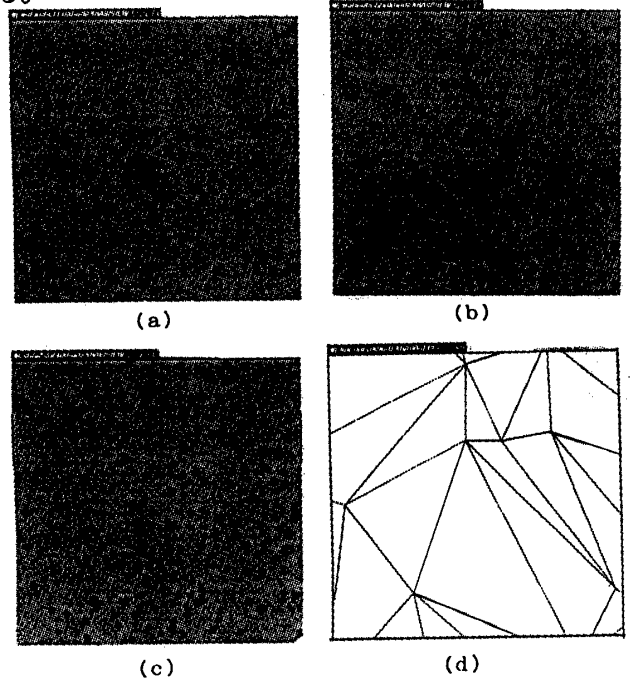


図4 画像オーバレイの一例

- (a) 画像1, (b) 画像2, (c) 画像2の3角形分割による局所線形変換
- (d) (c)で用いた三角形

4. おわりに

以上のように、RLGSパターンの画像解析の課題をほぼクリアできる見通しを得た。本稿で示したゲノム解析の画像処理技術は、RLGS法を支援し、高速なゲノムマッピング技術や遺伝子診断・治療等に、貢献すると考える。今後の課題として、スポットの重なりがある場合や、尾を引くような場合の位置検出、さらに、多くのRLGSパターンに対して実験を重ねて、実用化をはかりたい。

[参考文献]

- 1) E.M. Southern : "Detection of Specific Sequences among DNA Fragments Separated by Gel Electrophoresis", J.Mol.Biol., 98, pp.503~517 (1975)
- 2) R.S.Saiki et al. : "Enzymatic Amplification of β -Globin Genomic Sequences and Restriction Site Analysis for Diagnosis of Sickle Cell Anemia", Science, 230, pp.1350~1354 (1985)
- 3) Y.Hayashizaki, et al. : "Restriction landmark genomic scanning method and its various application." Electrophoresis, 14, pp.251~258(1993)
- 4) 林崎, 畑田, 宏常, 向井: "ゲノムスキニング法—restriction landmark genome scanning(RLGS)法", 蛋白質・核酸・酵素, Vol.38, No.3, pp.573~580 (1993)
- 5) 渡辺, 中沢, 高橋, 堀岡, 林崎: "ゲノムスキニング2次元電気泳動画像解析システムにおけるスポット検出とパターン照合", 信学技報, PRU95-34, pp.103~110(1995)