

〔ワークショップ：医学・生物分野における電気泳動システムに期待するもの〕

二次元電気泳動の画像解析装置の分子生物学分野への応用

戸田年総

SUMMARY

Since Dr. O'Farrell reported his high-resolution two-dimensional electrophoresis in 1975, many fruits of the method have been born. In parallel with the advance of the separation method, hardware systems and programs for analyzing the two-dimensional images were also developed. The most advanced systems provide us a convenient tool for comparing two images and assigning unmatched spots to the specific protein if it has been registered in a protein database.

Key words: two-dimensional electrophoresis, image processing, protein database.

はじめに

1975年にコロラド大学の O'Farrell¹⁾ が J. B. C. に寄せた一篇の論文は、多くの生化学者に大きな衝撃を与えた。なにしろ一つの電気泳動法で（実際には二つの方法の組合せであるが）大腸菌の蛋白質を 1,000 個以上のスポットに分離して見せたのであるから、二次元電気泳動がその能力を遺憾なく発揮するのは、2 種類の検体（たとえば、癌細胞と正常細胞、分化細胞と未分化細胞、老化細胞と若齢細胞、遺伝子導入細胞と対照宿主細胞など）の違いを蛋白質のレベルで検出するといったような場合である。しかし高分解能の二次元電気泳動像はスポットの数が多いため、個々のスポットの微妙な増減や等電点・分子量のわずかなシフトを肉眼的観察で判断することは容易でない。コンピュータによる画像処理技術がこの問題に一つの解決策を与えてくれた。

二次元電気泳動画像解析の歩み

コンピュータによる画像解析は、画像を読み取ること

から始まる。仮に 10 cm 四方の二次元ゲルを分解能 0.1 mm, 精度 0.01 OD で 3 OD までの光学密度値として記憶するには約 2 メガバイトのメモリが必要である。さらにこの画像データを解析するためには数十キロ～数メガバイト（処理内容によって異なる）のメモリを確保しなければならない。O'Farrell が二次元電気泳動を発表した当時は、PDP-11 クラスのミニコンピュータでも使わない限り、これだけのメモリ空間は実現できなかった。それでも二次元電気泳動像の解析にコンピュータを利用しようという試みは早くからあちこちで始まっていたようで、折しも第 1 回の国際電気泳動学会がチャールストンで開催された 1981 年に、先を争うようにその成果が発表された (Table 1)。画像の読み取りに関しては、ベルリン大学の Schneider らが撮像管テレビカメラ方式を、マックスプランク実験医学研究所の Kronberg ら²⁾ が走査顕微測光方式を報告した。また、米国 NIH の Lemkin ら³⁾ によって開発された GELLAB システムと Argonne 国立研究所の Anderson ら⁴⁾ によって開発された TYCHO システムにおいて、2 枚の二次元電気泳

Applications of the computerized image processing for analyzing two-dimensional electrophoretograms in the field of molecular biology.

Tosifusa Toda; 東京都老人総合研究所分子生物学部門

Correspondence address: Tosifusa Toda, Tokyo Metropolitan Institute of Gerontology, Department of Molecular Biology, 35-2, Sakae-cho, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan.

略号一覧: 2 DE, two-dimensional electrophoresis; PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis; IEF, isoelectric focusing; pI, isoelectric point; SDS, sodium dodecyl sulfate; CCD, charge-coupled device; OD, optical density; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; TRP, thymopoietin-responsive protein.
第 44 回電気泳動学会総会・ワークショップ

Table 1. 二次元電気泳動画像解析装置の進歩と cyclin/PCNA 研究

1975	二次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動発表 (O'Farrell)	1976
	DNA polymerase δ の発見 (Bymes et al.)	
	PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) の発見 (Miyachi et al.)	1978
1981	第1回国際電気泳動学会開催 (Charleston)	
	126 演題中 16 演題が二次元電気泳動関連	
	二次元セルロースアセテート膜電気泳動発表 (Toda et al.)	
	その半数の8演題が二次元の画像解析関連	
	撮像管カメラ方式による画像の取り込み (Schneider et al.)	
	顕微測光スキャン方式による画像の取り込み (Kronberg et al.)	
	二次元データベース: Human Protein Index 構想 (Taylor et al.)	
	GELLAB system: 位置補正, スポット対応アルゴリズム (Lemkin)	
	二次元電気泳動による Cyclin の発見 (Bravo et al.)	1981
1982	Clinical Chemistry 28 巻に二次元電気泳動と画像解析の特集	
1983	スキャナー入力/マイコン方式二次元デンストメーター発表, 児玉賞受賞 (Toda et al.)	
1984	データベース自動構築型二次元電気泳動解析装置 QUEST system 発表 (Garrels et al.)	
	CCD カメラ入力/マイコン方式二次元デンストメーター FIMC system 発表 (Toda et al.)	
	Cyclin=PCNA (Mathews et al.)	1984
	DNA polymerase δ 活性化因子の発見 (Lee et al.)	
	DNA polymerase δ 活性化因子=PCNA (Bravo et al.)	1985
1987	PDI 社, ワークステーション方式 PDQ-SCAN, PDQUEST 発売	
	PCNA の cDNA クローニング (Almendral et al.)	1987
1988	PDQUEST 上で Human Protein Database 作成, Cyclin/PCNA=Protein 9218 (Celis et al.)	

動パターンを位置補正しながら重ね合わせ, 異なるスポットを見つけた機能を実現された。しかし残念なことに, これらのシステムはミニコンピュータを用いることが前提であったため, 私達が身近に利用できるような方法ではなかった。これら両システムの長所を集大成する形で 1986年に Cold Spring Harbor Laboratory の Garrels 氏⁶⁾によって完成された QUEST システムも, 当初はやはり UNIX を OS とするミニコンピュータ上で動作するように設計されたものであったが, 完成からわずか数年の後に同じ UNIX を OS とする SUN ワークステーションに移植され, PDI 社から PDQUEST として発売された。このワークステーションバージョンは 1千万円をわずかに上回る程度の価格に抑えられたため, 各国の大学, 研究所で広く利用されるようになった。

セルロースアセテート膜二次元電気泳動法を引き下げて第1回国際電気泳動学会に参加していた大橋望彦博士と私⁶⁾は, そこで二次元画像解析システムの有効性を目の当たりにし, われわれにも利用できる手軽なシステムは作れないものかと思案しながら帰国した。帰国後最初に手掛けた第1号機は, 常光産業製の検査用デンストメーターから吐き出される信号をシャープ製の8ビットマイクロコンピュータで受け取って, 1スキャンごとにフロッピーディスクに書き込むというものであった。精度 0.2 OD で 2 OD 程度まで読み取れ, 解像度も 0.2 mm

程度を実現しており, マイクロコンピュータを用いた二次元デンストメーターの実用機としては世界初のものであった。われわれはさらに改良を重ねて英国 JOYCE-LOEBL 社製走査型顕微測光装置を用いた 2号機⁷⁾, CCD カメラを用いた 3号機⁸⁾へと進み, 老化関連蛋白質の検出⁹⁾などに利用された。

二次元電気泳動画像解析装置の現状

現在市販されている代表的な装置を Table 2 に示す。PDQUEST およびその流れを組む Image Master では, 従来ミニコンピュータでしか利用できなかったローリングディスク方式のバックグラウンド補正が導入されており, その他の機種ではそれぞれ独自のアルゴリズムで周囲の濃度から総合的に判断してバックグラウンドレベルを算定し, 除算できるようになっている。またこれらはいずれも, スポットの自動検出, 位置の補正, 差異の検出が自動的にを行う機能を備えている。さらに PDQUEST では登録された既知の蛋白質に関するデータベースを検索することによってスポットの同定を行うことができるほか, 新たな同定された蛋白質のデータを付け加えて独自のデータベースを作成することもできる。

Table 2. 市販されている代表的な二次元電気泳動画像解析装置

	The Discovery Series™ PDQUEST™ System	Bio Image™ 110 S	ImageMaster™
Image acquisition	CCD array scanner 400×280 mm 63.5 μm, 0-2.2 OD	Kodak CCD camera 270×270 mm 50 μm, 0-3 OD	CCD array scanner 400×280 mm 63.5 μm, 0-2.2 OD
Computer	Sun Work Station	Sun Work Station	Compaq microcomputer
OS	UNIX	UNIX	DOS/V 5.0
Software	PDQUEST	BioImage 2-DE Anal. BioImage 2-D Matching	ImageMaster Software (microPDQUEST)
バック補正	可 (ローリング法)	可	可 (ローリング法)
スポット自動検知	可	可	可
スポット位置補正	可	可	可
スポットマッチング	可	可	可
非対応スポット検知	可	可	可
データベース作成	可	不可	不可
データベース検索	可	不可	不可

細胞増殖・分化機構の研究における 二次元電気泳動画像解析の応用例

細胞の増殖, 分化, 老化, 癌化などに関わる蛋白質を検出する目的でしばしば二次元電気泳動が利用され, 多くの成果を収めている. なかでも Celis と Bravo らによって見つめられた増殖細胞核抗原 cyclin/PCNA は最終的に DNA ポリメラーゼ δ の活性化因子であることが判明し, 細胞生物学者や分子生物学者の間で注目を集めている.

古くから哺乳動物の細胞には α , β , γ 型の3種類の DNA ポリメラーゼが存在することが知られており, その局在性や誘導性から, ミトコンドリアの DNA は γ 型, 核の DNA は α 型の DNA ポリメラーゼによって複製されると考えられていた. ところが 1976 年に Byrnes らによって第4の DNA ポリメラーゼ " δ 型" が発見され, Prelich ら¹⁰⁾ によって " α 型は Lagging 鎖を, δ 型が Leading 鎖を合成する" ということが明らかにされてから " δ 型" がにわかに脚光を浴びることとなった.

一方, 臨床化学の領域では, 膠原病患者の血清中に自己の細胞の核に反応する自己抗体が存在することは古くから知られていたが, 1978年 Miyachi ら¹¹⁾はこの自己抗体に対する抗原が, 増殖中の細胞の核に存在する特定の蛋白質であることを見だし, この抗原を PCNA (proliferating cell nuclear antigen) と名づけた. しかしまだこの時点では, この抗原蛋白質の機能を知るすべはなかった.

これら二者の研究とはまったく独立に, 二次元電気泳動を用いて細胞増殖調節蛋白質の検索を行っていた Bravo ら¹²⁾は, 増殖期の HeLa 細胞に特異的に増加する蛋白質スポットを見つけ, cyclin (cell cycle 依存性蛋白質) と名づけた. この蛋白質のことはその後3年ほどの間あまり顧みられなかったが, Mathews ら¹³⁾が免疫吸収二次元電気泳動によって "cyclin と PCNA は実は同じ蛋白質である" ということが明らかにされると, 再び細胞生物学者, 分子生物学者の注目を集めることになる. 折しも同年 Lee ら¹⁴⁾によって DNA ポリメラーゼ δ の活性化因子が発見されその分子量 (37 kDa) が報告されると, Bravo ら¹⁵⁾は DNA ポリメラーゼ δ 活性化因子=cyclin/PCNA である可能性があることに気づき, 二次元電気泳動パターン上で両者のスポットが一致することを確認した. さらに念のためにアミノ酸配列分析を行い, N末端の 10 アミノ酸が一致することをつきとめた. Bravo の共同研究者である Celis ら¹⁶⁾は, 一連の研究の過程で "二次元データベースが整備されていれば, PCNA の例のように増殖や癌化, 分化, 形質転換などで変動することが二次元電気泳動によって明らかにされたものの, 機能が不明な蛋白質と, DNA ポリメラーゼ δ 活性化因子のように生理活性の研究で機能が明らかにされた蛋白質とをデータベース上で対応させることができる" と考え, 1987年に PDI社からPDQUESTが発売されると, "Human Protein Database" を作成, その中にこの cyclin/PCNA も Protein 9218 として登録されることとなった. このデータベースは, 有償ではあるが現在一般に公開されている.

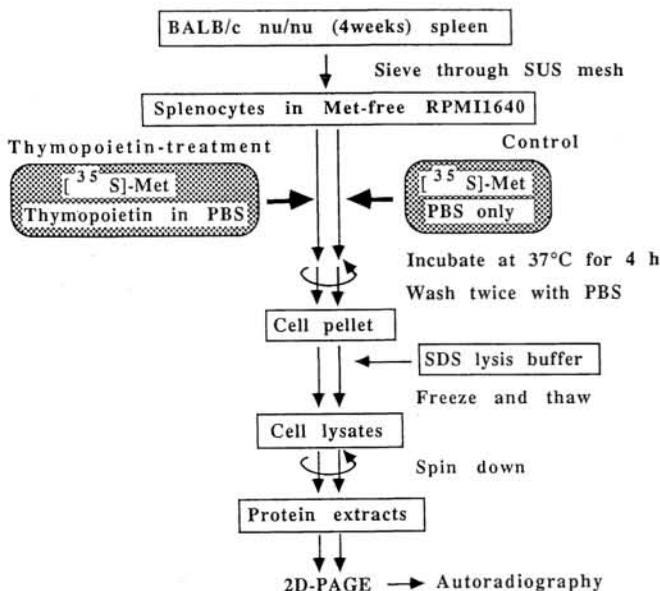


Fig. 1. The experimental procedure for labeling thymopoietin-responsive proteins in nude mouse splenocytes with [³⁵S] methionine.

Table 3. The protocol of two-dimensional gel electrophoresis.

The 1st dimension

Gel: Immobiline Dry Strip, pI 4-7
 Apparatus: Multiphor II (Pharmacia-LKB)
 MultiDriveXL (Pharmacia-LKB)
 Rehydration medium:
 8 M urea
 0.5%(v/v) Triton X-100
 0.2%(w/v) DTT
 0.2%(w/v) Pharmalyte 3-10
 0.002%(w/v) Orange G
 Cooling: by water circulation at 15°C
 Power: 1 300 V, 1 mA, 5 W, 4 h, 1200 Vh
 2 300 V, 1 mA, 5 W, 5 h, 9500 Vh
 3 2500 V, 1 mA, 5 W, 7 h, 24500 Vh

The 2nd dimension

Gel: 12% T, 2.66% C SDS-PAG (16×15 cm)
 Apparatus: Vertical PAGE apparatus
 (Anatech)
 Cooling: water circulation at 15°C
 Power: 10 mA constant

以上は細胞増殖研究における応用例であるが、私達は現在“サイモポエチンによるT細胞分化誘導に関する研究”を行っており、その中で二次元電気泳動・画像解析システムを用いて、サイモポエチン応答性の蛋白質をい

くつか見いだした¹⁷⁾。

サイモポエチンは Goldstein ら¹⁸⁾ によって最初ウシの胸腺で見つけられた 49 個のアミノ酸からなるペプチドホルモンである (ヒトの場合 48 個)。このペプチドには、マウスの Thy-1 陰性前胸腺細胞を Thy-1 陽性細胞に変える作用があり、T細胞の分化誘導因子のひとつであると考えられている。私達はサイモポエチンによって誘導されるT細胞分化のメカニズムを分子レベルで解き明かすべく、サイモポエチン刺激により細胞内に特異的に誘導される蛋白質を [³⁵S] メチオニン標識し、二次元電気泳動/オートラジオグラフィにて解析した。実験方法と泳動条件を Fig. 1 および Table 3 に、オートラジオグラムを Fig. 2 に示す。ImageMaster を用いて画像処理を行った結果、サイモポエチン刺激によって3時間以内に分子量約1万、等電点約5の2種類の蛋白質のみが特異的に誘導されることがわかった。私達はこの2種類の蛋白質がサイモポエチン刺激が細胞に加わった際の細胞内シグナル伝達に関わる物質ではないかと考えてサイモレスピン (thymorespin: TRP) と名づけ、その構造と機能を探るための研究を進めている。しかし TRP-1 と TRP-2 は銀染色でも検出できないくらい微量の蛋白質であるため、精製蛋白質を用いて構造や機能を調べることはほとんど不可能であるので、遺伝子側からの研究を進めているところであるが、遺伝子が単離さ

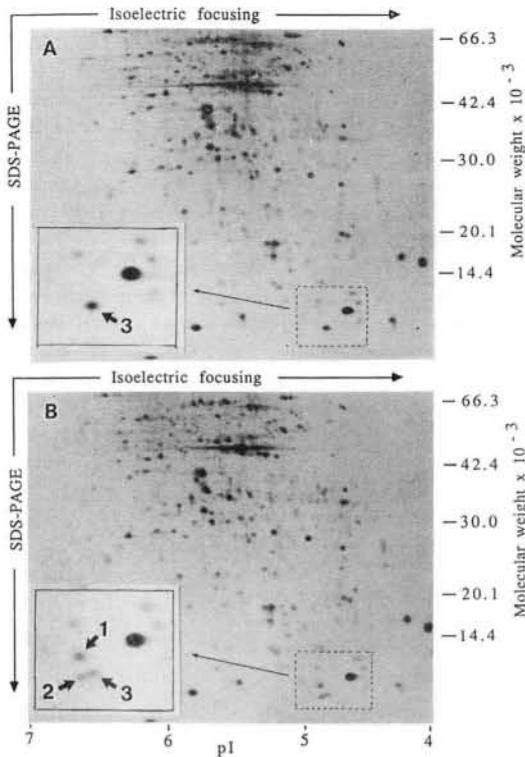


Fig. 2. Thymopoietin-responsive proteins detected by two-dimensional electrophoresis and computerized spot matching.

(A) Control splenocytes. (B) Thymopoietin-treated splenocytes. Spot 1 and 2 were thymospins induced by treatment with thymopoietin. Synthesis of spot 3 was reduced by the treatment oppositely.

れ塩基配列およびその翻訳アミノ酸配列が明らかにされるまでには相当な研究期間を要すると思われる。しかしその間、この蛋白質をデータベースに登録しておくことができ、あたかも DNA データベース上で NDP キナーゼ¹⁹⁾と癌転移抑制遺伝子 Nm 23 が結び付けられたときのように、まったく別の角度の研究から見つめられた機能性蛋白質と偶然に結び付けられることも期待できる。

ま と め

二次元電気泳動は O'Farrell の発表から 18 年目を迎え、その間に付随的に生まれた画像解析システムも成熟期に入った。折しも分子生物学領域の研究が目覚ましい進歩をとげ、生理現象が個々の遺伝子の構造と産物の機能のレベルで議論される時代となっている。この時期に

細胞の構成蛋白質を個々の遺伝子産物として分離同定できる性能をもつ二次元電気泳動の有用性があらためて見直されている。そして二次元画像解析装置およびそれに付随する二次元データベースは、そのパターンから速やかに既知蛋白質に関する情報を引き出すための支援システムとして今後の活躍が期待される。

文 献

- 1) O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of protein. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-21.
- 2) Kronberg H, Zimmer H-G, Neuhoff. Implicit modeling of spots for the evaluation of two-dimensional electrophoretograms. In: Allen RC, Arnaud P, editors. *Electrophoresis '81*. Berlin: Walter de Gruyter, 1981: 413-423.
- 3) Lemkin PF, Lipkin LE. GELLAB: Multiple 2D electrophoretic gel analysis. In: Allen RC, Arnaud P, editors. *Electrophoresis '81*. Berlin: Walter de Gruyter, 1981: 401-411.
- 4) Tayler J, Anderson NL, Anderson NG. A computerized system for matching and stretching two-dimensional gel patterns represented by parameter lists. In: Allen RC, Arnaud P, editors. *Electrophoresis '81*, Berlin: Walter de Gruyter, 1981: 383-400.
- 5) Garrels JI, Farrar JT, Burwell CB. The QUEST system for computer-analyzed two-dimensional electrophoresis of protein. In: Celis JE, Bravo R, editors. *Two-dimensional gel electrophoresis of proteins*. New York: Academic Press, 1984: 37-91.
- 6) Toda T, Fujita T, Ohashi M. Two-dimensional electrophoresis on cellulose acetate membranes. In: Allen RC, Arnaud P, editors. *Electrophoresis '81*. Berlin: Walter de Gruyter, 1981: 413-423.
- 7) Toda T, Fujita T, Ohashi M. An approach to quantitative analysis of two-dimensional electrophoretogram. *Physico-Chem Biol (Seibutsu-butsurikagaku)* 1983; 27: 215-7.
- 8) Toda T, Fujita T, Ohashi M. A method of microcomputer-aided two-dimensional densitometry: An apparatus equipped with a chargecoupled device camera, and an algorithm of microcomputer programming. *Electrophoresis* 1984; 5: 42-7.
- 9) Fujita T, Toda T, Ohashi M. Age-related changes of two-dimensional electrophoretic protein pattern of rat liver. In: Hirai H, editor. *Electrophoresis '83*. Berlin: Walter de Gruyter, 1983: 163-170.
- 10) Prelich G, Stillman B. Coordinated leading

- and lagging strand synthesis during SV 40 DNA replication *in vitro* requires PCNA. Cell 1988; 53: 117-26.
- 11) Miyachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to nuclear antigen in proliferating cells. J Immunol 1978; 121: 2228-34.
 - 12) Bravo R, Fey SJ, Bellatin J, Larsen PM, Arevalo J, Celis JE. Identification of a nuclear and of a cytoplasmic polypeptide whose relative proportions are sensitive to changes in the rate of cell proliferation. Exp Cell Res 1981; 136: 311-9.
 - 13) Mathews MB, Bernstein RM, Franza BR Jr, Garrels JL. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. Nature 1984; 309: 374-6.
 - 14) Lee MYWT, Tan C-K, Dewney KM, So AG. Further studies on calf thymus DNA polymerase δ purified to homogeneity by a new procedure. Biochemistry 1984; 23: 1906-13.
 - 15) Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . Nature 1987; 326: 515-7.
 - 16) Celis JE, Ratz GP, Celis A, Madsen P, Gesser B, Kwee S, Madsen PS, Nielsen HV, Yde H, Lauridsen B, Basse B. Toward establishing amnion cells (AMA) and normal peripheral blood mononuclear cells. Leukemia 1988; 2: 561-602.
 - 17) Toda T, Ishijima Y, Matsushita H, Yoshida M, Kimura N. Detection of thymopoietin-responsive proteins in nude mouse spleen cells by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and image processing. Electrophoresis 1994; 15 (in press).
 - 18) Goldstein G. Isolation of bovine thymin: a polypeptide hormone of the thymus. Nature 1974; 247: 11-4.
 - 19) 木村成道. NDP キナーゼ/Nm 23/Awd による転移能の制御. 実験医学 1992; 4: 271-7.