特集記事

植物ゲノム・染色体研究における画像解析法の進展

福井希一*

(大阪大学大学院工学研究科, 吹田市, 〒565-0871)

Advances in Image Analyses of Plant Genomes and Chromosomes

Kiichi Fukui

(Grad. Sch. Eng., Osaka Univ., Suita 565-0871)

キーワード: 染色体, ゲノム, 画像解析法, 可視化技術,
キアス (CHIAS), 染色体地図, 凝縮型

はじめに

構造が機能と並んで重要な側面を占める生物学では「見る」という解析手法が重要な役割を果たしてきた。これは染色体分野においても同様であり、発見当初から染色体研究の中心的手法は顕微鏡を用いての観察であった。「見る」ことにより得られる視覚情報は人間が外界より取り込む情報の7, 8割を占める(福井 1990)ことから、人間が判断を下す上できわめて重要であるが一方で判断に個人差が生じる場合がある。そこで渡部 (1978) は染色体研究に画像解析法を導入することが「多くの正確な定量的情報を読み取る」「自動的に客観的な情報を短時間に集める」上で不可欠だと指摘した。

しかしながら1辺が512画素、各画素256段階の階調を持つ1枚の白黒画像では256Kバイト、カラー画像では768Kバイトとなる大量の情報を処理し解析することは70年代にはきわめて困難であった。例えばNECから8ビットのCPUを搭載したパーソナルコンピュータ(PC8001: メモリ数, 16Kバイト)が初めて発売されたのが1979年8月であり、内部メモリを64Kバイトに拡大した機種は1981年12月に発売されている。こうした事実が渡部の指摘の先見性を示すものである。

研究としての画像解析はGあるいはQバンド処理されたヒト染色体の客観的かつ迅速な同定(Caspersson ら 1971)および染色体異常の検出とそれを診断に生かすための自動化(Lundsteen ら 1980)の2点を主目的としてヒト染色体では70年代から開始されていた。これらの研究蓄積およびマイクロエレクトロニクスの急激な発展により80年代に入っていくつかのヒト染色体の画像解析システムが開発されるに至った(Taylor・Graham 1980, Fannon ら 1985)。

一方、植物分野においてはリックらにより60年代に提唱された主として交配による染色体工学が一応の成果を

収め、従来の手法に変わる新しい染色体工学の構築が模索されていた(e.g., 福井 1980, 1983, 福井・新聞 1983)。しかし植物では長い研究の歴史を有するコムギ染色体さえも識別・同定が困難な状態であり、まず染色体の客観的な識別・同定法の確立が強く求められていた。

植物染色体画像解析システム、キアスの開発とその利用

1. キアスの開発

こうした背景の下で植物染色体を対象とした染色体画像解析システムの開発が1982年に開始された。その主たる目的は同属内にC₃, C₄型の光合成経路をもつ、ハマアカザ属植物の染色体解析であった。しかしこれらについて解析するのは当然として、さらに踏み込んで植物染色体全体に利用可能な普遍的システムの構築が考えられた。その結果、翌年に取りまとめられた設計理念は、①植物の染色体を主たる解析の対象とすること、②ルーチンワークについては可能な限り自動化すること、③研究者の経験や技量が生かせるシステムであること、④顕微鏡部分を自動化すること、および⑤染色体画像を直接デジタル化して解析すること、の5点であった(福井 1985)。

まず第1点の植物染色体を解析の対象にするというのが本システムの最大の特徴であり、かつソフトウェアを開発する上で最大の問題となった。すなわち植物の染色体数は4のハプロパルスから100以上になるシダまでさまざまであり、ヒトの場合とは異なり対象とする染色体数を限定することが困難であった。したがって植物種のほぼ全てを解析の対象にできること、および動物の場合には必要のない半数体、倍数体、異数体をも解析できることが不可欠であった。その結果、染色体数は4個から最大で120個までまた倍数性は1倍体から6倍体までを解析できるプログラムを構築した。

次に第2の省力化および標準化の面では、原画像の取り込み、照明むら等の補正による解析画像の作成、さらに画像の強調、ノイズの除去等各画像処理段階における最も適切な処理方法、またその際用いるデジタルフィルターの選択、フィルター処理時の諸条件を明らかにし、一連

の解析を流れ作業で行うプログラムを構築した。

例を挙げると、原画像の入力時における顕微鏡照明装置の電圧変動による画像の明るさの変化は10枚の画像を連続して取り込みそれらを平均化することにより解決した。また写真画像に含まれている照明むらや現像むら等は画像をマトリクスサイズの大きいローパスフィルターで処理することにより、擬似的なコントロール画像をつくり解決した。さらに1画素あたり8ビット(256段階)の白黒階調を持つ原画像(多値画像)から2値画像(1ビット、白黒の画像)を得る際に生じるいくつかの問題を解決した。すなわち、位相差像等のコントラストの弱い画像を2値化した際にバックグラウンドにしばしば生じる Sprinkled Salt-like Dust と呼ばれる無数の小さなノイズ、および染色体周縁部に生じる人為的なケバ立ちを2値画像のメディアンフィルター処理によって一括して取り除いた。

こうした画像処理の各段階における最適の処理法の選択とさらに処理条件の最適化さらには新手法の開発により、染色体の写真から数値データを取り、それに基づき染色体を並べ替えるまで、従来は日単位で仕事がなされていたものを25分程度に短縮することを可能とした(Fukui 1986b)。

第3点では完全な自動化すなわち人間の判断全てをコンピュータに任せるのではなく、動原体部位の認識やサテライトがどの染色体に帰属するか等、経験を積んだ研究者による高度な判断を随時解析過程に盛り込むことが出来るマンマシンインタラクティブシステムの開発を目指した。この点がなるべく自動化することを目指して開発されたヒト染色体の画像解析システム、例えば Magiscan と基本的に異なる点である。これにより、まずシステム開発に要する負担が大きく減少した。そして顕微鏡像のシミュレーション(Fukui・Kamisugi 1991)など研究の多様なニーズに合わせてシステムを多面的に利用していくことを可能にした。

第4の顕微鏡オートメーションは染色体像の自動検出を念頭に置いたものである。Finnonら(1985)の見積もりによるとヒト染色体検査の場合において顕微鏡下で解析対象となる染色体像の検出に全研究時間の半分以上が占められるとされている。植物の場合は前処理を行ってもヒトの培養細胞系のように高い分裂指数を得ることは困難であることから、染色体像の自動検出は必須のものと考えられた。また同時に検出した核板の品質判定をも行わせることとした。

実際にオオムギ染色体を用いて行った自動走査では、初期条件により異なるが研究者が見いだした良好な核板(14本の染色体が揃っており、重なりが2カ所以下)の内、平均して8割以上が自動的に検出された(Fukui and Kakeda 1990)。効率は劣るものの小型のイネ染色体についても同様の結果が得られたことから、植物染色体の自動走査はほぼ実用化の域に達したと結論された。しかしながら特

定の研究目的以外では大量の染色体像を得ることはあまり必要ではなく、当初の予想に反して一旦完成はしたものの自動焦点機能を含めて顕微鏡オートメーションはほとんど使われることがなかった。

最後の第5点は従来の染色体研究では不可欠であった写真現像、引き延ばしのための暗室操作を不要のものとし、研究を効率化するために考えられたものである。同時に染色体画像の数量化により、従来得ることが困難であった種々の画像パラメータについて定量的データを取得することを意図した。そのため、従来の顕微鏡ではカメラボックスが設置された位置に直接テレビカメラをマウントした。カメラの種類についても検討を加え、撮像管を用いたテレビカメラの中では当時最も細精かつ残像特性のよいプランビコンを選定した。これによりオオムギなど大型の染色体では一切写真を経由することなく顕微鏡下の染色体を直接アナログ情報として取り込み、かつADコンバーターによりデジタル化して解析することが可能となった。この際、中間変倍の機能を有していたツアイス社の顕微鏡が解析に適した大きさの像を得る上で有用であった。

その他ハードウェアにおいても空気式除震台の設置、定電圧装置の導入など数十カ所に上る改善を行って、1985年にメインフレームに西ドイツ(当時)コントロン社製の汎用画像解析装置、IBASI、IIを用いた、設計理念をほぼ満足する植物染色体画像解析システム、キアス(CHIAS, Chromosome Image Analyzing System, 福井 1985)が完成した。開発当初のブロックダイアグラムを図1に示す。また染色体写真からCHIASを用いて植物染色体画像を解析する標準的な方法を1986年に発表した(Fukui 1986b)。その後CHIASはほぼ10年にわたって植物染色体の画像解析に供され、種々の解析を通じて得られた結果は論文で、また多くの経験とノウハウについても逐一広く公開された(福井 1987, 1989a, 飯島・福井 1991, 1992, 福井・神杉 1991~92)。また画像解析ソフトをプログラム登

図1. 完成当時の初代CHIASのブロックダイアグラム(Fukui 1986)。CPUは8ビット、増設後の内蔵画像メモリは256Kバイト画像8枚分プラス各画像1ビットのオーバーレイメモリ、フロッピーディスクドライブは8インチで一枚が1Mバイトの容量、プリンターは80桁のラインプリンターであった。

録し、必要な点は特許出願した。

2. キアスミニおよびキアス2の開発と利用

CHIASは主なハードウェアが外国製であったため、国産の同等システムの開発がほぼ時を同じくして企画された。価格の低減がその主な目的であった。そこでメインコンピュータ、画像処理部を国産のものに置換し、CHIASとほぼ同等の染色体画像解析能を持つが、染色体の自動操作部などあまり必要のない機能を除いた卓上型染色体画像解析システム、キアスミニ (CHIAS-mini) が1989年に開発された (Kamisugi・Fukui 1990)。

またオペレーションシステム (OS) がCP/MからMS-DOSに移り変わる中で1993年にはコントロン社製の16ビットのCPUを有するVIDASをメインフレームとし、画像ファイルの互換性、記憶容量の拡大、その他の改善を行ったCHIAS2を実用化した。これによりプログラムの構築上および画像サイズ上の制約が大幅に軽減され、かつ異なったシステム間の画像のやりとりがフロッピーディスクを用いて可能となった (Fukui・Nakayama 1996)。

3. キアス3の開発

CHIASについては近年、さらに大きな進歩が計られた。インターネットからパブリックドメインの画像解析ソフトウェアをダウンロードできるようになったこと、またパソコンの性能が飛躍的に向上し、画像情報など大容量の情報処理が可能になったことの2点によるものである。それらにより画像解析ソフト (NIHImage) および通常のパーソナルコンピュータ (1999年6月現在ではマッキントッシュ) を用いた第3世代のキアス、CHIAS3が1996年に開発され、現在広く染色体研究に用いられている。CHIAS3のマニュアルは印刷物 (Kato ら 1997) あるいはインターネット (<http://mac99.inada.affrc.go.jp/Eudejas/chias3/chias3.html>) から入手できる。

植物染色体の画像解析分野では、わが国は依然世界の研究をリードしており (Fukui 1996a, 1998, Fukui・Ohmido 1999, Fukui ら 1999), それはCHIASが遅滞なくバージョンアップしてきたことおよび画像解析法を用いた種々の新しい染色体解析法の開発によるものと言える。

植物染色体の識別・同定と定量的染色体地図の作成

1. 3つの植物染色体地図作製法

画像解析法を用いた植物染色体研究において期待されたものは染色体の客観的な識別・同定と定量的な染色体地図の作製である。なぜなら植物染色体では動物の染色体の識別・同定に広く用いられているG, R, Qバンドのような詳細に出現するバンドは例外的な場合を除いて得ることは難しく、結果として染色体の識別・同定がきわ

めて困難であるからである。ただN, Cバンドの様な比較的単純なバンドはコムギ等大型の植物染色体では可能であり、これによりコムギの全染色体が識別・同定されている (Endo 1986)。

ところがイネのような小型の染色体ではNおよびCバンドも得られない、あるいは得られたとしても動原体部あるいは染色体末端部に共通して得るなど、識別・同定には役に立たないものが多い。そこで、染色体の処理法を工夫してGバンドを植物においても得ることを検討しつつ (Fukui ら 1989, Kakeda ら 1990), 一方ではバンドの出ない植物染色体の解析に適した新しい方法の開発を模索した。

実際の画像解析では次の3つの方法を開発して取り組んだ。まず既に得られているライムギ, オオムギ, コムギのような大型の染色体のC, N分染像については、①研究者がバンド領域を視覚的に判断して定量化をするが、その際画像解析システムの支援を受ける、というもの。次いで、②CHIASがバンド領域の判断を人間の視覚能をシミュレートして行うもの。そして、バンドの出ない小型の染色体については、③細胞分裂前中期におけるクロマチンの不均一な凝縮を定量化する方法、である。

2. オオムギ染色体のNバンド像の解析

第1の方法では、定量的な染色体地図がなかったオオムギを材料とし、当初ライムギ染色体Cバンド像の写真画像を対象にして組み立てられたCHIASのプログラム (Fukui 1986b) を直接顕微画像を解析できるように改めた (Fukui ら 1987b)。ここでは画像解析法を用いて多くのオオムギ染色体の数値情報を厳密に測定すれば第5(7), 6(6) (当時の染色体番号) 染色体以外は視覚的には同定できないとされていたオオムギ染色体を数値情報のみから同定できるのではというナイーブな期待もあった。

そのため従来の腕比、染色体長という数値パラメータの他に画像解析法を用いてのみ得られる濃度体積という全く新しい数値パラメータを定義し、併せて測定することにした。濃度体積は染色体領域における面積と平均濃度の積であり、細胞周期に応じて変化する染色体の長さには依存しないで染色体の容量を表すことのできるパラメータになると考えたのである (Fukui 1989b)。腕比、染色体長をそれぞれ0次元、1次元のパラメータとすると面積、濃度体積はそれぞれ2次元、3次元のパラメータとも言うべきものである。

実験では染色体番号の誤判定を最小限にするため、半数体を材料に選び、かつ核板ごとの染色むら为了避免のため、上記パラメータの数値情報を得る原画像は位相差像を用いた。重なりのない良好な核板を選んだのは言うまでもない。これらのオオムギ核板像を出来る限り多くデジタル化した上で、保存しておいたオオムギ染色体標本にN分染法を行い、染色体が完全に識別された核板、200を選んだ。これらの核板のそれぞれ7本の染色体について先の4

つのパラメータに関するデータに基づきオオムギ染色体の定量的な核型を完成した (Fukui ら 1987a). 200核板合わせて 1400本の染色体データを短時日に得られたのはまさに画像解析法の賜と言える。

また N バンド像の解析に当たっては染色体像に濃淡の歪みを取り除き、正規化等を行ってコントラストを強調し、必要に応じて擬似カラー化など視覚能を支援する種々の画像処理を行った上でオペレーターがバンド領域を視覚的に判定して、モニター上の画像に直接バンド領域を書き込んだ。こうしてオオムギ染色体の分染像を用いて定量的な染色体地図が初めて作成された (図 2, Fukui・Kakeda 1990). 完成した地図は物差しで写真上の染色体像を手で計って作成された地図と基本的な点で変わらず、経験を積んだ研究者が得るデータは「見る」という手段を用いてもきわめて正確であることが初めて実証された。

ただ中部動原型で、短腕と長腕の長さがほぼ等しい第 7(1, 当時)染色体における短腕・長腕の判定のような極めて高い精度が要求される点では、従来の染色体の短、長腕の配置が実際には逆であることが明らかになった。定量的な染色体地図を当時ようやく作成が始められたばかりであった RFLP を用いた組換え地図と比較した結果、染色体の定量的地図と組換え価に基づく地図の間では大きな差が生じることも明らかになった。この点はライムギ等でも明らかにされ (Gustafson ら 1990), ゲノム解析において定量的な染色体地図の重要性が広く理解されるきっかけとなった。しかし最も期待した濃度体積という新しく定義したパラメータは全体の値に占める面積の効果が大きく、染色体の体積を代表するパラメータとはならなかった。また 4 種の画像パラメータのいくら厳密な測定を行っても、オオムギ各染色体のデータは重なりあい、7本の染色体をこれらの数値データのみから識別することは不可能であることも明らかになった (Fukui・

Kakeda 1994).

オオムギ染色体 N 分染像の解析で用いられた方法は、簡易かつ研究者が経験を積んでいれば正確な地図を作成することが出来るので種々利用が図られ、例えばツクバネソウ染色体の C バンド像が同様の方法を用いて解析されている (Miyamoto ら 1991).

3. クレピス染色体の C バンド像の解析

染色体の分染像の解析では、バンドが必ず出現するものではないことに加えてバンド領域の判定に研究者間での差が出やすいものである。したがって人間の視覚能をシミュレーションし、バンド領域の判定を標準化することを考えた。そのためのモデル実験系として染色体の基本数が 3 であり、かつ大、中、小の大きさの異なる明瞭な C バンドが得られるクレピスを材料とした。

既にそれまでのバンド領域の解析において、単純な画像解析法の適用ではバンド領域の抽出は成功しないことが明らかになっていた (Fukui ら 1988). その理由は虹彩の開き加減で調節されている明暗に対する人間の視覚の調節が、一枚の画像の部分部分にも行なわれていることにある。その具体的な機構については不明であるが、人間の視覚では小さいバンドにはかなり明るい判定基準が、黒く大きなバンドには暗い判定基準が、周囲の濃淡に応じて設定されることを見出した (図 3, Fukui・Kamisugi 1995).

そこでマトリクスサイズを適切に設定したローパスフィルターを用いて人間の目が大小のバンド領域とそれ以外の領域から区別するために用いている、領域ごとに変動する基準濃度をもつ画像を作成することを考えた。大

図2. オオムギ染色体の定量的 N バンド地図 (Fukui・Kakeda 1990). オオムギ染色体の核型は 250 核板より、バンド情報は 10 核板より得た。現在の染色体番号はコムギの同祖群と整合性を図るため左より 7, 2, 3, 4, 1, 6, 5 となっている。

図3. クレピス染色体の画像解析 (Fukui・Kamisugi 1995).

A: クレピス第 2 染色体の C バンド像。矢印は NOR. B: 下側になる染色体中軸線に沿って濃淡の分布を見た。左側に 2 つの中程度のバンド、真ん中に大きなバンド、右肩に小さなバンドが濃度分布曲線により示されている。しかしながら一定の値を持つ a, b, c いずれの濃度値においても 3 種のバンド領域を全てを適切に抽出することが出来ない。C, D, E: a, b, c それぞれの濃度値を用いて抽出したときのバンド領域を示す。いずれも視覚的な判別と一致しない。

きなマトリクスサイズ (75 × 75) でローパスフィルターを処理したところ、大きく濃いバンドがあった領域は全体的に濃くなり、薄いバンド領域はほとんどバックグラウンドと変わらない濃度となる人間の目にはぼけた像が作られるが、この図を元の C バンド像からサブトラクションし、得られた画像について一つの濃淡値を定めるとバンドと非バンド領域をうまく区別することができた。

この様にして得られたバンド領域は視覚的に判断するバンド領域と合致し、人間の視覚能を画像処理によりシミュレートすることにより、オペレータの如何を問わず、一定の基準でバンド領域を抽出することが可能となった。この様にして、クレピス染色体 C バンド像の定量的な染色体地図が完成された (Fukui・Kamisugi 1995)。

4. 凝縮型による染色体の識別・同定と地図の作製

(i) ハマアカザ染色体の解析

小型の植物染色体を有するハマアカザ (*Atriplex*) 属, *A. rosea* L. (2n=18) の染色体の識別・同定においては別の方法を開発した。すなわち前中期染色体における染色体長軸上の濃度分布を画像解析する方法を用いて全ての染色体を識別・同定した (Fukui・Mukai 1988)。

ここでは染色体末端の薄く染まる部分を正確に画像解析するために同一核板について露光条件の異なる 2 種類の写真を組み合わせる新しい方法を開発した。これにより露光オーバーの写真からは末端の薄い部分も含めて、染色体の領域に関する情報を得、露出アンダーの写真からは染色体上での濃淡情報を正確に捉えた。また染色体長軸に沿った濃淡の分布を新しい染色体の画像パラメータとし、凝縮型 (Condensation pattern) と命名した。解析の過程をほぼ自動化するプログラムを開発したことは言うまでもない。

(ii) イネ染色体の解析

イネの染色体解析はこれらの手法、ノウハウ、プログラムの積み重ねの上で行ったものであり、イネ染色体に関する入手可能な全ての文献とりわけ Kurata・Omura (1978) を参考にした。その上でなお多くの予備実験を行い実験条件について改善して取り組んだ。例えば Hu (1964) が報告している前中期染色体のイネ染色体に生じる濃淡のパターンについて、酢酸オルセインおよびギムザ液を用いて前中期から中期にいたるイネ染色体を詳細に観察し、押し潰し法を用いてもいくつかの染色体を区別することが可能であることまた濃淡のパターンが色素の染色性の違いではないことをまず確認した (Fukui 1986a)。

また標本作成法についてはマッケイとクラークが 1946 年に報告しているペクチナーゼ処理および Kurata・Omura (1978) の酵素解離焙乾法を参考にし、酵素組成をその当時最も効果があるとされていた別の酵素に置き換えた上で最適処理条件を検討した。同時に染色体の損傷

を最小限に押さえるため焙乾法を空気乾燥法に改めた酵素解離空気乾燥法を開発した。

前処理法については、1937 年にブラックスリーとアベリーによって開発されて以来標準実験手法として採用されていたが、なるべく自然の状態での前中期染色体を得るため標本作製過程から省いた。

染色体同定の誤りを最小限にするため Hu (1958) と同じく半数体を材料とした。イネの場合、2 倍体への自然復帰率が品種により異なり、日本晴は 2 倍体への復帰率が高く実験材料として維持が困難であったため、コシヒカリの半数体を材料として用いた。

またハマアカザの画像解析とは異なり、記録する写真は通常とアンダーの 2 種類の露出とした。

この様にして決定された実験条件下で重なりのない良好なイネ前中期染色体 30 核板を得た。これらに対して 2 種類の露出での染色体写真を取り、それぞれデジタル画像として取り込み、照明むらの補正、濃度分布の正規化等の画像処理を行った。通常露出の画像からは 30 核板、360 本のイネ染色体の領域情報を、アンダー露出の画像からは各染色体の濃度分布値 (CP) を染色体ごとに 720 個のデータとして得た。イネ各染色体は顕微鏡下での凝縮型から識別・同定し、それが困難なものについては凝縮型を画像解析して得た濃度曲線 (CP) も参考にして確定した。

30 核板分のイネ染色体の CP を染色体ごとに平均して標準 CP (stCP, standard CP) を求め、各染色体での標準濃度分布を得た。定量的な染色体地図は染色体ごとの標準 CP を 2 つの濃度値 (一つは染色体の凝縮、非凝縮の境界、もう一つは凝縮領域内での 3 次狭窄等を区別する濃度値) で区分することにより作成した。図 4 はイネで作成された初めての定量的な染色体地図である (Fukui・Iijima 1991, Fukui 1996c)。前者の引用文献は体細胞分裂前中期染色体の長さの順、後者はパキテン染色体長に基づいて決められた統一番号に合わせたものである。同一染色体でもパキテン染色体と体細胞の染色体の長さが異なるがその原因については未だ不明である。

詳細な観察および画像解析を通じてイネ 12 本の染色体

図 4. イネ染色体凝縮型の画像解析による定量的地図 (Fukui・Iijima 1991)。白い部分が実際非凝縮領域を示す。黒い部分はもっとも凝縮した領域で、3 次狭窄など凝縮領域での構造的特徴を示す。イネ染色体番号は現在のもの。

から抽出した118の形態的特徴のそれぞれについて出現頻度を明らかにし、特徴間の重みづけをすると伴に数量的な比較を可能とした。Iijimaら(1991)では論文の出版時に各形質の出現頻度に関する数値がエディターにより省かれたので、別に記載した(Fukui・Iijima 1992)。これらの形態的特徴の中からほぼ100%出現するクリティカルな形質のみを選んで11の判別子を設け、それを流れ図の中で順序よく位置づけることによりイネ染色体の識別・同定のための別かれ図を作成した。

この別かれ図に基づきそれぞれの判別子についての質問にYes, Noで答えをしていくと最終的には12のイネの染色体全てを識別・同定できるというものである。これにより、イネ染色体の判別をシステムチックに行えるようになった。また同一核板をDNA結合蛍光色素であるエチジウムブロミドとギムザ液で染色し、現われるパターンを解析した。これにより植物染色体上に生じる濃淡の分布は、動物のGバンドの場合とは異なり、クロマチンの不均一な凝縮によるものであることを証明した(Fukui・Iijima 1991)。

(iii) 植物の小型染色体のCP解析

イネの染色体地図の作成過程において前処理をしない場合、観察されるほとんどの染色体はいわゆる前中期の形態を示した。この事実は前中期がM期の中で一番長い、あるいはM期を代表するものであることを物語る。凝縮型はその後小型染色体ではきわめて普遍的に生じる特徴であることが明らかになった。それによりCP解析はイネのみならず他の小型染色体を有する植物染色体の識別・同定、さらには染色体地図の作製へと利用範囲が大きく広がった。例えばCHIASを用いてダイズの染色体のグルーピングが行われた(Yanagisawaら1991)。CHIAS2を用いては、カルパチェンコらが1920年代にそれぞれ20, 18, 16本であることが明らかにしていたナタネ(*B. rapa*)、キャベツ(*B. oleracea*)、クロガラシ(*B. nigra*)染色体について初めての同定さらには染色体地図の作製がなされた(Fukuiら1998)。洋種ナタネ(*B. napus*)についても凝縮型を用いて1998年に完全な識別・同定と定量的な染色体地図が作製された(Kamisugiら1998)。

またサトウキビの野生種(*S. spontaneum*, $2n=8x=64$)については薬培養による半数体を用いたFISH法により4倍体であることを決定したうえで8本の染色体全てを識別・同定し、CHIAS3(Kato・Fukui 1998)を用いて染色体地図を作製した(Haら1999)。図5にサトウキビ染色体の画像解析過程を示す。現在では、アサ(投稿中)、ホウレンソウ(印刷中)、シロイヌナズナ(投稿準備中)の染色体も同様にして識別・同定され、CPに基づく定量的な染色体地図が完成している。

(iv) イネ染色体の自動判別

染色体の凝縮型に関するデジタル情報、CPを用いてイネ染色体の自動識別法の可否を検討した。すなわち、30核板360本のイネ染色体のデジタル情報のみからそれぞ

れのイネ染色体を同定しようとするものである。そのため、各染色体の長さ、腕比等CPを得る際に自動的に得られる従来のパラメータおよび、CP上に現われる極値の数、短腕・長腕における凝縮部位の数、部位、相対的な深さ、大きい順に3つの凝縮部位における濃度値の総計等合計で31個のパラメータを抽出し、最小距離を用いた判別分析法、線形判別法および別かれ図に基づく方法の3つを比較検討した。その結果、最も高い識別一致率を示した最小距離法では92.2%のイネ染色体において、人間の目による識別とCPによる識別が一致した(Kamisugiら1993)。この事実は染色体の識別・同定上CPがきわめて信頼性の高い情報であることを示している。同時に、CPで代表される1次元の濃度情報に染色体識別・同定に必要なほとんど全ての情報が含まれていることを示している。

これら凝縮型を巡る多くの植物染色体解析の結果、植物染色体はユリ、ムギ類等の大型の染色体とイネ、アブラナ属等小型の染色体に大別されることが明らかとなり、これらの間では凝縮パターン、分染特性、DNA含量等の間で大きな違いがある。こうした結果に基づき、大型の植物染色体はL型、小型のものはS型と呼んでグループ化し、区別して研究を進める必要のあることが明らかになった(Fukui 1996d)。

おわりに

現在、可視化された遺伝情報とも言うべき染色体の研究に画像解析法は不可欠となっている(Fukui 1996a)。例えば染色体研究の1分野として大きな発展を遂げている*in situ*ハイブリダイゼーション(ISH)法においては、シグナルの位置を正確に染色体上にマッピングするために広く用いられている(Kamisugiら1994, Ohmidoら1998)。また蛍光ISH(FISH)法においてはシグナルの位置の定量化のみならず、フォトンカウンティングカメラを用いてシグナル強度から遺伝子コピー数の算定も行なわれるようになった(Shishidoら1999)。GISH法において蛍光の強さ、すなわちゲノム間の類縁度を可視化するためにも用いられている(Fukuiら1998)。3次元画像解析法により核内における動原体やテロメアの局在性、またヒストンのアセチル化の動態などが調べられている(Wakoら1998)。このように1次元から3次元まで幅広い画像情報をDNAから染色体、さらには核に至るまで自由に取扱う画像解析法は染色体やゲノムの解析のみならず生物科学全体における効果的な手法として定着したと言える(Fukui・Nakayama 1998)。またインターネットを通じて画像データのやりとり、画像データベースの構築など、画像解析法が関係する諸分野が急速に開けてきた(福井・廣瀬1997)。われわれも共同して、染色体の画像データベース(CAJ, Chromosome Atlas of Japan, 廣瀬・加藤1998)を現在構築中である。CHIASは標準的な画像解析にも対応するため、育種上の種々の画像解析にも利用できる(福

岡・福井 1990, 福井 1996b). ここではそれぞれの手法についての詳細を述べることは出来なかったが, そのかわり文献を詳細に引用した. この小文が今後この分野を目指す方々にとって何らかの参考になれば幸いである.

謝 辞

CHIASを構築するプロジェクトを最初にお認め頂いた金田忠吉博士, 本研究の意義を認め, 種々お力添えと励ましを頂いた故日野稔彦博士, 原田久也博士, 濱村邦夫博士, 農業生物資源研究所, 北陸農業試験場においてCHIASによる染色体解析に協力して下さった同僚, 研究室の皆様, 当時は院生, 学生であった皆様, さらにCHIAS構築に全面的に御協力いただいた古賀トミオ, 川口順三を初めとする多くの方々に心より感謝申し上げます.

引用文献

- Caspersson, T., G. Lomakka and A. Moller (1971) *Hereditas* 67: 103–110.
- Endo, T. R. (1986) *Jpn. J. Genet.* 61: 89–93.
- Finnon, P., D. C. Lloyd and A. A. Edward (1985) *Mutation Res.* 164: 101–108.
- 福井希一 (1980) “作物育種試験のための実験手法” 農林技術会議事務局編, 東京. 105–113.
- (1983) “遺伝子組換え実用化技術第4巻” サイエンスフォーラム, 東京. 280–290.
- (1985) *細胞* 17: 145–149.
- (1986a) *Kromosomo* II–43–44: 1398–1404.
- (1986b) *Theor. Appl. Genet.* 72: 27–32.
- (1987) *映像情報* 19: 27–31.
- (1989a) *組織培養* 15: 62–65.
- (1989b) *In: Plant Chromosome Research 1987*, Hong Deyuan (ed.), Academia Sinica, Beijing, 195–200.
- (1990) “育種学最近の進歩 第31集”, (日本育種学会編), 養賢堂, 東京. 125–134.
- (1996a) *In: Kew Chromosome Conference* •, P.E. Brandham and M.D. Bennett (eds.), Royal Botanic Gardens, Kew, 201–213.
- (1996b) “イネ育種マニュアル”, (山本隆一・堀末 登・池田良一編), 養賢堂, 東京, 分担執筆 226–243.
- (1996c) *In: Rice Genetics*, G. S. Khush (ed.), International Rice Research Institute, Manila, Philippines, 117–130.
- (1996d) *In: Plant Chromosomes: Laboratory Methods*, K. Fukui and S. Nakayama (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 1–18.
- (1998) *Chromosome Sci.* 1: 131–136.
- ・廣瀬玉紀 (1997) *蛋白質 核酸 酵素* 42: 881–887.
- and K. Iijima (1991) *Theor. Appl. Genet.* 81: 589–596.
- and —— (1992) *Misc. Publ. Natl. Inst. Agrobiol. Resour.* 4: 1–25.
- and K. Kakeda (1990) *Genome* 33: 450–458.
- and —— (1994) Critical assessment of karyotype analysis by imaging methods. *Jpn. J. Genet.* 69: 537–544.
- and Y. Kamisugi (1991) *In: Computer Aided Innovation of New Materials*. M. Doyama T. Suzuki, J. Kihara, R. Yamamoto (eds.), Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 101–104.
- ・—— (1991~92) *セルサイエンス* 7: 590–593, 684–688, 776–779, 846–850, 927–931, 997–1000; 8: 70–75, 233–237, 312–315, 398–403.
- , —— (1995) *Chromosome Res.* 3: 79–86.
- and Y. Mukai (1988) *Jpn. J. Genet.* 63: 359–366.
- and S. Nakayama (1996) *In: Plant Chromosomes: Laboratory Methods*. K. Fukui and S. Nakayama (eds.), CRC Press, Boca Raton, FL, 247–261.
- , —— (1998) *In Genetics and Biotechnology in Crop Improvement*, P.K. Gupta (ed.), Rastogi Publications, Meerut, 38–51.
- ・新関宏夫 (1983) *農技研報 D* 34: 113–185.
- and N. Ohmido (1999) *In “Genomes”* J. P. Gustafson (ed.), Plenum Press, New York (in press).
- , K. Kakeda and T. Matsuno (1987a) *Barley Genet.* 5: 415–422.
- , T. Matsuno and K. Kakeda (1987b) *Barley Genet.* 5: 403–408.
- , N. Ohmido and T. Wako (1999) *In “Chromosome Today vol.12”* E. Olmo and R. Pavia (eds.), Birkhauser Verlag AG, Basel (in press).
- , R. Shishido and T. Kinoshita (1997) *Theor. Appl. Genet.* 95: 1239–1245.
- , H. Tsujimoto and K. Noda (1988) *Proc. 7th Intl. Wheat Genet. Symp.* 1: 275–280.
- , K. Fukui, K. Kakeda and K. Ito (1989) *In: Plant Chromosome Research 1987*, Hong Deyuan (ed.), Academia Sinica, Beijing, 207–212.
- , S. Nakayama, N. Ohmido, H. Yoshiaki and M. Yamabe (1998) *Theor. Appl. Genet.* 96: 325–330.
- 福岡忠彦・福井希一 (1990) *育種学雑誌* 40: 223–232.
- Gustafson, J.P., E. Butler and C.L. McIntyre (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87: 1899–1902.
- Ha, S., P.M. Moore, D. Heinz, S. Kato, N. Ohmido and K. Fukui (1999) *Plant Mol. Biol.* 39: 1165–1173.
- 廣瀬玉紀・加藤成二 (1998) “クロモソーム”(福井希一・芦川育夫編)ユニバーサルアカデミープレス社, 東京. 75–86.
- Hu, C.H. (1958) *Jpn. J. Genet.* 33: 296–301.
- (1964) *In: Rice Genetics and Cytogenetics*, Elsevier

- Publishing Co., Amsterdam, 51–61.
- 飯島加奈子・福井希一 (1991) イネ染色体—客観的識別・同定法の確立と細胞学的地図の作成—植物細胞工学 3: 6–12.
- ・—— (1992) 遺伝情報の画像解析—イネ染色体の識別・同定・映像情報 24: 47–54.
- , K. Kakeda and K. Fukui (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 597–605.
- Ito, M., N. Ohmido, Y. Akiyama, K. Fukui and T. Koba (1999) Characterization of spinach (*Spinacia oleracea* L.) chromosomes by condensation patterns and physical mapping of 5S and 45S rDNAs by FISH. J. Am. Soc. Hort. Sci. (in press)
- Kakeda, K., H. Yamagata, K. Fukui, M. Ohno, K. Fukui, Z.Z. Wei and F.S. Zhu (1990) Theor. Appl. Genet. 80: 265–272.
- Kamisugi, Y. and K. Fukui (1990) BioTechniq. 8: 290–295.
- , N. Furuya, K. Iijima and K. Fukui (1993) Chromosome Res. 1: 189–196.
- , S. Nakayama, R. Nakajima, H. Ohtsubo, E. Ohtsubo and K. Fukui (1994) Mol. Gen. Genet. 245: 133–138.
- , S. Nakayama, C. M. O'Neill, R. J. Mathias, M. Trick and K. Fukui (1998) Plant Mol. Biol. 38: 1081–1087.
- Kato, S. and K. Fukui (1998) Chromosome Res. 6: 473–479.
- , T. Hirose, Y. Akiyama, C.M. O'Neill and K. Fukui (1997) Res. Rep. Develop. Agr. Hokuriku Area 36: 1–76. (和文・英文)
- Kurata, N. and T. Omura (1978) Jpn. J. Genet. 53: 251–255.
- Lundsteen, C., B. Bjerregaard, E. Granum, J. Philip and K. Philip (1980) Clin. Genet. 17: 183–190.
- Miyamoto, J., S. Kurita and K. Fukui (1991) Jpn. J. Genet. 66: 335–345.
- Ohmido, N., Y. Akiyama and K. Fukui (1998) Plant Mol. Biol. 38: 1043–1052.
- Shishido, R., Y. Sano, T. Kataoka, S. Nakayama and K. Fukui (1999) Bioimages 7: 13–18.
- Taylor, C. J. and J. Graham (1980) Anal. Quant. Cytol. 2: 237–242.
- Yanagisawa, T., S. Tano, K. Fukui and K. Harada (1991) Theor. Appl. Genet. 81: 606–612.
- Wako, T., M. Fukuda, R. Furushima-Shimogawara, N.D. Belyaev, B.M. Turner and K. Fukui (1998) Anal. Chim. Acta 365: 9–17.
- 渡部 真 (1978) “新しい細胞遺伝学”(田中信徳編), 朝倉書店, 東京. 5–39.

図 5. 説明は次頁へ (157~164 頁 福井原図)

図 1~6. 説明は次頁へ (165~172 頁 向井原図)

図 5. CHIAS3 を用いたサトウキビ野生種染色体における凝縮型の画像解析 (Kato and Fukui 1998). a: 原画像, b: 染色体領域の決定, c: 染色体領域の確定と背景の消去, d: 擬似カラー化による凝縮型の明示, e: 8 種類, 各 4 本の相同染色体を染色体ギャラリー中のそれぞれのサブパネルに集めて比較, f: 拡大した染色体を動原体部分で切断した後, 染色分体に沿って濃度プロファイル (CP) を求める. CHIAS と CHIAS3 での濃度の割り当ては逆であり, CHIAS3 ではたて軸の上に行くほど暗い.

- 図 1. 多色 FISH 法によるパンコムギ ($2n=6x=42$, ゲノム=AABBDD) の 5S rRNA 遺伝子および 18S-5.8S-26S rRNA 遺伝子の同時マッピング. 5S rRNA 遺伝子と 18S-5.8S-26S rRNA 遺伝子はそれぞれ赤色と緑色の蛍光で検出されている.
- 図 2. 多色 FISH 法を用いたパンコムギの転座染色体 (右) と 1 B 染色体 (左) における DNA プローブ 6 種の同時マッピング. この転座染色体はコムギの 6 B 染色体の短腕全部および長腕の一部とライムギの 6 R 染色体の長腕の大部分をもっている. シグナルの順序は, 6 B 染色体短腕の末端 (上) から 6 RL 染色体の末端 (下) に向かって以下になった. 6 BS テロメア (t) — pAs 1(c) — 18S-5.8S-26S rRNA 遺伝子 (e) — pAs 1(c) — 動原体 (矢印) — 転座点 (f) (ここから 6 RL の末端まで pSc 119.1 によってライムギ由来の 6 RL のクロマチン部分が全体に薄い赤 (d) で標識されている) — pSc 119.2(a) — pSc 119.2(a) — pSc 74(b) — pSc 74(b) — pSc 119.2(a) — 6 RL テロメア (t). 1 B 染色体のシグナルの順序は, 1 BS テロメア (t) — pAs 1(c) — 18S-5.8S-26S rRNA 遺伝子 (e) — 動原体 (矢印) — pSc 119.2(a) — pSc 119.2(a) — 1 BL テロメア (t).
- 図 3. ライムギの 5S rRNA 遺伝子のスペーサー部分の染色体特異的配列の *in situ* PCR 法による検出. 1 R および 3 R 染色体の短腕末端付近に増幅されたシグナル (緑色) が観察されるが, 5 R 染色体は観察されない. 染色体末端の赤色部分はヘテロクロマチンである.
- 図 4. FISH 法によるライムギの ω セカリン遺伝子 (*Sec-1*) のマッピング, ライムギの 1 R 染色体短腕の付随体のほぼ中央部にシグナル (矢印) が観察される.
- 図 5. GISH 法によるピーナッツ (*Arachis hypogaea*, $2n=4x=40$, ゲノム=AABB) における B ゲノム染色体の検出. B ゲノム提供種である *A. ipaensis* の全ゲノム DNA をビオチンで標識したものに *A. villosa* の DNA をブロック DNA として加え, ピーナッツの中期染色体に GISH を行った. *A. ipaensis* 由来の染色体は緑色に彩色されている.
- 図 6. ヘッセバエ抵抗性パンコムギ系統における抵抗性遺伝子を含むライムギクロマチン (矢印) の検出. ライムギクロマチン (緑色) はコムギの 4 A 染色体の動原体付近に存在する. 青色と赤色のシグナルはそれぞれ 18S-5.8S-26S rRNA 遺伝子と テロメアである.