



Studies on the development of image analysis for plant research

Kato, Seiji

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2014-07-18

(Date of Publication)

2015-07-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3257号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D2003257>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



論文内容の要旨

氏 名 加藤 成二

専 攻 人間環境学専攻

推薦教授氏名 近江戸 伸子

論文題目

Studies on the development of image analysis for plant research

植物における画像解析法の開発に関する研究

論文要旨

第1章 緒言

人間は外部情報の約8割を視覚から得ていると言われており、視覚情報は極めて重要である。長さや重さなどの情報と比較して画像データが持つ視覚情報量は膨大であるため、重要でありながら視覚情報の解析や評価は容易ではなかった。視覚情報の肉眼での評価には熟練した技術が必要とされる場合も多いが、コンピュータとデジタル撮影装置、それぞれの発達により、視覚情報を定量的かつ客観的に処理する事が可能となり、視覚情報を解析する画像解析は、現在では、基礎的な部門では、人工衛星を利用したリモートセンシングによる植物の分布の研究から染色体の構造研究まで、また実業での応用部門でも米粒の被害検出など、広範囲に利用されるようになってきた。

ところで、染色体は、遺伝子の本体であるDNAを含有する構造体である。染色体上の遺伝子の位置は遺伝子の発現や遺伝に深くかかわり合っていることから、詳細な染色体地図の作製は、遺伝病の予防や治療、優れた農作物の品種育成などの面から極めて意義が大きい。この染色体地図の作成にも、これまで画像解析法が適用されてきたが、1997年に開発された、第2世代の植物染色体画像解析システム CHIAS II(Chromosome Image Analyzing System Version 2)においては、高価な専用の画像処理装置が必要であり、限られた研究者しか利用できず、このことが染色体地図のみならず染色体研究の隘路になっていた。さらに、植物の草姿に関する品種においてもその客観的評価に画像解析は有用であり、1990年代にダイズの草姿の評価の試みがされてきたが、染色体地図作成と同様、専用の画像処理ユニットが必要なため普及が望めなかった。

以上のような植物研究面における画像解析法の現状に鑑み、本研究では、第1に、高額な専用の画像処理ユニットを用いず、パーソナルコンピュータのみで植物の画像解析が可能なプログラムを開発することを目的に研究に取り組んだ。同時に、高精度カメラではなく汎用デジタルカメラによる画像も対象に、低コストで、汎用性のある画像解析システムを開発した。第2に、開発

したプログラムを用いて、イネ科ならびにマメ科植物を対象に染色体地図の作製を行った。第3に、植物形態の画像解析による鉢花の品質評価を行った。

論文は次の構成からなる。第1章は緒言、第2章はパーソナルコンピュータのみで動作する CHIAS III の開発、第3章は開発した CHIAS III および FISH 法を用いたイネ科同質倍数性作物であるサトウキビの全染色体の染色体地図の作製、第4章は減数分裂のパキテン期染色体に出現するクロモミアと呼ばれている染色体構造を正確に捉える技術の開発とそれを用いたイネ第9染色体の高精度染色体地図の作製、第5章は染色体地図を効率的に作製できるように CHIAS III を改良した染色体画像解析システム CHIAS IV の開発とそれを用いたアカクロバの染色体地図の作製について論じた。第6章は立体物である鉢花の画像解析を行った。山梨県の特産品であるクリスマスエリカの品質評価に対して画像解析技術の導入を図った。第7章は総合討論である。

第2章 植物染色体画像解析システム CHIAS III の開発

CHIAS (植物染色体画像解析システム)は、専用の画像処理装置を必要としたため、限られた研究施設でしか利用できなかった。第2世代のシステム(CHIAS II, CHIAS mini)も開発されたが、専用の画像処理装置を必要とする点は、従来システムと同様であった。そこで、パーソナルコンピュータによる小型の染色体の識別・同定のための植物染色体画像解析システムの開発を行った。前中期染色体に特異的に現れる染色体の凝縮型(CP)を測定することにより、定量的染色体地図を作成する方法を開発した。

第3章 画像解析法によるサトウキビ染色体の定量的染色体地図の作製

開発した CHIAS III を使い、画像解析法と FISH 法を使い、同質倍数体であるサトウキビ野生種の葯培養由来半数性個体の染色体の解析を行った。体細胞分裂前中期染色体の凝縮型を測定する事により、サトウキビで初めての定量的染色体地図とイデオグラムを得た。45Sおよび5SリボソームRNA遺伝子をプローブに用いたマルチカラーFISHの結果、それぞれを染色体地図上の3p3.1と6q1.3に位置付ける事ができ、サトウキビ半数性個体は8本の染色体基本数から構成される4倍体であることが明らかとなった。

第4章 画像解析法によるイネパキテン期第9染色体の高解像度定量的染色体地図の作製

減数分裂パキテン期の染色体は、凝縮が進んでいないため高解像度の染色体地図の作製に適している。また、クロモミアと呼ばれるクロマチンの構造体がこのステージでは特異的に観察される。イネ第9染色体は、DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole)およびPI(propidium iodide)による二重染色でGC含量の高い領域が観察され、他のパキテン期染色体からきわだった特徴を有する。そこで本染色体を対象に、植物染色体画像解析装置 CHIAS III を用いたクロモミアの解析および定量的染色体地図の作成法を開発した。その結果、サテライト領域を含む22のクロモミアから構成されるパキテン期染色体地図を得ることができた。PIとDAPIの二重染色法とFISHを組み合わせることにより、GCリッチな領域が仁形成領域(NOR)であることも確認した。さらに体細胞分裂前中期における定量的染色体地図および分子マーカーを用いた連鎖地図との比較を行った。前者では腕比に相違が確認され、後者では染色体の短腕部において顕著な差が見られた。パキテン期高精度定量的染色体地図が他の染色体地図では有しえない固有の特徴を持っていることが明らかとなった。

第5章 自動染色体画像解析システム CHIAS IV の開発

効率的な染色体の識別・同定と定量的な染色体地図の作製を目的として、新しい植物染色体画像解析システム CHIAS IV を開発した。このシステムは米国国立衛生研究所(NIH)が開発した

Java 言語によるパブリックドメインの画像処理ソフトウェア ImageJ を用いて、パーソナルコンピュータ上の Windows および Mac OS X で作動する。マメ科植物であるレッドクローバー (*Trifolium pratense* L.) の体細胞前中期染色体を用い、CHIAS IV の有効性を検証した。CHIAS IV を用いた画像解析法と FISH を組み合わせることによりレッドクローバーの定量的な染色体地図を作製した。CHIAS IV では、染色体の自動ソート機能を始めとした解析手順の自動化を取り入れた。その結果、CHIAS IV 使用時の核板解析に要する時間は、CHIAS III 使用時の 3分の1程度まで大幅に短縮できた。

第6章 画像解析を用いたクリスマスエリカの品質評価

山梨県総合農業技術センターで開発したクリスマスエリカは南アフリカを原産地とするツツジ科エリカ属の低花木スズランエリカ (*Erica formosa*) をクリスマスツリー仕立てにした鉢花である。このクリスマスエリカは高価格で流通しているが、長期的に価格を維持するためには品質の維持が重要となるため、客観的な品質評価基準が求められていた。そこで、クリスマスエリカの品質評価のため、画像解析を用いた花の面積による客観的な指標を作成した。汎用デジタルカメラとパブリックドメインソフトウェアである ImageJ を用い、RGB カラー画像を各色由来の 8bit グレイスケール画像に分解した後、濃度値より樹形輪郭の投影面積および開花している花の面積を測定することにより、指標値となる開花指数を算出した。画像解析で測定した開花指数とモニタによる肉眼での評価を比較した結果、高い相関を示した。これらの結果から、画像解析による値の客観化が実用性のあることが明らかになった。

第7章 総合討議

本研究では、まず第1に、マクロレベルならびにミクロレベルでの汎用性のある画像解析システム CHIAS III の開発に着手した。本画像解析システムの利点は、専用入力装置や画像処理プロセッサを用いることなく、汎用入力装置とパーソナルコンピュータを組み合わせることにある。これにより多くの研究者が画像解析を利用可能になった。第2にイネ科ならびにマメ科植物を用いて画像解析技術による数値化の有効性を検証した。植物の染色体研究を効率的に行う際に、染色体画像解析と FISH 法を組み合わせることが重要あり、それらの方法を確立し、証明したことが本論文の意義である。植物染色体研究に、画像解析法を用いる有用性としては、染色体の回転、並べ替え、疑似カラー化などによる肉眼観察への支援、染色体上の濃淡値を数値化した染色体地図の作成、染色体上への遺伝子の正確なマッピング等がある。本研究で開発した画像解析プログラム CHIAS IV を用いることにより、ゲノムの全体像の解明につながる染色体構造 (ヘテロクロマチン、ユークロマチン、セントロメアおよび NOR 等) の正確な位置情報を有する定量的染色体地図の作製が可能となった。DNA 塩基配列情報、連鎖地図そして、細胞学的定量的染色体地図の遺伝情報の統合は、遺伝学的な情報として有用である。本研究で開発された CHIAS IV は、インターネット上で公開されており、現在までに世界 12 カ国からの利用要請があり、ホウレンソウなどの園芸植物で、CHIAS IV を用いた細胞学的染色体地図が作成されている。

第3に、クリスマスエリカの開花程度の評価は、植物体にも画像解析法が有効である事を示した。1株当たり数千の花を咲かすクリスマスエリカの場合、花数を測定する事は実用的ではないが、画像解析により白い花の占有する面積を定量化することにより可能となった。現在、山梨県では実際の出荷規格にこの数値を利用していている。第5章で示した処理の自動化を植物形態に適用することにより、植物の果実や葉をデジタル表示する事も可能であり、収量の正確な予測にも貢献すると考えられる。

本研究が示した結果は、画像解析法の植物の定量や評価に対する可能性を証明した。植物研究には、画像処理が多用されており、不可欠なツールとなっている。更にその手法は、顕微鏡や目視といった、ミクロ、マクロな画像化が可能なあらゆる植物研究の分野へ広がっていくことが予想される。今後、この分野の研究の発展が期待される。

論文審査の結果の要旨

氏 名	加藤 成 二		
論文題目	Studies on the development of image analysis for plant research 植物における画像解析法の開発に関する研究		
判 定	合 格 ・ 不 合 格		
審 査 委 員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	近江戸 伸子
	副 査	教授	市橋 秀樹
	副 査	教授	矢野 澄雄
	副 査	教授	木庭卓人
	副 査	教授	福井希一
要 旨			
<p>植物研究における画像解析は、細胞の構造解明から人工衛星を利用したリモートセンシングによる植物の分布の研究まで広範囲に利用されているが、高価な専用の画像処理装置が必要であり、限られた研究者しか利用できなかった。本研究は、まず、安価なパーソナルコンピュータ (PC) を使用して汎用デジタルカメラで撮影した画像を対象に解析可能なシステムを開発した。次に、開発した画像解析法の有用性、汎用性を、各種植物の染色体ならびに鉢物の外部形態の画像解析に応用して、詳細な染色体地図の作製ならびに鉢物の品質評価が可能であることを明らかにし、実証したものである。</p> <p>論文は7章からなる。第1章緒言では、本研究の意義ならびに先行研究について述べた。第2章「植物染色体画像解析システムCHIAS IIIの開発」では、PCによる小型の染色体の識別同定のための植物染色体画像解析システム (CHIAS III) を開発し、前中期染色体に特異的に現れる染色体の凝縮型画像を基に、定量的染色体地図作製が可能であることを示した。第3章「画像解析法によるサトウキビ染色体の定量的染色体地図の作製」では、CHIAS IIIとFISH法を用い、体細胞分裂前中期染色体の凝縮型画像を対象にして、サトウキビの定量的染色体地図の作製が可能であることを世界で初めて実証した。第4章「画像解析法によるイネ</p>			

パキテン期第9染色体の高解像度定量的染色体地図の作製」では、イネ減数分裂のパキテン期染色体に出現するクロモミアを正確に捉える新たな技術を開発し、CHIAS IIIに改良を加え、高精度な染色体地図を作製できることを示した。第5章「自動染色体画像解析システムCHIAS IVの開発」では、CHIAS IIIをさらに改良して、染色体の並べ替えや回転等の複雑な処理を自動化したCHIAS IVを開発し、これを用いて、アカクロウバの染色体地図を短時間で作製できることを示した。第6章「画像解析を用いたクリスマスエリカの品質評価」では山梨県の特産品である鉢花 (クリスマスエリカ) の開花について画像解析を行い、鉢花の品質評価が可能であることを明らかにした。第7章総合討論では、本研究で開発した画像解析の学術的な意義と今後の研究の方向について総合的に考察した。

本研究の新規性ならびに評価できる点としては、第1に、開発したCHIASは、専用入力装置や画像処理プロセッサを用いることなく、汎用入力装置とPCを組み合わせることで画像解析が可能で優れたシステムであることである。本研究で開発されたシステムは、一部特許取得している。インターネット上で公開しており、現在までに世界12カ国からの利用要請があり、園芸植物で染色体地図が作製されている。第2に、画像解析により鉢花の開花の評価が可能であることを示したことにある。このことは果樹・果菜の果実や観葉植物や草花の葉の画像評価の可能性を示唆するものであり、その評価のデジタル化により、収量や品質の正確な予測にも貢献すると考えられる。さらに、植物画像情報の定量化を可能にする本システムの開発とそのインターネット上での公開により、近い将来、植物研究における画像解析法の適用分野が拡大することが予測され、基礎的研究のみならず実用面での発展が大いに期待される。

本研究で得られた成果は、査読付き国際学術雑誌に原著論文として6報 (筆頭著者3本) 発表している。

- 1) Kato S., and Fukui K. (1998): Condensation pattern analysis using a newly developed chromosome image analyzing system (CHIAS III). *Chromosome Res.* 6:473-479.
- 2) Ha S., Moore P. H., Heinz D., Kato S*, Ohmido N., and Fukui K. (1999): Quantitative chromosome map of the polyploid *Saccharum spontaneum* by multicolor fluorescence in situ hybridization and imaging methods. *Plant Mol. Biol.* 39:1165-1173. *equally contributed
- 3) Kato S., Ohmido N., and Fukui K. (2003): Development of a quantitative pachytene chromosome map in *Oryza sativa* by imaging methods. *Genes Genet. Syst.* 78: 155-161
- 4) Kato S., Ohmido N., and Fukui K. (2009): Image analysis of plant small chromosomes by an improved chromosome image analyzing system, CHIAS IV. *Chromosome Science* 12: 43-50.
- 5) Ohmido N., Ishimaru A., Kato S., Sato S., Tabata S., Hayashi M., and Fukui K. (2010): Integration of cytogenetic and genetic linkage maps of *Lotus japonicus*, a model plant for the legume. *Chromosome Research* 18: 287-299.
- 6) Kataoka R., Hara M., Kato S., Isobe S., Sato S., Tabata S., Ohmido N. (2012): Integration of Linkage and Chromosome Maps of Red Clover (*Trifolium pratense* L.) *Cytogenet Genome Res* 137: 60-60.

以上の審査結果から、本論文の審査委員会は学位申請者、加藤成二氏が博士 (学術) の学位を授与される資格を有するものと判断する。