

細胞周期解析の実際 PI (Propidium Iodide) 染色測定での注意点

蔵本技術部門

北村 光夫 (KITAMURA Mitsuo)

Keywords : Flow cytometry, 細胞周期, PI, DNA

1. はじめに

徳島大学大学院医歯薬学研究部総合研究支援センター先端医療研究部門医学系分室では、フローサイトメーターを用いた各種細胞解析支援を行っている。今回、PI(Propidium Iodide)染色を行った細胞の細胞周期解析方法と注意点をまとめたので報告する。

2. 細胞周期の解析原理

細胞分裂時には DNA の複製が行われ、親細胞から同量の DNA が娘細胞に引き継がれる。この過程は時期により、G1(Gap1), S(Synthesis), G2(Gap2), M(Mitosis)期と呼ばれ、S 期には細胞分裂前の DNA 合成、複製が行われ、M 期には分裂が行われる。このような DNA の合成、複製、分裂時の DNA を蛍光物質で染色し、その蛍光強度を用いて DNA 量を計測する。一般的に光路長、濃度が小さい場合は、DNA 量と蛍光強度は比例関係になるとされる。^[1]

今回の測定方法以外に蛍光色素を DAPI(4',6-diamidino-2-phenylindole) や 7AAD(7-Amino-Actinomycin D)を用いる方法ならびに BrdU(Bromodeoxyuridine)を用いた S 期に主眼をおいた解析、各周期を色分けできる Fucci (Fluorescent Ubiquitination-based Cell Cycle Indicator)を用いた方法などがある。フローサイトメーターに搭載されているレーザーの種類 (選択した蛍光が励起できるレーザー波長なのか) や着目する細胞周期の時期により適宜、選択される。PI は 488 nm レーザーで励起することができ、617 nm の最大蛍光波長が検出できる。

3. 使用した機器および細胞

フローサイトメーター

Becton Dickinson FACSVerse^[2]
(488nm,638nm レーザー搭載)

測定解析ソフトウェア

- Becton Dickinson BD FACSuite^[2]
- Beckmancoulter Kaluza^[3]

細胞

Y-1 マウス副腎皮質細胞

4. 細胞固定および染色プロトコル

以下はエタノールで細胞固定し、その後 PI で核染色を行う一般的なプロトコルであり、細胞の種類、状態によって適宜、濃度、時間、温度の調整を行う。

- ①細胞を $1\sim 10\times 10^6$ 個/ml 程度に調整して、15 ml 遠心チューブに分注する。
- ②PBS(-)(phosphate buffered saline, magnesium free, potassium free)を加え、よく混和して遠心(300G 5 min 程度)後、上清を除去。
- ③ ②の行程を繰り返す。
- ④細胞ペレットをタッピングでほぐし、冷 70% Ethanol 10 ml をボルテックスしながら徐々に添加する。
- ⑤4°Cで 2 時間以上固定する。
- ⑥遠心(300G 5 min 程度)して、70% Ethanol を除去する。
- ⑦細胞ペレットをタッピングして、PBS(-) 10 ml を加え、ピペッティングを行い、遠心(300 G 5 min 程度)して、上清を除去する。
- ⑧ ⑦の工程を繰り返す。
- ⑨RNase A(Ribonuclease A)溶液 0.25mg/ml を 1×10^6 個程度の細胞に対し、1 ml 加え、37°C で 20 min 静置する。
- ⑩PI 溶液を最終濃度 50 μ g/ml になるように添加し、4°Cで 30 min 暗所に静置する。
- ⑪40 μ m ナイロンメッシュにて濾過し、フローサイトメーターにて解析した。

5. 測定結果

図 1 (a)はフローサイトメトリーの基本プ

ロットの FSC(Forward Scatter)-SSC(Side Scatter)プロットである。横軸の FSC は細胞の大きさ、縦軸の SSC は細胞内の複雑さ(細胞内小器官などの状態)をそれぞれ反映している。図 1 (b)は PI ヒストグラムを表し、横軸に PI 蛍光強度、縦軸は頻度を表している。なお蛍光強度は測定機器の検出器感度設定に依存する相対的な値である。この PI ヒストグラムは、ダブルット除去のゲーティングをかけていないプロットである。G1 期ピーク(一番高いピーク)より蛍光強度の低い信号領域の部分は sub-G1 期と呼ばれ、アポトーシスの指標になるともいわれている^[4]。図 1 (b)は細胞の断片や細胞が複数個くっついた状態のものも含まれたプロットになっている。この状態では正確な細胞周期の解析はできない。

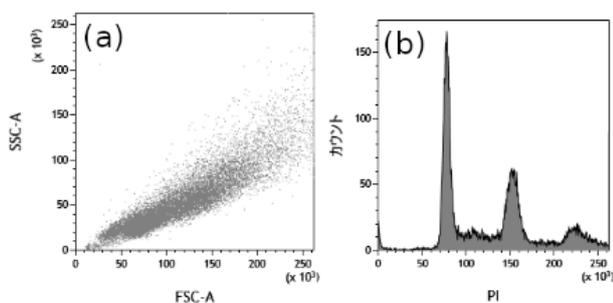


図 1 FSC-SSC 基本プロット(a)および PI ヒストグラム(b)。

そこで細胞 1 個ずつの集団として考えられる領域にゲートかける図 2 (a)。ゲートを通じたものだけのヒストグラムが図 2 (b)である。ゲートは横軸を細胞の面積、縦軸に細胞の高さを反映した 2 次元プロットを用いて、面積と高さが比例関係である領域 A をゲート設定している。

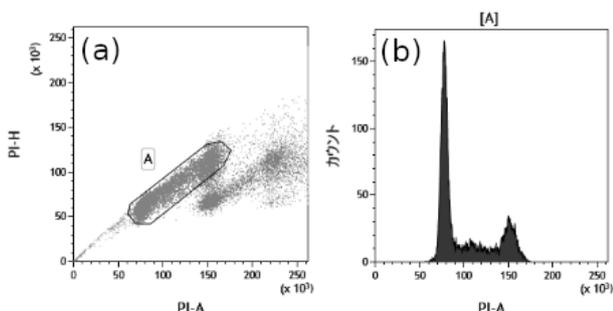


図 2 ゲート A(a)とゲート A を介した PI ヒストグラム(b)

それ以外の領域は細胞の断片やダブルットなどが考えられる。

今回測定した Y-1 マウス副腎皮質細胞は、継代培養時の細胞を用いた。セルサイクル解析ソフト^[3]により、G1 期 58.5%、S 期 18.9%、G2/M 期 22.6%であることがわかった。

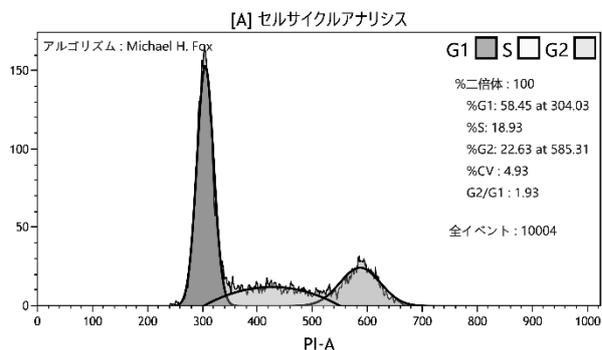


図 3 セルサイクル解析

6. 測定時の注意点

(1) RNase 処理

蛍光色素 PI は DNA, RNA を区別することなく塩基配列にインターカレートされる。従って細胞周期解析とは関係のない RNA 由来の蛍光も検出されることとなり、それを合算して解析すると正しい細胞周期データとはならない。そのため必ず RNase 処理を行い、RNA を分解しておく。実際に検証した Y-1 細胞のデータで見ると、図 4 (a)は RNase 処理済み、図 4 (b)は RNase 未処理の細胞のヒストグラムである。両者を比較すると図 4 (b)は、全体的にブロードなヒストグラムとなり、細胞周期の各時期の判別が難しい。また細胞数カウント値も不明瞭な値となっている。

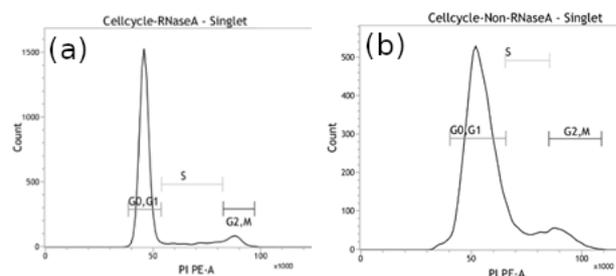


図 4 RNase 処理済み(a)と未処理(b)

(2) サンプル流速

フローサイトメーターでの測定時、サンプル溶液の流速は、最も遅い速度とすること。これは細胞 1 個にレーザーがあたる時間を均一化することにより、蛍光強度の検出条件を安定させ、ヒストグラムがブロードに広がることを防ぐためである。

(3) ダブレットの除去

フローサイトメーターの測定条件設定で、蛍光データ取得チャンネル設定の A(Area), W(Width), H(Hight)のデータ取得を設定し、細胞面積、細胞径のデータを取得できるようにしておく。また測定前にサンプルのピペッティングを行い、さらにナイロンメッシュでろ過する。図 2 (a)で示したように細胞集団にゲートを掛ける事によってダブレットの除去をおこなう。ダブレットの除去を行わないと G2/M 期の値が信用できないものとなる。^[5]

図 5 は図 3 と同じ試料を用いて解析を行っているが、ダブレット除去を考慮しないで解析を行うと、先に述べた理由から G2/ M 期の値が 1.6 倍多い解析結果となった。このように解析の原理、方法がわからないまま解析を進めると、誤った解析結果を報告しかねない（今回使用した解析ソフトウェアではダブレット除去ゲートを適切にかけないと解析ができないため、提示例は強引に解析を行っている）。

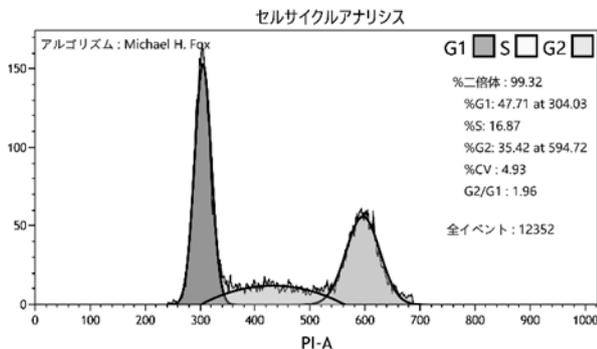


図 5 ダブレットの除去なしでの解析

(4) 流路の洗浄

細胞周期測定および解析に直接の関係はないが、PI は強い蛍光を発するため、粘着性の強い細胞などの測定を行った場合は、機器メンテナンスの観点や次の測定者のデータに影響を与えないようにするために測定後、念入りに流路の洗浄をしておくこと。

7. 最後に

近年フローサイトメーターは、比較的簡単に扱える解析機器となってきた。最近の機器では、一昔前のように光軸調整からフィルター選択、蛍光漏れ込み補正、QC チェックを手動で行わずとも自動で行われるため、

測定をサポートする技術職員の出番は少なくなっている。また測定アプリケーションも市販試薬ベースでプロトコルが一般化され、測定の実理を理解しなくてもマニュアル通りに調整、測定を行えば何かしらのデータが取得できる。このように機器の測定自動化が進む状況ではあるが、ユーザーには測定原理を理解し、使いこなしてもらえるように、今後も初学者のサポートは有用であると考えている。

参考文献

- [1] 柴山祥枝：核酸(DNA・RNA)の定量法。ぶんせき 7：268-274, 2018
- [2] <https://www.bdbiosciences.com/>
- [3] <https://www.bc-cytometry.com/>
- [4] Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G, et al: Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. Cytometry 13:795-808, 1992
- [5] 北村光夫, フリーウェアを用いたFCS出力ファイルの読み込みと描画, 臨床検査, Vol.62 774-778, 2018