原 著

Propidium iodide を用いた flow cytometry による
DNA 解析のための基礎的研究

山口大学医学部第2病理

佐々木功典 荻野 哲朗 長嶺 由啓 高橋 学

Flow cytometry によって信頼すべき DNA 解析を行うためには、使用する蛍光プローブの DNA への結合機序を詳細に知っておく必要がある。蛍光プローブとしては DNA に intercalation する propidium iodide が、高頻度に使用されているが、その DNA との結合機序はほとんど研究されていない。著者らは calf thymus DNA と syrian hamster spleen cell とを用いて PI の結合機序を spectrophotometer と flow cytometer とにより調べ、細胞核 DNA 解析のための至適 PI 濃度および RNase 処理の影響についても合わせて検討した。

DNA に結合した PI の吸収波長スペクトルの peak は 494 nm から 540 nm に移動し、525 nm に isosbetic point をみとめた。488 nm での励起では、DNA に結合した PI の量子収率は 24 倍に増加した。DNA 上には 2 種類の PI 結合部位があるが、一つは PI 低濃度の場合にみられ結合定数は大きく $K=3 \times 10^7/M$ であり、他方は $K=8 \times 10^5/M$ であった。細胞核としては $K=3.5 \times 10^6/M$ であった。FCM のための至適 PI 濃度は 50 $\mu g/ml$ であり、この濃度では核 DNA 上の結合部位は飽和状態になると考えられた。低濃度 PI での染色では、わずかな濃度変化によって G1/G0 peak が大きく変動した。Spleen cell では RNase 処理によって CV (coefficient of variation) はやや改善するものの、G1/G0 peak の位置の移動はみられなかった。

Key words: DNA analysis—Flow cytometry—Propidium iodide—RNase—Scatchard plot

I. はじめに

細胞核 DNA 量の測定は、生物学ばかりではなく、癌の診断・治療への応用といった臨床面においても興味をもたれ、盛んに研究されるようになってきた。最近になって flow cytometry (FCM) が実用化され、短時間に多数の細胞を処理することが可能となった。それに伴っ

て、種々の定量的蛍光染色法が開発され試みられている^{5,6)}。FCM による細胞 DNA 量分析には、使用されるレーザー波長の制約もあって、核酸の二重鎖部に intercalation し、強い蛍光を発する ethidium bromide (EB) が最もポピュラーに使用されている色素である^{1,8,9,17)}。

これと同じ phenanthridine 誘導体である propidium iodide (PI) は EB にくらべて FCM によるすぐれた DNA ヒストグラムパターンが得られるため²⁰⁾、Crissman ら⁴⁾や Krishan¹²⁾の報告以来、使用頻度は著しく増加し、われわれも現在は PI を最もよく用いている。信頼できる結果を得るためには色素の結合過程に関して詳細な知識が必要とされるにもかかわらず、EB に比べて PI の核酸に対する結合特性についての研究は極めて少ない。われわれは、子牛胸腺 DNA を用いて spectrophotometer と fluorescence spectrophotometer によ

Fundamental study for flow cytometric DNA analysis using propidium iodide

Kohsuke SASAKI, M.D., Tetsuro OGINO, M.D., Yoshiaki NAGAMINE, M.D. and Manabu TAKAHASHI, M.D.

Department of Pathology, Yamaguchi University School of Medicine, Ube 755

論文別刷請求先 ☎ 775 山口県宇部市小串 1144 山口大学医学部第2病理 佐々木功典

昭和58年9月3日受付

Fig. 1 The peak of the absorption spectrum can be seen to shift progressively toward a limit which represents the spectrum of the dye in a fully complexed form. Further additions of DNA produce no significant change in the spectrum. All the curves pass through an isosbetic point at 525 nm. PI concentration: 50 $\mu\text{g/ml}$. DNA concentration: 0; (A), 50 $\mu\text{g/ml}$; (B), 100 $\mu\text{g/ml}$; (C), 200 $\mu\text{g/ml}$; (D), 300 $\mu\text{g/ml}$; (E).

り, PI の DNA に対する結合過程を調べ, ハムスター脾細胞を用いて FCM によって PI の核に対する結合能に検討を加えた. さらに細胞核 DNA 解析のための至適 PI 濃度および RNase 処理の影響についても検討した.

II. 材料と方法

Spectrophotometry には子牛胸腺 DNA (Sigma chemical Co.) を, flow cytometry (FCM) にはシリアン・ハムスター脾細胞を用いて検討した. この脾細胞は 37°C, 0.1% collagenase (Sigma Chemical Co.) 溶液中で incubation することによって single cell suspension とし, 70% ethanol で固定されたものである. 吸光度は Hitachi 200-20 spectrophotometer にて, 蛍光強度は Hitachi 650-10S fluorescence spectrophotometer にて測定し, FCM には FACS-III (Becton Dickinson Co.) を用いた. 実験に用いた propidium iodide (PI) は PBS に溶解した.

1. spectrophotometry と fluorescence spectrophotometry

PI (Calbiochem-Behring Co.) 濃度を一定 (1.5×10^{-5} M と 7.5×10^{-5} M) にして, DNA 濃度を 0 から段階的に増加させて, その吸光度と蛍光強度との変化を測定した. これらのデータより, 量子収率の変化, 結合定数,

結合部数を算出した.

2. FCM

ハムスター脾細胞を PBS にて 2 回洗浄後, 37°C にて 30 分間 0.1% RNase 処理し, 細胞数を一定 (1×10^6) にして PI 濃度を段階的に変えて染色した. FACS III を一定の条件に調整し 30,000 個の細胞を測定して DNA ヒストグラムを描いた. 蛍光強度の増加率より PI の至適染色濃度を定め, さらに結合定数を推定した. こうして決められた至適染色濃度での RNase 処理の FCM 解析に及ぼす影響を検討した.

III. 結果

1. Absorption Spectrum

PI 濃度 0~100 $\mu\text{g/ml}$ の範囲では Lambert-Beer の法則が成立した. PI 溶液 (DNA=0) では, 吸収スペクトルの peak は 494 nm であり, DNA を添加すると溶液の色は orange-red から pink に変化し, peak も漸次 540 nm へと移動したが, 一定量以上の DNA を加えてもスペクトルは変化しなかった (PI 濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ では, DNA 300 $\mu\text{g/ml}$ で plateau となった). さらに, 525 nm に isosbetic point が存在した (Fig.1). Scatchard plot¹⁹⁾ は直線となりこれより $K=8 \times 10^5/\text{M}$, $N=3$ base pairs/mole of PI (K : 結合定数, N : 結合部数) が算出

された (Fig. 2).

2. Fluorescence Emission Spectrum

励起波長 488 nm では, 蛍光 spectrum の peak は 605 nm にあり, DNA の添加によっても peak はほとんど移動しなかった (Fig. 3). 励起波長 488 nm, 蛍光波長 605 nm の条件下で, PI-DNA complex の蛍光強度は 10 倍となり, 量子収率は 24 倍となった (Fig. 4).

Scatchard plot¹⁰⁾ では, absorption spectrum と異なって直線とならず, 少なくとも 2 種類の PI 結合部位が存在することが示唆された (Fig. 5). その一つ (complex I) は DNA に対する PI の量が著しく少ない場合にみられ, 大きな量子収率を示し, 他方 (complex II) は PI 量が多いときにみられ, 量子収率も前者に比べてやや小さい. Complex II の結合特性は吸収スペクトルより算定した値と一致した.

	K (M)	N (mole of dye)
Complex I	3×10^7	7 base pairs
Complex II	8×10^5	3 base pairs

3. FCM

PI 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上では histogram pattern に大差はみられなかったが, 極めて低濃度の PI 染色は高濃度の場合と異なって, DNA histogram 上で cell cycle の各 stage の区別を困難にするばかりではなく, CV (coefficient of variation) 値を大きくした. さらに G1/G0 peak channel, すなわち蛍光強度は低濃度 PI ではわずかな濃度の変化によって大きく移動した (Fig. 6). しかしながら, PI 濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ では plateau に達した. Wang-Edelman の式 (11) より $K=3.5 \times 10^6 \text{ M}$ を得た. DNA ヒストグラムの第一 peak (G1/G0) の channel number を PI 濃度に対してプロットした titration curve より, FCM analysis のための PI 濃度は, 50 $\mu\text{g/ml}$ が適当であることが示唆された. すなわち, この濃度では核 DNA の PI 結合部が, 蛍光測定でみる限りでは, 飽和された状態とみなすことができよう. PI 濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ の染色では, RNase 処理 (1 mg/ml, 37°C, 30 min) によっても G1/G0 peak の channel number はほとんど変化せず, DNA histogram pattern にもほとんど差を認めなかった. しかし CV は RNase 処理によってわずかに改善した (Fig. 7).

IV. 考 察

FCM による DNA 解析にて信頼すべき結果を得るためには, 蛍光プローブの DNA への結合過程を詳細に知

Fig. 2 Scatchard plot for PI binding to DNA measured by spectrophotometry. Abscissa: the number of dye molecules bound per nucleotides. Ordinate: (the number of dye molecules bound per nucleotide)/(the molar concentration of free dye) $\times 10^4$. The binding constant derived from this plot was $8 \times 10^5/\text{M}$.

っておく必要がある. しかしながら, EB に関する研究^{2,3,11,13-15,25,26)}は多くあるものの, PI についてのデータは極めて少ない. EB の 10 位にあるエチル基を N-diethyl-N-methylaminopropyl 基に置換した analogue が PI であり, これらは二重鎖核酸の塩基対間に intercalation することによって結合し, 強い蛍光を発する. 蛍光プローブと核酸との間の結合定数と核酸上の結合部位数とが Scatchard plot¹⁹⁾ により算出できる. この plot が直線とならない場合には, 異なった種類の結合部位が存在するか, プローブ間の相互作用があることを示唆している^{2,16,25)}. PI の場合には吸光度でみれば直線となっていたが, 蛍光度では Scatchard plot は Fig. 5 にしめすように折れ線となり DNA には少なくとも 2 種類の結合部位が存在するといえよう. この測定法による差は, 蛍光測定法の感度がより鋭敏でありわずかな変化でも捉えられるためであろう. Lawrence と Daune¹³⁾ も intercalation による結合には 2 種類あり, その一方は

Fig. 3 The maximum of the emission spectrum for PI is about 605 nm, and shift of the spectrum is inconspicuous even when the DNA-PI complex is formed. Slit: 10 nm, scan speed: 60 nm/min, excitation wavelength: 488 nm. PI concentration: 50 $\mu\text{g/ml}$. DNA concentration: 0; (A), 15 $\mu\text{g/ml}$; (B), 50 $\mu\text{g/ml}$; (C $\times 3$), 75 $\mu\text{g/ml}$; (D $\times 3$), 200 $\mu\text{g/ml}$; (E $\times 10$).

Fig. 4 The fluorescence intensity increases when DNA added, but further additions of it result in reduction of the fluorescence enhancement which is due to the binding of PI to DNA. The fluorescence intensity is given in arbitrary units. The fluorescence enhancement of PI bound to DNA is about 10 times greater than that of free dye and the relative quantum yield of the dye is about 24 for DNA.

結合部位数としては少ないが大きな結合定数を有すると報告している。DNA/PI 値が大きいときの結合には、この結合部位が大きな役割をはたしているものと推察される。われわれの得た PI の結合定数は、EB で報告された値にほぼ一致する^{2,13,25)}。Waring も PI の DNA への結合能は EB のそれと同様であったと報告している²⁶⁾。蛍光プローブの DNA 結合に及ぼす chromosomal protein の影響については、ほとんどないという報告¹³⁾から大き

く影響するという報告まである^{9,11)}。われわれの結果からは、結合部位数の問題は別として、核としての方が pure DNA より PI と強く結合するといえよう。

Free PI には 494 nm が、DNA と結合した PI には 540 nm 近傍が励起波長としては最適であることは吸収スペクトルからも推察される。しかしながら、アルゴンレーザーを用いている flow cytometer の特性として、出力の大きい 488 nm の励起波長を使用せざるを得ない

場合が多い。したがって、ここに報告した実験はすべて 488 nm の励起波長で行った。PI の蛍光波長スペクトルは DNA と結合してもほとんど変化しなかった。これらの結果は Tas と Westerneng との報告によく一致する²¹⁾。しかしながら、Crissman ら⁶⁾は DNA と結合した PI の蛍光波長は短波長側に移動していくと述べている。励起波長を変えることによって蛍光強度および量子効率を大きくすることは可能ではあるが、FCM の使用可能な波長は限られている。励起波長 488 nm では DNA に結合した PI の量子効率は free PI の 24 倍に増加した。PI analogue である EB は 13.7 倍であると報告されている²⁾。したがって PI は EB に比べて FCM には有利であるといえよう。

細胞(核)DNA量は染色液に浮遊したままの状態測定されるので、染色液自体の蛍光が誤差をうみだすのではないかとの危惧を懐くのは当然であろう。しかしながら、これは實際上、全くといっていい程に無視できる¹⁸⁾。すなわち、DNA に結合した、PI の量子収率が著しく大きく、細胞(核)にレーザー光が照射される水柱部では細胞(核)周囲には、染色液自体による蛍光がほとんど存在しない状態といえることが、この要因であろう。FCM では、細胞数を一定にして PI 濃度を変化させると、PI の低濃度域ではわずかな濃度変化によって DNA に結合した PI の蛍光強度 (G1/G0 peak channel) は大きく影響されるが、PI 濃度 50 $\mu\text{g/ml}$ で蛍光強度はほぼ plateau に達した。PI 濃度 10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の染色では、DNA histogram pattern には大きな変化は認められなかったが、極めて低い濃度の染色では高濃度の場合より、とくに S 期と G2/M 期に相当する fraction の分離が不明瞭となる傾向にあった。これらの事実より DNA

Fig. 5 Scatchard plot of fluorescence emission spectrum data. Abscissa: the number of drug molecules bound per nucleotide. Ordinate: (the number of drug molecule bound per nucleotide)/(the molar concentration of free drug) $\times 10^4$. The curvature in the plot would be due to binding to secondary site of DNA.

Fig. 6 Relationship of relative fluorescence intensity (1st peak channel number) to PI concentration. Ethanol fixed hamster spleen cells were stained with varying concentration of PI. Note that the relative intensity of stained cells changes very little above 50 $\mu\text{g/ml}$.

Fig. 7 DNA distributions of ethanol-fixed spleen cells stained with PI (50 $\mu\text{g/ml}$) with (A) and without (B) RNase treatment. There is no conspicuous difference in DNA histograms between two, although the CVs of the G1/G0 peaks are 4.0% and 4.2%, respectively.

analysis のための至適染色濃度は 50 $\mu\text{g/ml}$ であり、この濃度では蛍光発生にかかわる DNA の結合部がほぼ PI によって飽和された状態になるとみなされる。すなわち、蛍光強度は PI 濃度に依存しており、適切な染色濃度を選択する必要がある。そうでなければ、誤った結論を導くことになる。

RNase 処理の影響は対照とする細胞によって異なっているであろう。実際、ハムスター脾細胞では RNase 処理によって CV は大きな変化はみられず、G1/G0 の peak channel の移動もなかった。一方、Eisenhut ら⁹⁾ は Ehrlich ascites tumor cell で RNase 処理によって蛍光量の 25% 低下を、Vindeløv²⁴⁾ は JB-1 cell で 10% 低下を、Darzynkiewicz ら⁷⁾ は human leukemic SK-L7 cell で 30% の低下をそれぞれ報告している。われわれの実験で用いた脾細胞で G1/G0 peak が移動せず、histogram pattern も変化しなかったのは、この細胞には Taylor ら²²⁾ が述べているように RNA 量が少ないためか、あるいは Fried ら¹⁰⁾ や Torelli ら²³⁾ が報告している

ごとく、核内に RNase 抵抗性の二重鎖 RNA が存在しているためかもしれない。いずれにしろ、測定する細胞によっては RNase 処理の過程を省略することも可能であろう。ただし、CV 値はやや大きくなることには妥協せねばならないであろう。

Summary

It is essential to fully understand the chemical mechanisms of dye-binding reaction of DNA in order to obtain reliable results in flow cytometric (FCM) analysis of cellular DNA content. There are few reports on the binding process of propidium iodide (PI) to DNA although PI is frequently used as fluorescent probe for DNA analysis. The binding mechanisms was investigated with (fluorescent) spectrophotometer and flow cytometer using calf thymus DNA and Syrian hamster spleen cells. Moreover, optimal concentration of PI for DNA analysis was determined and effects of RNase treatment was examined.

The absorption maximum was shifted from 494 nm to 540 nm in PI-DNA complex, and a well-defined isosbetic point was demonstrated at 525 nm. Excitation at 488 nm, where the relative quantum yield of PI bound to DNA was 24 times greater than that of free dye, results in an emission maximum at about 605 nm. Two modes of interaction were distinguished between PI and DNA, i.e., complex I which was observed only on small values of DNA/PI ($K=3\times 10^7/M$) and complex II ($K=8\times 10^5/M$). Association constant (K) of hamster spleen cells was estimated to be $3\times 10^9/M$ from the FCM data. Optimal concentration of PI for cell staining was defined as 50 $\mu g/ml$, and in this concentration binding sites on nuclear DNA could be saturated by PI molecules. The channel of G1/G0 peak of DNA histogram was greatly varied by slight changes of PI concentration when cells were stained with lower dye concentrations. RNase treatment did not influence the position of G1/G0 peak, while it slightly improved CV (coefficient of variation) values of the peak in DNA histograms.

文 献

- 1) Anderson, K.J., Skagen, D.W. : Fluorometric determination of DNA in fixed tissue using ethidium bromide, *Ann. Biochem.*, 83 : 703~710, 1977.
- 2) Angerer, L.M., Moudrianakis, E.N. : Interaction of ethidium bromide with whole and selectively deproteinized deoxynucleoproteins from calf thymus, *J. Mol. Biol.*, 63 : 505~521, 1972.
- 3) Bresloff, J.L., Crothers, D.M. : DNA-ethidium reaction kinetics : demonstration of direct ligand transfer between DNA binding sites, *J. Mol. Biol.*, 95 : 103~123, 1975.
- 4) Crissman, H.A., Steinkamp, J.A. : Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations, *J. Cell. Biol.*, 59 : 766~771, 1973.
- 5) Crissman, H.A., Mullany, P.F., Steinp, J.A. : Methods and application of flow systems for analysis and sorting of mammalian cells. In : *Methods In Cell Biology*, D.M. Prescott (ed), vol. 9, p. 179~246, New York, Academic Press, 1975.
- 6) Crissman, H.A., Stevenson, A.P., Kissane, R.J., Tobey, R.A. : Techniques for quantitative staining of cellular DNA for flow cytometric analysis. In : *Flow Cytometry and Sorting*, Melamed, M.R., Mullaney, P.F., Mendelsohn, M.M. (ed.), p. 243~261, John Wiley Son, New York, 1979.
- 7) Darzynkiewicz, Z., Traganos, F., Sharpless, T., Melamed, M.R. : Conformation of RNA in situ as studied by acridine orange staining and automated cytofluorimetry, *Exp. Cell. Res.*, 95 : 143~153, 1975.
- 8) Dittrich, W., Cohde, W. : Impulse fluorometry with single cells in suspension, *Z. Naturforsch.*, 24B : 360, 1968.
- 9) Eisenhut, M., Chone, B. : Studies of the binding of ethidium bromide to cells before and after enzyme treatment, *Histochemistry*, 62 : 207~220, 1979.
- 10) Fried, J., Perez, A.G., Clarkson, B.D. : Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide, *J. Cell. Biol.*, 71 : 172~181, 1976.
- 11) Karsten, U., Wollenberger, A. : Improvements in the ethidium bromide method for direct fluorometric estimation of DNA in cell and tissue homogenates, *Anal. Biochem.*, 77 : 464~470, 1977.
- 12) Krishan, A. : Rapid flow cytophotometric analysis of a mammalian cell cycle by propidium iodide staining, *J. Cell. Biol.*, 66 : 188~193, 1975.
- 13) Lawrence, J.J., Daune, M. : Ethidium bromide as a probe of conformational heterogeneity of DNA in chromatin. The role of histone H1, *Biochemistry*, 15 : 3301~3307, 1976.
- 14) Le Pecq, J., Paoletti, C. : A new fluorometric method for RNA determination, *Analytical Biochem.*, 17 : 100~107, 1966.
- 15) Le Pecq, J.B., Paoletti, C. : A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids, *J. Mol. Biol.*, 27 : 87~106, 1967.
- 16) McGhee, J.D., Hippel, P.H. : Theoretical aspects of DNA-protein interactions : co-operative and non-co-operative binding of large ligands to a one dimensional homogeneous lattice, *J. Mol. Biol.*, 86 : 469~489, 1974.
- 17) Nicolini, C., Kendall, F., Baserga, R. : The G0-G1 transition of WI38 cells. 1. Laser flow microfluorometric studies, *Exp. Cell Res.*, 106 : 111~118, 1977.
- 18) Sasaki, K. : unpublished data.
- 19) Scatchard, G. : The attractions of proteins for small molecules and ions, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 51 : 660~672, 1949.
- 20) Srohr, M., Petrova, L. : The alkaline hydrolysis of nucleic acid for removal of RNA associated fluorescence in phenanthridium related flow through cytometry, *Histochemistry*, 45 : 95~99, 1975.
- 21) Tas, J., Westerneng, G. : Fundamental aspects of the interaction of propidium diiodide with nucleic

- acids studied in a model system of polyacrylamide films, *J. Histochem. Cytochem.*, 29 : 929~936, 1981.
- 22) Taylor, I.W., Milthore, B.K. : An evaluation of DNA fluorochromes, staining techniques, and analysis for flow cytometry, *J. Histochem. Cytochem.*, 28 : 1224~1232, 1980.
- 23) Torelli, U., Torelli, G., Cadossi, R. : Double-stranded ribonucleic acid in human lymphocytes, *Exp. Cell Res.*, 88 : 188~192, 1974.
- 24) Vindeløv, L.L. : Flow microfluorometric analysis of nuclear DNA in cells from solid tumors and cell suspensions, *Virchows Arch. Pathol.*, 24 : 227~242, 1977.
- 25) Waring, M.J. : Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids, *J. Mol. Biol.*, 13 : 269~282, 1965.
- 26) Waring, M. : Variation of the supercoils in closed circular DNA by binding of antibiotics and drugs : evidence for molecular methods involving intercalation, *J. Mol. Biol.*, 54 : 247~279, 1970.
- 27) Waring, J.L., Edelman, G.M. : Fluorescent probes for conformational states of proteins. iv. The pepsinogen-pepsin conversion, *J. Biol. Chem.*, 246 : 1185~1191, 1971.
-