

本稿は1998年11月24-26日、メルパルク大阪で開催された日本環境変異原学会第27回大会のシンポジウム「コメット法、その変異原性試験としての展望」(企画:佐々木有, 生島隆治)で発表された(座長:佐々木有, 生島隆治)。

アポトーシスに伴う DNA 断片化のコメット法による検出 —その特徴

大山 ハルミ¹, 山田 武²

¹放射線医学総合研究所障害基盤研究部 〒263-8555 千葉市稲毛区穴川 4-9-1

²東邦大学医学部生物科学研究室 〒143-8540 東京都大田区大森西 5-16-21

(現:電力中央研究所生物科学部柏江分室 〒201-8511 狛江市岩戸北 2-11-1)

Teardrop assay : A detection method for individual apoptotic cells with DNA fragmentation

¹Division of Radiobiology & Biodosimetry, National Institute of Radiological Sciences
Anagawa 4-9-1 Inage-ku, Chiba 263-8555, Japan

²Department of Biology, Toho University School of Medicine
Omori-nishi 5-16-21 Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan

Summary

Apoptosis is a programmed cellular suicide, which plays an important role in many biological events, including removal of cells damaged by a variety of mutagen. DNA fragmentation into oligonucleosomal units is a hallmark of apoptosis. Single cell gel electrophoresis assay (comet assay) invented for measuring DNA strand breaks in individual cells has been utilized also for visualization of apoptotic DNA fragmentation. Examination of X-irradiated thymocytes by comet assay revealed that apoptotic cells showed almost the same migration pattern with teardrop-shaped fragmented DNA tail and a small non-migrated DNA core particle, whereas viable cells exhibited no DNA migration. The migration patterns were almost the same, independent of radiation dose and time after irradiation. These findings indicate that DNA cleavage in an apoptotic thymocyte is an “all-or-none” type event. The migration patterns differ from those of radiation-induced DNA strand breaks detected by a conventional comet assay. The term “teardrop assay” is then proposed in place of “comet assay” reflecting the shape of migration pattern of apoptotic DNA fragments on electrophoresis.

(This paper, in a session chaired by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, was presented to the symposium “A view of Comet assay as a mutagenicity test system”, organized by Yuu Sasaki and Takaji Ikushima, at the 27th annual meeting of the Environmental Mutagen Society of Japan, and held at the Mielparque Osaka in Osaka, Japan, November, 24-26, 1998.)

Keywords : apoptosis, comet assay, DNA fragmentation

はじめに

アポトーシスは、遺伝子にプログラムされた能動的な細胞死である。1972年、Kerrらは、ネクローシスと異なる特徴的形態変化に気づき、細胞の増殖分化と表裏一体

受付:1999年3月30日

受理:1999年4月8日

©日本環境変異原学会

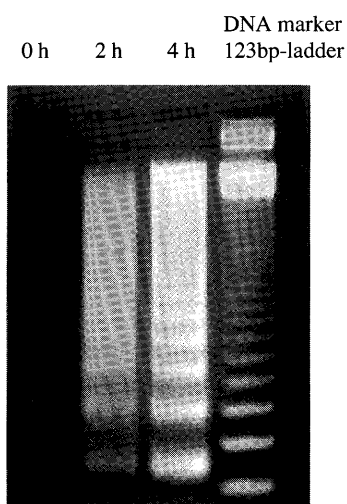


Fig. 1 Apoptotic DNA fragmentation in the irradiated rat thymocytes
DNA fragments were extracted from the cells 2 to 4 h after 10 Gy X-irradiation. Agarose gel electrophoresis of the DNA showed a typical “ladder pattern” of oligonucleosomal fragments

となって多細胞生物の生命維持に必須の役割を果たしているアポトーシス (apoptosis) を発見し、その概念提起を行った (Kerr et al. 1972)。90 年代に入り、多くのがん遺伝子やがん抑制遺伝子産物の関与が明らかにされるとともに研究が進んだ。ここ数年、線虫細胞死遺伝子の相同遺伝子の検索から、カスパーゼファミリーなどの細胞死実行に関わるタンパク質が相次いで見出されるなど、研究が一段と加速している (Yamada et al. 1998)。

アポトーシスは、発生過程での形態形成や、細胞交代などの生理的な制御機構や、放射線を含む多くの変異原により損傷を受けた細胞の除去機構として働いている (大山, 山田 1998 a,b, Ohyama & Yamada 1998)。したがって、その異常は、がん, AIDS, 自己免疫疾患, アルツハイマー病など、多くの疾病と関連する。アポトーシスは形態学的にほぼ同様な過程を経て発現するが、分子機構の面では、誘発要因や細胞の種類、細胞周期他により異なる、多様で複雑で精緻な制御を受けることもわかってきた (Yamada et al. 1998, 山田, 大山 1994, 山田 1998, 大山, 山田 1998 a,b)。なお、文献は最近の主として総説を挙げた。

1. アポトーシスの生化学的な指標としての DNA 断片化

この細胞死の特徴的な生化学的な指標 (biochemical hallmark) とされているのが、クロマチン DNA のオリゴヌクレオソーム単位の切断である。それを DNA 断片化 (DNA fragmentation) と呼び、通常、DNA 試料をアガロースゲル電気泳動で分離し、180 bp (塩基対) の整数倍に切断された DNA 断片の“ラダー”を検出する (Fig.

1)。ただし、DNA 断片化を伴わないアポトーシスも報告されている。また、アポトーシスでの DNA 分解には、さらに高分子の 50–300 kbp の切断もあり、パルスフィールド電気泳動などで検出されている。

2. DNA 断片化検出法としてのコメット法

アポトーシスの大きな特徴は、細胞集団の中で散発的に発現し、一旦始まると急速に進行する点にある。ところが、通常のアガロースゲル電気泳動法では、アポトーシスを起こした細胞集団平均の DNA 断片化を検出しているに過ぎず、個々の細胞の DNA 分解像は検出できない。DNA 断片化を起こした個々の細胞の検出法として、TUNEL 法や、フローサイトメトリーで検出する方法なども開発されている。しかし、こうした方法では、個々の細胞での DNA 分解像は観察不能である。この点、単一細胞ゲル電気泳動：通称、コメット法によって、はじめて、個々のアポトーシス細胞での DNA 断片化像が明らかにされた。しかし、通常 DNA 損傷検出の場合の、彗星のような“コメット”像と異なり、アポトーシスでの DNA 断片化の場合は、少量の DNA が原点に残るだけでほとんどは涙滴状に泳動されることが明らかになった (Olive et al. 1993, Fairbairn et al. 1995, Ohyama et al. 1998)。

3. 胸腺細胞の放射線誘発アポトーシス

胸腺細胞は多くの要因によりアポトーシスを起こし、アポトーシスについての基礎的な多くの知見がこの細胞の研究から得られている。胸腺細胞はもっとも放射線感受性の高い細胞の一つで、照射後、短時間に間期死を起こす。私たちは、X線照射したラット胸腺細胞の死細胞を Percoll で分離する方法を確立した。分離細胞の観察から、生きている状態から、細胞サイズ縮小、細胞表面微絨毛の消失や DNA 断片化など、アポトーシスの特徴的な変化を示す死の状態に急速に移行することを明らかにした (Ohyama & Yamada 1998, 大山, 山田 1998 b)。

4. アポトーシス細胞の単一細胞ゲル電気泳動

胸腺細胞の X 線誘発アポトーシスでの DNA 断片化を、コメット法を改良し調べた (Ohyama et al. 1998)。すなわち、180 bp の整数倍の DNA 断片のロスが減らすため、細胞を 4 % の低融点アガロースに浮遊させる。薄い単層のゲルをスライド上に形成、中性条件で細胞融解と泳動を各 4 分間という短時間に終了、DAPI で蛍光染色し DNA の泳動像を観察した。

その結果、照射胸腺細胞には、DNA が原点にほとんど留まる細胞と、少量が原点に残るだけで大部分の DNA が涙滴状にほぼ均一な泳動像を示す細胞の 2 群が検出された (Fig. 2a)。この涙滴状の泳動を示す細胞の割合は、

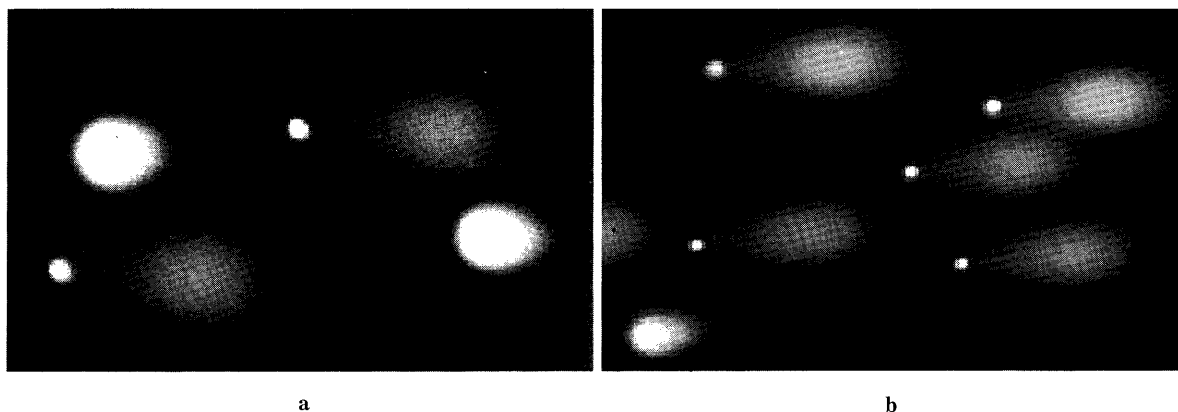


Fig. 2 Photomicrograph of single cell gel electrophoresis of 10 Gy X-irradiated rat thymocytes
The cells 4 h after irradiation consisted of two populations, one showing no DNA migration, and the other having the teardrop-shaped migration pattern (Fig. 2a). Apoptotic cell fraction separated from the irradiated cell population by Percoll density gradient centrifugation exhibited almost homogeneous “teardrop-shaped DNA migration” on the gel electrophoresis (Fig. 2b)

Table 1 Comparison of characteristic features in apoptotic DNA fragmentation with those in DNA damage

	DNA damage	apoptotic DNA fragmentation
Induction	passive	enzymatic (endonucleases)
Site of cleavage	random	linker region of chromatin
DNA fragment size	random	oligonucleosomal fragments
Repair	+	—
Shape of DNA migration in comet assay	“comet” depending on dose	“teardrop” independ of dose
Occurrence	all cells	exclusively in apoptotic cells

エリスロシン B 分染法で検出したアポトーシス細胞の割合と一致し、線量と照射後の時間依存性に増加した。両者の中間段階の細胞はほとんど検出されなかった。さらに、Percoll で分離した細胞について調べ、アポトーシス細胞はほぼ均一な泳動距離や大きさを示す涙滴状の泳動像を示し (Fig. 2b)、一方、生細胞の DNA は分解せずに原点に留まることを確認できた。なお、この条件では、X 線照射自体による DNA 切断の、いわゆるコメット像は検出されなかった。

Percoll で分離したアポトーシス細胞の中には、分離の直前に死んだ細胞から、数時間前に死んだ細胞も混在している。したがって、こうした知見は、アポトーシスでの DNA 分解が一旦開始するとすみやかに進行し、かつ急速に停止することを示している。なお、泳動像が均一になっているのは、胸腺細胞はほとんど G₀ 期の細胞であり DNA 含量がほぼ同じであること、Percoll 分離は照射後 3 時間目に行っていることにもよる。より長時間経ってからでは、分解が進み、涙滴部が小さくなった泳動像も検出される。

なお、胸腺細胞から、DNA 断片化に関与すると考えられるエンドヌクレアーゼ-DNase- γ を、東京理科大学の田沼先生のグループが精製し、クローニングを行っている (田沼 1998)。しかし、急速な DNA 分解と停止の機構

など作用機構の詳細はいまだ明らかにはなっていない。

胸腺細胞以外のリンパ腫細胞などでも、同じような涙滴状の泳動像が観察され、これまでの報告からも、アポトーシスにおける DNA 断片化時の特徴的な泳動像と考えられる。ただし、涙滴部の大きさや距離は細胞の DNA 含量が異なるため、泳動像は胸腺細胞の場合のように均一ではない。

5. DNA 損傷による切断とアポトーシスでの DNA 断片化の違い

Table 1 に、放射線による DNA 切断とアポトーシスによる DNA 断片化の違いをまとめた。コメット法は、元来、放射線による二本鎖あるいは一本鎖のランダムな切断を検出するために考案された方法であり、名称通りの“コメット”様の泳動像を示す。照射されたすべての細胞に線量依存性に切断が生じ、コメット像は、線量依存性に変化する。また、切断は多様な修復機構により修復されるため、照射後時間が経つと尾の部分が消えていく。

それと比較して、アポトーシスにおける DNA 断片化は、エンドヌクレアーゼにより、酵素的にヌクレオソームのリンカー部位が特異的に切断された産物であり、放射線自体による DNA 損傷と成因がまったく異なる。また、アポトーシス細胞にのみ起こり、線量増加はアポト

ーシス細胞の割合を増加させるが、DNA 分解像には影響せず、マイクロゲル電気泳動での泳動像は涙滴状となる。

いわゆるコメット法は DNA 損傷自体の検出に使われている例と、変異原誘発アポトーシスの検出に使われている例とがある。“コメット”という名称を両者に使うのは、紛らわしくもあり、上述のように現象としても泳動像からも好ましくない。そこで、私たちはアポトーシスの DNA 断片化の検出の方法としてマイクロゲル電気泳動を用いたときは、(Teardrop assay)と呼ぶほうが良いのではないかと考えている (Ohya et al. 1998)。

6. DNA 断片化検出法としてのマイクロゲル電気泳動法の限界と留意点

なお、アポトーシスでは、多くの場合、細胞も断片化してアポトーシス小体となり、貪食除去される。胸腺細胞のアポトーシスも、細胞浮遊液の *in vitro* 照射では細胞縮小が起こるだけだが、全身照射した胸腺内ではアポトーシス小体となる。変異原を作用させた組織内でのアポトーシスでも、アポトーシス小体となっていることが多いと考えられる。それらの検出には、マイクロゲル電気泳動は適さない。さらに、アポトーシス小体は、すみやかに貪食除去され消失してしまうため、その点からも検出されにくい。

放射線誘発アポトーシスの例では、照射後に数時間に照射された細胞自体が死ぬ“間期死型”と呼ばれるものと、照射後、一回以上の分裂を繰り返し、場合によっては 100 時間にも及ぶ長時間にわたって生じる“増殖死型”がある (大山, 山田 1998 b, Ohya et al. 1998)。胸腺細胞のような間期死型のアポトーシスを示す細胞は比較的少ない。また、増殖死型アポトーシスについても多くの細胞では研究されていない。

多くの変異原によるアポトーシスにも、放射線誘発アポトーシスのように、間期死型と増殖死型があると考えられる。増殖死型の場合には、長時間にわたってアポトーシス細胞が出現するため、DNA 断片化像も胸腺細胞のように単純ではない。こうした点を留意して泳動像の解析結果をみていく必要がある。

変異原を多量に作用させた場合、変異原自体による涙滴状パターンの出現と、アポトーシスによる場合もありうるので注意を要する。

7. アポトーシスの機構と意義

アポトーシスの実行過程では、線虫の細胞死遺伝子のホモロジー検索から発見されたシステインプロテアーゼであるカスパーゼ群が必須の役割を果たしている。現在までに多数のカスパーゼにより分解される多数の基質が明らかにされているが、その中に、ポリ (ADP-リボース) ポリメラーゼ、DNA 依存性プロテインキナーゼの触媒部位、Rad 51 などの DNA 修復に関連する酵素が含まれ

ている。これらのタンパク質分解は、おそらく、断片化した DNA が修復され、再結合することを阻止し、損傷遺伝子が再利用されるのを抑制する機構となっているのであろう。

生体には多様な DNA 修復機構が備わっているが、こうした分子レベルでの修復はミスに伴う。アポトーシスの重要な意義の一端は、DNA 損傷を起こした細胞を完全に除去し、修復ミスを防ぎ、発がんや奇形などのリスクへの防御機構として働くことにある。反面、アポトーシスは、場合によっては、変異原による障害をもたらす。形態形成期の照射では、奇形発生が多いことが知られている。p 53 ノックアウトマウスを用いた実験で、形態形成初期の照射では、正常に比較して流産が減り、奇形が増加することが観察されている (Norimura et al. 1996)。すなわち、p 53 誘発アポトーシスが異常胚を流産させ、奇形を防ぐ役割を果たしている。ところが、私たちのグループでは、肢指形成期照射により、肢指原基細胞にアポトーシスが多発し、それが奇形の原因となることを明らかにした (Wang et al. 1999)。

DNA 損傷要因などのストレスにより p 53 レベルが上昇し、G₁ 停止やアポトーシスなどが起こる。DNA 損傷要因によるアポトーシスは p 53 依存性に起こることが多いが、細胞によっては、膜のセラミド生成を介することも報告されている (Ohya et al. 1998)。

結 語

アポトーシスに伴う DNA 断片化検出法として、単一細胞電気泳動法は、他の方法では得られない情報をもたらす。しかしながら、その利用には限界も存在する。変異原によるアポトーシスの検出と機構の研究は、変異原の生体影響を解明するうえで益々重要性を持つと考えられる。そうしたアポトーシス研究法として、マイクロゲル電気泳動法は、限界をわきまえながら利用すれば有用な方法として役立つであろう。逆に、DNA 損傷の検出法としてコメット法を使用する場合も、要因作用後時間が経っている場合は、アポトーシスのことも念頭に入れる必要があるであろう。

参考文献

- Fairbairn, D. W., Olive, P. L. and O'Neill, K. L. (1995) The comet assay: a comprehensive review, *Mutat. Res.* 339, 37-59.
- Kerr, J. F. R., Wyllie, A. H. and Currie, A. R. (1972) Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implication in tissue kinetics, *Brit. J. Cancer*, 26, 239-256.
- Norimura, T., Nomoto, S., Katsuki, M., Gondo, Y. and Kondo, S. (1996) p53-dependent apoptosis suppresses radiation-induced teratogenesis, *Nature Medicine* 2, 577-580.
- 大山ハルミ, 山田 武 (1998 a) アポトーシス概論, 産婦人科の実

- 際, 47, 1111-1119.
- 大山ハルミ, 山田 武 (1998 b) DNA 損傷とアポトーシス, 医学のあゆみ, 187, 363-367.
- Ohyama, H. and Yamada, T.(1998) Radiation-induced apoptosis : A review. In Apoptosis : its roles and mechanism, T. Yamada and Y. Hashimoto, (Eds) Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo pp. 140-184.
- Ohyama, H., Tamamoto, H. and Yamada, T.(1998) "Tear-drop assay," a rapid and sensitive method for characterization of radiation-induced apoptotic DNA fragmentation in individual thymocytes. In Apoptosis : its roles and mechanism, T. Yamada and Y. Hashimoto, (Eds), Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo, pp. 185-198.
- Olive, P. L., Frazer, G. and Banáth, J. P.(1993) Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells using the comet assay, Radiat. Res. 136, 130-136.
- 田沼靖一 (1998) アポトーシスと DNA エンドヌクレアーゼ, 医学のあゆみ, 187, 324-328
- Wang, B., Fujita, K., Ohhira, D. Watanabe, K., Odaka, T., Mitani, H., Hayata, I., Ohyama, H., Yamada, T. and Shima, A.(1999), Radiation-induced apoptosis and limb teratogenesis in embryonic mice, Radiat. Res. 151, 63-68.
- 山田 武, 大山ハルミ (1994) アポトーシスの科学, 講談社ブルーバックス.
- 山田 武 (1998) アポトーシスとは—Overview—, 医学のあゆみ, 187 : 283-288.
- Yamada, T. and Hashimoto, Y. Eds.(1998) "Apoptosis : its roles and mechanism", Business Center for Academic Societies Japan, Tokyo.