

# 蛍光ダイナミクス情報を利用したフローサイトメトリーによる FRET 検出

中田 成幸\*・林 弘能\*・星島 一輝\*  
土井 恭二\*・木村 憲明\*

## Flow Cytometric FRET Detection Using Fluorescence Dynamics Data

Shigeyuki NAKADA \*, Hironori HAYASHI \*, Kazuteru HOSHISHIMA\*  
Kyouji DOI \*, Noriaki KIMURA\*

**Abstract:** It has been verified that FRET(Fluorescence Resonance Energy Transfer) phenomenon is utilized for detecting molecular interactions of proteins in a living cell. In this work, we present a rapid and assured FRET detection method for living cells proposing the new flow cytometric equipment which is capable of measuring its fluorescence lifetime change. FRET-based approaches for protein interactions in living cells are powerful but are limited due to the uncertainty of the donor and acceptor chromophore representation. By measuring the fluorescence lifetime data in addition to the intensity data, a simple, quantitative and multidimensional analysis is realized for FRET detection. Measurements of Ras-Raf protein interactions are shown to evaluate that this approach is available. It's derived that the detection can be executed as a rapid (~thousands of cell/sec) and a sensitive (~0.02nsec lifetime resolution) measurement.

**Keywords:** fluorescence resonance energy transfer (FRET), fluorescence lifetime, flow cytometry, protein interaction in living cells

### 1. まえがき

生体内で起こっているさまざまな生理機能は、細胞内のタンパク質や低分子化合物が互いに結合・解離することにより成り立っている。ヒトゲノム解析が一段落した近年、細胞中での遺伝子の機能を解明し、疾病発症と深く関わるシグナル伝達を調査するため、これら分子間相互作用研究の重要性が増してきている<sup>1)</sup>。

これらタンパク質の相互作用は、セントラルドグマと呼ばれる先天的情報だけでなく後天的情報が影響していることが考えられるため、後天的情報を蓄積した生細胞中で実施されることが望ましい<sup>2)</sup>。

近年、生細胞中でこれらタンパク質の分子間相互作用を検出する技術として、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) 現象を利用した手法が適用され多くの論文が執筆されてきている。

FRETは、2種の蛍光物質がごく近傍に存在し、一方の蛍光波長がもう一方の吸収波長と重なる場合に励起エネルギーが移動する現象を言う。注目する2つのタンパク質に2種類の蛍光色素を結合し、一方の蛍光色素 (ドナー) の蛍光波長がもう一方の蛍光色素 (アクセプタ) の励起波長に重なるように選択する

と、それらが近接した場合にドナーからアクセプタへエネルギーが移動し、ドナーを励起すると、アクセプタが光る。タンパク質の結合や構造変化が起きた時このみ蛍光色素が近接しFRETが誘起されることから、タンパク質の相互作用を検出できる手段となっている<sup>3)4)</sup>。

近年 GFP(Green Fluorescent Protein)を始めとした多種の蛍光タンパク質が開発され、これらを細胞内で発現させることができるようになってきており、生細胞内での情報伝達の研究に FRET を活用することが有効になってきている<sup>5)~9)</sup>。

これらの研究は、顕微鏡イメージングを主な手段として実施されてきたが、1日に観察できる細胞の数は限られること、定量的な評価が困難であることなどから、研究効率を上げていくために新しい FRET 検出手法が望まれている。

本研究では、生細胞中での FRET を高速かつ確実、定量的に検出することを目標に、細胞を高速に流しながら1細胞ごとの蛍光強度を計測すると同時にその蛍光寿命情報を検出できる新しいフローサイトメータ(Flicyme®:Fluorescence Lifetime Cytometer)を提案し、実際の細胞内 FRET の検出を行った結果について述べる。

FRET が発生し、ドナーからアクセプタへエネルギーが移動するとドナーの蛍光寿命が短縮することが知られている<sup>3)4)</sup>。これを検出パラメータとした FRET 検出は、蛍光量変動の影響を受けにくく、かつ定量的な FRET の程度 (FRET 効率) をより直接的に求めることができる。

\*三井造船(株) 玉野技術開発センター 玉野市玉原 3-16-1

\*Mitsui Engineering & Shipbuilding Co.,Ltd., Tamano Technology Center, Tamano

(Received November 1, 2006)

これまで、フローサイトメータをベースとして蛍光寿命情報を同時に取得し、それを基に FRET 検出が試みられた報告は見られない。

蛍光寿命計測とフローサイトメトリ計測のメリットを併せ持たせることにより、膨大な細胞の FRET 効率を短時間に計測することができ、信頼性の高い統計的データを得ることができる。したがって、細胞内シグナル伝達の探索や薬理候補化合物のスクリーニングなど、大量のサンプルについてたんぱく相互作用を調査する用途に有用であり、基礎医学や創薬の研究開発の効率向上に寄与できるものと考えられる。

本報では、まず FRET の蛍光ダイナミクスモデル化により蛍光寿命計測が蛍光色素の標識量や pH 変化の影響を受けにくい FRET 効率の計測法であることを示す。つぎに、試作したフローサイトメータについて述べ、蛍光寿命計測の概要について述べる。また、装置としての蛍光寿命計測精度について検討を行った結果について述べる。その後、実際の細胞について FRET 計測試験を行った結果を示し、蛍光寿命フローサイトメータの有効性を示す。

## 2. FRET 蛍光ダイナミクスモデル

時刻 0 に理想的なパルス光源で励起された蛍光分子の蛍光強度（単位体積から放射される光子の数）の時間変化  $F(t)$  [個/cm<sup>3</sup>] は以下となる<sup>10)</sup>。

$$F(t) = k_f N(t) = k_f N_0 e^{-(k_f + k_{nr})t} = k_f N_0 e^{-t/\tau} \quad (1)$$

ここで、

$N(t)$  : 励起状態にある単位体積中の蛍光分子数 [個/cm<sup>3</sup>]

$N_0$  : 時刻 0 で励起状態にある単位体積中の蛍光分子数 [個/cm<sup>3</sup>]

$k_f$  : 発光遷移の速度定数 [1/s]

$k_{nr}$  : 共鳴エネルギー移動を除く無輻射遷移の速度定数 [1/s]

$\tau \equiv 1/(k_f + k_{nr})$  : 蛍光寿命 (蛍光緩和時定数) [s]

であり、 $N_0$  は、蛍光分子のモル吸光係数、モル濃度に依存する量であり、蛍光分子の標識量が変わると変化する量である。

インパルス応答が(1)式で表現される系の微分方程式は、レーザの入射パワーを  $u(t)$  [1/s] とすると、以下で表現される。

$$\frac{dN(t)}{dt} = -(k_f + k_{nr})N(t) + N_0 u(t) \quad (2)$$

以上の準備を基に、細胞内にドナー、アクセプタ蛍光タンパク質が近接して存在し、FRET が発生する蛍光モデルを求める。FRET が発生する場合の特徴は、ドナー分子の励起された電子が発光遷移、無輻射遷移、共鳴エネルギー移動の競合により基底準位に落ちること、アクセプタ分子の電子がエネルギー移動により追加励起されることであり、蛍光モデルは以下で表現できる。

$$\frac{dF_d(t)}{dt} = -(k_d + k_t)F_d(t) + k_{df}N_{d0}u(t) \quad (3)$$

$$\frac{dF_a(t)}{dt} = \frac{k_{af}}{k_{df}}k_t F_d(t) - k_a F_a(t) + k_{af}N_{a0}u(t) \quad (4)$$

ここで、添字  $d, a$  は、ドナー、アクセプタのパラメータであることを示しており、

$k_d, k_a$  : ドナー、アクセプタの  $k_f + k_{nr}$  [1/s]

$k_{df}, k_{af}$  : ドナー、アクセプタの  $k_f$  [1/s]

$N_{d0}, N_{a0}$  : ドナー、アクセプタの  $N_0$  [個/cm<sup>3</sup>]

$k_t$  : 共鳴エネルギー移動の速度定数 [1/s]

である。

蛍光分子の蛍光波長スペクトルはある範囲で広がっており、通常それぞれの蛍光を多く検出できる波長領域を選択し、その領域を透過させる光学フィルタを通して検出している。また、蛍光の発光原理からそのスペクトルは特に長波長側に幅広く広がる特性を持っているため、ドナーの蛍光がアクセプタの蛍光領域に相当量混入する 경우가多く、以下の漏れ込みを考慮する必要がある。

$$\frac{dF_{da}(t)}{dt} = -k_{da}F_{da}(t) + k_{daf}N_{da0}u(t) \quad (5)$$

ここで、添字  $da$  はアクセプタ波長領域へ漏れ込んだドナー蛍光に関する同様なパラメータである。

(3)~(5)式に対しラプラス変換を施し、ドナーおよびアクセプタ検出波長域で観測される蛍光量  $F_{donor}, F_{acceptor}$  を求めると、(6)、

(7)式となり、蛍光ダイナミクスのブロック図は Fig.1 で示される。

$$F_{donor}(s) = F_d(s) = \left( \frac{k_{df}N_{d0}\tau_d^*}{1 + \tau_d s} \right) \cdot U(s) \quad (6)$$

$$F_{acceptor}(s) = F_a(s) + F_{da}(s) = \left\{ k_{af} \left( \frac{k_t \tau_a}{1 + \tau_a s} \cdot \frac{N_{d0}\tau_d^*}{1 + \tau_d s} + \frac{N_{a0}\tau_a}{1 + \tau_a s} \right) + \frac{k_{daf}N_{da0}\tau_{da}}{1 + \tau_{da} s} \right\} \cdot U(s) \quad (7)$$

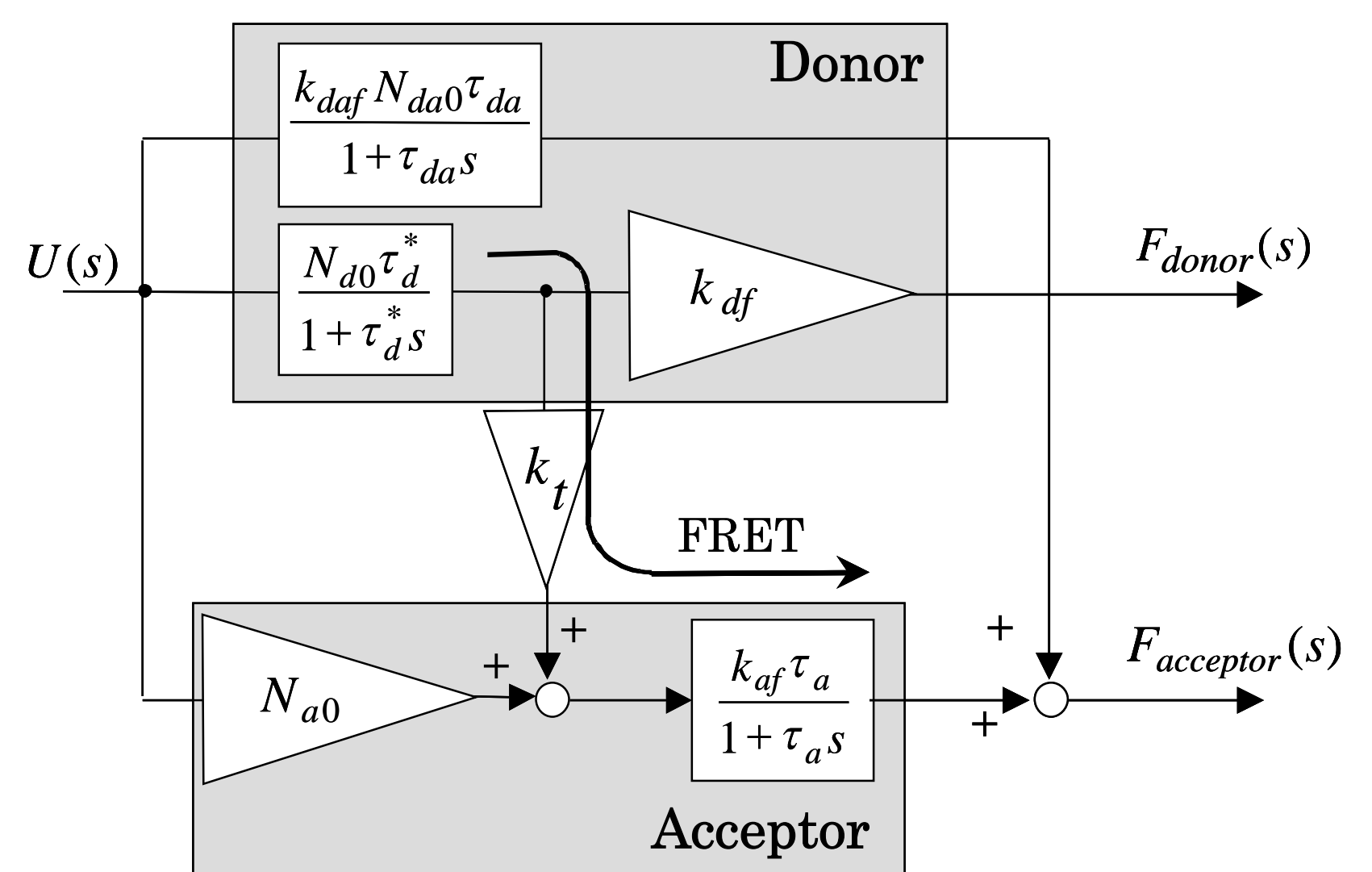


Fig.1 Fluorescence Dynamics Model of FRET

ここで,

$$\tau_d^* = 1/(k_d + k_t) : \text{FRET発生時のドナー蛍光寿命[s]}$$

$$\tau_a = 1/k_a : \text{アクセプタの蛍光寿命[s]}$$

$$\tau_{da} = 1/k_{da} : \text{ドナーのアクセプタ領域での蛍光寿命[s]}$$

である.

エネルギー移動の程度を表現する共鳴エネルギー移動効率 $E$ は, ドナーに吸収された光子エネルギーのうちアクセプタへ移送されたエネルギーの比率で定義されており, 以下となる<sup>11)</sup>.

$$E = \frac{k_t}{k_d + k_t} = 1 - \frac{\tau_d^*}{\tau_d} \quad (8)$$

ここで,  $\tau_d (=1/k_d)$  はアクセプタが存在せずFRETが発生しない時のドナーの蛍光寿命である. したがって, 蛍光寿命が計測できれば, FRET 効率が(8)式より簡便に求められることになる.

従来, 主に実施されている蛍光強度の測定は, (3)~(5)式で  $d/dt = 0$  あるいは(6), (7)式で  $s=0$  とした静的な蛍光強度を計測していることに相当する. すなわち, ドナー蛍光強度は,

$$F_{donor} = k_{df} N_{d0} \tau_d^* \quad (9)$$

アクセプタ蛍光強度は,

$$F_{acceptor} = k_{af} \left( k_t \tau_a N_{d0} \tau_d^* + N_{a0} \tau_a \right) + k_{daf} N_{da0} \tau_{da} \quad (10)$$

となる. したがって, FRET現象により  $k_t$  が0でなくなり,  $\tau_d^*$  が  $\tau_d$  に比較して小さくなると, ドナー蛍光強度が減り, アクセプタ蛍光強度が増加する. この変化をとらえることでFRET検出が可能となるが, ドナー, アクセプタの標識量が異なる場合や溶液の変質などにより細胞内のpHが変化しモル吸光係数が変化する場合には,  $N_{d0}, N_{a0}, N_{da0}$  が変化することになり, この方法ではそれらの影響を直接受けてしまうことになる. 一方, 蛍光ダイナミクス (蛍光寿命) を測る方法では, 原理的に標識量やモル吸光係数変化の影響は受けにくい.

以上の定式化から, ドナー波長領域の蛍光からドナー蛍光寿命を求めてFRETを評価する方法がもっとも簡便で直接的, 定量的であることが確認できる. 基準の蛍光寿命 $\tau_d$  は, アクセプタを発現させないサンプルやアクセプタは存在するがドナーと結合しないことが既知のサンプルから計測できる. 調査対象サンプルのFRET効率は, そのドナー蛍光寿命値を $\tau_d^*$ として, (8)式から簡便に求められる.

### 3. フローサイトメータによる蛍光ダイナミクス計測

#### 3.1 概要

試作したフローサイトメータ (Flicyme<sup>®</sup>) の概要をFig.2に, 外観をPhoto1に, 仕様をTable1に示した. レーザ照射場に細胞を1粒子ずつ高速に流し, 発生した蛍光を光学フィルタで分光し波長域ごとの蛍光を電気信号に変換して処理する. レーザ出力を高速で正弦波状に変化 (振幅変調) させ, 放射された蛍光正

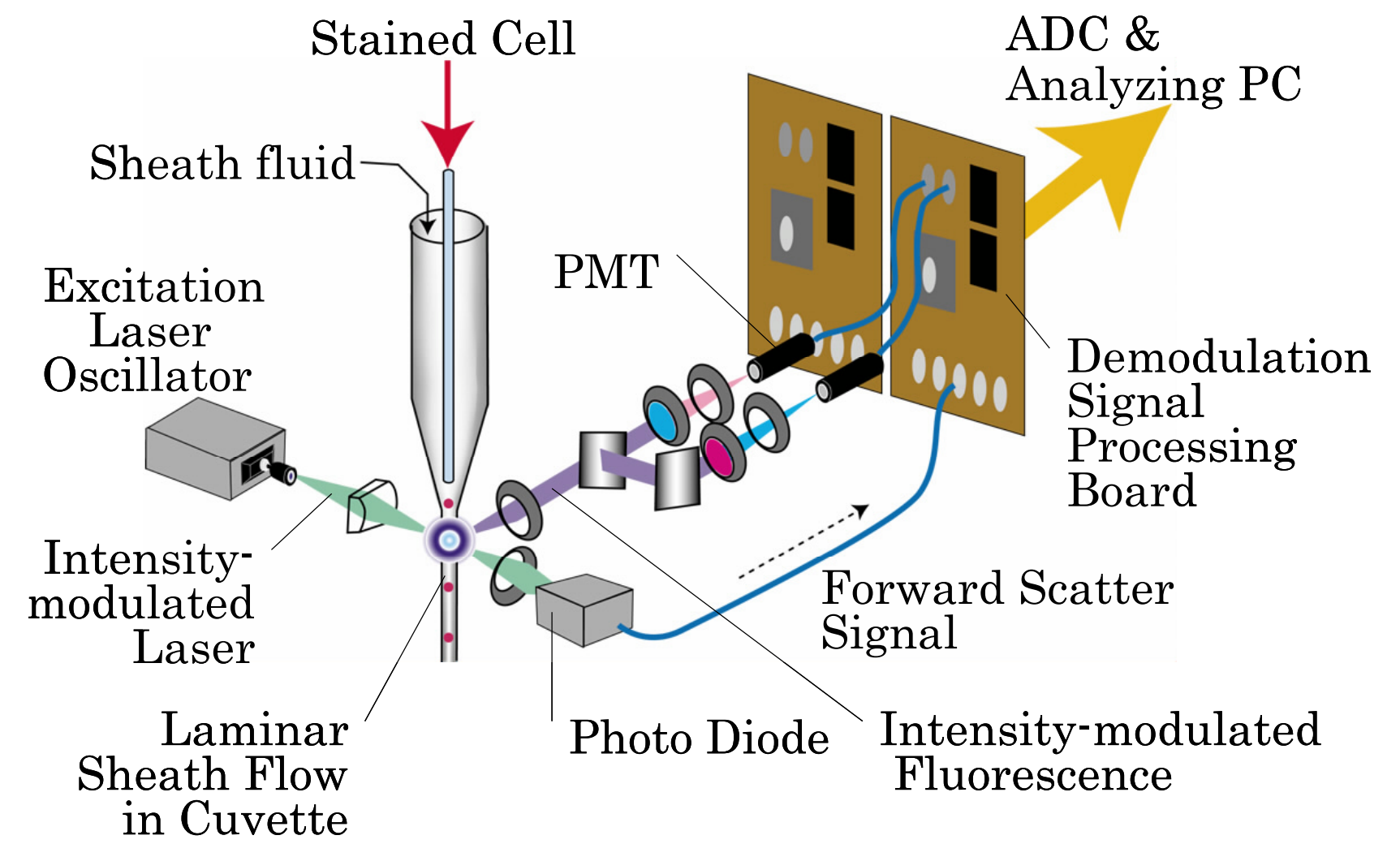


Fig.2 Measurement System of Flicyme<sup>®</sup>

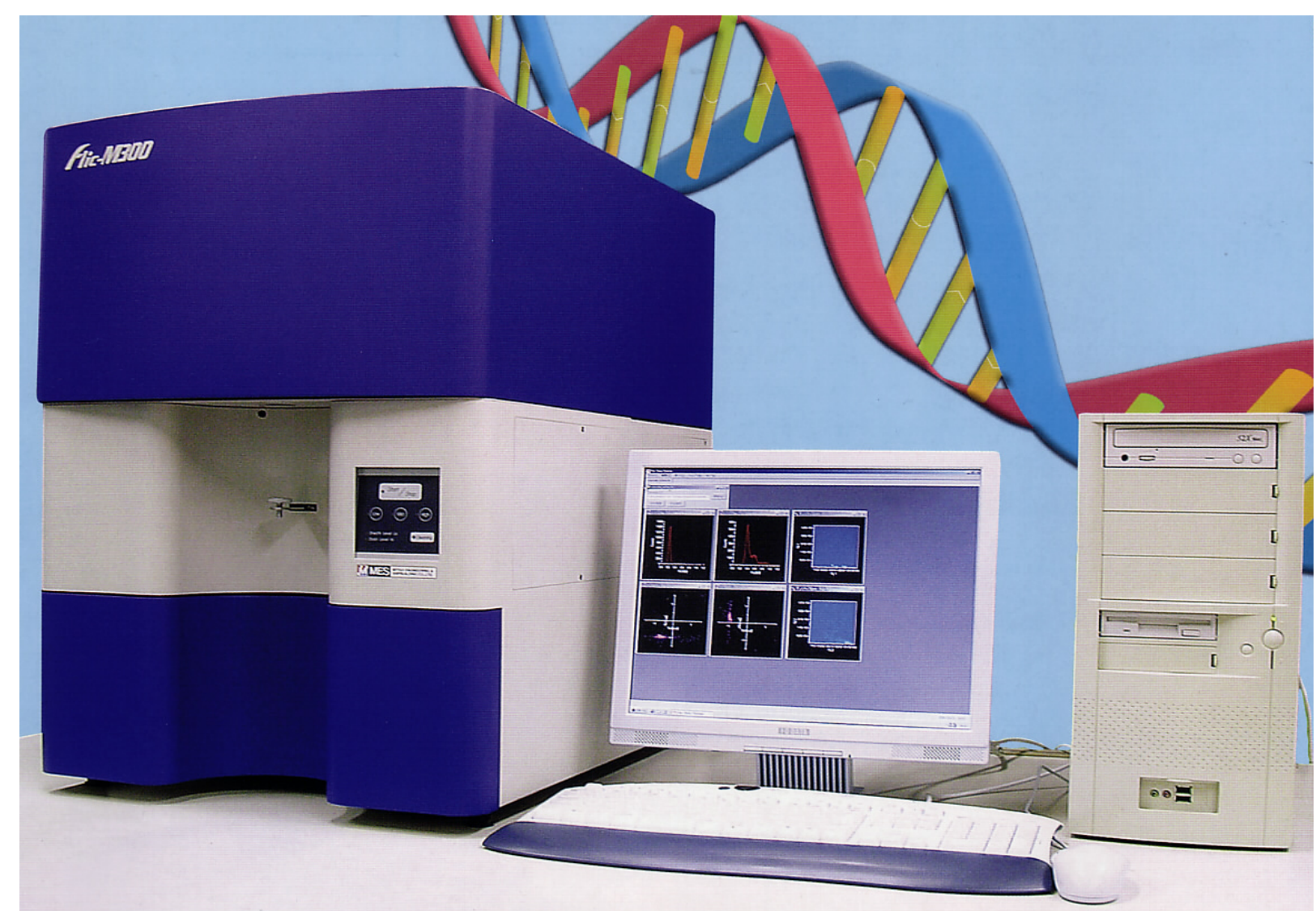


Photo 1 Appearance of Flicyme<sup>®</sup>

弦波信号を復調することにより, 蛍光強度信号の振幅と位相を1細胞ごとに検出できる構成となっている. すなわち, (6), (7)式の伝達関数の周波数応答を検出できることになる. 位相差法に基づく信号処理回路は, レーザ励起信号と蛍光信号の相互相関を計測し, それらの位相差と振幅値を求めるもので, 弊社でこれまでに開発したマルチパスリニアアレイレーダ<sup>12)</sup>の技術をベースとしている.

レーザのパワー $u(t)$ に角周波数 $\omega_M$ の正弦波を与えた時の蛍光信号は同じ角周波数をもつ正弦波で出力される. 入力信号と出力信号の振幅の比および位相差は, (6), (7)式で $s = j\omega_M$ とした時の複素平面上のベクトル和として以下のように表現される.

$$\frac{F_{donor}(s)}{U(s)} = P_d e^{j\theta_d} \quad (11)$$

$$\frac{F_{acceptor}(s)}{U(s)} = P_t e^{j\theta_t} + P_a e^{j\theta_a} + P_{ba} e^{j\theta_{ba}} \quad (12)$$

ここで,

$$P_d = \frac{k_{df} N_d 0 \tau_d^*}{\sqrt{1 + (\tau_d^* \omega_M)^2}}, \quad \theta_d = -\tan^{-1} \tau_d^* \omega_M$$

$$P_t = k_{af} \frac{k_t \tau_a}{\sqrt{1 + (\tau_a \omega_M)^2}} \frac{N_d 0 \tau_d^*}{\sqrt{1 + (\tau_d^* \omega_M)^2}}$$

$$, \quad \theta_t = -\left( \tan^{-1} \tau_a \omega_M + \tan^{-1} \tau_d^* \omega_M \right) = -\tan^{-1} \frac{(\tau_a + \tau_d^*) \omega_M}{1 - \tau_a \tau_d^* \omega_M^2}$$

$$P_a = \frac{k_{af} N_a 0 \tau_a}{\sqrt{1 + (\tau_a \omega_M)^2}}, \quad \theta_a = -\tan^{-1} \tau_a \omega_M$$

$$P_{da} = \frac{k_{daf} N_{da} 0 \tau_{da}}{\sqrt{1 + (\tau_{da} \omega_M)^2}}, \quad \theta_{da} = -\tan^{-1} \tau_{da} \omega_M$$

となる。

Flicyme®を使用することにより、そのドナー波長領域の検出チャンネル (Ch) から(11)式の振幅値 $P_d$ と位相角 $\theta_d$ が1細胞ごとに計測される。以上の式から、蛍光強度が振幅値 $P_d$ から求められ、ドナー蛍光寿命 $\tau_d^*$ が位相角 $\theta_d$ から次式により求められる。

$$\tau_d^* = -\tan \theta_d / \omega_M \quad (13)$$

(12)式の右辺第1項はFRETにより増加する蛍光、第2項はアクセプタがドナー励起レーザーにより直接励起される蛍光、第3項はドナー蛍光がアクセプタChへ漏れ込む蛍光であり、アクセプタ波長領域の検出Chから計測される情報は、これらのベクトル和の振幅と位相角になる。したがって、アクセプタ波長領域の蛍光を分析することにより多面的な参考情報が得られるが、直接励起蛍光や漏れ込み蛍光の影響を受けてしまうので、精度よく解析するためには、蛍光補正 (キャリブレーション) が必要である。現在蛍光強度情報を利用したFRET解析で主に利用されているレシオメトリーは、蛍光発現量 (標識量) の変動の影響を緩和するために、アクセプタ蛍光強度をドナー蛍光強度で割った比を以って評価されているが、ドナーとアクセプタの標識量が1対1とは限らない分子間FRETの系では、複雑な補正が必要であるなどシグナルノイズ比が上がりにくい理由となっている。

### 3.2 精度試験

蛍光情報からFRETを検出するためには、高分解、高精度な計測が必要とされる。装置のレーザー、光電子増倍管(PMT)、信号処理モジュールを組合せた特性試験を実施し、蛍光寿命計測の精度を推定した。

実際に使用するレーザー、PMT、信号処理モジュールを使用し、Fig.3に示すレーザーと光電子増倍管を対向させる実験系を構築した。変化した走行距離 $\Delta x$ 、等価蛍光寿命 $\Delta \tau$ と位相差 $\Delta \theta$ との間に以下の(14)式の関係が成り立ち、位相差が小さい場合は(13)式と同等な評価が可能である。(c:光速)

Table 1 Specifications of Flicyme®

Light Source	Laser Diode 407nm, 60mW
Detection Parameter	Scattering Light 2 Ch Fluorescence Intensity 3 Ch Fluorescence Lifetime 3 Ch
Detector	Forward Scatter : Photo Diode Side Scatter : PMT Fluorescence : PMT
Wavelength of Detection	482/35nm (for CFP,AG etc.) 542/30nm (for YFP etc.) or 579/34nm (for KO etc.) 650 Long Pass (for Keima etc.)
Sample Flow Rate	6 m/s
Sample Flow Volume	Lo: 40 $\mu$ L/min Mid: 80 $\mu$ L/min Hi: 160 $\mu$ L/min
Maximum Acquisition Rate	10,000 events/s
Frequency of Modulation	28MHz
Size	500(W) $\times$ 675(D) $\times$ 700(H)

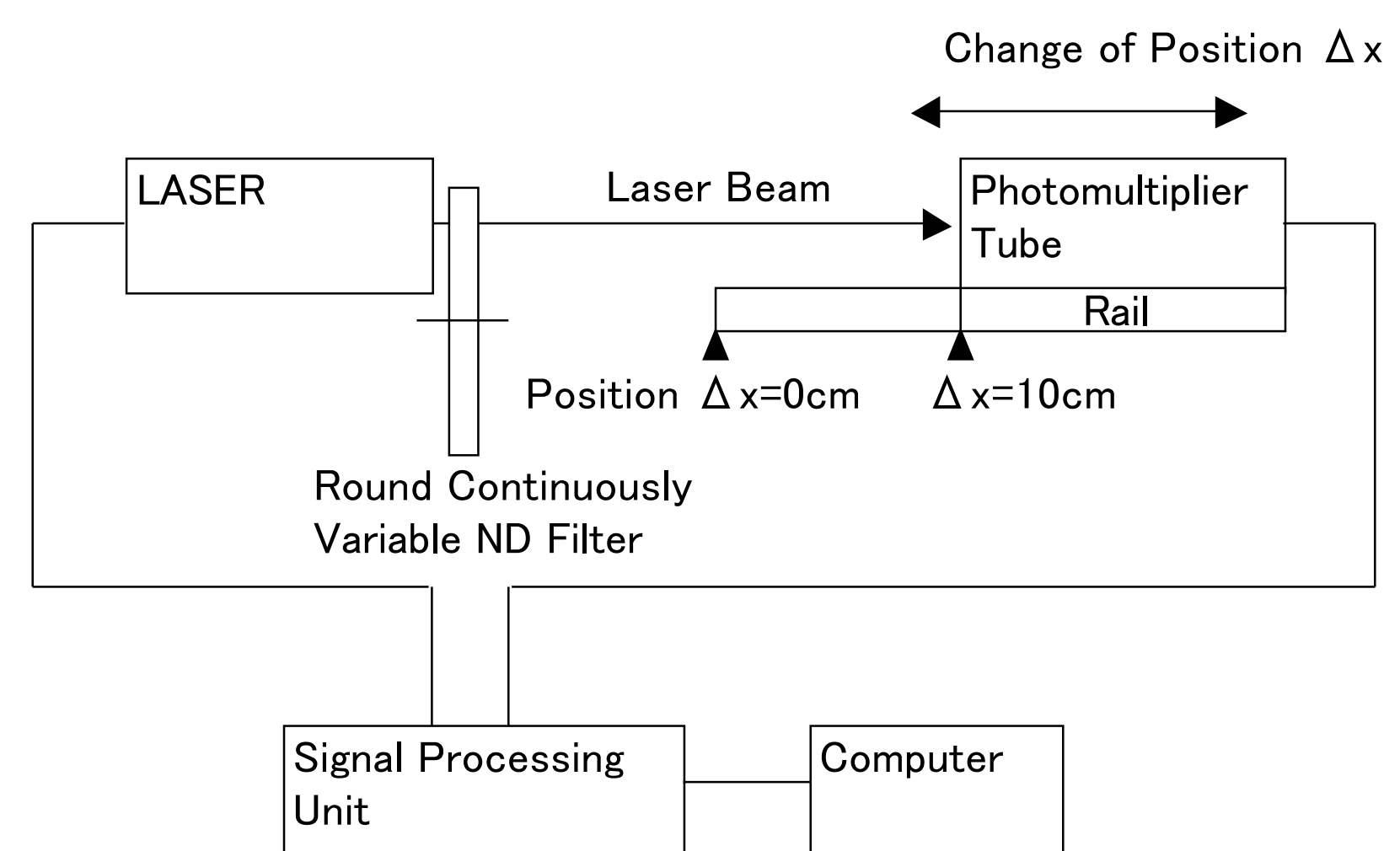


Fig.3 Block Diagram of Accuracy Measurement Test

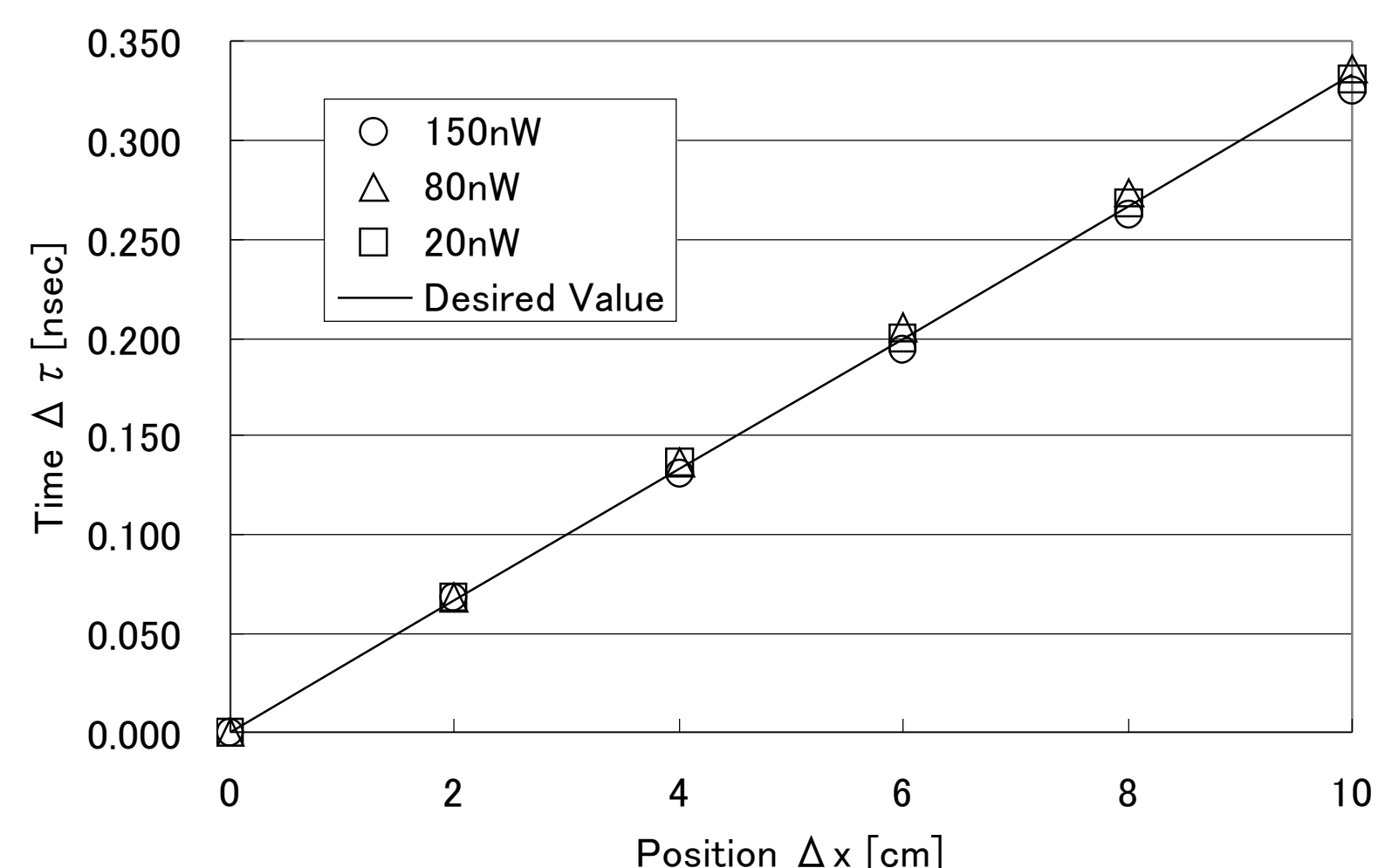


Fig.4 Variance of Laser-PMT Interval VS Equivalent Lifetime

$$\Delta\theta = \frac{\omega_M}{c} \cdot \Delta x = \omega_M \cdot \Delta\tau \quad (14)$$

走行距離を0から10cmまで変化させた時の等価蛍光寿命をFig.4に示す。プロット値は、実際に粒子がレーザー照射場を通過する時間20 $\mu$  secの計測を10,000回繰り返した統計データの中央値であり、直線は光速から求めた理想値を示す。Fig.4より、各プロット値は光強度に関わらず理想値と良い一致を示していることがわかる。また、この計測結果から、距離約5mmに相当する0.02nsec程度の時間精度が得られていると考えられる。

Fig.5に各光強度における光の走行距離の変化量 $\Delta x$ と位相角 $\theta$ の箱髭図を示す。上下に伸びた線分である髭の末端は最大、最小を表し、統計データの25%に相当する第1四分位と75%に相当する第3四分位を箱の上下辺で表現しており+記号は中央値を示す。この結果から光強度が弱くなるにつれ、位相角統計データの分散が大きくなることがわかる。これは、光強度が弱くなることは計測系が内包する熱雑音成分に比べ相対的に信号成分が小さくなることに起因していると思われる、妥当な結果であると考えられる。また、統計データの中央値はFig.4に示したようにほとんど変化していないことがわかる。

#### 4. 試験結果

##### 4.1 分子間 (2分子) FRETの計測結果

2つのタンパク質分子間の結合を生細胞で調査するのに適した分子間FRETの構成をFig.6に示す。細胞サンプルは、浮遊系の細胞293Fに癌遺伝子産物であるRasとRasのエフェクター分子であるセリン・スレオニンリン酸化酵素Rafをそれぞれドナー (AG:Azami-Green 変異体)<sup>13</sup>とアクセプタ (KO:Kusabira -Orange 変異体)<sup>14</sup>の蛍光タンパク質とともに細胞内に発現させたものである。FRETが発生することが知られているポジティブコントロール (No.1) として RasV12 (Rasの恒常活性化型変異体でRafと結合することができる) を使用したものを、比較対象 (ネガティブコントロール) としてアクセプタ側にRafが存在しないもの (No.2)、および RasN17 (ドミナントネガティブ型Ras) を使用したもの (No.3) を用意した<sup>8</sup>。10万細胞の計測結果をFig.7に示す。上段のFig.7(a)~(c)は、それぞれのドナー、アクセプタの蛍光波長帯域に対応した蛍光強度のカラーデンスティプロットである。ドナー用として中心波長482nm半値幅35nm、アクセプタ用として中心波長579nm半値幅34nmのバンドパスフィルタを使用している。下段左のFig.7(d)は、細胞の大きさに比例する前方散乱光強度のヒストグラムであり、No.1~3でほぼ同等の細胞が流れていることが確認できる。Fig.7(a)~(c)で蛍光タンパク質が多く発現している細胞集団を選択し、それらについてレシオメトリー (アクセプタ領域蛍光強度/ドナー領域蛍光強度) を計算したものをFig.7(e)に、ドナー領域の蛍光寿命を計算したものをFig.7(f)に示した。蛍光寿命ヒストグラムの横軸は10nsを1023ChとしたCh値で表現している。2種のネガティブサンプルのデータはほとんど重なっており計測の再現性が確認されている。またFRETが発生すると予想さ

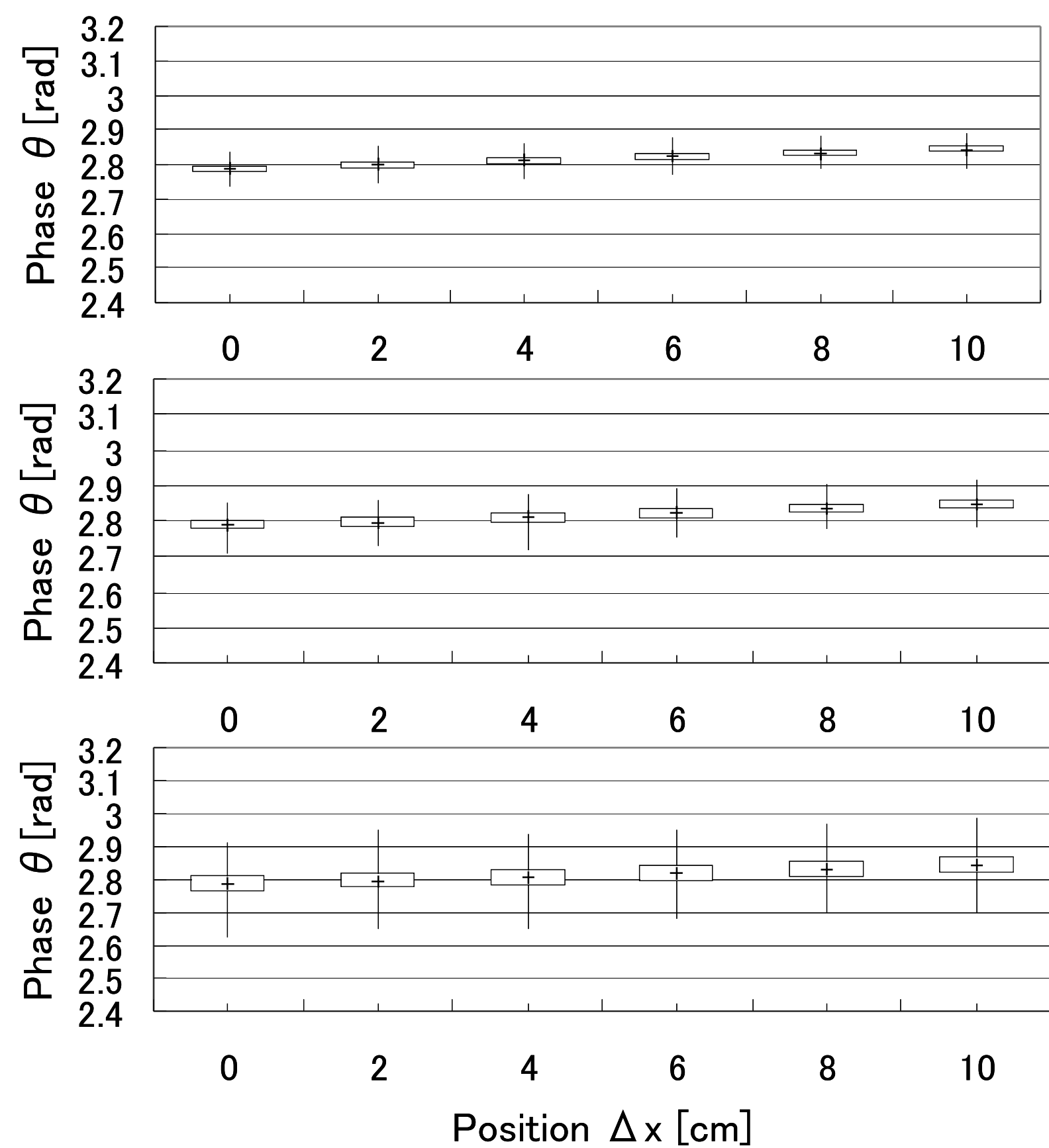


Fig.5 Box-and-Whisker Plot of Phase Angle

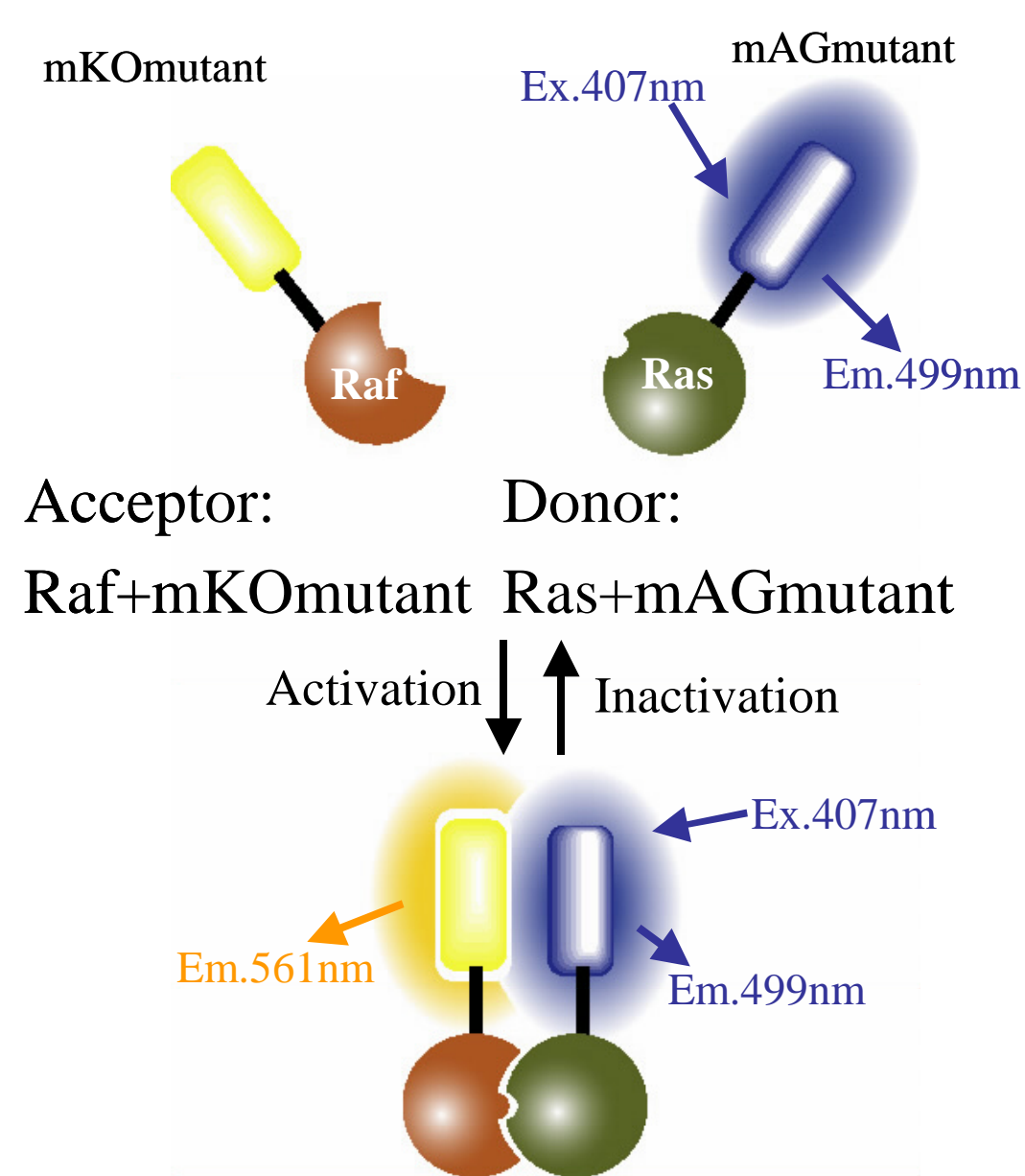


Fig.6 Architectonics of Ras-Raf intermolecular FRET

れた No.1 のデータは、レシオメトリーが増加する方向へ、ドナー領域の蛍光寿命も 0.22nsec 程度短くなる方向へシフトし、FRETが発生していることが計測されている。蛍光寿命のシフト値から(8)式を利用してFRET効率を求めると5.5%と計算された。

##### 4.2 分子内 (1分子) FRETの計測結果

細胞内の状態変化によりタンパク質の構造が変化したかどうかを調査するFRETプローブが種々開発されてきている。ここでは、Fig.8に示したRaichu (Ras and interacting protein chimeric

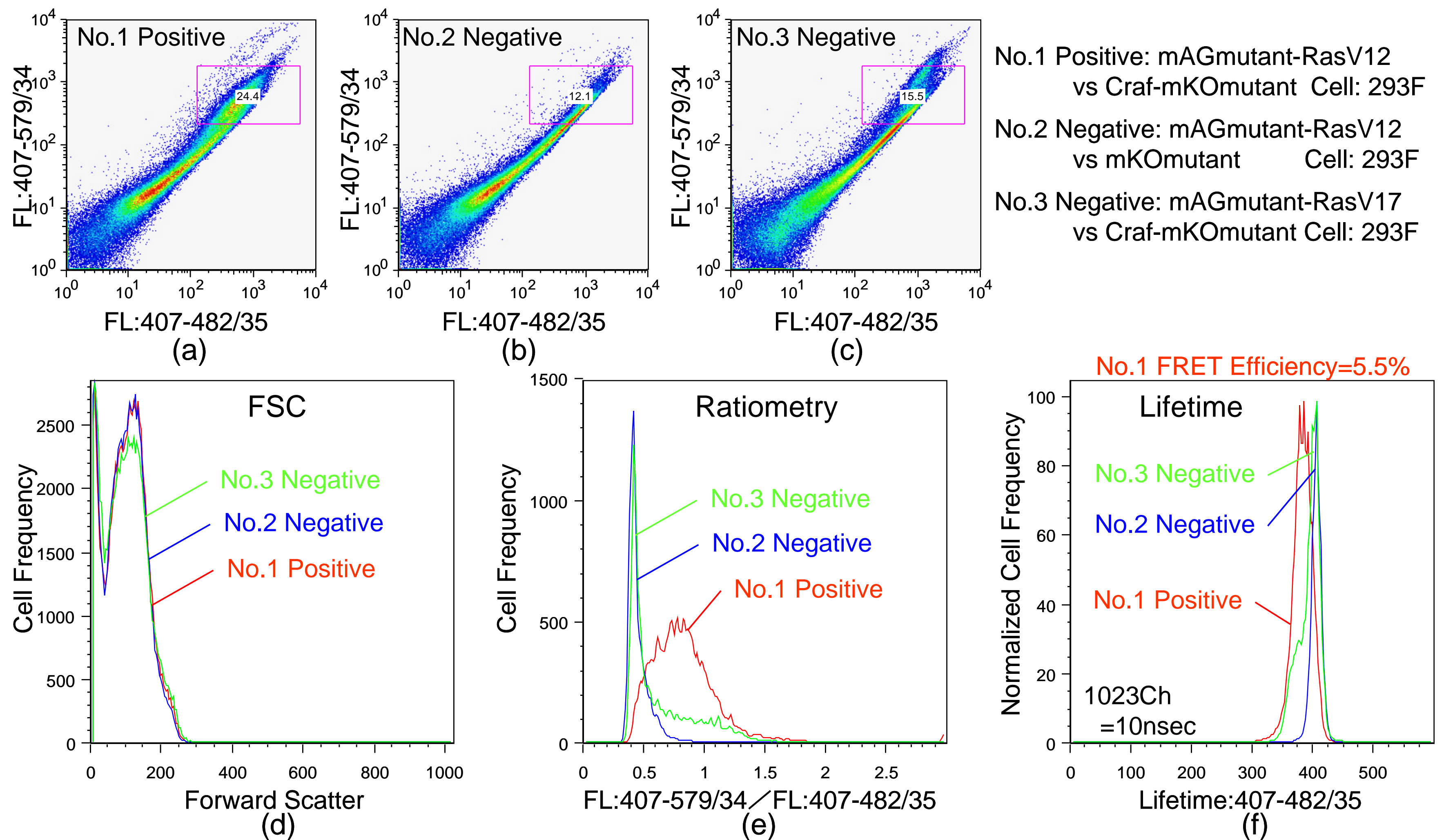


Fig.7 Experimental results of Flicyme® for intermolecular FRET

unit)<sup>15)</sup> と呼ばれる Ras スーパーファミリーG タンパクの活性化モニターを利用した試験について述べる. 前節と同じ mAG 変異体 mKO 変異体を使用し 3 種のサンプルについて比較検討を行なう. ポジティブコントロールとして RasV12-Raf を組合せたもの (No.4), および RasWT-Raf の組合せに Ras の活性化因子 mSos を加え FRET が起きるようにしたもの (No.5), ネガティブコントロールとして活性化因子が存在しなければ構造変化が起こらない RasWT-Raf を組合せたもの (No.6) を準備した.

10 万個の細胞に対して計測を実施した結果を Fig.7 と同じ表現で Fig.9 に示す. No.6 のネガティブサンプルに対して, 2 種のポジティブサンプル (No.4,5) の FRET 発生を計測できていることを確認した. 蛍光寿命ヒストグラムのピークシフトから FRET 効率を計算すると, No.4 が 8.5%, No.5 が 14.3% と推定された. このことは, 恒常的に活性化 RasV12 を使用した分子間相互作用よりも活性化因子 mSos が存在する場合の相互作用の方が強いことが予測されるもので, 妥当な結果であると考えられる. レシオメトリーによるヒストグラムからもほぼ同様な結果が得られている.

## 5. 結果の考察

分子間相互作用および分子内相互作用の 2 ケースについて, 高速に流しながら細胞内の蛍光情報からその蛍光寿命を計測し, その変化から細胞内での FRET の発生有無を検出する試

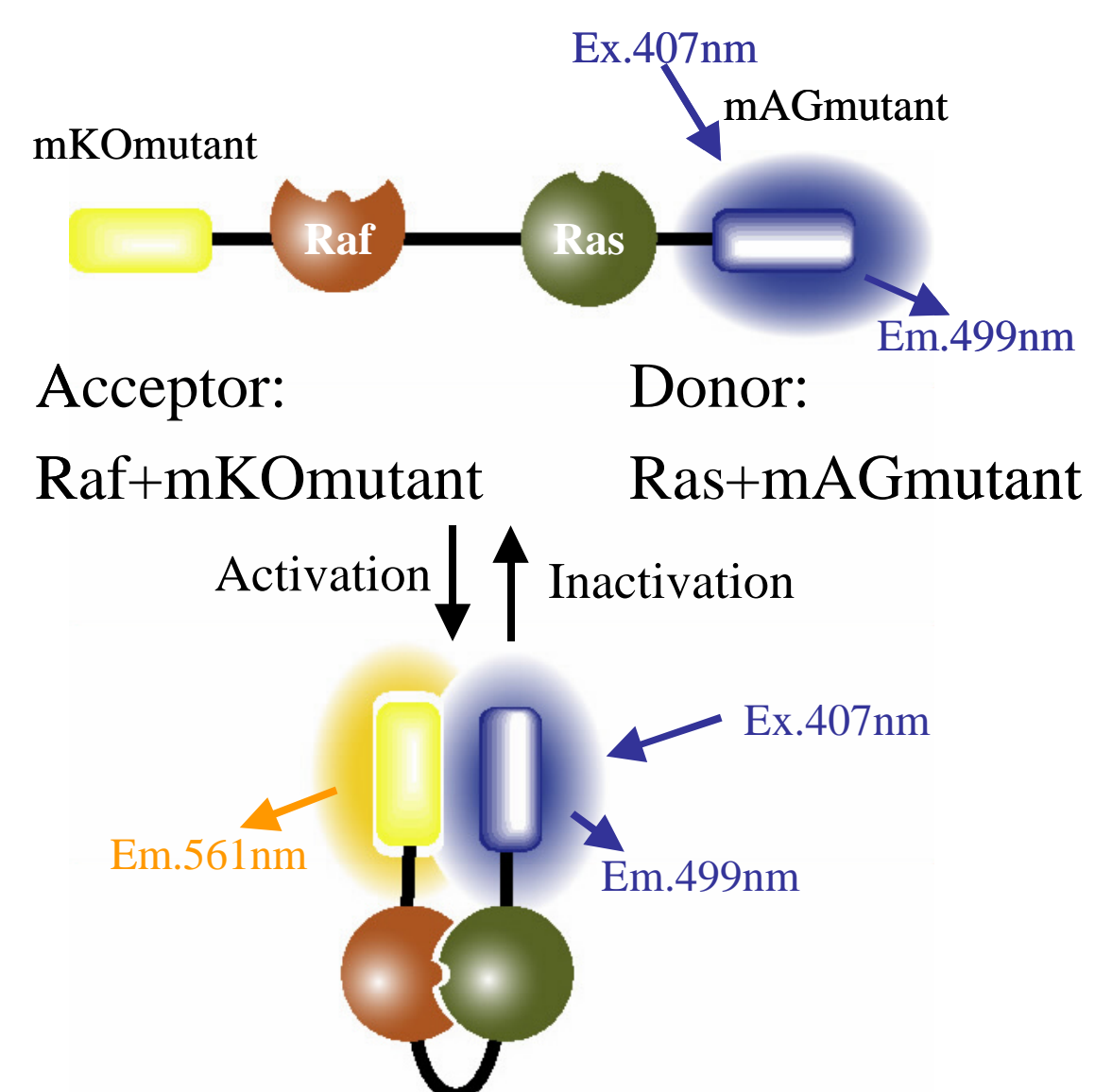


Fig.8 Architectonics of Ras-Raf intramolecular FRET

験を実施した. 4 章の実証試験で得られた蛍光強度は, 3.2 節で調査した光強度 20~150nW の範囲内であり, 蛍光寿命は 0.02nsec 程度の精度で計測できていると考えられる. この結果からドナー蛍光寿命の短縮による FRET 検出の有効性が実証されたと考えられる. また, レシオメトリーの情報に加えて, 蛍光寿命情報を計測することにより多面的な評価となり, より確実な検出につながる事が考えられる.

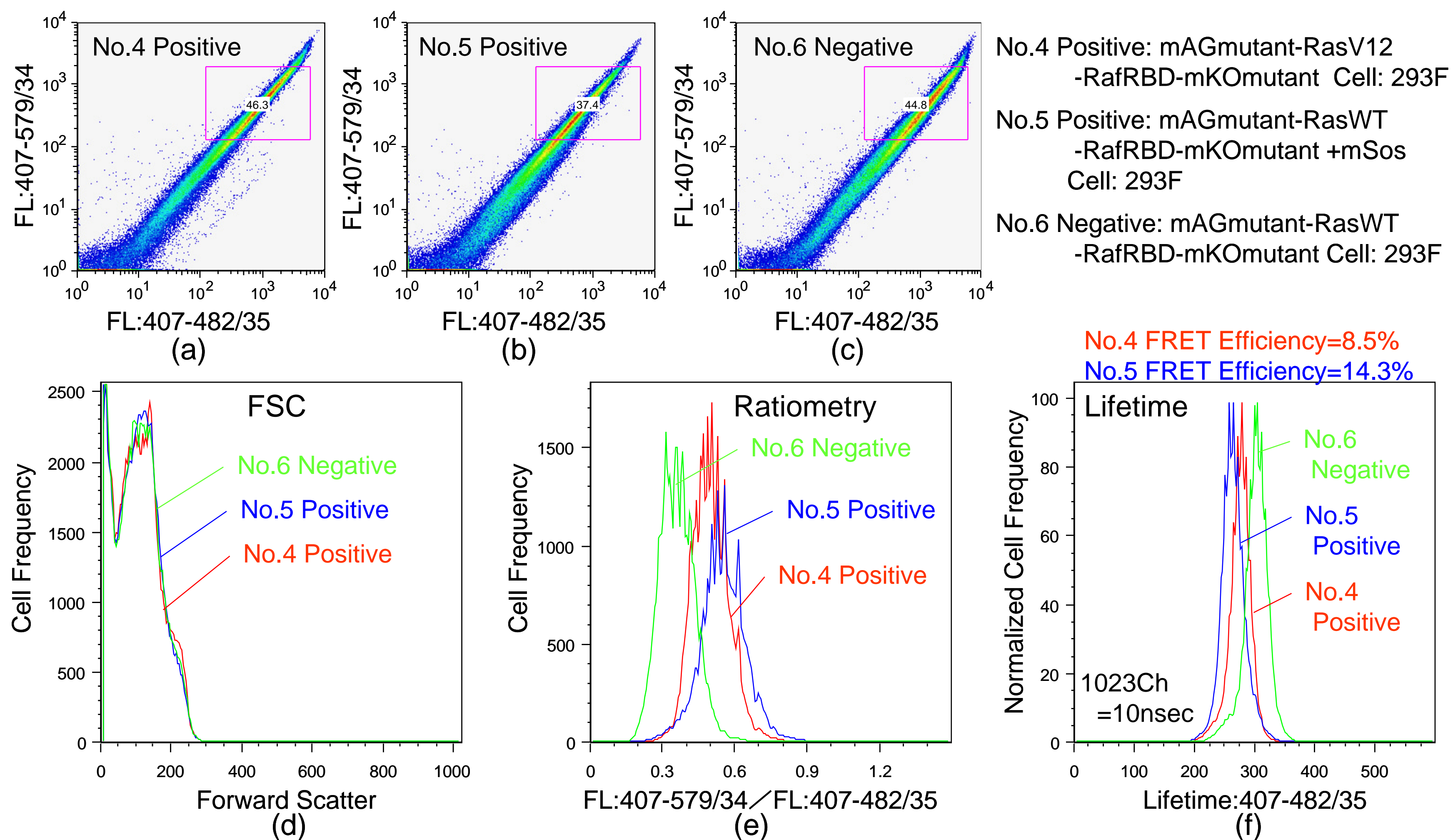


Fig.9 Experimental results of Flicyme® for intramolecular FRET

Flicyme®で計測できるのは、細胞から出射される蛍光全体から求められる蛍光寿命であり、平均的な FRET 効率である。多成分系の蛍光分子の場合は、各成分の強度で重み付けした平均値(ベクトル和)が求められる。FRET の検出と概略の FRET 効率を把握する目的には、これらの平均的な蛍光寿命が有益な情報に成り得ると考えられる。

また、蛍光分子が標識された対象分子のうちすべてが結合するとは限らず、対象分子の内どの程度の割合の分子が結合したのか調査したい場合には、FRET を起した分子のみの FRET 効率(最大 FRET 効率)を求める必要がある<sup>16)</sup>。この場合は、同条件のサンプルで発現量を増加させ FRET 効率の飽和点を最大 FRET 効率として推定する方法が使用できる。

## 6. まとめ

位相法を応用し、細胞を高速で流しながら1細胞ごとの蛍光寿命を計測できる装置を試作し、その分解能・精度について述べ、細胞内での FRET 現象を検出できることを実証した。毎秒数千細胞の計測スピードで 0.02nsec 程度の蛍光寿命精度が得られ、簡便に FRET に関する定量的な情報が得られることが確認できた。

また、従来の蛍光強度のみで行なう手法と比較して、蛍光寿命情報を組合せることにより多面的な情報となり、より確実な検出となることが期待される。特に、分子間 FRET の検出系ではドナーとアクセプタの蛍光分子を等量発現させることは

困難であり、蛍光強度のみの評価ではこの不確定要素の影響を受ける可能性がある。タンパク質相互作用解明に応用範囲が広く重要な分子間 FRET がより使い易くなる効果を期待できる。

これらの成果により、細胞内のたんぱく質相互作用の効率的かつ確実なハイスループットスクリーニングに利用できるものと考えられる。

さらに、最近では3種の蛍光タンパクを使用し2段階のエネルギー移動を検出した研究も行われ始めた<sup>17)</sup>。細胞内の複数の FRET 現象を同時に検出する場合、従来の方法ではドナー、アクセプタの両方の蛍光を観測する必要があった。本手法は、ドナー蛍光のみで FRET 検出が可能であり、よりシンプルなマルチ FRET 系の構築に利用できるものと期待される。

## 謝 辞

本研究で用いた細胞サンプルは京都大学医学研究科 松田道行教授にご提供いただき、FRET 検出への多大なるご指導をいただいた。また、蛍光タンパク質については理化学研究所 宮脇敦史博士、Amalgaam(有)殿にご協力いただき、計測結果についてもご議論、ご指導をいただいた。ここに記して深甚なる謝意を表します。

[ 参 考 文 献 ]

- 1) 竹縄忠臣:タンパク質相互作用研究のストラテジー, バイオテクノロジージャーナル, 5-5-6, 670/673, (2005)
- 2) Yasuda K: On-Chip single-cell-based microcultivation method for analysis of genetic information and epigenetic correlation of cells, J. molecular recognition, 17-3, 186/193, (2004)
- 3) Andrews David L., Demidov Andrey A.: Resonance Energy Transfer, Wiley, (1999)
- 4) Cristobal G. D. Remedios, Pierre D.J. Moens: Fluorescence Resonance Energy Transfer Spectroscopy is a reliable "Ruler" for measuring structural changes in proteins, J. Struct. Biol., 115, 175/185, (1995)
- 5) Nathan C Shaner, Paul A Steinbach & Roger Y Tsien: A guide to choosing fluorescent proteins, Nature Methods, 2-12, 905/909, (2005)
- 6) Miyawaki A. et.al: Fluorescent indicators for Ca<sup>2+</sup> based on green fluorescent proteins and calmodulin, Nature, 388-28, 882/887, (1997)
- 7) 松田道行: FRET イメージング技術がもたらす生命科学研究の革新, バイオテクノロジージャーナル, 6-1, 66/73, (2006)
- 8) 寺井, 松田:FACS による蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した分子プローブの活性測定, BD FACS™ Review, 3, (2005)
- 9) Annalee W Nguyen & Patrick S Daugherty: Evolutionary optimization of fluorescent proteins for intracellular FRET, Nature Biotechnology, 23-3, 355/360, (2005)
- 10) 木下, 御橋: 蛍光測定, 学会出版センター, 2/7, (1983)
- 11) Selvin P. R.: Fluorescence Resonance Energy Transfer, Methods in Enzymology, 246, 300/334, (1995)
- 12) 木村, 土井, 森, 弓井: コンクリート床版検査用3次元映像化レーダの開発, 三井造船技報, 174, 38/44, (2001)
- 13) Karasawa S., Araki T., Yamamoto-Hino M & Miyawaki A.: A green-emitting fluorescent protein from Galaxeidae coral and its monomeric version for use in fluorescent labeling, J. Biol. Chem., 278, 34167/34171, (2003)
- 14) Karasawa S., Araki T., Nagai T., Mizuno H.& Miyawaki A.: Cyan-emitting and orange-emitting fluorescent proteins as a donor/acceptor pair for fluorescence resonance energy transfer, Biochem. J. 381, 307/312, (2004)
- 15) Mochizuki N., Yamashita S., Kurokawa K., Ohba Y., Nagai T., Miyawaki A. & Matsuda M.: Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1, Nature, 411, 1065/1068, (2001)
- 16) 宮脇: 蛍光イメージング革命 第25回 FRET 定量ナビ(その1), 細胞工学, 24-11, (2005)
- 17) Emilia Galperin, Vladislav V Verkhusha & Alexander Sorkin: Three-chromophore FRET microscopy to analyze multiprotein interactions in living cells, Nature Methods, 1-3, 209/217, (2004)

[ 著 者 紹 介 ]

中 田 成 幸 (正会員)



1984年 岡山大学工学部生産機械工学科卒業  
同年 三井造船(株)入社. 玉野技術開発センター  
主管研究員, 機械力学, 制御システム機器  
の開発に従事, 日本機械学会, 日本サイトメトリ  
ー学会会員.

林 弘 能



1995年 徳島大学大学院工学研究科電気電子  
工学専攻修了, 同年 三井造船(株)入社,  
玉野技術開発センター 主任, 光・電子応用機  
器, 情報処理システムの開発に従事.

星 島 一 輝



1993年 徳島大学大学院工学研究科機械工学専  
攻修了, 同年 三井造船(株)入社, 玉野技術開  
発センター主任, 信号処理, 情報処理, 制御システ  
ム機器の開発に従事.

土 井 恭 二



1980年 東北大学工学部電気工学科卒業,  
同年 三井造船(株)入社, 玉野技術開発センタ  
ー主管研究員, 高周波技術の研究開発に従事,  
電子情報通信学会会員.

木 村 憲 明 (正会員)



1972年 大阪大学基礎工学部機械工学科卒業  
同年 三井造船(株)入社, 技術本部理事,  
流体解析ソフトウェア, マイクロ波・レーザ・プラズ  
マ機器の開発に従事, 応用物理学会会員,  
工学博士.