

総 説

Microscopic Fluorescence Resonance Energy Transfer 測定法の原理と問題点

村 田 晋 一, 望 月 邦 夫, 中 沢 匡 男,
近 藤 哲 夫, 中 村 暢 樹, 加 藤 良 平

山梨医科大学病理学第2

要 旨: 蛍光染色は, 特異性に高くかつ高感度であることから, 様々な組織細胞化学や分子生物学の研究に用いられてきた。蛍光特性の1つである Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) は, 適切な2種類の蛍光分子ペアが100 Å以下の距離に近接した時に生じるエネルギー移動であり, その解析は, 2つの分子の相対的位置関係, すなわち距離と方向性についての様々な情報を与えてくれる。近年, このFRETを顕微鏡下で視覚化するユニークな解析法, Microscopic FRET法が, 細胞内の様々な生理活性物質の局在や相互作用をオンゲストローム単位で解析できる手法として注目を浴びている。しかし, 顕微鏡下では, FRETの測定に様々な制約があるのみならず, 細胞内は光学的に多様であるために, FRETの発生に際して, 複雑な蛍光現象が起こっていると考えられる。本稿では, 緩衝液に溶解されたDNAと細胞核内DNA上で起こるFRET現象を, 蛍光強度と蛍光寿命の測定の二面から解析した結果を踏まえ, Microscopic FRET法の原理および問題点を提示する。

キーワード 蛍光共鳴エネルギー移動, 蛍光寿命, 顕微鏡, 細胞周期, DNA

はじめに

蛍光染色は, 特異性に高くかつ高感度であることから, 組織細胞化学や分子生物学の分野において, 細胞内でのDNAやRNA, あるいは様々な蛋白などの生理活性物質の研究に用いられてきた¹⁻⁸⁾。さらに, 近年では, 生理活性物質の局在のみならず細胞内での相互作用や分子構造の解析が, ますます重要性を増している。そこで, Fluorescence Resonance Energy Transfer (FRET) や蛍光寿命 (fluorescence lifetime) といった蛍光分子の局所環境の変化を調べる手法を応用して, 顕微鏡下でDNAや蛋白などの

相互作用や分子構造を調べる解析法が注目をあびている⁹⁻¹²⁾。

従来の蛍光強度を用いた手法では, 細胞内部分子の局所的濃度やその変化を捉えているにすぎない。FRETは, 適切な2種類の蛍光分子ペア (donor と acceptor) が100Å以下の距離に近接した時に生じる donor 蛍光分子と acceptor 分子の間に起こるエネルギー移動である¹³⁾。FRETは, 2つの蛍光分子間の距離に鋭敏であることから, 2つの分子の相対的位置関係, すなわち距離と方向性についての情報を与えるユニークな解析法となる。FRETの理論が確立されたのは, 古く1940年代に Förster による¹⁴⁾。その後, Stryer や Haugland らによる総説が出て以降, 主に液状検体を用いた研究に応用されてきた^{15,16)}。近年, 分子生物学的技術の発展,

〒409-3898 山梨県中巨摩郡玉穂町下河東1110

受付: 2001年9月18日

受理: 2001年9月19日

green fluorescent protein (GFP) など様々な新しい蛍光色素の発見, 高感度低ノイズカメラの開発に伴い, 顕微鏡下で FRET を観察すること (Microscopic FRET 法) が可能となり, 細胞内・組織上での様々な分子間の相互作用を可視化する手段として応用され始めた^{9,10)}。一方, 蛍光寿命の測定は, 蛍光強度の測定とは異なり, フォトブリーチングの影響を受けない, 蛍光分子の濃度に左右されない, FRET など蛍光分子の環境の変化に鋭敏である, などの長所がある^{11,12,13)}。本稿では, 蛍光強度と蛍光寿命の測定の二面から, 緩衝液に溶解された DNA と細胞核内 DNA 上で起こる FRET の解析を行い, Microscopic FRET 法の原理および問題点を提示する。

蛍光発光の原理と蛍光減衰曲線

まず, FRET の原理を説明する前に, 蛍光発光の原理を簡略に示す^{13,17)}。よく知られているように, 基底状態にある蛍光分子は, 光子 (励起光) からエネルギーを吸収し, 励起状態に遷移した後, 分子内緩和によりエネルギーを失い (一次励起状態), 再び基底状態に戻る。この過程で, 蛍光分子は発光遷移 (蛍光発光) と無放射遷移という競合するエネルギー放出を行う (図 1a))。いま, 時刻 $t = 0$ で一次励起状態にある単一種類の蛍光分子が N_0 個単位体積中に存在し, 蛍光強度が I_0 であったとする。発光遷移と無放射遷移の速度定数をそれぞれ k_f , k_{nr} として, ある時刻 t に励起状態に残っている分子の数を $N(t)$ とすると蛍光強度の時間変化すなわち蛍光減衰曲線 $I(t)$ は,

$$\begin{aligned}
 I(t) &= k_f N(t) \\
 &= k_f N_0 \exp[-(k_f + k_{nr})t] \\
 &= I_0 \exp(-t/\tau) \dots \dots \dots (1)
 \end{aligned}$$

で表される。ここで,

$$k_f + k_{nr} = 1/\tau \dots \dots \dots (2)$$

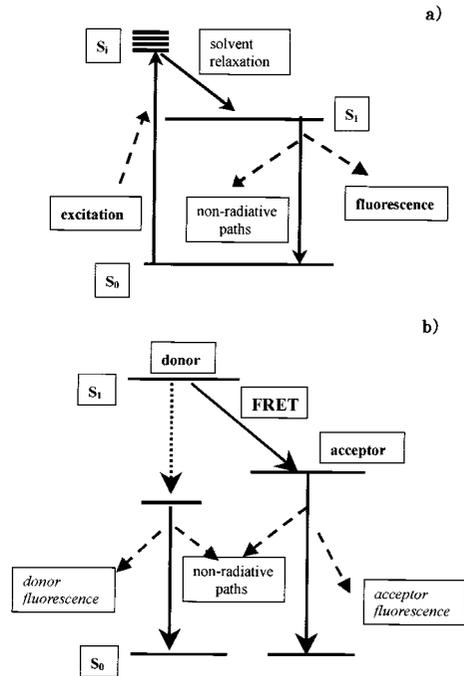


図 1 . 蛍光発光の原理。
a) FRET のない状態, b) FRET の起こった状態

で定義される時定数 τ が, 蛍光寿命 (fluorescence lifetime) である。蛍光減衰曲線 $I(t)$ や蛍光寿命 τ は, 蛍光分子の特性を表す基本であり, 後述する FRET の解析においても重要な指標となる。

蛍光減衰や蛍光寿命を測定する主な方法には, time-domain 法と frequency-domain 法がある¹³⁾。前者は, 発生する蛍光光子の数をフォトマルチプライアーで測定する方法である。後者は, 励起光の強度を周波数 (ω) で周期的に変化させると, それによって発光する蛍光が, 蛍光寿命固有の時相 (ϕ) のずれと振幅 (m) の減少を示す性質 (図 2) を応用したものであり, 次の数式によって求められる^{11,12)}。

$$\tau_\phi = \omega^{-1} \tan \phi \dots \dots \dots (3)$$

$$\tau_m = \omega^{-1} \left[\frac{1}{m^2} - 1 \right]^{1/2} \dots \dots \dots (4)$$

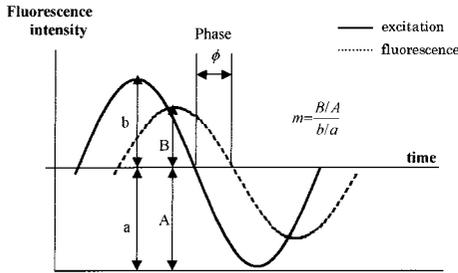


図2. frequency-domain 法による蛍光寿命測定
の原理。励起光の強弱を周波数 (ω) で
周期的変化させると、それによって発光
する蛍光が、蛍光寿命固有の時相 (ϕ) の
ずれと振幅 (m) の減少を示す。

ここで、 τ_ϕ は時相のずれから得られた蛍光寿命
(phase lifetime) であり、 τ_m は振幅の減少から
得られた蛍光寿命 (modulation lifetime) である。
蛍光が単一の蛍光寿命を示す分子から成っ
ている場合、 $\tau_\phi = \tau_m$ である。蛍光寿命測定は、
蛍光強度測定とは異なり、蛍光分子の濃度に左
右されない。また、蛍光寿命は、蛍光分子の環
境の変化を鋭敏に捉えるために、FRET 測定や
解析に適している。

FRET の原理

FRET は、蛍光分子 (donor) が一次励起状
態から基底状態に戻る過程に別の種類の蛍光分
子 (acceptor) が近傍に存在する場合に起こる
(図1b)¹³⁻¹⁷⁾。すなわち、最初に励起された
donor が一次励起状態から基底状態に移する
過程で、発光を起す前に、そのエネルギーの一
部が acceptor に移動 (FRET) する。FRET を
起す donor と acceptor の関係には、donor 蛍
光分子と acceptor 分子が 1 対 1 である single
donor and acceptor model と、1 つの donor 蛍
光分子に複数の acceptor 分子が存在する multi
ple acceptor model がある¹³⁾。single donor and
acceptor model は最も単純な系で、Förster 以
来、詳細に解析されている¹⁸⁾。ここでは、single
donor and acceptor model を念頭に FRET
の原理を説明する。Förster によると¹⁹⁾、

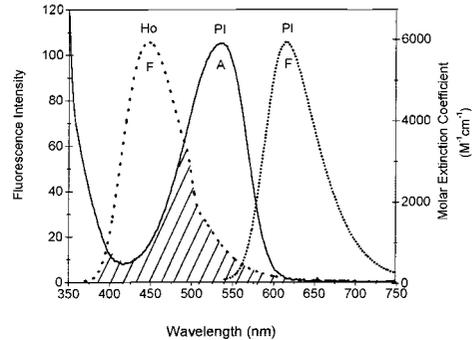


図3. 緩衝液に溶解した DNA にラベルされた
Ho と PI の吸収 (A) および蛍光 (F)
スペクトラム。斜線部は spectral overlap
(donor の蛍光スペクトルと acceptor の
吸収光スペクトルの重なり) を示す。(文
献 23) より引用。)

$$k_{ret} = \left\{ \frac{9000 (\ln 10)}{128 \pi^5 n^4 N_A} \cdot \frac{\kappa^2}{r^6} \cdot J \right\} k_r \cdots (5)$$

の関係がある。ここで、 n は溶媒の屈折率、 N_A
はアボガドロ数 (6.022×10^{23})、 κ^2 は配向因子
(orientation factor)、 J は spectral overlap
(donor の蛍光スペクトルと acceptor の吸収
光スペクトルの重なり)、 r は donor と accep
tor の分子間距離を表す。この数式に示される
ように、FRET が起こるには、donor 蛍光分子
の蛍光波長と acceptor 分子の吸収光波長の波
長領域に重なり (spectral overlap) が存在し
(図3)、かつ、donor と acceptor が 100\AA 以下
の距離に近接することが必要である。ただし、
acceptor が非蛍光分子でも上記条件を満たせ
ば、FRET は起こる。さらに式 (5) より、 k_{ret}
は donor と acceptor 間の距離 r の 6 乗で減少
し、FRET が donor と acceptor の距離に対して
鋭敏に変化することがわかる。

一方、multiple acceptor model では、一つの
donor と複数の acceptors の間の距離のみなら
ず空間的位置関係が FRET に影響を与えるた
めに、複雑な蛍光減衰が認められる¹³⁾。donor と
acceptor の空間的位置関係には、様々な場合が
想定される。最も単純なものは、donor と accep
tor に特別な位置関係がなく、一次元や二

次元,あるいは三次元に不規則に分布している場合である。Lakowiczらは, Blumenの次元モデル²⁰⁾から想定された蛍光減衰式を用いて, 様々な次元の検体の解析を行っている^{21,22)}。Blumenの次元モデルに基づく解析によると, Tris-HCl 緩衝液に溶解されたDNA上にラベルされた2種類のDNA色素, Hoechst (Ho; donor)とPropidium iodide (PI; acceptor)の間に起こるFRETは一次元空間で起こる²³⁾。図3に示されるように, Hoの蛍光スペクトルとPIの吸収光スペクトルの重なりは大きく(Förster distance (R_0)¹³⁾ = 35.7Å), HoとPIはFRETを発生する適切なdonor-acceptor pairである²³⁾。このような適切なdonor-acceptor pairによるmultiple acceptor modelでは, 1つのdonor蛍光分子は, 100Å以内の距離に存在するどのacceptor分子にもエネルギーを移動する確率がある。よって, Ho (donor)の濃度を一定にして, PI (acceptor)の濃度を増加

させると, Hoとの距離が短いPI分子が一次元空間内に増加するために, より強いFRETが起こり, donorの蛍光強度はより減少する(図4²³⁾)。donorの蛍光寿命も同様の原理で, PIの濃度が増加するに従ってより短くなる(表²³⁾)。

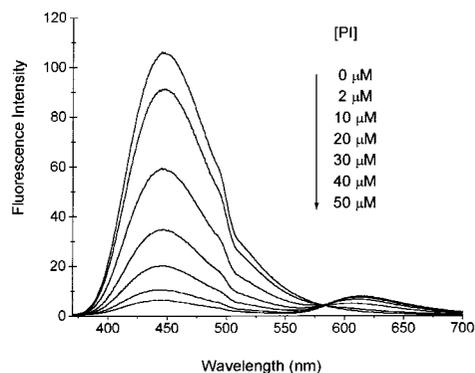


図4. 緩衝液に溶解したDNA (200 μM) 上のHo (4 μM)とPIの間に起こるFRET. PIの濃度変化 (0, 2, 10, 20, 30, 40, 50 μM)に伴い蛍光スペクトラムは変化する。励起波長は350nmである。(文献23)より引用。)

表. PIの濃度変化に伴うHoの蛍光寿命コンポーネント解析。励起波長は350nmである。(引用文献23)より引用。)

Concentrations [PI]	1 Component			2 Component			3 Component			
	τ_i (ns)	f_i	χ_R^2	τ_i (ns)	f_i	χ_R^2	τ_i (ns)	f_i	$m\tau$ (ns)	χ_R^2
0 μM	2.33	1.0	36.9	2.53	0.8	1.64	2.28	0.68	2.47	1.53
				0.51	0.1		0.31	0.18		
							3.34	0.14		
2 μM	2.15	1.0	99.5	2.41	0.7	2.91	2.45	0.66	2.30	3.81
				0.34	0.2		0.33	0.25		
							1.80	0.09		
10 μM	1.69	1.0	374	2.23	0.5	4.50	2.34	0.94	2.05	2.47
				0.35	0.4		0.003	0.04		
							0.67	0.02		
20 μM	1.17	1.0	727	0.30	0.5	11.9	0.13	0.38	1.64	1.06
				1.84	0.4		0.71	0.34		
							2.15	0.28		
30 μM	0.75	1.0	1635	0.17	0.7	31.8	0.08	0.62	1.33	1.56
				1.49	0.3		0.60	0.24		
							1.96	0.14		
40 μM	0.57	1.0	1383	0.14	0.7	16.5	0.10	0.61	1.06	1.42
				1.32	0.2		0.50	0.26		
							1.67	0.13		
50 μM	0.34	1.0	1564	0.11	0.8	19.8	0.06	0.77	0.78	1.69
				1.08	0.1		0.40	0.17		
							1.48	0.06		

$m\tau$: mean lifetime

また、PIの濃度が増加すると、1つのHo分子から100Å以内の一次元空間内に存在する各PI分子までの距離がより多彩になるために、蛍光減衰曲線はより多くの蛍光寿命成分を持つmulti-exponential decayを示す(表²³)。

顕微鏡下でのFRETの測定法

FRETは、発光遷移、無放射遷移と競合するので、それぞれの速度定数を k_{ret} , k_f , k_{nr} 、また、FRETが存在するときの蛍光寿命を τ_{da} とすると、式(2)と同様に

$$k_f + k_{nr} + k_{ret} = 1/\tau_{da} \dots\dots\dots(6)$$

で表される。一般的に、エネルギー移動効率(E)は

$$E = 1 - \tau_{da}/\tau_d \dots\dots(7) \quad \text{あるいは}$$

$$= 1 - D_{da}/D_d \dots\dots(8)$$

で定義される^{13,17}。ここで、 D_d , τ_d はdonorのみの(FRETが起こっていない)ときのそれぞれ蛍光強度と蛍光寿命で、 D_{da} , τ_{da} はdonorとacceptorが存在する(FRETが起こっている)ときのそれぞれ蛍光強度と蛍光寿命である。single donor and acceptor modelの液状検体では、式(5)より、donorとacceptorの距離 r を計算することが可能である。しかし、顕微鏡下では、検体の吸光度、屈折率、蛍光強度の測定上、様々な制約があるために、donorとacceptorの距離 r を直接計算することは困難である。よって、顕微鏡下のFRETの測定には、donorとacceptorの距離を測定するかわりに、エネルギー移動率あるいはそれに準ずる値(FRET画像)の測定が行われる。主なFRET画像測定法を示す。

方法1) donor 蛍光強度の変化を測定

acceptorの存在する状態と存在しない状態のdonorの蛍光強度を測定し、式(8)より、エネルギー移動率を測定する方法である。最も簡

単な方法は、まずdonorのみを染色し、その蛍光強度(D_d)を測定した後、acceptorで二重染色し、減少したdonorの蛍光強度(D_{da})を測る^{24,25}。ただし、acceptorを染色する際にdonorがフォトリーチングを起さないよう気をつける必要がある。他の方法としては、まずdonorとacceptorの両方を染色した状態で、donorの蛍光強度(D_{da})を測定する。次にacceptorに強い光をあててacceptorの光吸収能力を失わせる(フォトクロミズム反応)ことにより、FRETが起こらない状態をつくり、donorの蛍光強度(D_d)を測定する²⁶。

方法2) donorとacceptorの蛍光強度比を測定

donorとacceptorの両方を染色した状態で、フィルターを変えることによって、FRETにより減少したdonorの蛍光強度(D_{da})とFRETによって増強したacceptorの蛍光強度(F_{da})の比(F_{da}/D_{da})を求める方法である。最も一般的に行われてきた²⁷。

方法3) donor 蛍光強度のフォトリーチング時間を測定

acceptorの存在する状態と存在しない状態で、強い光をあてることによって、donorにフォトリーチングを起し、それぞれのフォトリーチング時間の比からエネルギー移動率を計算する²⁸。

方法4) donorとacceptorの蛍光寿命比を測定

近年、顕微鏡下でも0.2 nsの誤差で相対的蛍光寿命を測定する手法(fluorescence lifetime imaging microscopy; FLIM)が開発されて、様々な研究に応用されようとしている^{11,12}。蛍光寿命によるFRETのエネルギー移動効率の測定は、原則的には、式(7)を用いて行うが、蛍光寿命は蛍光分子の濃度に左右されないもので、単一蛍光寿命を示すdonorを選べば、acceptor存在下のdonorの蛍光寿命画像のみでFRETのエネルギー移動効率を求めることができる^{24,25}。

FRET測定の例を示す。細胞核内のDNA構造を知る上で、細胞内核DNA上でどのようなFRETが起こるかは興味深い。そこで、私たち

は、エタノールで固定した培養細胞核 (mouse fibroblasts, 3T3-Swiss albino, ATCC no. CCL-92) を Adenine-Thymine (AT) 特異性 DNA 蛍光色素の Ho と Guanine-Cytosine (GC) 特異性 DNA 蛍光色素の 7-aminoactinomycin D (7-AAD) で二重染色し, Ho (donor) と 7-AAD (acceptor) の間で起こる FRET の解析を行った^{24,25}。まず, Ho のみの染色を行い, 蛍光強度画像および FLIM を用いて蛍光寿命画像を採取した後, 7-AAD を加え二重染色し, 同様に蛍光強度および蛍光寿命画像を採取した (図 5^{24,25})。Ho のみの時のと比較して 7-AAD 存在下では, Ho の蛍光強度は弱まり (図 5a, b)), Ho の 2 つの蛍光寿命, phase lifetime (τ_{ϕ}) および modulation lifetime (τ_m) がともに短くなった (図 5c, d), e), f))。また, Ho と 7-AAD の両方が存在している状態では, phase lifetime が, modulation lifetime よりも短い (図 6²⁴)。この結果は, donor の蛍光減衰曲線は, より多くの蛍光寿命を成分に持つ multi-exponential decay であることを示している²⁴)。以上より, 細胞核内においても, 液状 DNA と同様に, Ho と 7-AAD の間で multiple acceptor FRET が発生していることが示された。さらに, Ho と 7-AAD の両方が存在している状態の Ho の蛍光強度画像や蛍光寿命画像を見ると, 異なった蛍光強度あるいは寿命を示す部分が核内に存在しており, 核内での AT の多い DNA と GC の多い DNA の位置関係を表しているもの考えられる (図 5h))。そこで, 蛍光強度からエネルギー移動効率を計算すると (図 5g)), AT の多い部位 (図 5a) で明るい部位) に一致してより強いエネルギー移動が見られた。これは AT の多い部位は GC の多い部位よりも DNA の密度が高い (DNA 間距離が短い) ことを示していると考えられる。50 個の細胞の Ho と 7-AAD の間で発生する FRET のエネルギー移動効率の変化と細胞周期の関係を見ると, 細胞周期が進むに従い, エネルギー移動効率が高い細胞が増加している (図 7²⁵)。この結果は, 細胞周期の S 期から G2/M 期に進むに従い,

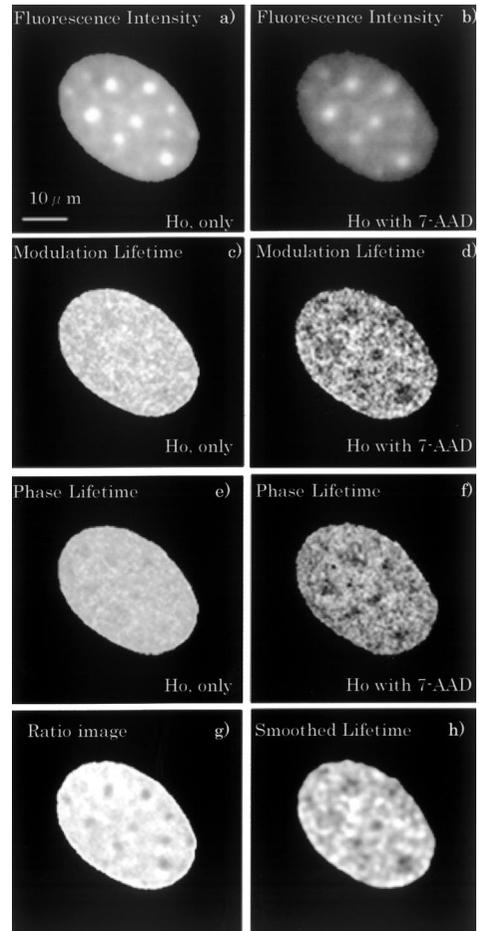


図 5. Ho ($0.4 \mu\text{M}$) と 7-AAD ($0.8 \mu\text{M}$) で染色された培養細胞 (mouse fibroblasts, 3T3-Swiss albino, ATCC no. CCL-92) 核から得られた蛍光強度画像, 蛍光寿命画像およびレイシオ画像。a), b) は Ho の蛍光強度画像, c), d), e), f) は Ho の蛍光寿命画像である。なお, 蛍光強度画像では, 明るい部位で Ho の濃度が高いことを, 蛍光寿命画像では, 暗い部位で蛍光寿命が短いことを示している。g) はレイシオ画像で, b) を a) で割り算した画像。(蛍光寿命画像と比較しやすくするために, D_{da}/D_d の数式を用いてエネルギー移動効率を計算したので, 暗い部位でエネルギー移動が大きいことを示している。) h) は FRET の強く起こった部位をわかりやすくするために, d) の画像にスムージングをかけた画像。蛍光寿命の短い部位で, $1.2 \pm 0.05 \text{ ns}$, 長い部位で, $1.7 \pm 0.06 \text{ ns}$ である。(文献 24, 25) より引用。)

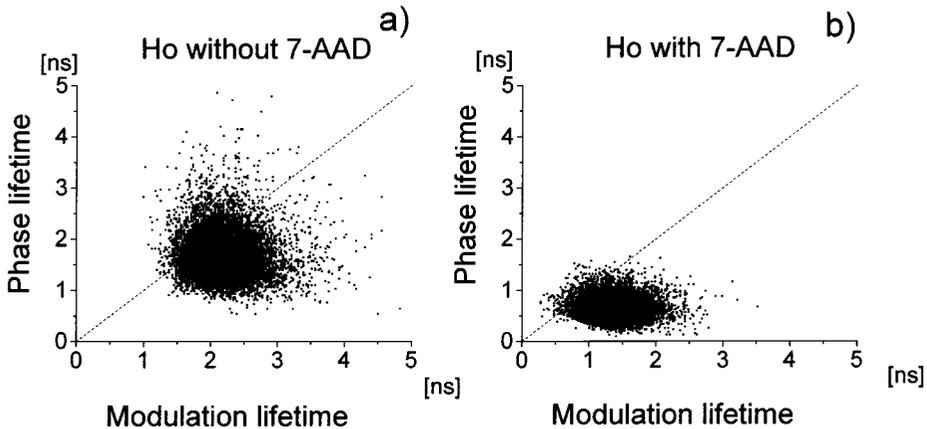


図6. 1 画像の各画素における Ho の modulation lifetime と phase lifetime の関係。(文献 24) より引用。)

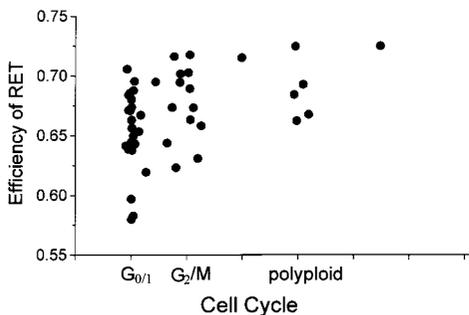


図7. 細胞周期に伴う Ho と 7-AAD の間で発生する FRET のエネルギー移動効率の変化。エネルギー移動効率は蛍光強度画像を用いて計算した。(文献 25) より引用。)

DNA の濃縮が起こる過程を示していると考えられる。蛍光寿命画像からも FRET のエネルギー移動効率を捉えることができる。前述したように、Ho のみの状態では、Ho の蛍光寿命は核内でほぼ均一であることから、Ho と 7-AAD の両方が存在している状態での Ho の蛍光寿命画像は、FRET のエネルギー移動効率と関連していると考えられる。蛍光強度から得られたエネルギー移動効率と蛍光寿命画像から得られたエネルギー移動効率 (図 5g) f)) を比較すると、移動効率の高い部位は一致しており、これらの測定結果が正しいことを示している。

Microscopic FRET の測定の問題点と補正法

1) FRET 発生の有無

FRET は、donor から acceptor へのエネルギー移動であるので、基本的には、donor 蛍光強度の減弱が観察されたときに、FRET が起こっていると考えられる。しかし、donor は、FRET 以外の様々な原因で、蛍光強度の減少を起す。その例として、フォトブリーチング、高い濃度の acceptor による内部遮蔽効果、donor 同士あるいは acceptor 同士の同種間 FRET などがある。いずれも、求めたい donor-acceptor 間の FRET が起こっていないにもかかわらず、donor の蛍光強度が減少し、FRET が起こったかのような誤測定の原因となる。実際に顕微鏡下で FRET が起こっているか否かの確認は、上記に示した様に、液状状態の検体での測定、acceptor 蛍光強度や donor 蛍光寿命の測定など、複数の方法で検討する必要がある。

2) ノイズ

FRET 画像は、複数の画像から求められる比、レシオ画像である。割り算を行うにあたり、分母の値が非常に小さい(蛍光強度が暗い)とき、レシオ画像は大きな誤値を示す。また、ノイズの多い画像の割り算を行うことによって、レシオ画像ではノイズが強調される場合がある。よって、より明るい蛍光色素の選択やシェーディ

ングコレクション・画像フィルター処理を行うなど、ノイズが少なく定量性のある画像を得ることが必要である²⁹⁾。

3) cross excitation や cross talking による測定誤差

FRET を顕微鏡下に測定しようとするときに、適切な donor と acceptor の選択および鋭敏な波長依存性を示す蛍光フィルターの使用が重要なポイントとなる。しかし、実際には、donor の発光と acceptor の吸収スペクトラルは形がなだらかであったり、donor と acceptor の蛍光波長ピークが近接したりしていることが少なくない。その結果、donor の励起する光が、直接、acceptor をも励起する cross excitation や donor の蛍光強度が acceptor の蛍光強度に混入してしまう cross talk が起こり、測定誤差の原因となる。これらによる測定誤差を補正するには、3種類のフィルターセット、すなわち、donor を励起して donor の蛍光強度を測定するフィルターセット (donor filter set)、donor を励起し FRET を介しての acceptor の蛍光強度を測定するフィルターセット (FRET filter set)、acceptor を直接、励起して acceptor の蛍光強度を測定するフィルターセット (acceptor filter set) を用いた測定が必要である。この3種類のフィルターセットを使って、donor および acceptor の両方が存在するサンプル、donor のみのサンプル、acceptor のみのサンプルを測定し、9つの画像を得る。この9つの画像から、FRET量は、以下の式で補正される^{28,30)}。

$$\begin{aligned} \text{corrected FRET} &= F_{da} - D_{da} (F_d / D_d) \\ &\quad - A_{da} (F_a / A_a) \dots \dots (9) \end{aligned}$$

ここで、 F_{da} , D_{da} , A_{da} はそれぞれ、donor および acceptor の両方が存在するサンプルを FRET filter set, donor filter set, acceptor filter set で測定したもので、 F_d , D_d , A_d はそれぞれ、donor のみのサンプルを FRET filter set, donor filter set, acceptor filter set で測定したもので、 F_a , D_a , A_a は、それぞれ acceptor のみのサンプル

を FRET filter set, donor filter set, acceptor filter set で測定したものである。

4) donor および acceptor の比

single donor and acceptor model では、donor と acceptor の比が1対1であるために、donor や acceptor の比や濃度は問題にならない。しかし、multiple acceptor model では、acceptor を持たない donor や donor を持たない acceptor の存在が問題となる。acceptor を持たない donor の蛍光強度は、FRET の測定結果を過小評価する。また、donor と acceptor の両方の濃度がともに極端に高い部位では、donor と acceptor の距離が離れていて弱い FRET しか起こらなくても、FRET を伴う donor 分子の濃度が高いために画像上は強い FRET を示す部位として示される。そこで、donor と acceptor の距離をより正確に測定するには、式(9)から得られた corrected FRET をさらに donor と acceptor の濃度で補正した normalized FRET を求める必要がある³⁰⁾。

$$\text{normalized FRET} = \frac{\text{corrected FRET}}{G \cdot D_{da} \cdot A_{da}} \dots \dots (10)$$

G は定数であり、corrected FRET は相対値であるので、 $G = 1$ を用いる。

式(9)と(10)を用いて、Ho と 7-AAD の細胞核内の FRET を求めると、補正前と補正後で異なった結果を得る(図8)。補正をしていない画像(図5g)および図8a))は、donor と acceptor の距離のみならず FRET を起している donor-acceptor 分子の濃度の影響を受け、一方、補正した画像(図8b)は、donor と acceptor の距離のみの影響を受けている。この結果は、ATの多いDNA部位では、DNAは凝集しているものの、GCが少ないためにHoと7-AADの距離が離れていることを示していると考えられる。

まとめ

ヒト腫瘍の病理診断を行う上で、腫瘍細胞の

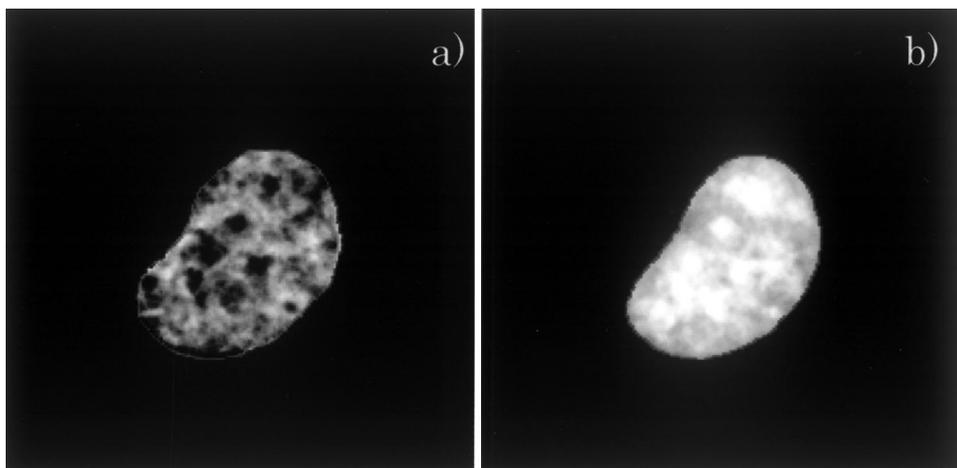


図8. 細胞核 DNA 上二重染色された Ho と 7-AAD の間で発生するエネルギー移動を式 (9) および (10) を用いて求めた FRET 画像。Ho と 7-AAD の濃度で補正する前の画像 (a) と補正後の画像 (b)。細胞内の明るい部分がエネルギー移動が小さいことを示している。補正前 (a) と補正後 (b) で異なった結果が示されている。

クロマチン構造の解析は、良悪性鑑別の重要な指標になると考えられる。私達は、テキスチャー解析法を用いて、ヒト甲状腺腫瘍細胞の核内 DNA 分布パターンを解析してきた^{3,6-8,29}。さらに、私達は、核 DNA 構造の異常に基づく良悪性鑑別を進めるために、FRET 現象で得られる細胞画像に、テキスチャー解析法で確立してきた技術を応用し、腫瘍細胞内での核 DNA 構造や核膜による DNA 活性化制御の研究に取り組んでいる。上記に述べたように FRET は、注意深い解析を必要とする手法ではあるが、うまく行けば、従来、不可能であった細胞内の分子の位置関係や相互作用を可視化することを可能にするユニークな手法であり、今後、様々な細胞内 DNA や蛋白の解析に応用されるものと期待される。

文 献

- 1) Ashihara T, Kamachi M, Urata Y, Kusuzaki K, Takeshita H, Kagawa K: Multiparametric analysis using autostage cytofluorometry. *Acta. Histochem. Cytochem.*, **19**: 51-59, 1986.
- 2) 村田晋一, 浦田洋二, 島 正巳, 小関忠尚, 松井道宣, 徳田 一, 芦原 司: Malignant insulinoma の一例: 免疫組織化学および顕微蛍光測光法による検索. *病理と臨床*, **6**, 1095-1100, 1988.
- 3) 村田晋一, 浦田洋二, 蒲池正浩, 諸富直文, 土橋康成, 松塚文夫, 隈 寛二, 芦原 司: DNA 顕微蛍光測光法による甲状腺腫瘍の細胞増殖解析 組織型および分化度との比較検討. *病理と臨床*, **7**, 1009-1016, 1989.
- 4) 村田晋一, 糸井啓純, 浦田洋二, 土橋康成, 松塚文夫, 芦原 司: 甲状腺の濾胞性腫瘍の細胞増殖動態と核形態の定量的解析 画像解析装置結合型顕微蛍光測光装置を用いて. *臨床細胞学会誌*, **29**, 819-828, 1990.
- 5) Urata Y, Itoi H., Murata S, Konishi E, Ueda K, Azumi Y, and Ashihara T: From cytofluorometry to fluorescence image analysis. *Acta Histochem. Cytochem.*, **24**, 367-374, 1991.
- 6) 村田晋一: 甲状腺の腺腫様過形成と腫瘍の細胞学的特性 DNA 顕微蛍光測光法とイメージ・サイトメトリーを用いて. *京都府立医科大学雑誌*, **100**, 311-331, 1991.
- 7) 村田晋一, 寺内邦彦, 浦田洋二, 芦原司: 免疫組織・細胞化学検査 - 特殊技術・応用. 4) 共焦点顕微鏡, *臨床検査*, 医学書院, 東京: **39**, 79-83, 1995.
- 8) 村田晋一, 浦田洋二, 山野剛, 平井栄美, 古谷昌則, 芦原司: 甲状腺病理カラーアトラス; イメージ・サイトメトリーを応用した甲状腺乳頭癌細胞の核形態解析. *内分泌外科*, **15**, 1-5, 1998.
- 9) Miyawaki A, Llopis J, Heim R, McCaffery JM, Adams JA, Ikura M, Tsien RY: Fluorescent indicators for Ca²⁺ based on green fluorescent pro-

- teins and calmodulin. *Nature*, **28**; **388**: 882-7, 1997.
- 10) 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*, **28**; **411**: 1065-8, 2001.
 - 11) Lakowicz, JR, and Berndt, K W: Lifetime-selective fluorescence imaging using an rf phase-sensitive camera. *Rev. Sci. Instrum.*, **62**: 1727-1734, 1991. (Reprinted in SPIE Milestone Series on Optical Tomography, 1997).
 - 12) Murata S, Herman P, and Lakowicz JR: Texture analysis of fluorescence lifetime images of AT- and GC-rich regions in nuclei. *J. Histochem. Cytochem.*, **49**(11): 1443-52, 2001
 - 13) Lakowicz, JR: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 2nd Edition, Plenum Publishers, New York, 1999.
 - 14) Förster Th: Intermolecular energy migration and fluorescence. *Ann. Phys.* 2:55-75, 1948 (Translated by R. S. Knox, Department of Physics and Astronomy, University of Rochester, Rochester, NY 14627).
 - 15) Stryer L: Fluorescence energy transfer as a spectroscopic ruler. *Annu Rev Biochem.*, **47**: 819-46. 1978.
 - 16) Stryer L, Haugland RP: Energy transfer: a spectroscopic ruler. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, **58**(2): 719-26, 1967.
 - 17) 木下一彦, 御橋広真編: 蛍光測定 - 生物学への応用. 日本分光学会測定シリーズ3, 学会出版センター, 東京, 1983.
 - 18) Clegg R M: Fluorescence resonance energy transfer and nucleic acids. *Methods Enzymol.*, **211**: 353-389, 1992.
 - 19) Förster Th: Modern quantum chemistry. O. Sinanoglu (ed.), Academic Press, New York, p93, 1965.
 - 20) Blumen A, Manz J: On the concentration and time dependence of the energy transfer to randomly distributed acceptors. *J. Chem. Phys.*, **71** (11) 4694-4702 1979.
 - 21) Maliwal BP, Kusba J, Lakowicz JR: Fluorescence energy transfer in one dimension: frequency-domain fluorescence study of DNA-fluorophore complexes. *Biopolymers.*, **35**(2): 245-55, 1995.
 - 22) Li L, Gryczynski I, Lakowicz JR: Resonance energy transfer study using a rhenium metal-ligand lipid conjugate as the donor in a model membrane. *Chem Phys Lipids*, **101**(2): 243-53, 1999.
 - 23) Murata S, Kusba J, Piszczek G, Gryczynski I, and Lakowicz JR: Donor fluorescence decay analysis for energy transfer in double-helical DNA with various acceptor concentration *Biopolymers*, **57**(5): 306-15, 2000.
 - 24) Murata S, Herman P, Lin HJ, Lakowicz JR: Fluorescence lifetime imaging of nuclear DNA: effect of fluorescence resonance energy transfer. *Cytometry*, **41**(3): 178-85, 2000.
 - 25) Murata S, Herman P, Lakowicz JR: Texture analysis of fluorescence lifetime images of nuclear DNA with effect of fluorescence resonance energy transfer. *Cytometry.*, **43**(2): 94-100, 2001.
 - 26) Miyawaki A, Tsien RY: Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol.*, **327**: 472-500, 2000.
 - 27) Uchiyama H, Hirano K, Kashiwasake-Jibu M, Taira K: Detection of undergraded oligonucleotides in vivo by fluorescence resonance energy transfer. *J. Biol. Chem.*, **271**(1) 380-384, 1996.
 - 28) Jovin TM, and DJ Arndt-Jovin: FRET microscopy: digital imaging of fluorescence resonance energy transfer. Application in cell biology. In cell structure and function by microspectrofluorometry. E. Kohen, J. S. Ploem, and J. G. Hirschberg. Editors. Academic Press, Orlando. FL 99-117, 1989.
 - 29) 村田晋一, 久保速三, 糸井啓純, 小西英一, 浦田洋二, 芦原司: 組織細胞化学 1993 ; 定量的組織細胞化学のための画像解析の基本的技術, 日本組織細胞化学会編, 126-139, 1993.
 - 30) Gordon GW, Berry G, Liang XH, Levine B, Herman B: Quantitative fluorescence resonance energy transfer measurements using fluorescence microscopy. *Biophys J.*, **74**(5): 2702-13, 1998.

Microscopic Fluorescence Resonance Energy Transfer on Nuclear DNA**Shin-ichi MURATA, Kunio MOCHIZUKI, Tadao NAKAZAWA, Tetsuo KONDO,
Nobuki NAKAMURA and Ryohei KATOH***Department of Pathology, Yamanashi Medical University, Yamanashi 409-3898, Japan*

Abstract: DNA fluorescence dyes have been used to study DNA dynamics, chromatin structure and cell cycle analysis. However, most microscopic fluorescence studies of nuclear DNA have been using the steady state approach and have not taken advantage of additional information content of the fluorescence resonance energy transfer (FRET). FRET is the transfer of the excited-state energy from the initially excited donor to an acceptor. As FRET efficiency depends on the distance between donor and acceptor, microscopic FRET is a useful technique used for quantifying the distance between donor and acceptor in the cells. However, microscopic FRET measurements can suffer from several causes of distortion, which include fluorescence cross talk and the dependence of FRET on the concentration of donor and acceptor. We used frequency-domain fluorescence lifetime measurement as well as the steady state approach to study the spatial distribution of DNA-bound donor (Hoechst 33258: Ho) and acceptor (7-aminoactinomycin D: 7-AAD) on nuclear DNA. Additions of the 7-AAD acceptor resulted in a spatially non-homogeneous decrease in fluorescence intensity and the lifetime of the Ho-stained nuclei. The spatially dependent phase and modulation values of Ho in the presence of 7-AAD, also showed that the Ho decay becomes non-exponential.

Key words: fluorescence resonance energy transfer, fluorescence lifetime, microscopy, cell cycle, DNA