

ある (図 11)。その例として, *mec-3* プロモーターに N 末端側 GFP を, *egl-44* プロモーターに C 末端側 GFP を連結して, 線虫で発現させ, たった 2 つの FLP 神経だけを特異的に蛍光標識することに成功している [38]。

BiFC のように GFP の N 末端側, C 末端側断片を“非共有結合的”に複合体形成させるのではなく, “共有結合的”に連結させる方法も開発されている。Ozawa らは, タンパク質スプライシング活性をもつ酵素を用いて, 分割 GFP を共有結合的に連結する方法を考案し [39], その 1 つの応用例として, 細胞内小器官に発現する遺伝子を迅速に解析する方法 (rapid identification of novel genes; RING) を開発した [40]。RING 法は, まず GFP の N 末端側, C 末端側断片のそれぞれにタンパク質スプライシング酵素 DnaE の N 末端側, C 末端側断片を融合させたものを作製し (それぞれ EGFPn-DnaEn, DnaEc-EGFPc), 次に EGFPn-DnaEn に cDNA ライブラリーを融合させ, DnaEc-EGFPc に細胞内小器官移行配列を融合した遺伝子とともに, 細胞に導入する。cDNA 内に目的の細胞内小器官へ移行するタンパク質がコードされていれば, その小器官内で GFP が再構成されて蛍光性になる。FACS で蛍光性細胞を回収し, その中に含まれる cDNA の配列を解析すれば, どのような遺伝子が発現していたかが判明する。この方法を用いて, Ozawa らはミトコンドリアに局在する新規タンパク質を見いだすことに成功した。

④ 蛍光タンパク質を用いて標的分子を壊す

蛍光分子に励起光を与えると, 程度の大小はあるが, 活性酸素が産生される。蛍光分子が強い励起光で退色してしまうのは, 自らが産生した活性酸素によって酸化され, 不可逆的に発色団の構造が変化してしまうからである。ライブセルイメージングでは禁忌であるこの現象を逆用すれば, 光照射依存的に微小領域に存在する分子を, 任意の時間に破壊することが可能となる (図 12)。いわゆる CALI (chromophore-assisted light inactivation) 法とよばれるこの技術は, もっぱらマラカイトグリーンやフルオレセインなどの小分子蛍光化合物を用いて行なわれてきたが, 最近になって蛍光タンパク質でも可能であることがわかってきた。蛍光タンパク質は発色団が完全にタンパク質の中に埋没しているため, 産生された活性酸素は, タンパク質内部で反応してしまい, 外に出てこない。蛍光タンパク質が, 丸裸の小分子蛍光化合物ほど光毒性を示さないのはそのためである。ところが, 2 光子励起をした場合には, 効果的に活性酸素が蛍光タンパク質外に拡散し, 近傍のタンパク質を破壊できることが Tanabe らによって示され, MP-CALI (multi-photon excitation-evoked CALI) と命名された [41]。この方法は, 細胞内の局所領域に存在するタンパク質を, 任意の時間に破壊できる方法としてきわめて有用であるが, 非常に高価な 2 光子顕微鏡を用いなければならないという弱点をもっている。その弱点を克服する方法として, 通常の水銀光源でも CALI が可能な蛍光タンパク質 (KillerRed) が, Bulina らによって開発された [42]。KillerRed は, ミトコンドリアマトリクスに局在するタンパク質や細胞膜に局在するタンパク質に応用され, それぞれミトコンドリアへの酸化ストレスの負荷によるアポトーシスの誘導や, 細胞膜結合ドメインの破壊による細胞膜からの遊離などの現象が観察されている。KillerRed は 2 量体を形成するため, 今のところ応用できる対象は限られているが, 早晚, 単量体のものが開発されるであろう。そうなれば, ようやく多くの研究者が, 蛍光タンパク質を用い

- [25] Ando, R. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 12651-12656, 2002
- [26] Chudakov, D. M. *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **278**, 7215-7219, 2003
- [27] Wiedenmann, J. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 15905-15910, 2004
- [28] Chudakov, D. M. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **22**, 1435-1439, 2004
- [29] Tsutsui, H. *et al.*: *EMBO Rep.*, **6**, 233-238, 2005
- [30] Verkhusha, V. V. *et al.*: *Chem. Biol.*, **12**, 279-285, 2005
- [31] Gurskaya, N. G. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **24**, 461-465, 2006
- [32] Baird, G. S. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 11241-11246, 1999
- [33] Nagai, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 3197-3202, 2001
- [34] Kawai, Y. *et al.*: *Anal. Chem.*, **76**, 6144-6149, 2004
- [35] Belousov, V. V. *et al.*: *Nat. Methods*, **3**, 281-286, 2006
- [36] Hu, C. D. *et al.*: *Mol. Cell*, **9**, 789-798, 2002
- [37] Hu, C. D. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 539-545, 2003
- [38] Zhang, S. *et al.*: *Cell*, **119**, 137-144, 2004
- [39] Ozawa, T. *et al.*: *Anal. Chem.*, **72**, 5151-5157, 2000
- [40] Ozawa, T. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **21**, 287-293, 2003
- [41] Tanabe, T. *et al.*: *Nat. Methods*, **2**, 503-505, 2005
- [42] Bulina, M. E. *et al.*: *Nat. Biotechnol.*, **24**, 95-99, 2006

[永井健治]

第 13 章

共鳴エネルギー移動(FRET)の基礎

GFP テクノロジーが発展した現在では、FRET (Förster resonance energy transfer. F は一般的には fluorescence があてられる) は、より身近な道具になりつつある。たとえば、CFP と YFP を適当につないだプラスミドを細胞に発現させ、この細胞を適切な波長の光で励起すれば、CFP から YFP へのエネルギー移動は起こる。しかし、FRET を生化学現象のプロープとして用いたり、FRET シグナルを解析して未知の生命現象を明らかにしたりするためには、FRET の理論を理解することが重要である。この章の目的は、FRET の基本的な原理 [1, 2] を示し、FRET プロープの基本的な仕組みと作製方法の概要を提供することである。

I FRET とは

誤解を恐れずに言えば、FRET は距離を測る手段である。分子スケールの定規だと考えていただきたい。FRET は、光学顕微鏡の分解能よりもはるかに小さな距離を測ることができる定規である。しかし少々難儀な点もある。プラスチックや金属でできた定規は温度が変わると伸び縮みしてしまうが、FRET プロープの精密な定規も蛍光色素の向いている方向が変わると多少伸び縮みしてしまう。このような場合には、距離の絶対的な尺度としてではなく、距離の相対的な変化を観察するために FRET は使われる。また、偽物の定規が混じっていることがあって、本物との区別がむずかしい場合がある (第 14 章「FRET の測定法と評価」を参照)。さらには、性能の良い定規を作れるようになるまでに、多少の熟練が必要なことがある。前途多難なようであるが、エネルギー移動の基本原理を理解すると、想像以上にシンプルな FRET の概要が見えてくるはずである。こうしたハードルを乗り越えていくことで、分子の微細な変化を生体内で実時間計測できるほぼ唯一の方法を手にすることができるようになる。

II FRET の物理化学

原子や分子のようなミクロのレベルでは、電子軌道は連続的ではなく、飛び飛びの値しかとることができない。このような離散的な軌道はエネルギー準位とよばれ、図 1 のようなダイアグラムで表される。最もエネルギーの低い軌道である基底状態 (S_0) の電子が光を吸収すると、励起状態 (S_1) へと遷移する。この状態はある程度安定であるため、電子はしばらくこの準位に留ま

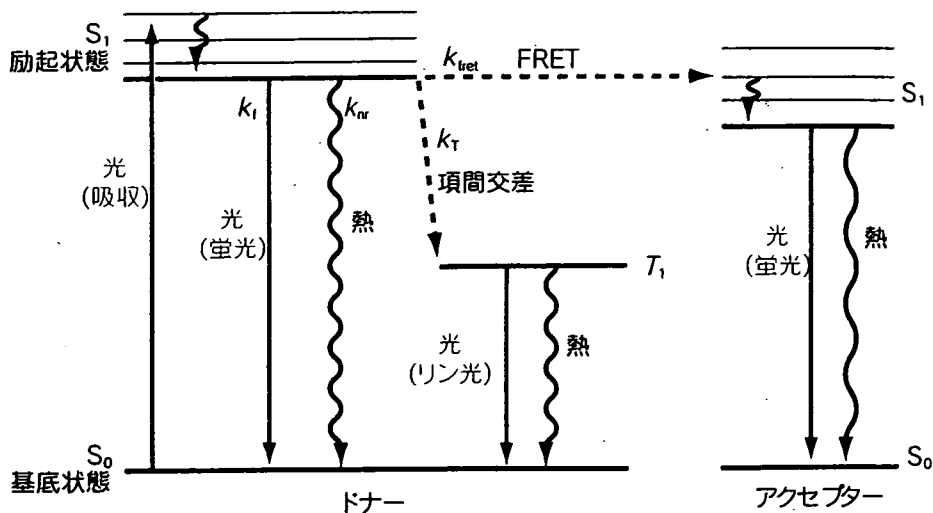


図1 FRETのヤブロンスキー・ダイアグラム

光の放射を伴う遷移は直線で、無放射的な遷移は波線でそれぞれ表す。

る。この S_1 に留まっている時間を S_1 寿命 (蛍光寿命) とよぶ。

励起された電子は、より安定でエネルギー準位の低い基底状態へ自発的に遷移するが、このときに失われるエネルギーが電磁波として放出される。これが蛍光である。 S_1 から S_0 への遷移には、蛍光過程の他にも、項間交差による三重項への遷移や、熱を放出する過程などがある。 S_1 から S_0 への遷移の速度定数 k_D は、それぞれの競合する過程の速度定数の和として、以下の式 (1) で表される。

$$k_D = k_f + k_{nr} + k_T = 1/\tau_D \quad (1)$$

ここで、 k_f は蛍光過程の遷移速度定数、 k_{nr} は熱過程の遷移速度定数、 k_T は三重項への遷移速度定数、 τ_D は S_1 寿命 (蛍光寿命) である。

ある色素の電子が S_1 状態にあるとき、このすぐ近傍に存在する別の色素が S_0 状態にあると、 S_1 状態の色素から S_0 状態の色素へ光の放出を伴わないエネルギー移動が起こる。これが FRET である。エネルギーを渡す側の色素をドナー、受け取る側の色素をアクセプターと、それぞれよぶ。励起状態にあるドナー色素から見れば、FRET は S_0 への経路の一つにすぎない。このときのドナー色素の S_1 から S_0 への遷移速度定数 k_{DA} は、FRET の速度定数を k_{FRET} として、以下の式 (2) で表される。

$$k_{DA} = k_f + k_{nr} + k_T + k_{fret} = \frac{1}{\tau_{DA}} \quad (2)$$

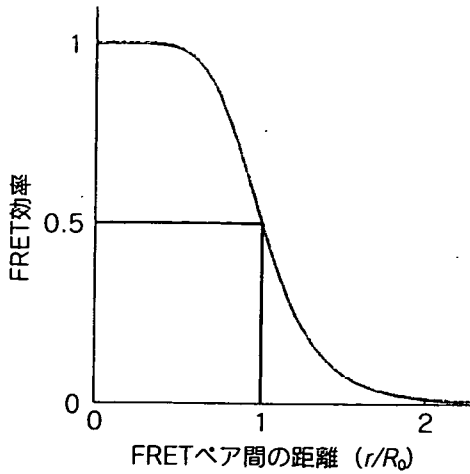
また、 k_{FRET} は以下の式で求められる。

$$k_{fret}(r) = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (3)$$

ここで、 τ_D はドナーが単独のときの S_1 寿命、 r はドナーとアクセプターとの間の距離、 R_0 はフェルスタ距離とよばれる、FRET 効率が 50% になるときのドナーとアクセプター間の距離である。

R_0 と r が等しい距離にあるとき、すなわちドナーとアクセプターがフェルスタ距離にあると

図2 FRET ペア間の距離と FRET 効率との関係



き、 k_{fret} はドナー単独のときの S_0 への遷移速度定数 ($1/\tau_D$) と等しくなり、このときの FRET 効率は 50% である (図 2)。

フェルスタ距離は、以下の式により求められる。 κ^2 は配向因子、 n は媒質の屈折率、 Q_D はドナーの蛍光量子収率、 J はドナーの蛍光とアクセプターの吸収の重なり積分である。 R_0 の単位はナノメートルである。

$$R_0 = 9.78 \times 10^2 (\kappa^2 n^{-4} Q_D J)^{1/6} \quad (4)$$

また、重なり積分は、以下の式 (5) で求められる。 F_D はドナーの蛍光スペクトルを全蛍光量で 1 に規格化した値、 ϵ_A はアクセプターのモル吸光係数 ($M^{-1}cm^{-1}$)、 λ は光の波長 (cm) をそれぞれ表す。 J の単位は $M^{-1}cm^3$ である。

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (5)$$

FRET 効率 (E) は、吸収したエネルギーのうち、アクセプターに移動するエネルギーの割合であるから、

$$E = \frac{k_{\text{fret}}(r)}{1/\tau_D + k_{\text{fret}}(r)} \quad (6)$$

で求められる。この式に式 (3) を代入すると、

$$E = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6} \quad (7)$$

となる。ここから、タンパク質などに導入された蛍光色素が R_0 の距離にあるときに 50% のエネルギー移動効率が得られ、また、距離の変化に対して非常に感受性が高い (距離の 6 乗に反比例する) ことがわかる (図 2)。

さらに式 (1) と式 (2) を式 (6) に代入すると、

$$E = 1 - \frac{\tau_{DA}}{\tau_D} \quad (8)$$

が得られる。ドナー単独時のドナーの S_1 寿命 (τ_D) と、FRET が起こっているときのドナーの S_1 寿命 (τ_{DA}) から FRET 効率が求められる。また、蛍光色素の減衰は以下の関数で表される。

これは、蛍光色素をパルス励起し、ナノ秒単位の短い時間で S_1 から蛍光を放出しながら基底状態へ遷移する様子を測定することで得られる。 I_0 は $t=0$ での蛍光強度、 τ は色素の S_1 寿命としたとき、以下の式 (9) で表される。

$$I(t) = I_0 e^{-t/\tau} \quad (9)$$

ここから、 S_1 寿命と蛍光強度が比例することがわかり、

$$E = 1 - \frac{F_{DA}}{F_D} \quad (10)$$

が得られる。 F_D はドナーが単独のときの蛍光強度、 F_{DA} は FRET が起きているときのドナーの蛍光強度である。これは、アクセプターブリーチングなどにより FRET 効率を求めるときに使われる式である。

FRET でドナーとアクセプターの距離を計算する際には、まず FRET ペアの J (スペクトルの重なり積分) を求める(式5)。これには、 F_D (ドナーの蛍光スペクトル) と ϵ_A (アクセプターのモル吸光係数) があればよい。次に R_0 (フェルスタ距離) を計算するが、 κ^2 (配向因子)、 n (媒質の屈折率、通常 1.33)、 Q_D (ドナーの量子収率) から、式(5)を用いて計算する。さらに実験データから式(8)や式(10)を用いて E (FRET 効率) を求め、このときの r (ドナーとアクセプターの実際の距離) を式(7)から求める。

さて、やっかいな値として κ^2 (配向因子) がある。これはドナーの発光遷移モーメントとアクセプターの吸収遷移モーメントの相対的な配向がどのような状態にあるかを示す値である。それぞれの遷移モーメントが一直線上に同じ向きに並んだときが 4、平行に並んだときが 2、直交しているときが 0 である。この値を正確に求めるためには、それぞれの蛍光色素の相対的な配向を観察する必要があるが、これは現時点では困難である。蛍光色素が“速く”回転している場合、蛍光が等方的に放射されていると仮定すると $\kappa^2 = 2/3$ と近似できるので、この値を用いて計算されることが多い。この仮定で気を付けなくてはならないのが、蛍光色素の回転運動が S_1 寿命に比べて十分に速いということである。蛍光を等方的に放射するためには、励起光を吸収して蛍光を放出するまでの間に色素は十分に回転する必要がある。フルオレセインやローダミンのような小さな色素であれば(回転速度が S_1 寿命に比べて十分に速いので)、通常は回転速度が問題になることはない。しかし、GFP のような高分子の場合は、 S_1 寿命に対して回転速度が有意に遅い。このため、GFP の蛍光は等方的にならず、 $\kappa^2 = 2/3$ とした場合に無視できない誤差が生じてしまう。 κ^2 が正確に求まらないと R_0 (フェルスタ距離) も正確に求めることができない。このため、現状の技術では、GFP を用いた FRET で絶対的な距離を計測することは困難であり、GFP 間 FRET はもっぱら生体内分子の相互作用を定性的に可視化するために使われる。また、GFP 間 FRET に基づく機能プローブを用いてイオン濃度などを定量的に計測するためには、プローブのキャリブレーションが必要である。

④ FRET ペアの選択方法[3]

FRET ペアには、通常 2 種類の蛍光色素を用いる。“通常”と述べたのは、それ以外の場合が

あるからである。たとえば、アクセプターは、吸収スペクトルさえあれば蛍光性でなくてもエネルギー移動が起こるので（クエンチャに相当する）、FRETを検出することができる。この場合はドナーの蛍光強度の増減を観察することになるが、FRETに依存した蛍光強度の変化とそれ以外の要因（たとえば、プローブの局在変化など）に伴う蛍光強度変化を区別することができない。したがって、生細胞でのFRET測定のように、条件にさまざまな制約がある場面では、2種類の蛍光色素を用いたほうが有利である。その理由は、ドナーとアクセプターの蛍光強度がレシプロカルに変動するため、その比（レシオ）を取ることで、より大きなS/N比を得ることができるからである。

FRETペアの2種類の蛍光色素を選択する際には、一般の多色観察で考慮する点（クロストーク、細胞毒性、退色、イオン感受性、観察機器との相性など）に加え、なるべくFRETが起こりやすいペアを選択することが重要である。FRET効率の低さからシグナルを得ることが困難なケースが多々あるため、FRETが起こりやすいペアを選択することでなるべく高いFRETシグナルを得たいからである。FRETが起こりやすいペアとはフェルスタ距離の大きなペアである。しかし、前述したように、GFPを用いたFRETプローブではフェルスタ距離を正確に求めることが困難である。したがってGFPを用いる場合には、ドナーとアクセプターの重なり積分（ J ）を基準にFRETペアを選択することが適している。

前述した、重なり積分を求める式をもう一度示す。

$$J = \int_0^{\infty} F_D(\lambda) \epsilon_A(\lambda) \lambda^4 d\lambda \quad (5)$$

F_D はドナーの蛍光スペクトルを全蛍光量で1に規格化した値であり、無単位である。 ϵ_A はアクセプターの各波長でのモル吸光係数（ $M^{-1}cm^{-1}$ ）である。 ϵ_A を求めるためには吸収スペクトル、あるいは励起スペクトルを用いる。ただし、吸収スペクトルには蛍光に寄与しない部分も含まれるため、吸収スペクトルと励起スペクトルが完全には同一でない場合があるので注意を要する。FRETのアクセプターにとっては光の吸収能が重要であり、蛍光の放出は必須ではない。このため吸収スペクトルを用いるほうが物理的には正確である。吸収スペクトルがモル吸光係数で表されている場合はそのまま計算できるが、吸光度で表されている吸収スペクトルや励起スペクトルを使う場合は、スペクトルをピークの値でいったん1に規格化し、アクセプターの最大モル吸光係数で乗算することで、各波長でのモル吸光係数が得られる。

λ は光の波長であるが、ここでは単位を cm として扱う。単位の換算で混乱することがあるので注意が必要である。フェルスタ距離を求める式(4)は、重なり積分（ J ）の単位を $M^{-1}cm^3$ としたときに、計算で得られるフェルスタ距離の値がナノメートルの単位となるようにするための式である。

このような計算は、表計算ができるコンピュータソフトウェア（たとえばExcelなど）を用いれば、多数の蛍光色素のペアの組合せに対して短時間で行うことができる。それによって、理論上最も相性のよいペアを短時間内に計算して選び出すことができる。膨大な組合せの中から可能性を絞り込むためにはこのような計算が有効であるが、残念ながら計算だけでは高いFRET効率が得られないこともある。これは、たとえば立体障害による発色団の機能阻害や、アクセプター以外へのエネルギー移動の可能性が、上記の計算では考慮されていないからである。現在の

技術では、このような可能性は実験的にしか確認することができない。したがって、FRETペアの候補を計算によりある程度絞り込んだ上で、複数の候補から実験的にFRET効率の最も大きなペアを同定するのが、現時点での効率のよい方法である。

また、式(5)の λ^4 に注目すると、これは長波長側の蛍光色素ペアがFRETに有利であることを示唆している。まったく同じドナーとアクセプターのスペクトルであっても、 λ の値を200 nmほど長波長側にずらすだけで、フェルスタ距離が大幅に増加する。 J は λ の4乗に比例するので、たとえば λ が20%増加するだけで J は2倍程度に上昇する。一般的に、長波長領域の色素はモル吸光係数も高いので、さらに有利な条件を得ることができる。他の状況が許せば、より長波長側のペアを選択することは理にかなっている。

④ GFP 間 FRET に基づく機能指示薬の作製方法[4]

上記の計算や、使用する機材との兼ね合いなどから、FRETに用いる GFP ペアが決定すれば、次の段階は「どのようにしてつなぐか」である。刺激に応じて構造が変化するタンパク質 X が存在するとして、この構造変化を FRET により検出したい場合、大きく分けて3通りのつなぎ方がある (図3)。

最も素直な考え方がサンドイッチ法であり、作製の容易さから、多くの場合このつなぎ方がまっ先に試される。これは、タンパク質 X の N 末端と C 末端にそれぞれドナーとアクセプターをつなぎ、FRET ペアでタンパク質 X をサンドイッチする方法である。タンパク質 X の構造変化により FRET ペアの距離や配向が変化することに基づいている。後述するリンカーや配向の最適化が有効なことが多い。GFP と比較してタンパク質 X が十分に小さい場合は有効なことが多

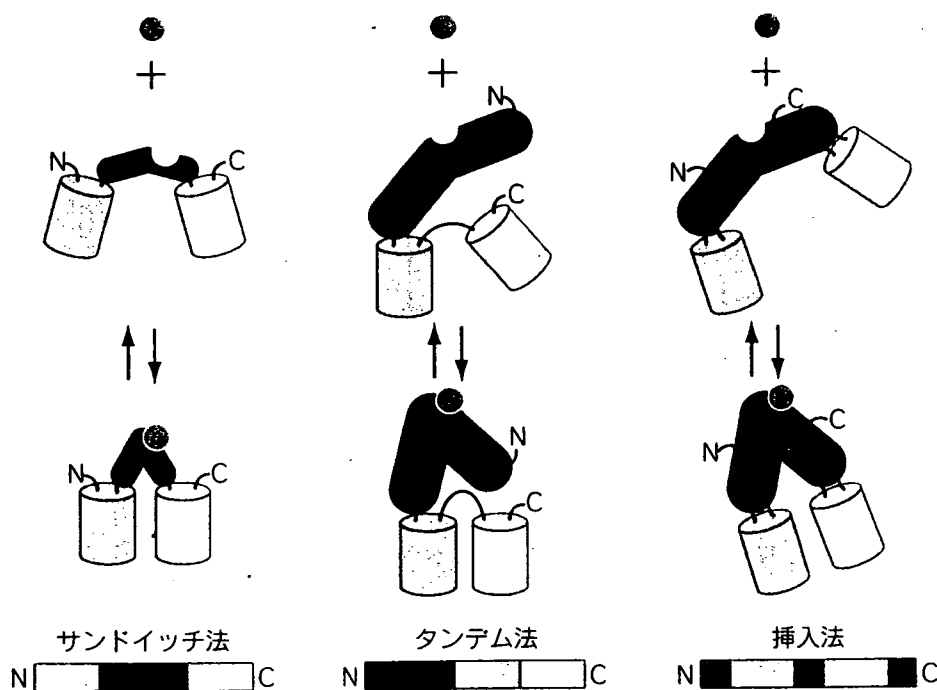


図3 FRET ペアのつなぎ方

青色が CFP, グレーが YFP, 濃青色がタンパク質 X, 丸い濃灰色がタンパク質 X の構造変化を誘発するエフェクターをそれぞれ表す。

いが、タンパク質 X の大きさや立体構造によっては、N 末端と C 末端の距離がフェルスタ距離を大幅に上回ってしまうことがある。このようなケースでは、FRET シグナルを得ることはできない。

別のアプローチとしてタンデム法がある。ある程度柔軟性のあるリンカーで FRET ペアをつなぎ、その末端にタンパク質 X をつなぐ方法である。サンドイッチ法とは逆に、タンパク質 X が GFP と比較して大きい場合や、大きな複合体を形成する場合、膜などの構造物近傍で用いる場合に有効である。考え方としては、構造変化に伴いタンパク質 X が FRET ペアへ何らかの力を加え、これが FRET ペアの相対距離または配向を変化させ、シグナルの変化を誘発するというものである。作製手順としては、まず多様なリンカーで FRET ペアをつなぎ、FRET 効率がある程度高いペアを複数ピックアップしておく。これらの候補ペアをタンパク質 X の末端に導入し、構造変化に対して最も FRET シグナルの変化量の大きなペアを選択する。これとは逆に、FRET 効率の低いペアをタンパク質 X につなぎ、構造変化により FRET 効率の上昇を期待する方法もあるが、スクリーニングの効率などから前者のほうが一般的である。

挿入法は、タンパク質 X の内部に FRET ペアを挿入し、タンパク質 X の構造変化により FRET ペアの距離変化を検出する方法である。サンドイッチ法でシグナルが得られない場合でも有効なことがある。タンパク質 X と GFP の機能を互いに阻害しない形で挿入することが肝要であるが、しばしば困難を伴う。サンドイッチ法やタンデム法に比べて作製の難易度が高く、リンカーなどの最適化もむずかしいことがある。しかし、タンパク質 X の大きさや構造によっては、挿入法が唯一の選択肢の場合もある。作製には 2 通りのアプローチがあり、2 次構造予測や原子座標データなどから機能をなるべく阻害しない挿入部位を予測する方法と、トランスポゾンなどを応用してランダムに挿入部位を試行する方法とがある。いずれにしても、タンパク質 X の機能阻害が最小で FRET 変化が最大の挿入部位を見いだすまで多くの検体を解析する必要がある。

いずれの方法を選択しても、初期段階で得られるプローブは変化率が低いため、FRET ペアの距離と配向を最適化する必要がある。たとえば、さまざまな種類のリンカーを導入し、FRET 変化量の大きなクローンをスクリーニングすることで、ドナーとアクセプターの間の距離を最適化することができる [5]。図 2 を再度見ていただきたいが、FRET 効率の変化が許容される距離のダイナミックレンジは非常に狭いため、タンパク質の構造変化が最適な FRET ペアの距離の変化になるようにリンカーを最適化する必要がある。また、GFP どうしが接近しすぎるとタンパク質のフォールディングが阻害されるなど、そもそもの吸収や蛍光がなくなることもあるため、注意が必要である。

距離と同時に FRET ペアの配向を最適化することも重要である。GFP の円順列変異体を用いると、本来のタンパク質末端とは別の部位に新たな末端を創出し、ここに別のタンパク質をつなぐことができる [6]。配向因子の説明でも述べたように、GFP は分子量が大きいので配向はランダムと仮定できない。またリンカーの種類によっては、GFP の相対的な配向がきわめて制限されることもある。これは逆に考えれば、配向因子を 2/3 以上にすることが可能であることを示している。計算で最適な配向を求めることは困難であるが、さまざまな円順列変異を導入することで非常に変化率の大きなプローブを作製することが可能である。Ca²⁺ 指示薬の Cameleon などにおいて、このような最先端の手法が大きな成功を収めている [6]。

ここまでFRETプローブの原理と作製方法を述べてきたが、少々詰め込みすぎの感がある。FRETや蛍光についてさらに深く理解するためには、ぜひLakowiczの教科書[1]をひもといていただきたい。FRETは、純粹に物理化学的な原理に基づく現象であり、その原理の理解は、測定データを正確に解釈する上で重要である。また、使いやすいFRETプローブを作製するためには、FRETの基本原理の正しい理解に加えて、それに基づいた効率のよい生物学的スクリーニングも重要である。本章を通じて、FRETプローブ作製のための概要をつかんでいただければ幸いである。

文献

- [1] Lakowicz, J.R.: Principles of Fluorescence Spectroscopy, 3rd ed., Springer, 2006
- [2] 永井健治：蛋白質 核酸 酵素, 51, 14, 1989-1997, 2006
- [3] 永井健治・小寺一平：実験がうまくいく蛍光・発光試薬の選び方と使い方, pp.158-162, 羊土社, 2007
- [4] 永井健治・宮脇敦史：タンパク質構造・機能解析実験実践ガイド, p.173, メディカルドゥ, 2005
- [5] Nagai, T., Miyawaki, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 319, 72-77, 2004
- [6] Nagai, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 101, 10554-10559, 2004

[永井健治・小寺一平]

第 14 章

FRET の測定法と評価

前章「FRET の基礎」では、FRET の物理化学的な原理、FRET ペアの選択法、および蛍光タンパク質間の FRET に基づく機能指示薬の作製に関する留意点を述べた。本章では、分子間 FRET と分子内 FRET の違い、FRET を観察・評価する方法、ならびに FRET の真偽判定法を解説する。シンプルな FRET の原理とは裏腹に、その観察と評価については厳密に行う必要があることを理解してもらうことが本章のねらいである。

① 分子間 FRET と分子内 FRET

FRET 効率は色素分子間の距離とそれらの遷移双極子モーメントの相対的配向に大きく依存する（前章「FRET の基礎」参照）。この性質を利用して、分子間相互作用や分子構造の変化を測定することができる。分子間相互作用は相互作用を調べたい分子ペアのそれぞれに、エネルギーのドナーとアクセプターになる色素を標識して FRET を観測する（分子間 FRET, 図 1 a）。一方、分子構造の変化は、1つの分子の中にドナーとアクセプター色素の双方を標識し、その色素間で起こる FRET を観測する（分子内 FRET, 図 1 b）。どちらも FRET を観測する点では変わりはないが、分子間 FRET を観測し解析するほうが圧倒的にむずかしい。その理由としては、おもに

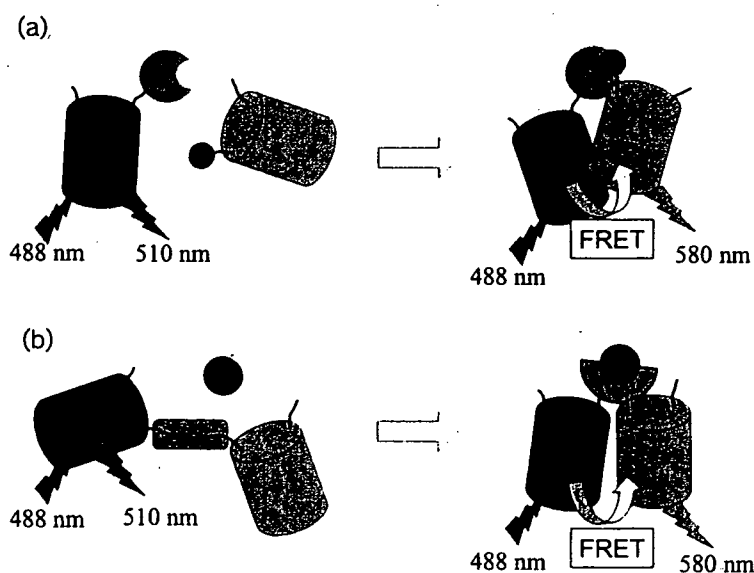


図 1 分子間 FRET (a) と分子内 FRET (b)

以下の5点があげられる。

- 1) ドナーおよびアクセプターで標識された解析対象分子は、相互作用するまではそれぞれ異なる局在をしている場合が多いので、それぞれを別に観察する必要が出てくる。そのためドナーを励起したときのドナーからの蛍光シグナルとアクセプターからの蛍光シグナルに加えて、アクセプターを直接励起したときのアクセプターからの蛍光シグナルを取得する必要がある。
- 2) 分子間 FRET においては、分子内 FRET において成立する「ドナーとアクセプターが1対1の量比で存在する」という前提がない。たとえば、分子間相互作用を調べたい2つタンパク質 (A と B) のそれぞれに CFP と YFP を融合 (CFP-A, YFP-B) し、細胞に共発現させた場合を考えてみると、2つの融合タンパク質の発現比率は、各細胞によって異なってくる。CFP-A の発現量が YFP-B に比べ多い場合、つまりドナーが過剰な場合は、FRET に寄与しない CFP-A が相対的に多くなるため、FRET の変化量が小さくなる。
- 3) 一方、YFP-B の発現量が多い場合には、ドナー CFP の励起波長による YFP の直接励起に伴うシグナル量が相対的に多くなるため、やはり FRET に伴うシグナルの変化量が小さくなる。
- 4) CFP-A と YFP-B に加え、もともと細胞に発現している A と B も分子間相互作用に寄与するため、A と B, A と YFP-B, CFP-A と B, CFP-A と YFP-B の4つの相互作用の組合せが考えられる。このうち FRET に寄与するのは CFP-A と YFP-B との組合せのみであるので、やはり FRET の変化量は小さくなる。さらに、A, B, CFP-A, YFP-B それぞれの発現量の違いによっても、FRET の変化量に違いが出てくる。
- 5) FRET の変化量とは関連しないが、融合タンパク質 CFP-A と YFP-B の過剰発現は、つまり A と B の過剰発現となるため、その効果も念頭において実験結果を検討しなければならない。

このようなさまざまな条件に分子間 FRET は依存するため、観測する細胞ごとにデータが異なってくる。一見、再現性が得られないように見えてしまうが、そのように考える前に、少なくとも上記のどのパラメータがばらついているのかをチェックしてみしてほしい。もし、パラメータのいくつかを固定させることができれば、細胞間でのばらつきの少ないデータ取得につながるはずである。一方、1対1のドナー/アクセプター量比が保障される分子内 FRET については、上記の1)~4)の制約はないので、分子間 FRET ほど注意を払わなくても、ばらつきの少ないデータが得られやすい。

II FRET を観察する方法

第13章「FRETの基礎」の章のくり返しになるが、FRETとは、「色素の電子が S_1 状態にあるとき、このすぐ近傍に存在する別の色素が S_0 状態にあると、 S_1 状態の色素から S_0 状態の色素へ無放射的にエネルギー移動が起こる」ことである。そして、エネルギーを渡す側の色素をドナー、受け取る側の色素をアクセプターとよぶ。ドナー、アクセプターともに“蛍光性”色素であれば、FRETによりドナーが放射する蛍光は消光し、アクセプターからの蛍光が増加する(図2)。したがって、FRETの検出には、アクセプターとドナーの両方の蛍光、もしくは少なくとも一方の蛍光を測定すればよい。しかし、“真のFRETシグナル”だけを取り出すことはそう簡単ではない。

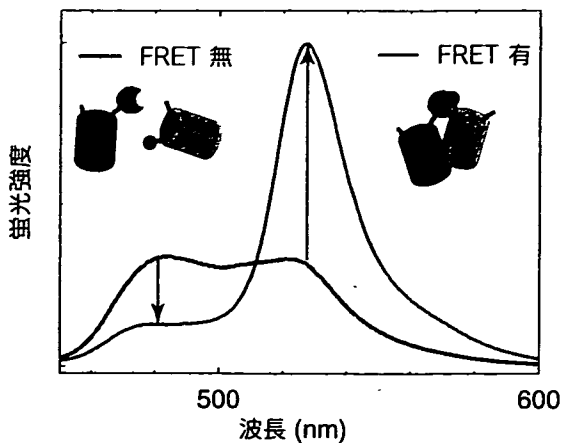


図2 FRETによる蛍光スペクトル変化

CFPとYFPをFRETペアに用いた場合の、FRETが起きていないときと、起きているときの蛍光スペクトルをそれぞれグレーと青で示す。FRETによりアクセプターからの530 nmの蛍光強度は増加し、ドナーからの480 nmの蛍光強度は減少する。

そればかりか不十分な理解で測定結果を解析すると、FRETシグナルでないものをFRETシグナルと見誤ってしまうことすらある。そこで、ここではまず、最もオーソドックスなFRET測定法として広く利用されている“レシオ測定法”（Ⅱ-1項）について、その利点・欠点を解説し、より正確かつ定量的にFRETシグナルを抽出する方法として、“増感蛍光を抽出する方法”（Ⅱ-2項）と“ドナーの蛍光寿命を測定する方法”（Ⅱ-3項）を取り上げる。

1. アクセプターとドナーの蛍光強度比を測定する方法（レシオ測定法）

“レシオ測定法”は、プローブの濃度や局在変化などに伴う蛍光強度変化を補正する方法として、定量的な蛍光イメージングを行なうために広く用いられてきた手法である。2波長励起1波長測定型や1波長励起2波長測定型などに分類されるが、FRET測定は後者である。というのも、FRETが起きると、ドナーの蛍光強度は低下し、アクセプターからの蛍光が増加するので、ドナーを励起したときのドナーとアクセプターの両方の蛍光を測定、つまり1波長励起2波長測定すればよいことになるからである（図2）。これにより、プローブの濃度変化など、FRET以外に起因する蛍光強度の変化分を相殺できるだけでなく、FRETの増減に依存するドナーとアクセプターの蛍光強度の変化が、レシプロカル（逆相関）であるため、それらの比（レシオ）を求めることで、シグナル変化量を増加させることができる。

2波長を測定する方法としては、ドナー・アクセプター蛍光用の干渉フィルターをフィルターチェンジャーなどで交互に切り替え、取得するのが一般的である（第5章「マルチカラータイムラプス蛍光顕微鏡」参照）。ただし、フィルターチェンジャーによるフィルターの切り替えには通常100ミリ秒前後を要するので、ドナーを取得する時間と、アクセプターを取得する時間に差が生じてしまう。もしこの時間内に刻々と見たい生理現象が進行してしまうと、ドナーとアクセプターの蛍光を測定したときの生理状態は異なるものになってしまい、レシオの値は無意味なものになってしまう。そこで、高い時間分解能でFRETのレシオ測定を行いたい場合は、2分割光学系（図3）や3CCD（図4）を利用してドナーとアクセプターの蛍光シグナルを“同時に”測定する。2分割光学系は、浜松ホトニクス社のW-Viewやジーオングストローム社のジーオングベースなどを用いて、ドナーシグナルとFRETシグナルに分離し、1台のCCDカメラの左右にそれぞれ結像させる（これらは比較的簡単に自作可能）。後者の場合は3CCDカメラに内蔵されるダイクロイックプリズムによって3色に分光した蛍光を3つのCCDに結像させる。3つのCCD

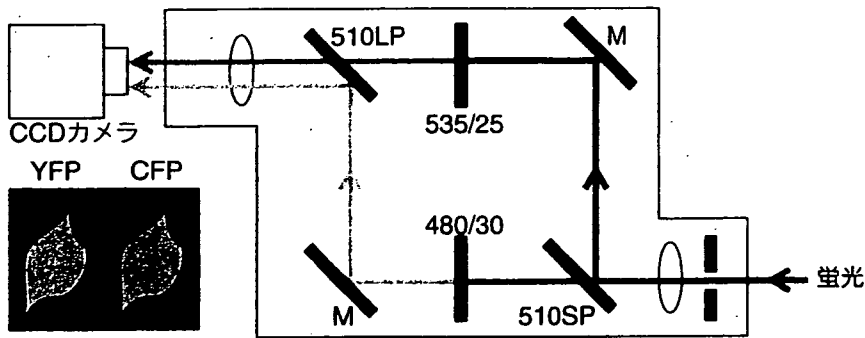


図3 2分割観察光学系によりFRETを観察する方法

M:ミラー, 510SP:510nmよりも短い波長, 長い波長をそれぞれ透過, 反射させるミラー, 535/25:535nmを中心波長とする半値幅が25nmの干渉フィルター, 480/30:480nmを中心波長とする半値幅が30nmの干渉フィルター.

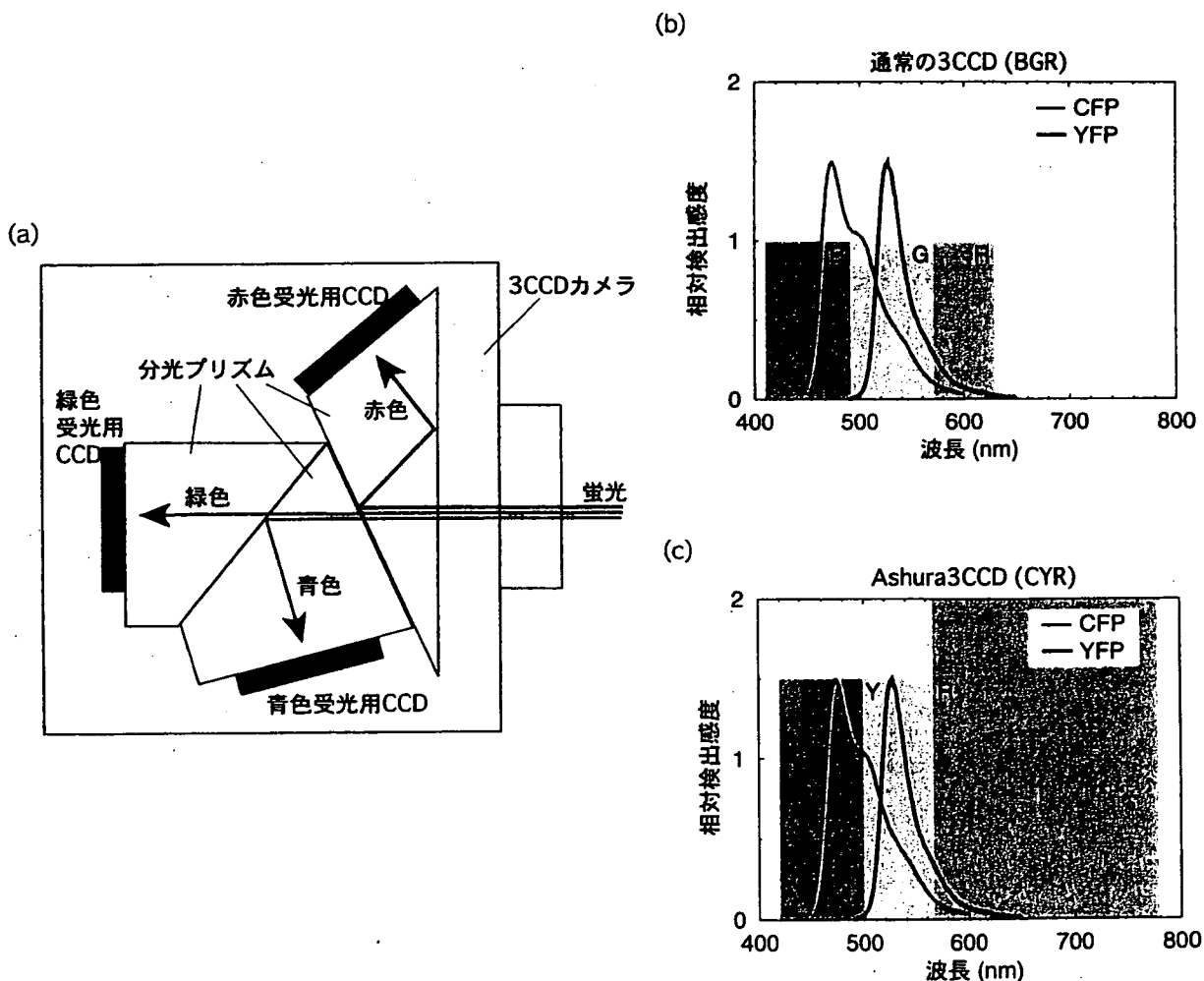


図4 3CCDの分光の仕組みと分光・感度特性

(a) 3CCDの概念図. 3CCDに入射した蛍光はダイクロイックプリズムによって3つの波長帯(赤, 緑, 青)に分光され, それぞれ独立した3つのCCD面上に結像する.

(b) 通常の3CCDカメラの分光・感度特性.

(c) CFP-YFP FRETペアに特化した3CCDの分光・感度特性.

のうち、2つを使えばドナーシグナルと FRET シグナルを取得できる。ちなみに、浜松ホトニクスからは2種類の3CCD カメラ（カラー3CCD と Ashura 3CCD）が出ており、このうち Ashura 3CCD はダイクロイックプリズムの分光特性が CFP-YFP ペアに適した CYR（シアン、イエロー、レッド）に改変され、かつ通常のカラー3CCD よりも感度が高い（図4）。CFP と YFP をもっぱら FRET ペアとして用いるのであれば、お勧めである。

レシオ測定法による FRET の検出は、ドナーとアクセプターの2波長測定でも検出できるが、連続的な蛍光スペクトルから抽出することができる。後述するように、蛍光検出に分光機能を有する蛍光顕微鏡が現れ出したので、この機能を FRET 観察に利用しない手はない（第6章「スペクトルイメージング」参照）。ただし、本方法の真価はスペクトル分離演算との併用により発揮され、“増感蛍光の抽出”を行う場合にきわめて有効となる。その詳細はⅡ-2-B「蛍光スペクトル測定とスペクトル分離演算」の項で述べる。

さて、レシオ測定法は FRET 変化を簡便に測定する方法であるが、厳密な意味で FRET シグナルを抽出しているわけではない。ドナーとアクセプターの蛍光シグナルがレシプロカルに変動することを根拠に、FRET が起きていると結論することはできない点を銘記されたい（Ⅲ-2 項参照）。とくに、本方法を“分子間” FRET に適用する場合は、たとえばドナーとアクセプターの細胞内局在の変化によってもレシオ値が変化するため、FRET の評価には細心の注意が必要である。

2. 増感蛍光を“抽出”する方法

分子間 FRET を測定するためには、レシオ測定法のような簡便な測定法ではなく、FRET によって生じる「増感蛍光」を抽出する方法が正確さ・信頼性の点で優れている。そのためには、FRET シグナルを検出するチャンネルに紛れ込む、その他のシグナル（クロストークシグナル）を分離しなければならない。ここでは、クロストークシグナルを除去する代表的な2つの方法を解説する。

A. 3フィルターセット法 [1]

増感蛍光を干渉フィルターを通して取得しようとする、1) ドナー蛍光のアクセプター蛍光チャンネルへの漏れ（蛍光のクロストーク）と、2) 直接励起されたアクセプターからの蛍光（励起のクロストーク）という2つの無視できないシグナルが、真の増感蛍光シグナル（=FRET シグナル）と混ざった形で検出される。この混ざったシグナルから増感蛍光シグナルを抽出するには、検出したシグナルを補正しなければならない。これには、表1のように、FRET フィルターセット、ドナーフィルターセット、アクセプターフィルターセットの3つのフィルターセットを用いることで達成できる。ドナーとアクセプターを含む FRET サンプルを FRET フィルターセット、ドナーフィルターセット、アクセプターフィルターセットで計測して得られる蛍光シグナルをそれぞれ F_f , D_f , A_f とする（表記法は表1を参照）。上記のクロストークがなければ、 F_f を FRET シグナルとしてよいが、現実にはクロストークの寄与を補正する必要がある。ドナーだけを FRET フィルターセットとドナーフィルターセットで計測したシグナルを F_d , D_d とすると、ドナーを励起したときにドナーの蛍光のうち FRET フィルターに漏れる割合は F_d/D_d である。

表1 3フィルター法のフィルターセットの構成と蛍光シグナルの表記法

フィルターセットの構成	励起フィルター	蛍光フィルター
FRETセット(F)	ドナー	アクセプター
ドナーセット(D)	ドナー	ドナー
アクセプターセット(A)	アクセプター	アクセプター

サンプルの種類	フィルターセット	(F)	(D)	(A)
	ドナー+アクセプター (f)	Ff	Df	Af
ドナー (d)	Fd	Dd	Ad	
アクセプター (a)	Fa	Da	Aa	

注：ドナーフィルターセットでのアクセプターシグナル Da およびアクセプターフィルターセットでのドナーシグナル Ad は、選択するドナー用蛍光フィルターと蛍光色素しだいで、0にできる。

したがって、FRET計測時のドナー蛍光のFRETへのクロストークの寄与は、Df (Fd/Dd) となる（蛍光のクロストーク）。同様に、アクセプターだけをFRETフィルターセットとアクセプターフィルターセットで計測したシグナルを Fa, Aa とすると、FRETフィルターセットで励起されるアクセプターシグナルの割合はアクセプターフィルターセットで励起されるシグナルに対して Fa/Aa であり、FRET計測時に直接励起されたアクセプターからのクロストークの寄与は Af (Fa/Aa) となる（励起のクロストーク）。この2つのクロストークを差し引くと、真のFRETシグナル

$$[\text{FRET}] = \text{Ff} - \text{Df}(\text{Fd}/\text{Dd}) - \text{Af}(\text{Fa}/\text{Aa})$$

が得られる。さらに Df と Af, および係数 G（使用する蛍光色素と光学系の特性によって決まる係数。ただし、G は 1 としてもよい場合が多い）に対して規格化することで、ドナーおよびアクセプターの濃度の影響を相殺した、規格化 FRET シグナル

$$[\text{FRET}_N] = \{ \text{Ff} - \text{Df}(\text{Fd}/\text{Dd}) - \text{Af}(\text{Fa}/\text{Aa}) \} / (G \cdot \text{Df} \cdot \text{Af})$$

が得られる。

以上はむずかしい計算がいつさい出てこないため、研究者個人で計算することが可能であるが、画像解析ソフトを利用することでコンピュータまかせにすることも可能である*1。

B. 蛍光スペクトル測定とスペクトル分離演算 [2]

3フィルター法は、FRETチャンネルに紛れ込むドナーのシグナルや、アクセプターのクロス励起に伴うシグナルを排除して、FRETシグナルとその他のシグナルを干渉フィルターを用いて分離するのが最大の目的である。しかしながら、もし、ドナーとアクセプターの蛍光ピークが近接

*1 自分で計算するのが面倒な場合、たとえば、ニコンの共焦点レーザー顕微鏡 C1 の画像解析ソフトを用いれば、わずらわしい計算をコンピュータまかせにすることができる。また、アクセプターのクロス励起が無視できる FRET ペア（たとえば CFP と YFP）を用いる場合には、アクセプターフィルターを除いた2つのフィルターで FRET シグナルの抽出を行うことが可能になる。本方法はすでに述べた2分割光学系（図3）や3CCD（図4）での FRET 測定とすこぶる相性がよい。いずれの装置を利用した場合でも、たとえば、浜松ホトニクス社の画像解析ソフト AquaCosmos にオプション装備される「マルチバンドイメージング」のような画像解析ソフトを用いることで、FRET シグナルの抽出を自動的に行なうことが可能である。

していると、その分離はかなりむずかしいものになってしまう。なぜなら、蛍光フィルターはたいていの場合、数 10 nm 程度の波長範囲の蛍光を透過させるように設計されており、10 nm 程度しか蛍光ピークが離れていない場合は、ほとんど分離が困難になるからである。もちろん、レーザーラインフィルターのような透過波長域がきわめて狭いフィルターを使用すれば、分離はいくぶん容易になるが、蛍光のクロストークは排除できない。また、取得できる蛍光量が制限されるため、相当暗い画像になってしまう。

第 13 章「FRET の基礎」で学んだように、FRET を効率よく行わせるための 1 つのパラメータ、 J 値（スペクトルオーバーラップ）を大きくしようとする、必然的にドナーとアクセプターの蛍光ピークが近接してくる。したがって、効率のよい FRET ペアを選択すればするほど、蛍光観察の波長分解能を上げなければならなくなる。そのためには、蛍光分光光度計のように、蛍光を回折格子などで細かく分光して“スペクトル”の形で測定する必要性が出てくる。

共焦点蛍光顕微鏡の中には、マルチカラー蛍光観察に対応すべく、蛍光検出に分光機能を有するものがある（第 6 章「スペクトルイメージング」参照）。この機能を FRET 観察に利用しない手はない。顕微鏡下での分光測定法は大別して 2 つの方法があり、ピクセルごとの蛍光を回折格子あるいはプリズムにより分光し 32 個の光電子増倍管 (PMT) で受光するものと、プリズムで分光した蛍光を任意の波長幅（～数 nm）で任意の範囲を走査し、スペクトル画像を取得する方法とに分けられる。この方法を用いると、フィルターで分光する場合よりも、はるかに高い波長分解能で分光できるだけでなく、スペクトルの線形分離法（スペクトルアンミキシング；linear unmixing）を併用することで、複数成分の蛍光を分離することも可能となる。このスペクトルアンミキシング機能は、多重染色した試料において、発光波長が近接した蛍光色素でも、蛍光スペクトルの違いによって識別し、クロストークを減じる画像処理機能として各種共焦点レーザー顕微鏡に装備されたものである。もちろん、FRET 観察にも利用することで、非常にわずかな FRET の変化を捕らえることができるようになるのみならず、上述した大きな J 値（第 13 章「FRET の基礎」参照）をもち、FRET に有利な蛍光色素のペア（たとえば、Sapphire と YFP、図 5）を使用することも可能になる。

以上、アクセプターからの蛍光を抽出する 2 つの方法を述べたが、最後に重要な点を一つ付け加えておく。それは、「ドナー励起により、アクセプターから蛍光が観察される」からといって「FRET が起こっている」と結論できないことである。確かに FRET が起こるとアクセプターからの蛍光が観察される。しかし、その逆は真ならずである。したがって、アクセプターからの蛍光を抽出して FRET を観測する場合は、その実験に加え、FRET が起きているのかどうかの評価をしっかりと行う必要がある。この点については、後述する第 III 節「FRET の真偽評価法」を参照されたい。

3. ドナーの蛍光寿命を測定する方法 [3]

FRET が起こるとドナーの蛍光強度が低下する、あるいは蛍光寿命 (S_1 寿命) が短くなる（前章参照）。ドナーの蛍光強度の増減から、FRET の変化を測定するのは技術的に簡便であるが、すでに述べたように、FRET に依存した蛍光強度の変化と、それ以外の、たとえば、プローブの

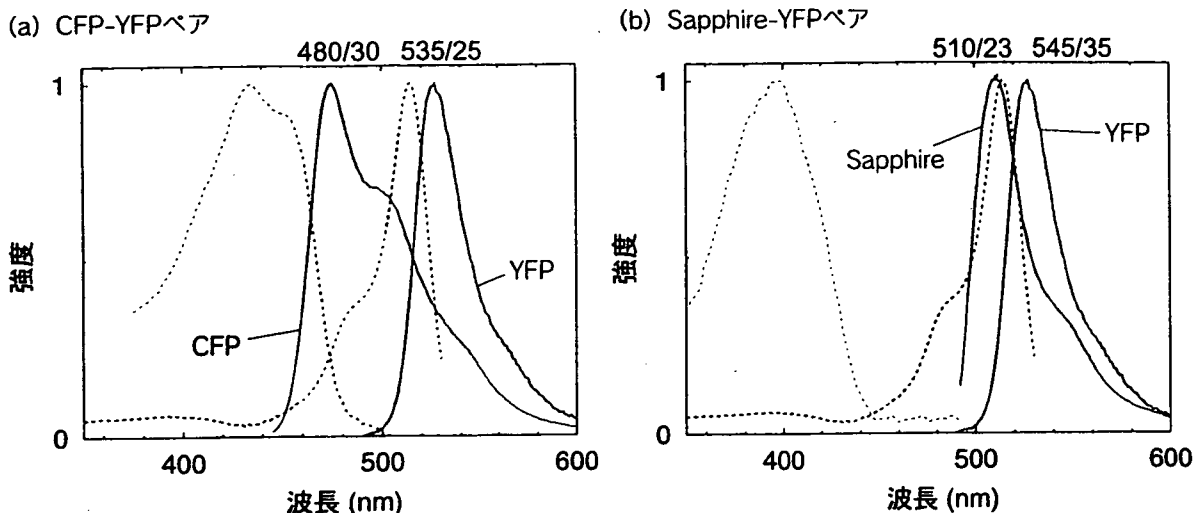


図5 FRET ペアのスベクトル

CFP と YFP の吸収スペクトル (破線) および蛍光スペクトル (実線) (a) と, Sapphire と YFP の吸収スペクトル (破線) および蛍光スペクトル (実線) (b).

(a) CFP の蛍光スペクトルと YFP の吸収スペクトルが適度にオーバーラップし, CFP と YFP の蛍光ピークが十分離れているため, 480/30 と 535/25 の干渉フィルター (それぞれ影付け) で十分, 分離できる.

(b) Sapphire の蛍光スペクトルと YFP の吸収スペクトルがかなりオーバーラップしているため, より効率よく FRET が生じる. しかしながら, Sapphire と YFP の蛍光ピークが近いため, YFP の蛍光取得チャンネルに Sapphire の蛍光がかなり混入する. しかも, 510/23 の干渉フィルターで Sapphire の蛍光を取得する場合, YFP 蛍光取得用の干渉フィルターを長波長側に少しずらした 545/35 などを使用する必要があるため, YFP の蛍光を効率よく取得できない.

濃度や局在変化, 退色などに伴う蛍光強度変化を区別することはむずかしい. とくに, 分子間 FRET によりタンパク質間相互作用を解析しようとする場合は, ドナー分子とアクセプター分子の量比や局在の変化に伴う“見かけの FRET 変化”を蛍光強度から補正することはほとんど不可能である. 一方, ドナーの蛍光寿命の測定を行えば, 光の強度情報の変化に依存しない, 蛍光寿命という絶対的な物理パラメータが得られるため, きわめて正確かつ定量的な FRET 観察が可能になる. また, 上述したレシオ測定法や増感蛍光を抽出する方法と異なり, FRET の“真偽評価”がその測定自身に含まれているため, “偽の FRET”を拾うことがなく信頼性が高い. したがって, 本手法は最良の FRET 測定法といっても過言ではない.

蛍光寿命を測定する方法には, 大別して時間分解法と位相変調法の2つがある (図6). 時間分解法は, 短パルスの励起光を蛍光プローブに照射し, 試料から放射される蛍光強度の減衰を時間分解能の高い検出器で観察する (図6a). おもな測定方法としては, 時間相関単一光子計数法 (time-correlated single photon counting; TCSPC) やストリークカメラを用いて, 時空間変換によってスペクトルと時間波形を一度に測定するものがあげられる. TCSPC は「1回の励起事象による光子1個の発光確率分布が, 励起によって発する全光子の, 時間軸上での実際の強度分布になる」という概念に基づいており, 多数回のパルス励起のうち, 単一光子発光を検出することで, この確率分布を求めるという方法である. ストリークカメラは測定光の時間情報を位置情報に変換して検出することで, 超高速 (ピコ秒のオーダー) に起こる光現象を捕らえるカメラである. 蛍光タンパク質の蛍光寿命が数ナノ秒のオーダーであるため, ストリークカメラを用いることで, 蛍光寿命の変化を高い時間分解能で測定することができる. 一方, 位相変調法は数十

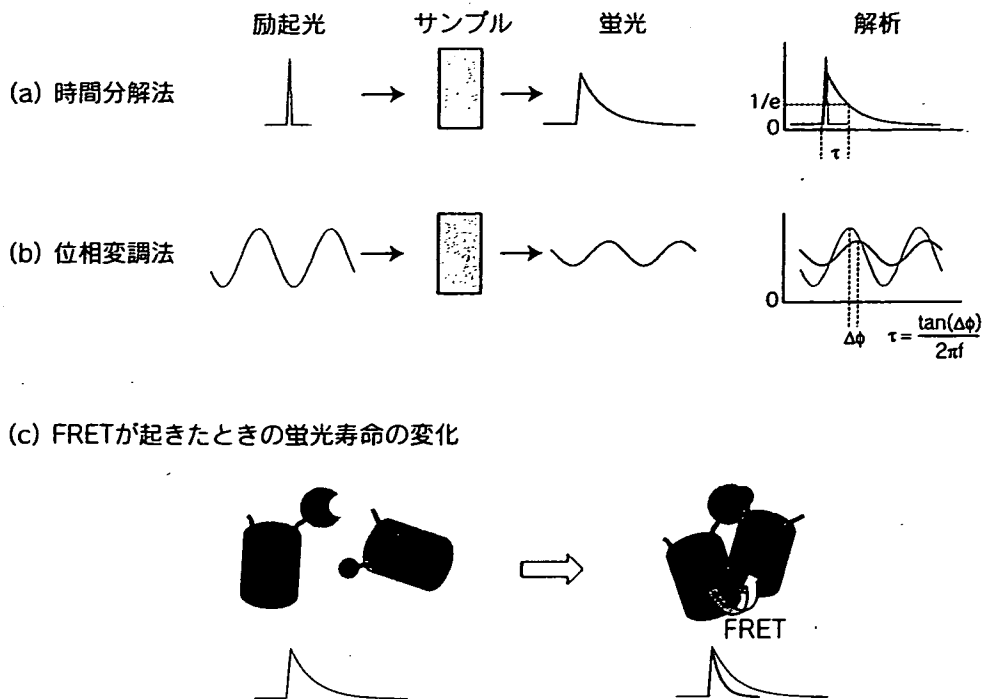


図6 蛍光寿命測定の方法

MHzの正弦波に変調した光で蛍光プローブを励起し、観測される蛍光と励起光とのなす位相差と、変調信号の振幅変化から蛍光寿命を算出する方法である(図6b)。

いずれの方法も原理的には優れた定量性を有するが、バイオイメージングの分野では(とくに日本では)まだまだ普及するには至っていない。顕微鏡下でのリアルタイム画像測定も現時点ではむずかしい。しかし、近年、いくつかのメーカーが蛍光寿命を測定できる顕微鏡(FILIM)システムを市販化しており、近い将来FRETイメージングに蛍光寿命測定を用いる頻度が高くなっていくものと予想される。

III FRETの真偽評価法

FRETが起きているかいないかを定量的に評価するには以下の3つの方法がある。

- 1) アクセプターブリーチング法
- 2) 蛍光寿命測定法
- 3) ドナーブリーチング法

このうち、蛍光寿命測定法についてはすでに述べたので、ここではそれ以外の2つの方法に関して概説する。

1. アクセプターブリーチング法 [4]

アクセプターブリーチング法は最も広く用いられているFRETの真偽評価法である。これはアクセプターを光学的に退色(ブリーチング)させたときにドナーの蛍光回復が起きるかどうかでFRETを評価する方法である。エネルギーを渡す相手(アクセプター)がいなくなるので、

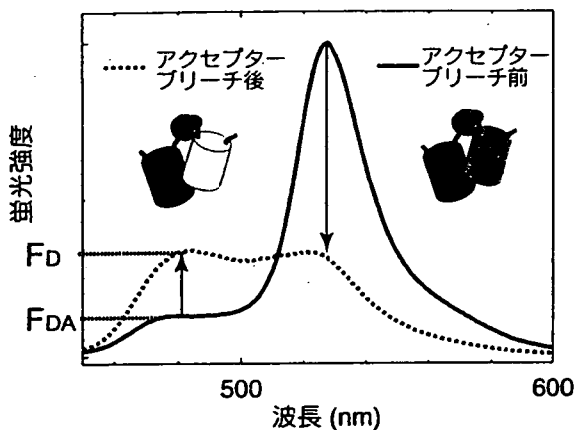


図7 アクセプターブリーチングによる蛍光スペクトルの変化

アクセプターブリーチングにより、アクセプターの蛍光は減少し、消光していたドナーの蛍光が増加する。アクセプターブリーチ前とブリーチ後のドナーの蛍光強度をそれぞれ F_{DA} 、 F_D とすると FRET 効率は $1 - F_{DA}/F_D$ となる。

消光していたドナーが再び発光できるようになるという原理を利用している (図7)。この方法ではドナーの蛍光回復量から FRET 効率という物理量を算出することも可能である。算出方法はきわめて簡単で、アクセプターが存在するときのドナーの蛍光強度を F_{DA} 、アクセプターがない (ブリーチした) ときのドナーの蛍光強度を F_D とすると、FRET 効率 E_t は

$$E_t = 1 - F_{DA}/F_D$$

で導出される。

原理的にも手技的にもシンプルなお方法は、FRET を評価する上で非常に信頼性の高い方法であるが、FRET と再吸収機構を区別できないという欠点がある。再吸収機構とは、蛍光分子の濃度が高いときに、ドナーから放射された蛍光が試料中のアクセプターになりうる蛍光分子に再吸収され、もう一度蛍光として放射されることをいう。再吸収機構の結果、ドナーの蛍光強度は減少し、アクセプターの蛍光強度は増加する。一見、FRET が起きているときと同じことが観察されるのだが、この現象はドナーとアクセプターの距離に依存しないため、なんら物理的な情報を引き出すことができない。したがって “trivial mechanism (無価値な機構)” あるいは “偽 FRET” ともいわれる。この偽 FRET が起きているときにアクセプターを退色させると、ドナーからの発光が増加するので、真の FRET と区別ができない。したがって、アクセプターブリーチング法で FRET の評価をする場合は注意を要する。とくに、FRET プローブを細胞膜や核膜などの微小空間に発現させると、プローブの濃度が高くなるだけでなく、ドナーとアクセプターの遷移双極子モーメントの配向が揃いやすくなるため、偽 FRET が観察されると思っておいたほうがよい。細胞質のように比較的プローブの動きの自由度が高い場所であっても、蛍光タンパク質の発現量が多すぎると、やはり FRET 偽陽性の測定結果が出てしまう。蛍光分光光度計で蛍光測定する場合、蛍光溶液の励起波長における吸収が O.D. (光学濃度) = 0.05 以下になるように推奨されている [5]。それよりも吸収が多い場合には再吸収機構がはたらくためである。顕微鏡下で光学濃度を測定するのは不可能なので、観察者は極端に明るく光る細胞をできうるかぎり FRET の観察対象から外すべきであろう。

2. ドナーブリーチング法 [6]

FRET が起こるとドナーの蛍光量子収率は低下し、その結果、蛍光寿命が短くなる (前章参