

照)。これとまったく同じ理屈でドナーの項間交差量子収率も低下し、その結果、ドナーのブリーチ速度が遅くなる。一方、偽 FRET ではこのようなことは起こらない。そのため FRET に伴うドナーブリーチングの速度を測定することで FRET と偽 FRET の区別が可能となる。これがドナーブリーチング法である。なぜ、項間交差量子収率が減少するとドナーのブリーチング速度が遅くなるのであろうか？ このことを理解するためには、なぜ蛍光分子が励起光照射によってブリーチングするのかを知る必要がある。励起光が照射され S_1 状態になった蛍光分子は、ある確率で項間交差し、三重項励起状態になる。この状態の蛍光分子は基底状態の酸素（三重項酸素）を励起して一重項酸素（活性酸素の一種）を産生したり、他の分子種と反応してさまざまなラジカルを発生させたりする。これらのラジカル種はきわめて反応性が高く、それを生み出した蛍光分子自身を酸化し、不可逆的に蛍光性（吸光性も）をもたない化学構造へ変化させてしまうのである。これが、蛍光分子のブリーチングのメカニズムである。ドナーブリーチング法はアクセプターブリーチング法と同様、通常の蛍光顕微鏡があれば実行可能であり、かつ FRET と偽 FRET を見分けることができるという点で信頼のおける方法であると思われる。ただし、ドナーをブリーチングさせる光によって直接アクセプターもブリーチングされる場合は、まったくデータの評価ができなくなるので、ブリーチングに強いアクセプターを用いる必要がある。蛍光タンパク質で言えば、現在汎用されている CFP-YFP ペアは YFP の光安定性が低いために本方法には適さない。BFP-GFP ペアや YFP-RFP ペアなど、ドナーのほうがアクセプターよりも光安定性が低いペアを選ぶとよい。

実際の測定方法としては、ドナーがブリーチングする強度の励起光に設定して、一定時間（たとえば 1 秒）光照射し、励起光を通常の蛍光観察時の強度にして、蛍光画像を撮影する。これをドナー蛍光がゼロに近づくまで、何度もくり返す。撮影後、観察試料の平均強度を時間に対してプロットすることで減衰曲線が得られる。FRET が起こっていない場合は減衰が速く、FRET が起こっている場合は減衰が遅くなる。50% の蛍光強度まで減衰する時間を解析することで項間交差量子収率が求められ、そこから FRET 効率を求めることができる。

以上、FRET の観察法や評価法を網羅的に述べてきた。ここで取り上げたことは、得られたデータを正しく評価するために必要な最小限の知識として十分に理解し、ぜひ実践に活かしてほしい。

文 献

- [1] Gordon, G. W. *et al.*: *Biophys. J.*, **74**, 2702-2713, 1998
- [2] Zimmermann, T. *et al.*: *FEBS Lett.*, **531**, 245-249, 2002
- [3] Lakowicz, J. R. *et al.*: *Anal. Biochem.*, **202**, 316-330, 1992
- [4] Miyawaki, A., Tsien, R. Y.: *Methods Enzymol.*, **327**, 472-500, 2000
- [5] 木下一彦・御橋廣真(編)：蛍光測定—生物科学への応用—, p. 55, 学会出版センター, 1983
- [6] Jovin, T. M., Arndt-Jovin, D. J.: *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **18**, 271-308, 1989

[永井健治・齋藤健太]

実習 6

FRET

実習6-1 スペクトルイメージングによる FRET の検出

目 的 FRETによって蛍光スペクトルが変化することを理解する。

実習内容 FRET有無での蛍光スペクトル変化を測定する。

- SECFP (CFPのバリエーション) と Venus (YFPのバリエーション) それぞれ単独の蛍光スペクトルをスペクトル顕微鏡で測定
- SCAT3.1 (SECFP-Venus 連結, FRET 状態) の蛍光スペクトル測定
- スペクトル分解によるクロストークの除去
- 分断された SCAT3.1 (SECFP と Venus が分断, FRET がない状態) の蛍光スペクトルを測定し, FRET 状態と比較

関連の講義

- 第 6 章 スペクトルイメージング
- 第 8 章 改変型蛍光タンパク質の利用
- 第 13 章 FRET の基礎
- 第 14 章 FRET の測定法と評価

背 景 caspase3 の指示薬である SCAT3.1 (SECFP-DEVD-Venus) [1] は, SECFP と Venus の間に, caspase3 で切断されるアミノ酸配列をもっているために, アポトーシスによって caspase3 が活性化されると, SECFP-Venus ペア間に FRET が起こっている状態から, FRET が解除された状態へと移行する (図 1)。アポトーシスは, 細胞培養液にシクロヘキシミド (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) と抗 Fas 抗体 (500 ng/ml) を添加後, 4~5 時間で起こる。

材 料

- SCAT3.1 を一過的に発現する HeLa-S3 細胞 (生細胞)
- アポトーシスを誘導した SCAT3.1 発現細胞 (生細胞でもよいが, ホルムアルデヒドで固定したものでもよい。固定した細胞は, PBS で 3 回洗い, PBS 中に保存する)

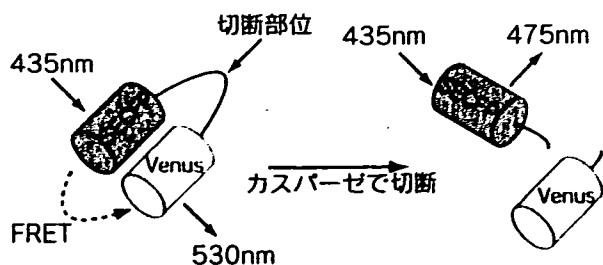


図1 caspase3 指示薬としての SCAT3.1 の分子構造の模式図

SCAT3.1 は、SECFP と Venus の間に、caspase3 で切断を受ける DEVD 配列をもつ。細胞で発現した SCAT3.1 は、生理的な環境では SECFP と Venus の間に FRET が起こるが、アポトーシスが誘導されると caspase3 が活性化し、SECFP と Venus の間で切断を受けて FRET が解消される。

- SECFP を発現する HeLa-S3 細胞 (生細胞)
- Venus を発現する HeLa-S3 細胞 (生細胞)

レーザー走査型共焦点顕微鏡 (スペクトル蛍光顕微鏡) (第 6 章と口絵参照)

- Leica SP5, C-Apochromat 63×/NA 1.4, oil
- Nikon C1si PlanApochromat 60×/NA 1.4, oil
- Olympus FV1000, UPlanApo 60×/NA 1.35, oil
- Zeiss LSM510META, C-Apochromat 40×/NA 1.2, W, Corr
- SECFP 励起用レーザーとして、半導体レーザー (405 nm, 430 nm, 440 nm 各種レーザー), ガスレーザー (413 nm Kr) が必要

① 細胞の準備

- ガラスボトムディッシュで培養した HeLa 細胞に、観察の 1~2 日前に SCAT3.1 遺伝子をコードする DNA プラスミドをトランスフェクションし、SCAT3.1 を発現させる。
- 観察前に、通常の培地を、(背景光を減らすため) フェノールレッド不含培地に取り換える。通常の培地は CO₂ インキュベータ外では pH を保てないため、20~25 mM HEPES (pH 7.3) を加える。観察前に、培地の乾燥を防ぐためミネラルオイルを重層する。

② 顕微鏡によるスペクトル観察

- サンプルを顕微鏡にセットし、透過光観察により対物レンズのピントを細胞に合わせる。
- Hg ランプによる励起光を用いて蛍光観察を目視で行い、観察すべき細胞を選ぶ。
- 観察したい蛍光スペクトルの範囲 (たとえば、SCAT3.1 の場合は、450~580 nm 程度) を決め、その観察に必要なダイクロイックミラーとレーザーを選択する。
- SCAT3.1 (SECFP-Venus が FRET を起こしている) 発現細胞, SECFP 発現細胞, Venus 発現細胞, アポトーシスを起こした SCAT3.1 発現細胞

(FRETは解除している)を、順次観察する。使用する各装置によって、蛍光スペクトルを測定する仕組み、方法、時間が異なるので、その仕様に合わせて測定する。

③ コンピュータへのデータ取り込み

- 最も明るい(蛍光強度が高い)波長でもシグナルが計測レンジをこえないように、レーザーパワー、ピンホールサイズ、PMTのゲイン(感度)、スキャンスピードなどのパラメータを調節する。12ビット(4,096階調)でデータを取る場合は、シグナルは2,000カウント程度を目安とすると、多少増減してもレンジ内に収まり、かつ高いS/N比が確保できる。
- パラメータの設定時に行った励起により、細胞が弱るか、蛍光が退色しているおそれがある。そのため、実際のデータ取りは、パラメータの設定に使ったのとは別の細胞を使う。または別の培養器の細胞を用いるとよい。

④ データ解析

- まず蛍光スペクトルのreferenceを作るためにSECFP単独、Venus単独の蛍光スペクトルデータを取り、コンピュータに記憶させる。
- SCAT3.1の蛍光スペクトルを取り、上のreferenceデータを用いて、各顕微鏡装置に付随するコンピュータソフトでlinear unmixingを行い、それぞれSECFP、Venus単独の蛍光スペクトルに分解する。

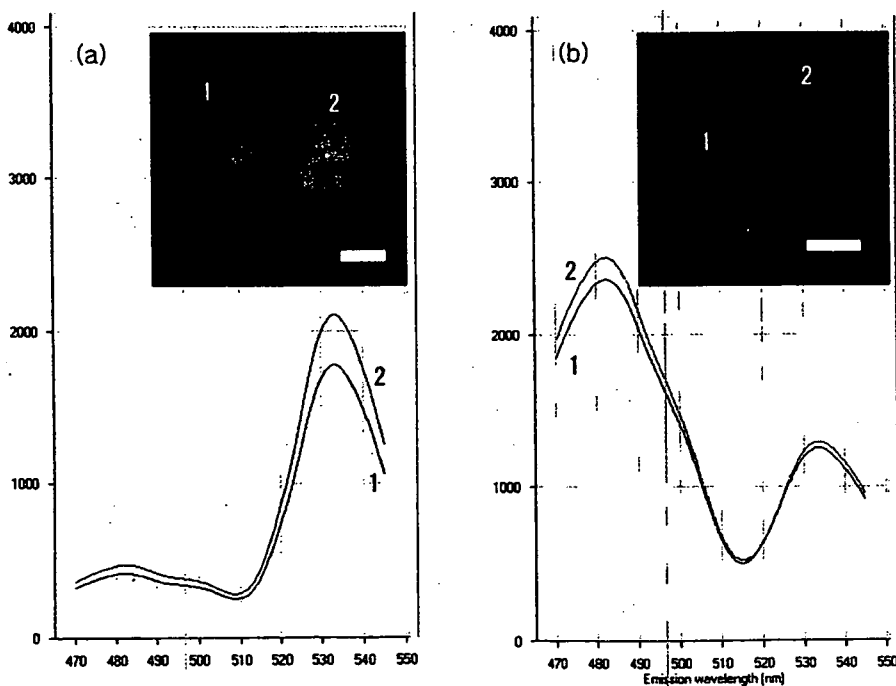


図2 FRETの有無での蛍光スペクトルの変化

413 nmのレーザーを使ってCFPを励起したときの画像と蛍光スペクトル。
(a) 正常な細胞(FRET), (b) アポトーシスを起こした細胞(FRET解除)。

- アポトーシスによって SCAT3.1 が切断され FRET が解除されたサンプルに対しても、同様のデータ取得と linear unmixing を行う。
- アポトーシスなし (FRET あり) とアポトーシスあり (FRET なし) の SECFP と Venus の蛍光強度の比から、FRET の有無を検討する (図 2)。

考察のポイント

- スペクトルイメージングによる観察が威力を発揮するのはどのような状況か?
- スペクトル顕微鏡はどのような仕組みで蛍光スペクトルを取得するのか?
- linear unmixing ではどうやって異なる蛍光物質から発せられる蛍光をスペクトル分解するのか?
- FRET とはどのような現象か? (なぜ、アポトーシスありの細胞となしの細胞で蛍光が変化したのか?)

[原口徳子・永井健治・松田知己]

実習 6-2 アクセプターブリーチングによる FRET の検出

目的 アクセプターブリーチングによるドナーの蛍光回復から FRET の真偽判定を行う。測定データから FRET 効率を算出する方法を理解する。

実習内容

- 1) アクセプターの蛍光色素をブリーチする前後における、ドナーの蛍光強度を顕微鏡下で測定する。
- 2) 得られた蛍光強度データを基に FRET 効率を算出する。

関連の講義

第 13 章 FRET の基礎
第 14 章 FRET の測定法と評価

材料 SCAT3.1 を発現する HeLa-S3 細胞 (実習 6-1)
SECFP と Venus を共発現する HeLa-S3 細胞

機材 レーザー走査型共焦点顕微鏡

- Leica SP5, C-Apochromat 63×/NA 1.4, oil
- Nikon C1si PlanApochromat 60×/NA 1.4, oil
- Olympus FV1000, UPlanApo 60×/NA 1.35, oil

- Zeiss LSM510META, C-Apochromat 40×/NA 1.2, W, Corr
- SECFP 励起用レーザーとして、半導体レーザー (405 nm, 430 nm, 440 nm 各種レーザー), ガスレーザー (413 nm Kr) が必要

手順

① 細胞の準備

実習 6-1 と同じ。

② 顕微鏡による蛍光観察とブリーチング

- 1) サンプルを顕微鏡にセットし、透過光観察により対物レンズのピントを細胞に合わせる。
- 2) 水銀ランプ (あるいはキセノンランプ) を用い目視による蛍光観察を行い、SCAT3.1 が発現している細胞を選ぶ。
- 3) FRET 観察および Venus のブリーチングに必要なダイクロイックミラー、フィルター、レーザーを選択する (蛍光スペクトルを取る場合も、それに必要なダイクロイックミラー、フィルター、レーザーを選択する)。

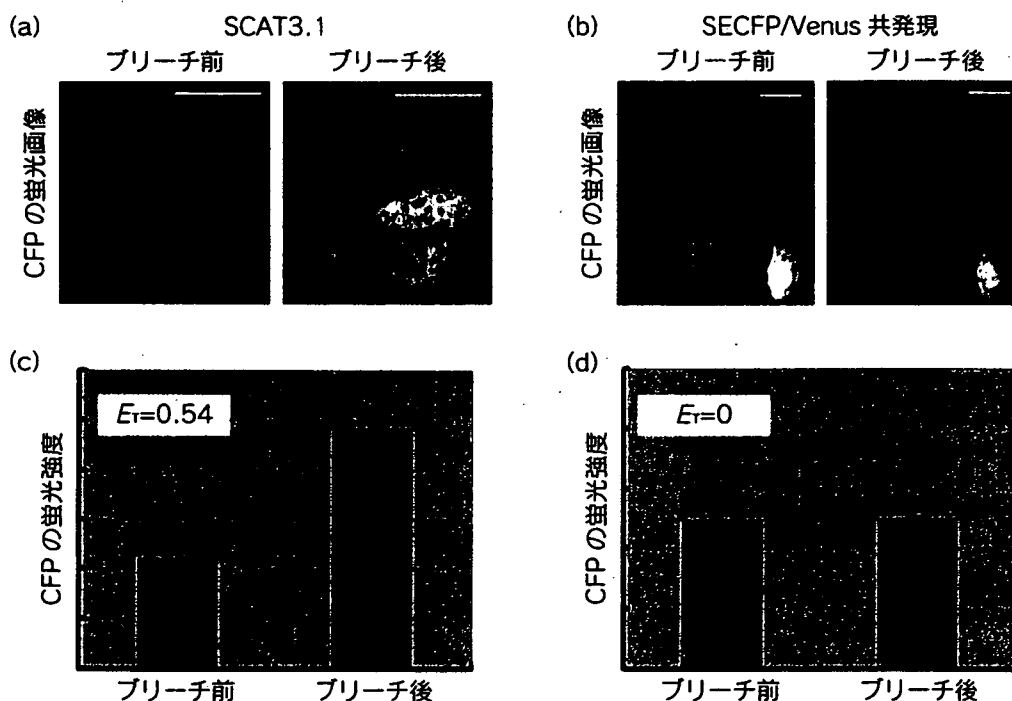


図3 アクセプターブリーチングによる FRET の検証

- (a) アクセプターブリーチ前後の SCAT3.1 を発現する HeLa 細胞のドナー蛍光画像。
- (b) アクセプターブリーチ前後の Venus と SECFP を発現する HeLa 細胞のドナー蛍光画像。
- (c) (a) の細胞におけるアクセプターブリーチ前後でのドナーの蛍光強度変化。
- (d) (b) の細胞におけるアクセプターブリーチ前後でのドナーの蛍光強度変化。

図 1 に示すように、アクセプターブリーチ後には SCAT3.1 内のドナーである SECFP の蛍光強度が増加しているのがわかる。一方、SECFP と Venus を共発現する細胞においては、SECFP の蛍光強度増加は見られなかった。また、ドナーの蛍光強度変化から、FRET 効率を求めたところ、SCAT3.1 では 0.54、SECFP と Venus では 0 という値が得られた。以上から、これらの細胞では、SCAT3.1 では効率よく FRET が起こっているのに対し、それを構成している蛍光タンパク質が共発現しただけでは FRET が起こらないことが示された。

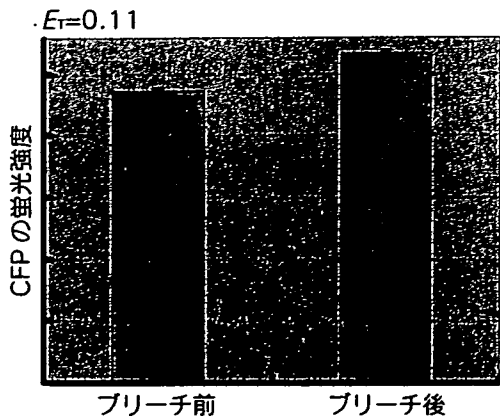


図4 蛍光再吸収による偽 FRET

SECFP と Venus を共発現する細胞の中でも、比較的明るい細胞をアクセプターブリーチするとドナーの蛍光強度が有意に増加する。また、その強度変化から FRET 効率を算出すると 0.11 であった。本結果は、アクセプターが大量に発現する細胞を測定していることから、再吸収機構 (図5、および第14章「FRETの測定法と評価」参照) が起こっているものと考えられた。

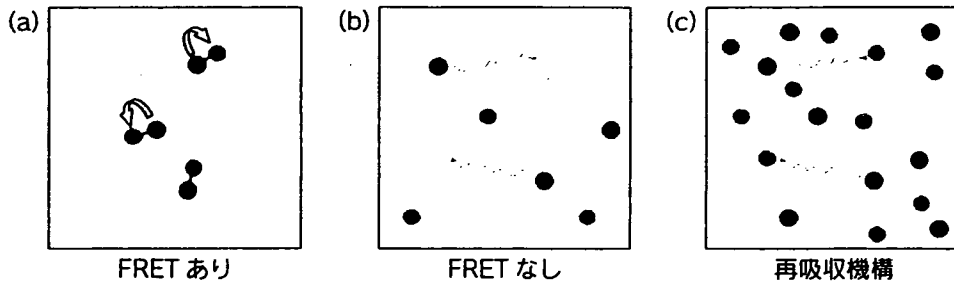


図5 再吸収機構

- (a) FRET が起きている場合、ドナー (濃いグレー) からアクセプター (薄いグレー) にエネルギーが移動し、アクセプターから蛍光が放出される。
- (b) FRET が起きているとき、ドナーから蛍光が放出される。
- (c) FRET が起きているときでも、アクセプターが過剰に存在すると、そのアクセプターがドナーから放射された蛍光を吸収してしまうため、アクセプターからの蛍光が観察される。

FRET 観察時の SECFP の励起には 405 nm 半導体レーザー (413 nm, 430 nm, 440 nm のレーザーでもよい) を使用する。Venus のブリーチングは Ar レーザーの 515 nm を使用する。

- 4) 励起光強度などの測定条件を適当な細胞を用いて検討する。アクセプターブリーチ後は、ドナーの蛍光強度が増加するので、それを考慮して励起光強度などを決める必要がある。測定には条件検討で使用した以外の細胞を用いる。
- 5) SCAT3.1 を発現する細胞に対して、SECFP と Venus それぞれの蛍光強度を測定する (蛍光スペクトルを取得してもよい)。
- 6) アクセプターである Venus に対して、515 nm のレーザーパワーを最大にし、細胞全体をスキャンして完全にブリーチする。
- 7) ブリーチング後、SCAT3.1 の SECFP と Venus それぞれの蛍光強度を、上と同じ条件で測定する (蛍光スペクトルでもよい) (図3)。
- 8) SECFP と Venus を共発現する HeLa-S3 細胞に対しても、上と同様の測定を行う。発現量が違う細胞を選び、再吸収機構による“偽 FRET”の有無を検討する (図3、図4、図5)。

③ データ解析と FRET 効率の計算

- 1) 細胞全体（または特定領域）について、ブリーチング前後での SECFP（ドナー）の蛍光強度を求める。
- 2) その値を、第 13 章「FRET の基礎」、式 (12) に代入し、FRET 効率を計算する。

考察のポイント

- SECFP と Venus の吸収・蛍光スペクトルと選択したフィルター・ダイクロイックミラーとの関係。
- アクセプターブリーチングによりドナーの蛍光強度の回復が起こっていれば「真」、ドナーの蛍光強度の回復が起こっていなければ「偽」と判定してよいか？
- アクセプターブリーチングで FRET の真偽が見分けられないのはどのような場合か？ また、その場合どのような方法を用いれば FRET の真偽を確かめられるか？
- アクセプターが完全にブリーチできていない場合、FRET 効率はどのように見積もられるのか？（小さく見積もられるか、大きく見積もられるか？）
- FRET 効率からいえること、推測できることは何か？

[斉藤健太・永井健治]

実習 6-3 レシオイメージングによる FRET の検出

目的 レシオイメージングによる FRET の検出についての原理と方法を理解する。

実習内容 細胞内 Ca^{2+} 濃度変化を分子内 FRET の変化として検出する。細胞培養液にヒスタミンを添加することで生じる Ca^{2+} 波を、Cameleon YC3.60 の蛍光変化として高速撮影で捉える。

関連の講義
第 13 章 FRET の基礎
第 14 章 FRET の測定法と評価

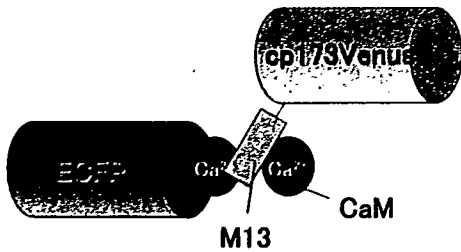


図6 カルシウム濃度指示薬としてのCameleon CY3.60の分子構造の模式図

ECFPと円順列変異 cp173Venus の間にカルシウムと結合するサイトをもつ。カルシウムが結合しない状態ではFRETが起こらないが、カルシウムが結合するとFRETを起こす。そのために、カルシウム濃度を測定する指示薬として使われている。

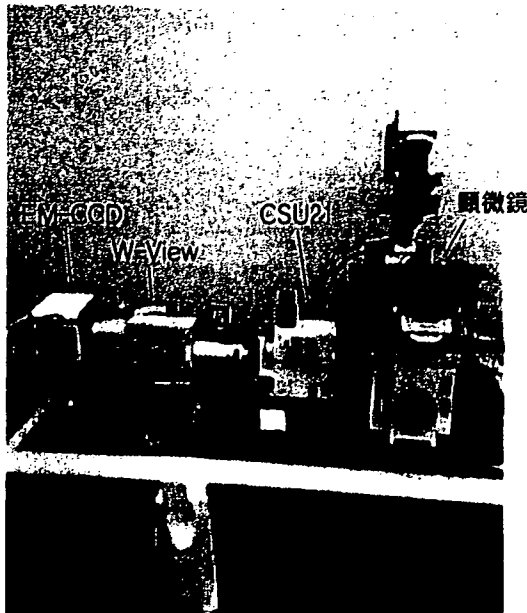


図7 高速FRET観察システム

背景

Cameleon YC3.60 [2] は Ca^{2+} 結合タンパク質であるカルモジュリン (CaM) と Ca^{2+} -CaM 結合ペプチド M13 をタンデムに連結したペプチド鎖を CFP と YFP でサンドイッチした構造をもつ (図6)。 Ca^{2+} の濃度に応じて FRET 効率が変わるので、 Ca^{2+} 指示薬として使われる。

材料

Cameleon YC3.60 を発現する HeLa 細胞 (生細胞)
 ヒスタミン 200 μM 溶液
 ハンクス緩衝液カルシウム入り (HBSS+)

機材

- ニポードディスク共焦点顕微鏡 (下記を組み合わせたシステム) (図7)
- ・顕微鏡: Olympus IX81, PlanApo 60 \times /NA 1.4
 - ・共焦点システム: 多点走査型共焦点ユニット CSU21 (横河電機)
 - ・励起光源: 440 nm 半導体レーザー
 - ・観察光学系&カメラ: W-View+EM-CCD カメラ (または Ashura 3CCD) (浜松ホトニクス) (第14章「FRETの測定法と評価」参照)
 - ・画像取得および解析ソフト: AQUACOSMOS (浜松ホトニクス)

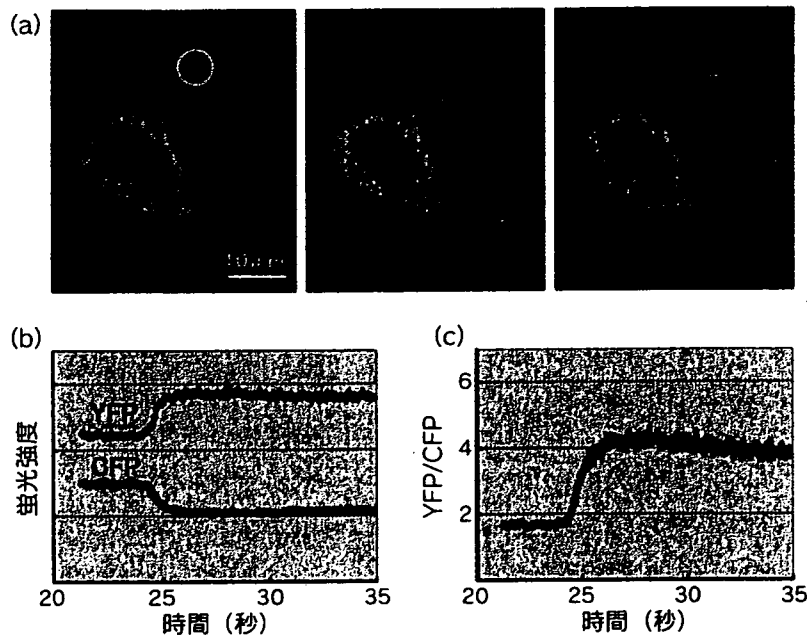


図8 HeLa細胞をヒスタミン刺激したときの Ca^{2+} 濃度変化

(a) 共焦点蛍光レシオ画像。

(b) YFPとCFPチャンネルの蛍光強度変化。

(c) YFP/CFPレシオ値の変化。

ヒスタミン刺激による小胞体からの Ca^{2+} 動員の様子をビデオレート共焦点観察した。画像取得後、バックグラウンドの画像を減算し、AQUA COSMOSのレシオ表示・ Ca^{2+} 濃度計算機能を用いて、“アクセプター画像とドナー画像の比”の表示と Ca^{2+} 濃度の計算を行った。

手順

① 細胞の準備

- ガラスボトムディッシュで培養したHeLa細胞に、観察の1日前にcameleon YC3.60遺伝子をコードするDNAプラスミドをトランスフェクションし、cameleon YC3.60を発現させる。

② 顕微鏡による蛍光観察

- トランスフェクション済み培養細胞ディッシュをインキュベータから取り出す。
- 観察前に、培地をHBSS+に換える。
- 顕微鏡ステージの上に培養細胞ディッシュを設置する。
- 水銀ランプを光源として用いて、蛍光性細胞を探す。
- 励起光を遮断する。
- カメラによる画像取得開始
- CSUのシャッターを開け、励起レーザーを照射する。
- 観察細胞の蛍光強度に合わせ、カメラの露光時間やピニングなどをセッティングする。
- カメラのセッティングが終了したら、すぐにCSUのシャッターを閉じる。
- 画像取り込み（バースト）開始

- 刺激薬剤（ヒスタミンなど）を培養液に加える。
- 画像取得続行
- 画像取得終了
- 画像解析（図 8）

考察のポイント

- フィルター交換方式，W-View 光学系，および 3CCD で FRET 観察するときの相違点は何か？
- 観察対象に応じて，適切に画像取得間隔を設定する必要がある。どのような観点で設定を行なうべきか？

文献

- [1] Nagai, T., Miyawaki, A.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **319**, 72-77, 2004
- [2] Nagai, T. *et al.*: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 10554-10559, 2004

[永井健治]

実習 9

全反射顕微鏡

実習 9-1 全反射顕微鏡による 1 分子動態観察

目的

- 全反射顕微鏡の使い方と 1 分子計測法を学ぶ。

実習内容

受容体へ結合したローダミン標識 EGF の細胞膜上での拡散運動について、全反射顕微鏡を用いて 1 分子レベルでリアルタイム観察する。コンピュータにデータを取り込み、画像解析ソフトを用いて蛍光輝点の輝度重心の運動軌跡を求める。拡散速度の分布、拡散速度と輝点の蛍光強度との相関について解析する。

関連の講義

第 22 章 全反射顕微鏡と 1 分子計測

背景

上皮成長因子 (epidermal growth factor ; EGF) は、上皮細胞・線維芽細胞など種々の細胞に対して増殖作用を及ぼすペプチドホルモンである。増殖応答は細胞外からやってきた EGF 分子が細胞膜上の受容体に結合することによって開始されるが、細胞質内への情報伝達には、EGF-受容体複合体が 2 量体を形成し、受容体分子どうしが相手の細胞質ドメインのチロシン残基を相互にリン酸化することが必要である。

EGF 受容体は細胞膜を 1 回貫通した膜タンパク質であり、細胞膜には単量体として存在する他に、EGF の結合以前から 2 分子あるいは数分子の会合体を形成していることが明らかになってきた。細胞膜は脂質二重層を基本構造とする 2 次元の液体であり、EGF 受容体は、細胞膜内を熱拡散でランダムに運動している。受容体の一部は膜骨格への結合などにより、運動が抑制されている。EGF-受容体複合体の 2 量体形成は、受容体会合体に 2 分子の EGF が順に結合していく場合と、2 つの EGF-受容体複合体が熱運動しながら衝突し、結合して起こる場合がある。

ローダミン標識した EGF を細胞に結合させ、それを全反射顕微鏡で観察すると、個々の分子が蛍光輝点として検出される。輝点の運動は、EGF-受容体複合体の熱拡散運動を表す。輝点の蛍光強度はその場所に存在する分子数に関係

している。

材 料

- HeLa 細胞
- ローダミン標識 EGF

機 材

- YAG レーザー (532 nm) 全反射顕微鏡システム (オリンパス, ニコンなど)
- EM-CCD カメラ (アンドール, 浜松ホトニクス, ローパーサイエンティフィックなど)
- 1分子追跡ソフト (オリンパス, 浜松ホトニクスなどから販売されている)

手 順

① 細胞の準備

- 超音波洗浄したカバーガラス上に培養した HeLa 細胞を観察用チャンバーにセットする。
- 背景光の上昇を防ぐため, フェノールレッド, 血清を含まない培地を用いる。高分子浸透圧を保つため, 1%の BSA を加える。また, 通常の培地は CO₂ インキュベータ外では pH を保てないため, 5 mM PIPES (pH 7.2~7.4) を加える。

② 全反射顕微鏡によるローダミン標識 EGF の蛍光 1 分子観察

- コンピュータに搭載されているイメージングツールを起動し, CCD カメラによる観察像をディスプレイに表示させる。
- チャンバーを顕微鏡にセットし, 透過光観察により対物レンズのピントを細胞底面に合わせる。
- YAG レーザー光励起による全反射顕微鏡に切り替える。
- 最終濃度が 1~10 nM になるようにローダミン EGF を加える。
- 光路調整つまみを操作して, 対物レンズからの YAG レーザー射出角度を全反射励起になるように調節し, 細胞基底膜に結合したローダミン EGF

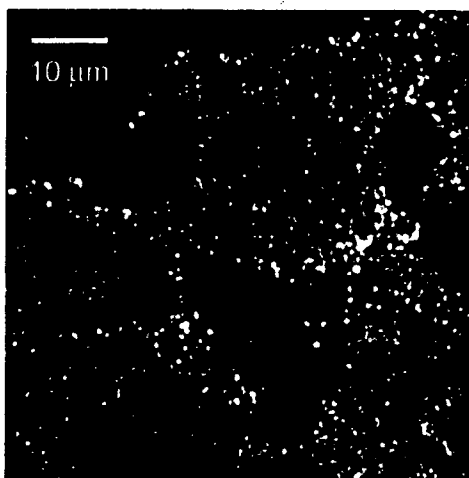


図1 ローダミン標識 EGF の全反射蛍光顕微鏡像

を1分子レベルで検出できるようにする(図1)。レーザー射出角度をレンズの中央部から周辺部に移動させていくと、全反射角に達したところで、背景光が急激に減少し、ローダミンEGF1分子が高コントラストで観察できるようになる。

- 焦点を上下して、全反射になったときに、細胞内や細胞上面からの蛍光信号が観察されなくなることを確認する。また、入射角の違いによる見え方の違いを見る。

③ コンピュータへのデータ取り込みの準備

- ディスプレイを見ながらS/N比と蛍光退色の度合いのバランスが適切になるように、入射角、レーザーパワーとカメラの感度のパラメータを調節する。(運動を時間分解能よく観察するため、1秒あたり10~30枚程度の積算時間にする。)

④ データ取得

- 上記パラメータが決まったら、データ取得用に新たな細胞を準備する。(時間がたつとEGFは細胞内に取り込まれる。)
- ローダミン標識EGFを投与し、リアルタイム観察像を1つの視野で数十秒間取得する。
- 各人がそれぞれ2ないし3の視野の動画を撮る。

⑤ データ解析

- 取得した連続画像を、1粒子追跡ソフトウェアで読み込み、S/N比の良さそうな輝点を選んで、動態追跡を行う(図2)。グループ全体で1秒間以上の輝点追跡データを数百個集める。
- 解析結果のデータを出力し、平均2乗変位から拡散係数を求める(図3)。
- 同時に、各輝点の蛍光強度を求める。

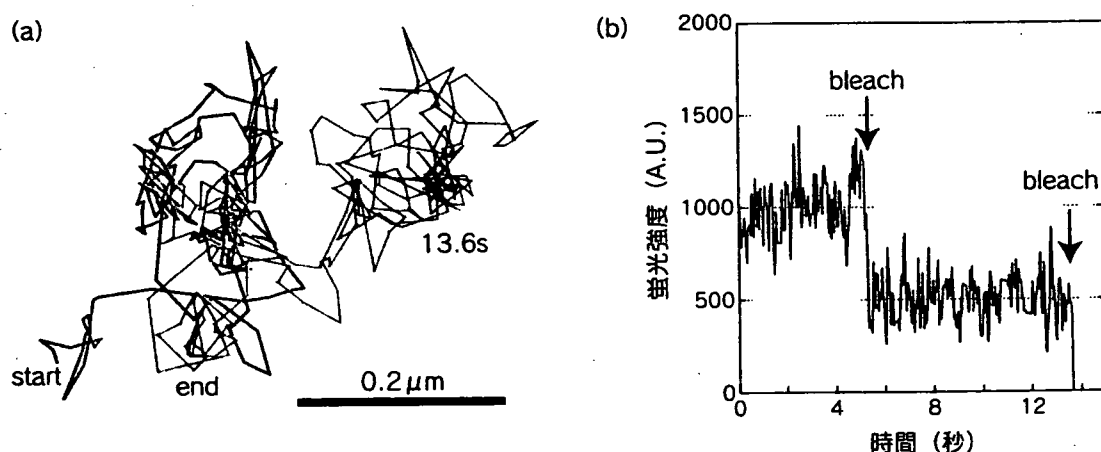


図2 運動軌跡(a)と蛍光強度変化(b)の例

1段階目の退色の前後の軌跡をそれぞれグレー、青で示している。A.U.:任意の単位。

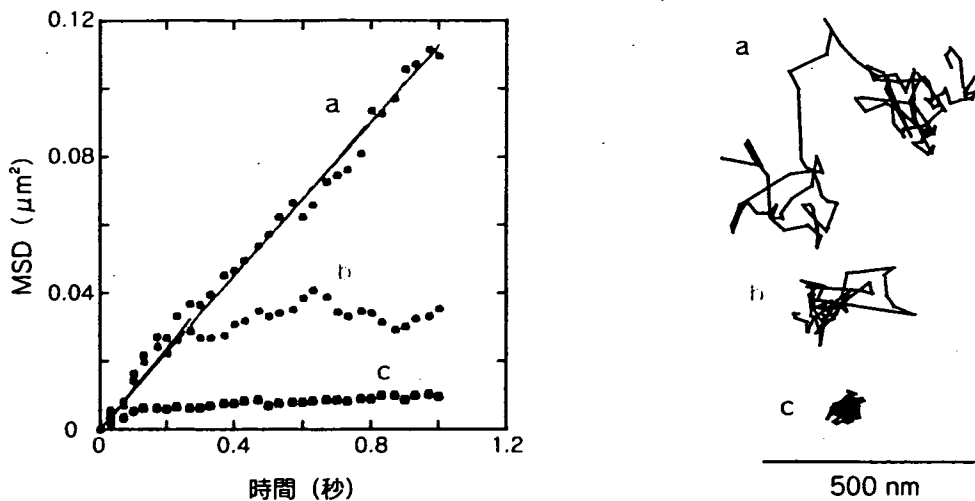


図3 平均2乗変位の時間発展(左)と運動軌跡(右)

GFPを融合したEGF受容体の例。EGFは結合していない。短時間領域(30~170ミリ秒)と長時間領域(170~670ミリ秒)の見かけの1分子拡散係数から、個々の粒子の運動をa~cの3つに分類し、各々40~50粒子の平均2乗変位(MSD:この場合は多数粒子平均)をプロットしたのが左図。右図はa~cに分類された粒子の運動軌跡の例。

考察のポイント

- 全反射画像と、レーザー光が光軸上にあるときの落射蛍光画像、その中間にある斜光照明画像を比較する。
- どこが全反射の臨界角かわかるか。
- 1分子運動軌跡には、どのような特徴があるか。運動軌跡をいくつかのパターンに分類することができるか。各々のパターンで平均2乗変位の時間発展はどのようになっているか。
- 蛍光強度変化から、光退色の様子を観察せよ。退色から会合体数を求めることができるか。退色するまでの時間分布はどうなっているか。(EGFと受容体の解離は 10^4 秒程度と遅いので、輝点の消失がEGFの解離で起こる可能性はほとんどない。しかし、受容体のエンドサイトーシスは分のオーダーで起こるので、細胞内への取り込みによる焦点面からの輝点の消失は見える可能性がある。退色と取り込みを区別できるだろうか。)
- 輝点の蛍光強度は、ローダミンEGFの数に比例し、EGF受容体の会合数に関係しているが、1分子蛍光強度のゆらぎは大きいので、個々の輝点の会合数を求めるのはむずかしい。しかし、多数粒子の蛍光強度分布として、EGF数の分布を求めることはできる。蛍光強度と拡散係数や運動パターンの間に相関があるか。

[日比野佳代・佐甲靖志]

実習9-2 分光光度計でのスペクトル測定と1分子 FRET

目的

分光光度計によるスペクトル測定を用いた FRET 観察法と1分子 FRET 観察法を学ぶ。

実習内容

蛍光色素間のフェルスター共鳴エネルギー移動 (FRET) により色素間の微細な距離変化を可視化することができる。一方の蛍光色素 (ドナー) を励起したときに、もう一方の蛍光色素 (アクセプター) が近傍に存在すると、無輻射的にエネルギーがドナーからアクセプターに移動し、アクセプターから蛍光が発せられる。このときのエネルギー移動効率は、ドナー-アクセプター間の距離の6乗に反比例し、かつ蛍光色素の双極子モーメントの配向に依存するため、色素間のわずかな距離の変化を検出することができる。しかし通常の計測では、非常に多くの色素の蛍光を十把一からげに観測するため、個々にふるまう分子の集合体としての平均値しか測定できない。FRET を1分子観察することにより、分子の複雑なふるまいを動的にかつ詳細に可視化するのが本手法のねらいである。

関連の講義

- 第13章 FRETの基礎
- 第14章 FRETの測定法と評価
- 第22章 全反射顕微鏡と1分子計測

背景

本実習では、両端にドナーとアクセプターを共有結合させたテロメア DNA を用いる。テロメア DNA は TTAGGG のくり返し配列であるが、陽イオン存在下で G-quadruplex とよばれる4本鎖構造をとる。陽イオンの添加によるテロメア DNA の高次構造変化を DNA 両端につないだ蛍光色素間の FRET 効率の変化として捉え、分子動態の観察を行う。

材料

Potassium Sensing Oligonucleotide
(Alexa 488-GGGTTAGGGTTAGGGTTAGGG-TAMRA)

機材

蛍光分光光度計：日立 F-2500
顕微鏡：TE2000E+パーフェクトフォーカスシステム+全反射照明系 (いずれも Nikon)
分光光学系：W-VIEW システム (浜松ホトニクス)
カメラ：Cascade II EM-CCD (日本ローパー)
画像取得・解析ソフト：MetaMorph (日本モレキュラーデバイス)

実験の手順

① バルクでの FRET 計測

- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に終濃度が 0~100 mM の NaCl と 0.1 μ M の Alexa 488-PSO-TAMRA が溶解したサンプルを用意する。
- サンプルを石英キュベットに移し、蛍光分光光度計にセットする。
- 励起光を 470 nm に設定し、500~650 nm の蛍光スペクトルをそれぞれのサンプルについて計測する (図 4)。
- 得られたスペクトルから FRET 効率を求め、重なり積分とフェルスター距離から蛍光色素間の距離を求める。
- <オプション>それぞれのサンプルに UV を照射し、FRET 効率の変化を肉眼で観察する (図 4)。

② 1 分子 FRET 計測

- アルカリ洗剤とメタノールで洗浄したカバーガラスを全反射顕微鏡にセットする。
- ガラス表面の蛍光性のゴミを手がかりに、ガラス表面にピントを合わせる。
- 励起光源 (488 nm) の ND フィルターをすべて外し、ガラス表面に付着している蛍光性のゴミを退色させる。
- Nikon パーフェクトフォーカスを作動させ、バーストモードによる取り込みを開始する。
- 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解させた Alexa 488-PSO-TAMRA (ピコモル程度) 10 μ l をカバーガラス表面に静かにのせる。
- 観察を開始し、5 秒ほど経過してから 600 mM の NaCl を 2 μ l 添加する。
- W-View システムで、ドナーとアクセプターの蛍光量を同時に取得し、FRET の起こっている輝点を抽出する。
- 画像解析を行い、蛍光強度の変化を測定する (図 5)。

考察のポイント

- 1 分子 FRET 観察とバルク FRET 観察で得られたデータのそれぞれの本質を考察する。
- データから計算される蛍光色素間の距離にはどれほどの妥当性があるか考察する。
- 蛍光スペクトルの等発光点とは何か? カチオン濃度を変化させたときに生じた等発光点は何を意味するのか?
- ガラス表面上で 1 分子 FRET 観察を行う際の問題点を考察する。

[小寺一平・谷 知己・永井健治]

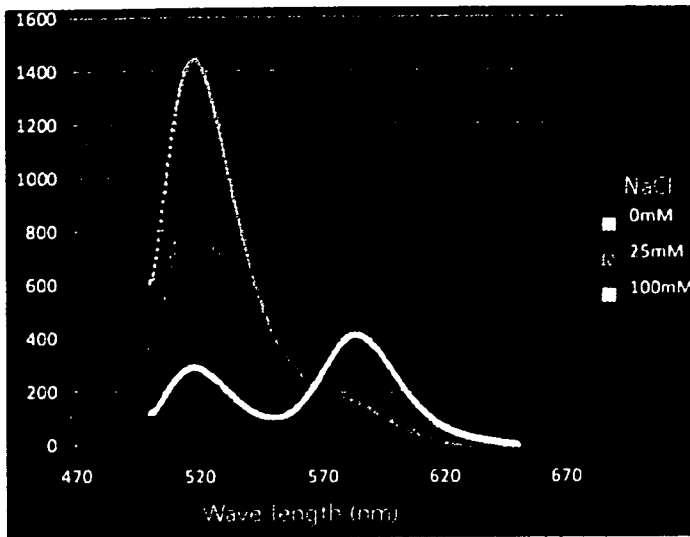


図4 バルク FRET 計測の結果

(左) バルク FRET 計測による蛍光スペクトル。カチオン濃度の上昇に伴い FRET 効率が上昇する様子がわかる。また 570 nm 付近に等発光点が存在する。

(右) 0 mM と 100 mM の NaCl が含まれたサンプルに UV を照射すると FRET 効率の変化が肉眼で観察できた。

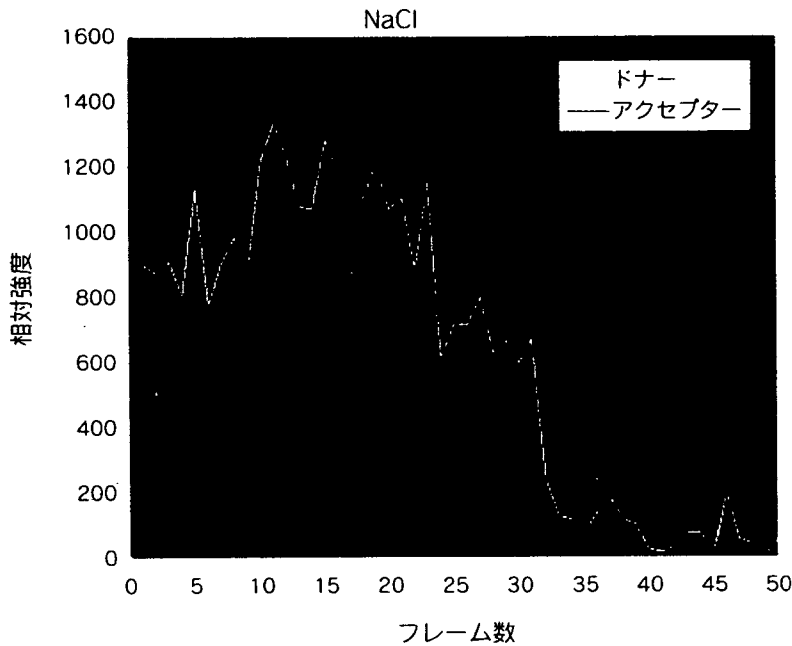


図5 1分子 FRET 観察の結果

NaCl 添加後にドナーの蛍光は減少し、アクセプターの蛍光は増加している。その後、同時刻にドナーとアクセプターの蛍光が消失する。1分子 FRET の観察から、ドナーとアクセプターの強度が同時期に対照的に変化する輝点を得られた。

実験がうまくいく

蛍光・ 発光試薬の 選び方と使い方

編集：三輪佳宏

成功の秘訣は
試薬選びにあり!

羊土社

4章 細胞・酵素活性測定のためのプローブ

② アポトーシスの検出

—生きた細胞・個体におけるカスパーゼ活性の
ライブ検出

竹本 研, 永井健治, 宮脇敦史, 三浦正幸

Kiwamu Takemoto, Takeharu Nagai, Atsushi Miyawaki, Masayuki Miura

はじめに

細胞死は生体を構成する細胞の数の調節,あるいは組織の形態形成において非常に重要なイベントの1つである。線虫の遺伝学的解析から細胞死実行因子ced-3, ced-4の発見により,細胞死は実行遺伝子により巧妙に計画されていることが明らかになった(プログラム細胞死)。これまでに,ced-3とヒトインターロイキン1 β 変換酵素(ICE:IL-1 β conbering enzyme)とのホモロジーをもとに,哺乳類から14種類,ショウジョウバエでは7種類のカスパーゼファミリープロテアーゼが報告されている。

カスパーゼは細胞死が実行される際に活性化されるシステインプロテアーゼであり,基質内の特定のアスパラギン酸残基のC末端側で切断するユニークな活性をもつ。カスパーゼが細胞内のさまざまな基質を切断することにより,細胞死を実行するものと

考えられている。一般的に“アポトーシス”と呼ばれる細胞死形態をとる場合は,このカスパーゼに依存する細胞死実行経路が関与しているとされ,実際にカスパーゼの特異的阻害剤で多様な細胞死が効率よく抑制される。本項では,培養細胞あるいは個体レベルでのアポトーシス細胞の検出法・カスパーゼ活性の検出法に関して解説したい。

アポトーシスに伴う形態的变化を検出する手法

1. 核・染色体DNAの断片化検出

アポトーシス細胞で認められる典型的な形態的变化として,核の断片化・染色体DNAの断片化・細胞膜の構造変化があげられる。こうした細胞の形態変化を検出することで,培養細胞から個体レベルで起こる細胞死の検出が可能である(表)。ヘキスト

表◆細胞死誘導時の細胞・染色体の形態変化を検出する主な手法

染色手法	細胞死検出の原理	発売元メーカー(販売元)
Hoechst染色	染色体DNAに結合し,各構造の断片化・凝集を観察する	Molecular Probes社など
TUNEL染色	DNAの断片化により生じたDNA3'-OH末端に, TdTを用いて, 標識dUTPをニックエンドラベルする	CHEMICON(フナコシ)社など
Annexin V染色	細胞死誘導時に起こるPSの細胞表面への露出を標識済みのPS結合タンパク質Annexin Vで検出する	バックマン・コールター社など