

蛍光相互相関分光法を駆使した生細胞内の分子状態解析

佐々木 章, 金城 政孝

(北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞機能科学研究室)

1. はじめに

ゲノム配列が短時間で解読できる時代になり、現在はそれらの遺伝子配列情報を基礎としたプロテオーム解析に研究の中心がシフトしてきている。すなわち生命現象を主に担うタンパク質がいつ、どこで、どのような相互作用をして機能しているかを解析することが求められている。本稿では、蛍光イメージング技術の一つであり、生きた細胞あるいは水溶液中における生命現象の定量解析のための基盤技術として近年発展している蛍光相互相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy: FCS) と蛍光相互相関分光法 (fluorescence cross-correlation spectroscopy: FCCS) の利用法について紹介するとともに、読者が自身の研究へ適用しようとする際のハードルが少しでも下がるよう、実際的な利用例や注意点を交えながら述べたい。さらに、FCCS から得られる情報と FCS から得られる情報それぞれを組み合わせることで詳細な分子状態を解析した例も紹介したい。

2. FCCS で何がわかるか

(1) 原理

FCS, FCCS の基礎に関しては本誌に掲載されたレビュー¹⁾や詳細を解説した文献²⁻⁵⁾が発表されているのでこちらに譲り、本稿では基本的なコンセプトと得られる情報の簡単な説明にとどめたい。

FCS は、共焦点光学系で作成された微小な測定領域 (0.1 フェムトリットル程度) を観察し、一つ一つの蛍光分子がブラウン運動で測定領域を出入りすることによって引き起こされる蛍光強度の揺らぎを観測する。測定領域内に蛍光分子が多数存在する場合には1分子の出入りが全体

の強度に及ぼす影響は小さくなり、蛍光強度の揺らぎ幅は小さくなる。また、蛍光分子のサイズが大きく拡散が遅い場合にはブラウン運動による蛍光分子の出入りがゆっくり行われることになり、揺らぎの時間変化が緩やかになる。つまり、揺らぎの中には「分子の数」と「分子の拡散速度」に関する情報が含まれる。得られた揺らぎのシグナルから自己相関関数による解析で上記のような「動的な」情報を引き出すことができる。加えて、FCS 測定では一般的な蛍光測定と同様、平均蛍光強度の情報も得られる。これは揺らぎに依存しない「静的な」情報である。

FCCS は、2種類の蛍光分子の揺らぎを同時に測定し、各々の揺らぎの「同時性」を解析する方法である (図 1A)。観測される揺らぎの同時性は2種類の蛍光分子が時間的・空間的に一緒に存在すること、すなわち、分子間の相互作用を直接表す。FCCS は2種の蛍光分子の揺らぎの同時性を相互相関関数で解析するが、各色の自己相関から FCS で得られる情報も同時に取得可能である (図 1B)。FCCS, FCS から得られる情報を総合的に判断することで、相互作用の有無だけでなく、相互作用している分子の数や状態、例えば蛍光分子何個が相互作用に関与しているか、複合体の大きさはどれくらいかという情報まで詳細に解析することができる。

(2) パラメータの意味は

自己相関の減衰時間から蛍光分子が測定領域を通過するのにかかる平均的な時間 (拡散時間) がわかり、そこから分子の拡散定数 (D) が求められる。この値から分子のサイズや形状、あるいは粘性などの微環境を知ることができる。自己相関の振幅の高さからは測定領域内に平均的に存在する分子の数が算出可能である。予め測定領域の体積を測っておくことで測定サンプルの濃度を求めることができる。さらに分子の数と平均蛍光強度から1分子あたりの蛍光強度 (counts per molecule: CPM) を算出することができる。CPM の値からは蛍光分子のホモオリゴマーや凝集体の形成状態を知ることができる。

相互相関の振幅は2色の蛍光分子が結合している度合いを直接表す。実際の現場では、自己相関の振幅に対する相

Fluorescence cross-correlation spectroscopy for molecular dynamics in the living cell

Akira Sasaki and Masataka Kinjo (Laboratory of Molecular Cell Dynamics, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, Frontier Research Center for Post-genome Science and Technology Hokkaido University, Kita-21 Nishi-11 Kita-ku, Sapporo 001-0021, Japan)

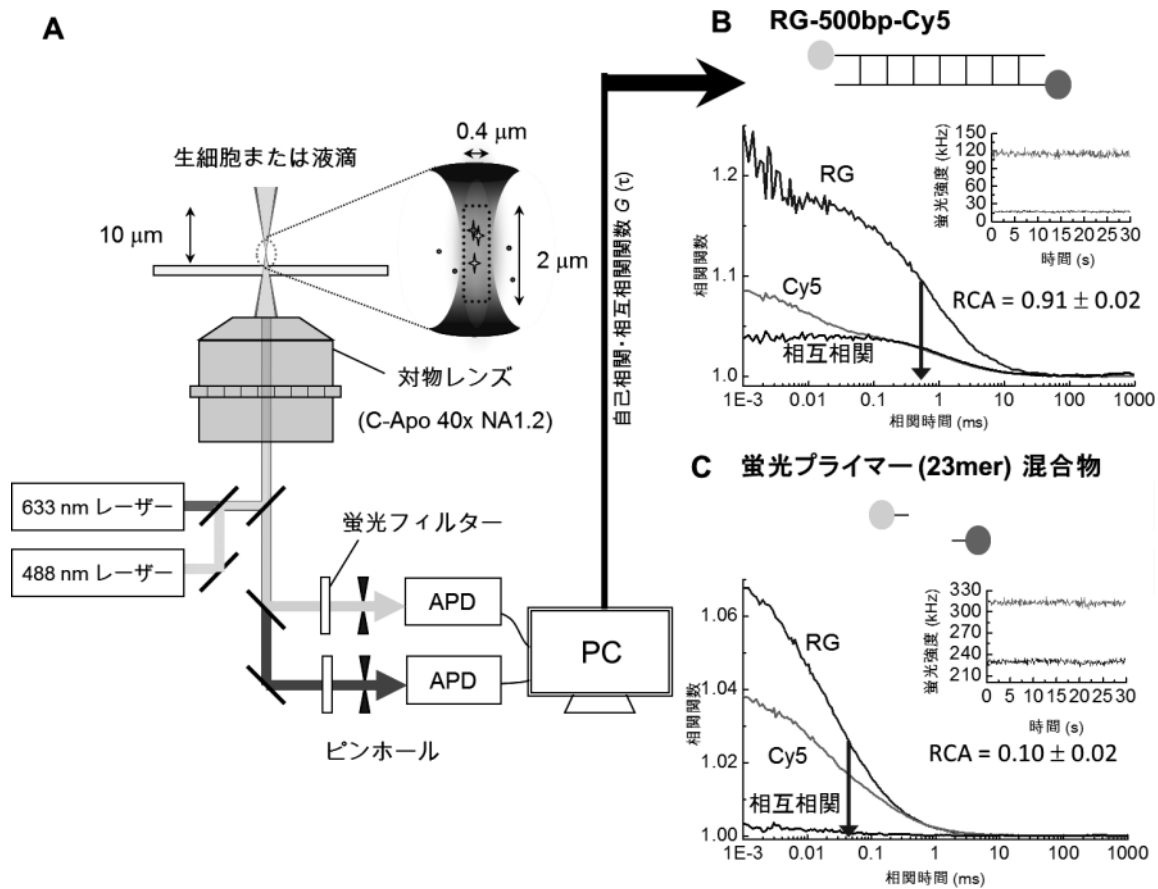


図1 装置図と FCCS から得られる情報

- (A) FCCS 測定装置の装置概念図。
 (B) ロードミングリーン (RG) と Cy5 で両末端を蛍光標識した二重鎖 DNA の FCCS 測定。
 (C) 蛍光標識プライマー混合物の FCCS 測定。

互相関の振幅の比, RCA (relative cross-correlation amplitude) という値を指標に相互作用の程度を簡便に知りえる。

FCCS で得られる情報は, 生化学的手法における非変性ポリアクリルアミド電気泳動 (native-PAGE), クロマトグラフィー, 免疫沈降法や酵母ツーハイブリッド (yeast-two-hybrid) 法などに類似する。それらの方法と比較した FCCS の最大の強みは, 「その場で (*in situ*)」, 「リアルタイムに」定量測定が可能である点であろう。また, FCCS は光学測定の一つであるため非侵襲性や特異性に優れ, 溶液中をそのまま測定することができるのも特徴である。測定領域がサブフェムトリットルオーダーと非常に小さいため, ごく微量のサンプル溶液で測定が可能であり, 生きた細胞内の局所における測定も可能である。

FCCS の相互作用解析では, 結合分子間の距離は大きな問題とならないので, 分子同士が他のタンパク質等を介して間接的に結合している場合でも検出可能である。この特長は一般的に行われている蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET) による相互作用

解析に対するアドバンテージといえる。

一方で FCS, FCCS は動かない分子の解析に利用するのは困難である。動かない (動きの遅い) 分子の解析には光退色後蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching: FRAP) や画像相関法 ICCS (image cross-correlation spectroscopy) 等の手法との組み合わせが有効である。

3. FCCS に必要なもの

(1) 装置

蛍光相関分光装置の基本構成は共焦点レーザー光学系が用いられる。レーザーからの励起光は対物レンズで一点に絞り込まれ測定領域を形成する。対物レンズは 40~63 倍程度の高倍率・高開口数 (NA) のレンズが使用される。FCCS の場合には 2 色の励起光と蛍光発光を利用するので, 色収差の補正が必須である。

蛍光分子はその測定領域内において励起され蛍光を発す

テクニカルノート

る。発せられた蛍光はピンホールを通りシングルフォトンカウンティングが可能な高感度検出器（アバランシェフォトダイオード又は光電子増倍管）にて検出される。検出された信号から相関器もしくはソフトウェアにより自己相関関数・相互相関関数が計算される。顕微鏡メーカー等各社から FCS 測定装置⁶⁾あるいは共焦点顕微鏡に接続可能なユニット等が市販されている。

(2) 蛍光標識

FCCS は蛍光測定的一种であるため測定サンプルを蛍光標識することが必要となる。基本的にはいずれの蛍光色素・蛍光タンパク質も利用可能であるが、励起した際に消光（フォトブリーチング）されにくく、光化学的性質が明らかな色素を選んだ方がよい。また、蛍光の漏れ込み（クロストーク）による偽陽性を防ぐため、2色の組み合わせは発光スペクトルに重なりが少ないものを選ぶことが重要である。具体的には、有機蛍光色素では Alexa Fluor[®] (Life Technologies Corporation) や ATTO シリーズ (ATTO-TEC) が明るさや安定性、波長のラインナップの面で優れている。蛍光タンパク質では、短波長では EGFP (高感度緑色蛍光タンパク質) が利用しやすい。FCCS 測定を行うときに EGFP と組み合わせる長波長側の蛍光タンパク質として、現時点では mCherry が一番使いやすいと思われるが、ブリーチング耐性やタンパク質のマチュレーションの面で注意が必要である⁷⁾。

相互作用を正しく検出するためには、未反応色素の混入を最小限にしなければならない。有機蛍光色素を用いた標識を行う際には未反応色素の精製除去を必ず行う。一方で、蛍光性でない夾雑タンパク質は測定上問題にならないことが多いため、細胞抽出液をそのまま測定することも可能である。逆に、細胞内や細胞抽出液で測定する場合には、細胞が持っている未標識の内在性目的タンパク質が競合することがあるため、系の構築には注意と工夫が必要である⁸⁾。

(3) 実際の条件設定

FCCS 測定を行う場合に検討が必要な条件に、励起光強度、測定時間がある。励起光強度は、強いとブリーチングが問題になる他、光化学的過程（三重項遷移）の寄与が大きくなるので CPM が低くなりすぎない範囲で可能な限り弱く設定することが望ましい。FCS, FCCS は平均化された情報を解析するため、測定時間を長くすることによって相関関数の S/N (signal to noise) 比を改善することができる。特に、動きが遅く分子の出入りのイベント数が少ない場合や蛍光分子数が少ない（濃度が低い）場合に数十秒から数分程度に測定時間を延ばすことが多い。

FCS で解析可能な濃度範囲は、装置にもよるが pM から

μM オーダーである。原理的に高濃度になると検出される揺らぎが小さくなるため、測定が困難になる。一方、濃度が低く、自家蛍光やバックグラウンドノイズが無視できない場合に補正する手法も提案されている⁹⁾。相互作用を見たい場合にはサンプルの濃度と K_d によって結合分子の割合が決まるため、目的の相互作用と手持ちのシステムで検出可能な濃度領域を検討する必要がある。また、FCCS の測定系は2色の測定領域の位置を三次元的にそろえることが非常に難しいため、実際に用いるシステムは理想的な状況ではないことが多い。従って、使用するシステムの条件を規格化するために2色の蛍光タンパク質のタンデム体のようなポジティブコントロールの測定を必ず行う必要がある¹⁰⁾。

(4) データの解釈

FCS の測定は、蛍光性のサンプルさえ用意できれば比較的迅速、簡便にデータが得られる。しかし、得られる情報がシンプルであるがゆえに、データの解釈には慎重な考察が不可欠である。算出される値がどのような分子状態に由来するか帰属するためには、他の生化学的手法やイメージングとの比較など総合的な判断が求められる。特に、得られた値が目的の蛍光分子由来か、自家蛍光やブリーチング等によるアーティファクトを含んでいないかを注意深く判断しなければならない。判断基準の一つとして、用いた蛍光標識のコントロール測定と比較して CPM が理にかなっているかどうかを検討する必要がある。

FCCS は、分子同士が結合しているか、していないかという定性的な判断が一見して理解しやすいのが強みである。そこからさらに定量的な解析（たとえば K_d の算出など）に進みたい場合には結合比や測定領域の重なり等の装置条件の補正が必要になる⁷⁾。

4. 外来 DNA 分解過程の FCCS 解析例

カチオン性脂質等を用いた遺伝子導入において、細胞膜（一般的にはエンドソーム）を突破した外来 DNA は細胞質から核に移行する必要がある。効果的な発現を実現する新規ベクター創製のためには細胞内、特に細胞質内での DNA の動態を解明することが必要である。そこで、我々は細胞内に導入された外来 DNA の拡散、あるいは分解を直接観察し、FCS および FCCS から得られる情報を組み合わせることで、分解メカニズムに迫った。

両末端を別々の蛍光色素で標識した DNA をガラスビーズによる導入法を使って生細胞に導入し、細胞質内での外来 DNA の拡散の様子を観察することを試みた。導入直後に細胞質内で FCCS 測定を行うと高い相互相関の振幅が観察され、導入直後では導入した DNA がインタクトである

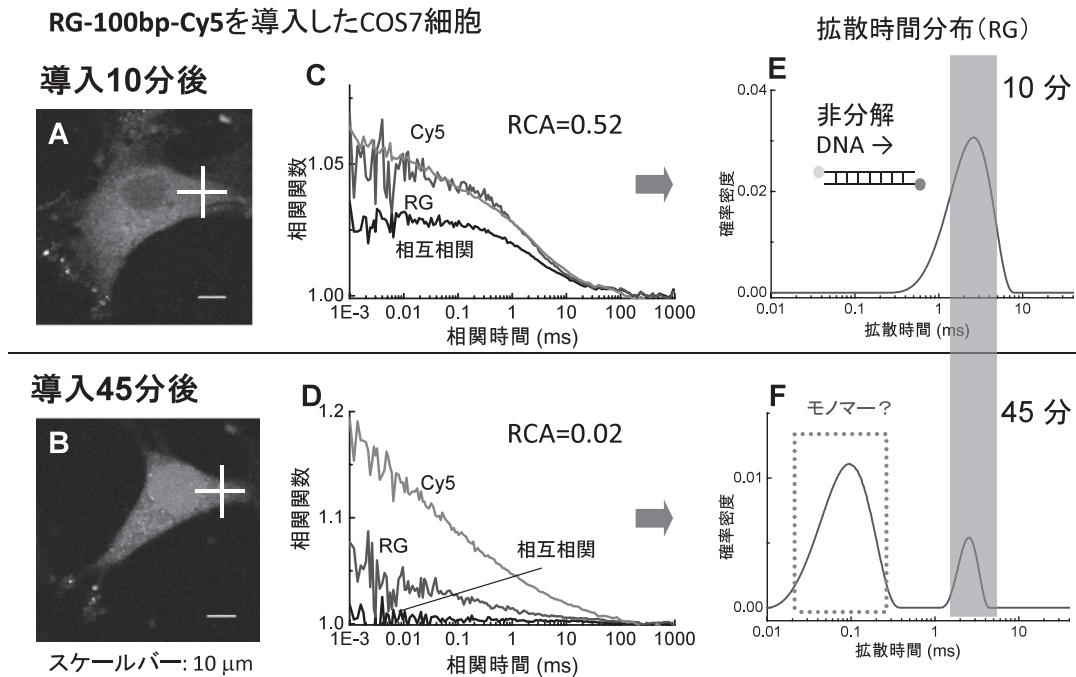


図2 COS7細胞の細胞質に導入した両末端蛍光標識二重鎖DNAのFCCS測定
(A, B) 導入10分後(A), 45分後(B)のレーザー走査型共焦点顕微鏡画像。
(C, D) 画像内のクロス点におけるFCCS測定結果。
(E, F) 得られた自己相関関数の拡散時間分布解析。

ことが示された(図2A, C)。しかし、導入45分後に同一の細胞をFCCS測定すると、相互相関の振幅はほとんど観察されなかった(図2B, D)。それらの結果から、導入されたDNAは45分程度の短い時間で切断を受けていることが明らかになった。また、細胞内におけるDNAおよび分解産物の拡散の速さを自己相関によって解析し、得られた拡散時間の分布から分解のメカニズムについて研究した(図2E, F)¹¹⁾。水溶液中における分解モデルと細胞内で観察された分解を併せて考察した結果、細胞質内での外来DNA分解は主に5'-3'エキソヌクレアーゼによるものであると結論づけた。さらに、見いだされた分解作用が、導入された外来DNAによる遺伝子発現の効率に影響を及ぼすかどうかをレポーター遺伝子の発現を指標に評価した結果、培養細胞における遺伝子発現の際にエキソヌクレアーゼによる分解がバリアーになっており、さらに細胞種によってエキソヌクレアーゼ活性は異なるということが明らかになった。

5. おわりに

FCCSはFCSと併せて、さまざまな細胞内外の分子の動的な状態や相互作用を定量化する方法として注目され普及してきている。本稿で紹介したように、FCS, FCCSから得られる情報を総動員することで細胞内外における分子状

態を詳細に解析することが可能である。筆者らの将来における希望はFCCSを利用した細胞内外、溶液中の測定結果を統合し、単一細胞内の生体分子の量やサイズ、相互作用を定量的に理解することである。

- 1) 金城政孝 (2010) 生化学, 12, 1103-1116.
- 2) Kinjo, M., Sakata, H., & Mikuni, S. (2010) in *Live Cell Imaging*. (Goldman, R., Swedolow, J., & Spector, D. eds.), pp. 229-238, Cold Spring Harbor Press.
- 3) Eigen, M. & Rigler, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 5740-5747.
- 4) Bacia, K., Kim, S.A., & Schwille, P. (2006) *Nat. Methods*, 3, 83-89.
- 5) Bacia, K. & Schwille, P. (2007) *Nat. Protoc.*, 2, 2842-2856.
- 6) Weisshart, K., Jüngel, V., & Briddon, S.J. (2004) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 5, 135-154.
- 7) Foo, Y.H., Naredi-Rainer, N., Lamb, D.C., Ahmed, S., & Wohland, T. (2012) *Biophys. J.*, 102, 1174-1183.
- 8) Muto, H., Nagao, I., Demura, T., Fukuda, H., Kinjo, M., & Yamamoto, K.T. (2006) *Plant Cell Physiol.*, 47, 1095-1101.
- 9) Glauner, H., Ruttekolk, I.R., Hansen, K., Steemers, B., Chung, Y.D., Becker, F., Hannus, S., & Brock, R. (2010) *Br. J. Pharmacol.*, 160, 958-970.
- 10) Saito, K., Wada, I., Tamura, M., & Kinjo, M. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 324, 849-854.
- 11) Sasaki, A. & Kinjo, M. (2010) *J. Control. Release*, 143, 104-111.