〔生化学　第82巻　第12号，pp. 1103–1116，2010〕

総　説

蛍光相関法によるタンパク質の機能解析

金　城　政　孝

蛍光相関分光法（FCS）や蛍光相互相関分光法（FCCS）の原理は1970年代に確立されたが，実用化したのは様々な装置の改良と種々の蛍光タンパク質の発見・利用によるところが大きく，2000年代に入ってからである．この手法は溶液の中のタンパク質を始めとする分子間相互作用などの解析に利用されているが，例えばFCSで知り得ることは「分子の大きさ」と「濃度」と言う，非常に単純なことであり，生化学における基本的な技術となり得る．本総説ではFCSを利用したタンパク質凝集における検出と，FCCSの細胞内における外来DNAの分解過程の解析を中心として紹介する．さらに，近年発達してきた新しいFCS/FCCS法や，細胞測定における現状を含め，今後の発展方向を紹介する．

1. は じ め に

様々な生物種のゲノムプロジェクトや各種オーミックス（omics）と呼ばれる網羅的な研究の発展により，細胞内の生体分子機能が様々な面から理解されつつある．これまで生化学的解析から常時結合していると思われていた分子同士でさえ，生体内ではダイナミックに離合集散を繰り返し，数種類のタンパク質が関係しながら様々な大きさの会合体または凝集体・複合体を形成し，それが細胞や生体の機能や運命にまで関係するタンパク質社会と言う概念で示されることが分かってきた．しかしこれらの研究の多くは試験管内の実験に基づいた結論であり，実際の細胞内でそのような凝集体や複合体がいつどのように形成されるかに関してはあまり明らかにされていない．このような凝集体や複合体の形成をいち早く検出し分子の挙動や相互作用を細胞内で高感度に検出するシステムが重要である．

細胞内のタンパク質や分子の動態を知るための方法としては，FRAP（fluorescence recovery after photobleaching）やFRET（fluorescence resonance energy transfer）がよく知られている．FRAPやFRETは，緑色蛍光タンパク質（green fluorescent protein, GFP）などの蛍光性タンパク質が発見・開発され，また蛍光顕微鏡などのイメージング機器の発展とともに盛んに使われるようになっている．これらの方法は比較的簡便で高感度である一方，FRAPでは動きの速い分子の拡散速度を測定できない．FRETでは二つの蛍光色素が一定の角度配置と特定の距離以内でなければ検出が困難であり，タンパク質間相互作用を検出するためには特定の分子設計とそれを構築するための経験と技術が必要である．従って多くのFRETプローブは分子内FRETを利用した特定のイオンや小分子を検出するためのセンサープローブとして利用されていることが多い．

本総説では筆者らの研究室で行った蛍光相関分光法（fluorescence correlation spectroscopy）と蛍光相互相関分光法（fluorescence cross correlation spectroscopy）を用いた生体分子の相互作用解析の研究と，次世代光イメージング法へ向けての展開について紹介したい．

蛍光タンパク質の発見は様々な生命現象の解明に貢献し，そのため下村，Chalfie，Tsienら3氏がノーベル賞を受賞したのはいまだ記憶に新しい．何を検出するのか（ターゲットとプローブ）とどのように検出するのか（方法や装置）というのは車の両輪である．ノーベル賞の受賞の理由の説明の中にも，光検出法の発展がGFPの利用を一段と推し進めたと記述されている[1]．そのまた逆も真である．すなわち，GFPの発見により，光学的検出法の新

北海道大学大学院先端生命科学研究院先端細胞機能科学分野（〒001–0021 札幌市北区北21条西11丁目　ポストゲノム棟4F）
Study of protein function using fluorescence correlation spectroscopy
Masataka Kinjo（Laboratory of Molecular Cell Dynamics, Faculty of Advanced Life Science, Hokkaido University, 001–0021, Sapporo, Japan）

たな研究分野が広がり，その一つがFCSやFCCSと言える．

2. FCS 小 史

自然科学の様々な分野で過去に発表された論文の中から，画期的な発見をNature誌が選んで公表したものにNature Milestones誌がある．その一つに顕微鏡（microsope）の発展に関係したNature Milestones Light Microsocpyが発表されている．その中の21のMilestoneを眺めると顕微鏡の発展はプローブと装置の発展が幾重にも織り成されているのが分かる．

FCSの確立は10番目のMilestoneとされ，1972年の発明である[2]．実際，1972，1974年にFCSに関係する最も重要な理論的な四つの論文が出版された[3〜6]．それから，しばらく全反射顕微鏡との組み合わせや界面での測定などで微小な領域を確保しながらの研究が繰り返されてきたが，まだ溶液系での測定が中心であった[7,8]．しかし，共焦点光学系の確立と共に，高感度・低バックグラウンドの測定が可能となり[9]，秒単位の短時間測定ができるようになって生細胞応用への道を開いた．そして次に大きな発展に寄与したのは，遺伝子操作を利用するだけで生体内に蛍光プローブを導入できるようになったGFPの発見と利用の確立である．

本邦でも，すでに1985年にFCSの原理とそれを利用した生体高分子研究への応用と，当時の測定上の限界について報告がある[10]．その中でFCSにより得られる生物学的意義について述べられており，さらに蛍光相互相関分光法への言及があることは注目に値する．しかし，標準蛍光色素であるローダミン6Gの測定だけでも2時間以上が必要だったことからも分かるように，早い時期からその原理や性能について注目を集めていたにもかかわらず実用的な方法ではなかった．

FCSが実用化されるには直進性のいい光であるレーザー光源の簡便な利用，その光を波長領域の回折限界まで絞り込むことが可能な光技術と高性能の対物レンズ，微弱光測定による単一光子検出法と，その光子数を計測してリアルタイムに加減乗除できる高速パーソナルコンピューターが通常の生化学の研究室で利用可能となるなど，様々な基盤技術の発展を待たなければならなかった[11]．

3. 蛍光相関分光法

FCSの概略を簡単に述べると，レーザー光を利用した共焦点光学系を利用しフェムトリットル（10^{-15} L）程度の極微小な観察領域を構築し，その中を出入りする蛍光分子の蛍光強度を測定する手法である．つまり，通常のレーザー共焦点蛍光顕微鏡による一点（スポット）測定に他ならない．溶液や細胞内の分子は周りに制限するものがなければ，ブラウン運動というランダムな動きをし，その動きは分子の大きさに依存した速度を持つ．FCS測定ではこのランダムな運動をしている蛍光分子が測定領域を出入りすることに起因する蛍光強度の増減を検出する（**図1**，原理の紹介については文献[12,13]を参照）．その蛍光強度の増減を相関関数により表現することで，測定領域を通過する拡散時間といった「分子の動き」やその領域における「分子数」といった情報を得ることができる．

3-1 FCSの解析

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，同様の光学系で構築されている共焦点走査型レーザー蛍光顕微鏡（laser scanning microscopy；LSM）と構造がほぼ同じである（図1A）．レーザーからの励起光は対物レンズを通してカバーグラス上の試料に達し，そこで光の回折限界まで一点に絞り込まれ測定領域を形成する．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る（図1B）．発せられた蛍光は同じ対物レンズで集光されピンホールを通り高感度検出器（アバランシェフォトダイオード又は光電子増倍管：PMT）にて検出される．蛍光相関分光装置では，検出された信号からデジタル（またはソフトウェア）相関器により自己相関関数（後述）が計算される．LSMと異なる点は二次元画像を得るためレーザー光を走査するガルバノスキャナ装置が必要ない点である．

2. 単一分子検出

光を回折限界まで絞り込み，かつピンホールにより上下方向からの光を遮断された測定領域は近似的に微小な円柱状と仮定することができる（図1C）．その直径は励起光の持つ波長と同程度の約400 nm，軸長は1 μm程度であり，その体積はフェムトリットル（10^{-15} L）程度以下になる．1 M（mol/L）に含まれる分子の数（アボガドロ数≒6×10^{23}）からすると蛍光分子の濃度が0.1 μM（10^{-7} M）の場合，FCSの測定領域内にはわずか60個程度の分子が存在することになる．このような微小に絞り込まれた測定領域と上述した高感度検出器を組み合わせることにより，単一分子レベルの蛍光を検出することが可能となる．では，どのようなシグナルを検出するのであろうか．

3. 分子の運動と蛍光強度のゆらぎの関係

溶液中や細胞内の分子は周りに制限するものがなければ，ブラウン運動というランダムな拡散運動をしている．従って測定領域にはこのブラウン運動により，絶えず出入りする蛍光分子が存在し（図1C），その動きは検出器を通して蛍光強度の値として観測される．このとき，蛍光強度

は一定ではなく，蛍光分子のランダムな出入りにより同じくランダムに増減を繰り返す，すなわち「揺らぎ」として観測される．

分子が小さく，速いブラウン運動をしているときは測定領域を通過する時間が短いため，蛍光強度の増減の変化が急になり速い揺らぎの変化となる（**図 2A**）．逆に分子が大きく，遅いブラウン運動をしているときは測定領域の通過に要する時間が長いため，蛍光強度の増減が緩やかになる（図 2C）．つまり，揺らぎの緩急の中には「分子の大きさ」（分子量，形）に関する情報が含まれていることが分かる．

一方，分子の数が少ないとき，例えば平均 1 個程度の分子が測定領域を出入りするときは，測定領域内に分子が存在するときと，存在しないときで 0 から 100% の間で蛍光強度の増減が観測される（図 2B）．逆に分子の数が多く常に多数の分子が存在すると，たとえば平均 100 個の分子が測定領域を出入りするときは，10 個の分子が一挙に出入りをしてもわずか 10% の蛍光強度の増減しか観測されない（図 2D）．蛍光強度のランダムな増減の大きさ，つまり，揺らぎの大きさの中には「分子の数」に関する情報が含まれている．FCS 測定とはこのように「分子の大きさ」と「分子の数」という基本的な物理量を揺らぎから得る方法である．

4.　FCS の解析方法

微小な観察領域中を出入りする蛍光分子の「揺らぎ」は，自己相関関数によって解析を行うことで分子の数（N）や，測定領域内にとどまっている時間（または通過する時間）を示す相関時間（τ）が得られる．

$$G(\tau) = \frac{\langle I(t) I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} \quad (1)$$

$$= 1 + \frac{1}{N} \sum_i \frac{y_i}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_i}\right)\left(1 + \frac{1}{s^2} \cdot \frac{\tau}{\tau_i}\right)^{\frac{1}{2}}}$$

$$(i = 1,\ 2,\ 3) \cdots\cdots\cdots (2)$$

自己相関関数 $G(\tau)$ は式（2）で表され，ここでは最大 3 成分までフィッティングを行って値を得ることを示している．N は観察領域内に存在する分子の総数，s はストラクチャーパラメータと呼ばれ観察視野の形状を決める値であり，観察領域の長軸（$2z$）と短軸の半径（w）の比（z/w）で表される（図 1C）．この式では光化学反応である三重項遷移などの速い時間領域については省いている．実際の測定においては色素の性質によっても異なり，レーザー強度との関係などを考慮する必要があり，それについての詳細な報告がある[14,15]．

FCS で得られる相関関数の変化は図 2F にモデルで示すような時間間隔に対して減衰する曲線となる．横軸は時間の単位であり，縦軸は分子が観察領域で検出された時からの存在確率となる．曲線はある時検出された分子の存在確率が時間とともに減衰することを示し，2 分の 1 に減少した時を相関時間（τ）といい観察領域における滞在時間または，通過時間を表す．たとえば分子が小さくなると動きが早くなる（拡散速度が大きく）ために観察領域を通過に要する時間は短くなる．但し，その必要な時間は観察領域の大きさ，つまり装置に依存する数値になるため絶対的ではないが，分子の大きさと比例関係になるため頻繁に使われる．図 2A から C のように分子が大きくなると，図 2F の曲線 1 から曲線 4 へと変化する（右にシフトする）．大きな分子は拡散速度が小さいために観察領域から出ていくのに時間がかかり，存在確率は緩やかに減少することを示している．曲線 5 の相関関数は大きな分子と小さな分子が半分ずつ混ざった状態を示し，曲線 1 と曲線 4 の足し合わせとなる．一方，FCS で得られた相関関数の y 軸切片の大きさは相関関数の振幅（amplitude）と呼ばれる．測定領域に含まれる平均分子数が少ないほどゆらぎは大きくなるために（図 2B）相関関数の振幅は大きくなる（図 2F 曲線 1 から曲線 2 への変化）．図 2 の B→A→D のように測定領域内の平均分子数が増えると揺らぎの変化は小さくなり，図 2F の曲線 2→1→3 へと相関関数は小さくなる方向へ変化する．

FCS が他の蛍光測定法や蛍光イメージング法と際立つ点は，蛍光標識分子の動的な性質と静的な性質の両方同時に得られる点である．この点を簡単に整理してみたのが**図 3** である．揺らぎの測定から得られる情報は先にも述べたように，分子の動きの速さを示す『拡散定数（拡散速度）』であり，また，揺らぎの幅から得られる『分子数』の二つである．また通常の蛍光測定と同じように常に蛍光強度をモニターしているために，観測された蛍光強度を分子数で割ると，『一分子当たりの蛍光強度（count per molecule, CPM）』というパラメーターが計算上得られる．このように直接的には，拡散速度，分子数，蛍光強度の三つのパラメーターが得られ，間接的にさらにもう一つ，CPM が得られる．これら四つのパラメーターは測定条件や測定色素に関係して複雑に変化する．特に CPM は動的な性質と静的な性質に関係するために，測定装置・実験材料・条件など測定系全体の評価指標となる[16]．

式（2）に示されるモデルでは単純拡散を組み合わせた（加算した）形になっている．これは 2 種類の分子が存在している場合のほか，結合した分子と結合していない分子の割合などを記述するのに有効である．しかし一方では単純拡散では表現できないような蛍光分子の微環境やミクロな環境の影響を受ける異常拡散（anomalous diffusion）と呼ばれる場合や，生化学反応の生成物が複数存在する場合などにはそれに応じたモデルがあり，また流速などを組み込んだモデル式がある[17]．

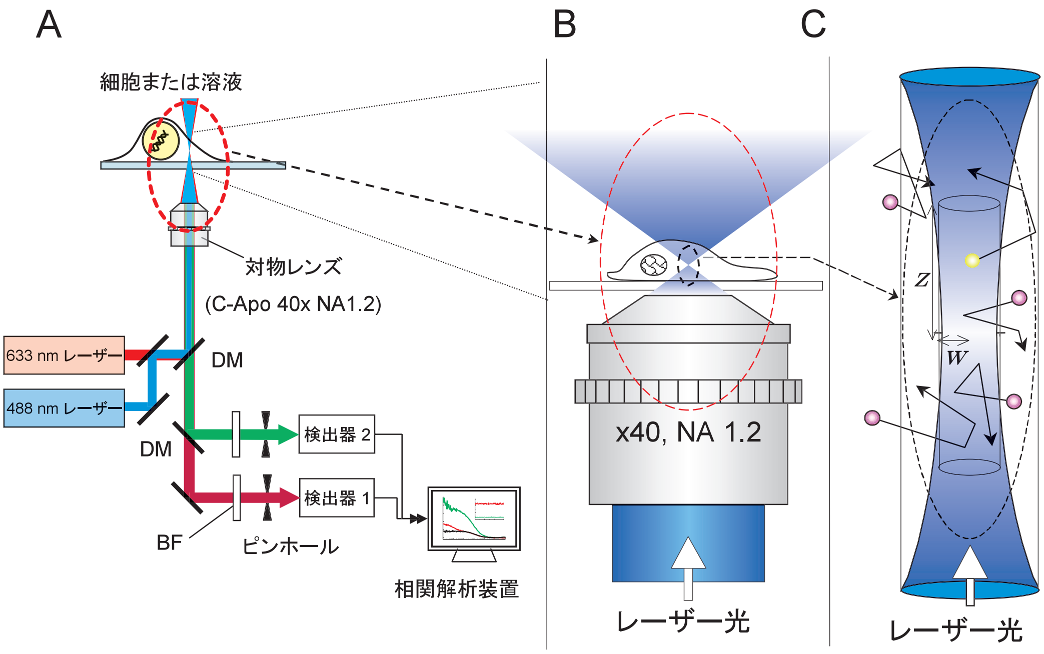
A
B
C
細胞または溶液
対物レンズ
(C-Apo 40x NA1.2)
633 nm レーザー
488 nm レーザー
DM
DM
検出器 2
検出器 1
BF
ピンホール
相関解析装置
x40, NA 1.2
レーザー光
Z
W
レーザー光

図1

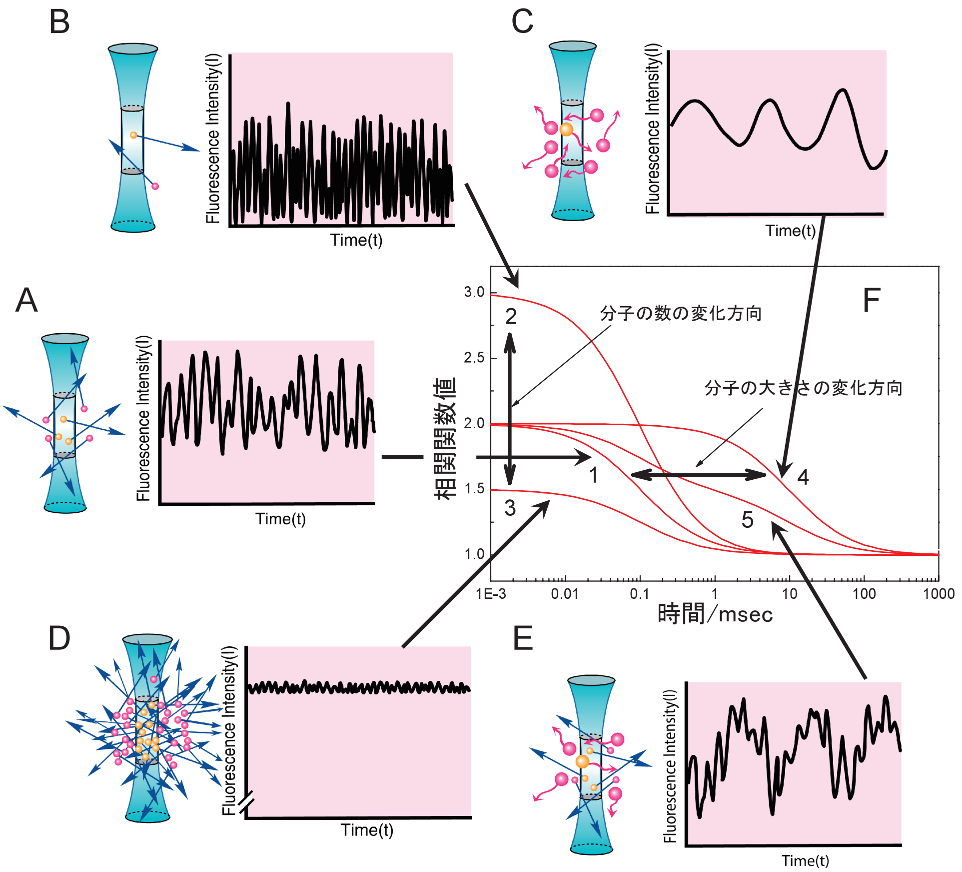
B
Fluorescence Intensity(I)
Time(t)
C
Fluorescence Intensity(I)
Time(t)
A
Fluorescence Intensity(I)
Time(t)
F
分子の数の変化方向
分子の大きさの変化方向
相関関数値
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
1E-3
0.01
0.1
1
10
100
1000
時間/msec
1
2
3
4
5
D
Fluorescence Intensity(I)
Time(t)
E
Fluorescence Intensity(I)
Time(t)

図2

図 1　蛍光相互相関分光装置

（A）蛍光相互相関分光（fluorescence cross correlation spectroscopy）装置の全体の模式図を示す．蛍光相関（FCS）測定ではここに表示している一組のレーザー光源と検出器を利用する．励起光源のレーザー，光を絞るための対物レンズ，検出器並びに相関器で構成されている．

BF：バリアフィルター（蛍光フィルター），DM：ダイクロイックミラー，NA：開口数

（B）試料測定部の模式図．レーザー光は対物レンズカバーグラス上の溶液や細胞の中の一点に絞られる．

（C）検出領域の拡大模式図．検出領域はここでは半径 w，軸長 $2z$ で定義される円柱状の領域として示した．蛍光分子（○）はブラウン運動により動き回り領域の中を自由に出入りし，この円柱の中で励起され蛍光を発する．

図 2　共焦点領域を出入りする蛍光分子と蛍光強度の揺らぎ，自己相関関数の関係

（A）小さな分子の場合．観察視野の蛍光強度は速やかに上昇し減少する．

（B）観察領域における分子の数が少ない場合．分子の出入りが離散的になり，大きな揺らぎ幅となる．

（C）大きな分子の場合．観察視野の蛍光強度は緩やかに上昇し減少する．

（D）観察領域に含まれる分子数が多い場合．蛍光強度の変化は平均化され揺らぎは小さくなる．

（E）観察視野に大きな分子と小さな分子が存在すると，蛍光強度の揺らぎは大きな揺らぎと小さな揺らぎの足しあわせとなる．

（F）自己相関関数の変化と分子数，分子の動きの関係

1，4，分子の大きさが大きくなると，水平の矢印のように相関関数値は 1 から 4 へ減衰が遅くなるよう変化する．

2，検出領域に含まれる平均分子数が少ないと揺らぎは大きくなるため自己相関関数の振幅（y 軸切片）も大きい．

3，分子数が増えると揺らぎは小さくなるために振幅も小さくなる．従って分子数の増加方向は 2 から 1，3 の変化として示される．

5，大きな分子と小さな分子が 50% ずつ混ざった状態を示す．

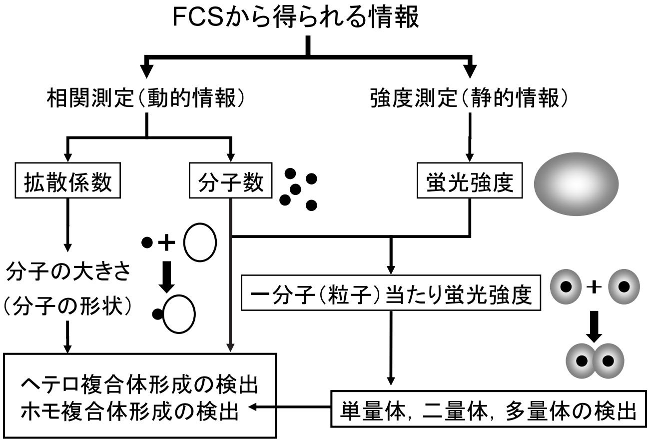

図 3　FCS 測定から得られる蛍光分子の情報とその関係

蛍光相関分光法で得られる特徴的な動的な情報と通常の蛍光測定で得られる静的な情報に分けている．動的な部分からは拡散定数（拡散速度）と分子数が分かる．また測定で得られる平均的な蛍光強度を分子数で割り付けると，一分子当たりの蛍光強度（CPM）が分かる．

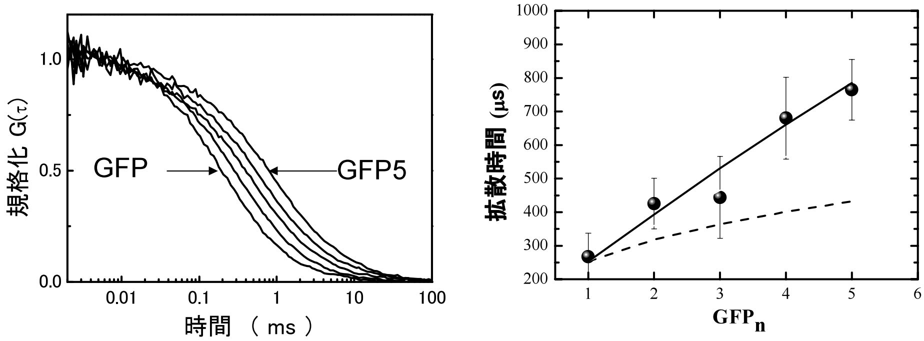

図 4　タンデム型 GFP オリゴマーサイズと拡散時間の関係

A　GFP モノマーから GFP 五量体までの相関関数．

B　相関関数から得られた拡散時間と GFP オリゴマーの大きさの関係（黒丸）．実線は GFP オリゴマーの分子量から計算された棒状分子の場合のシミュレーション．破線は球状分枝とした時のシミュレーション．

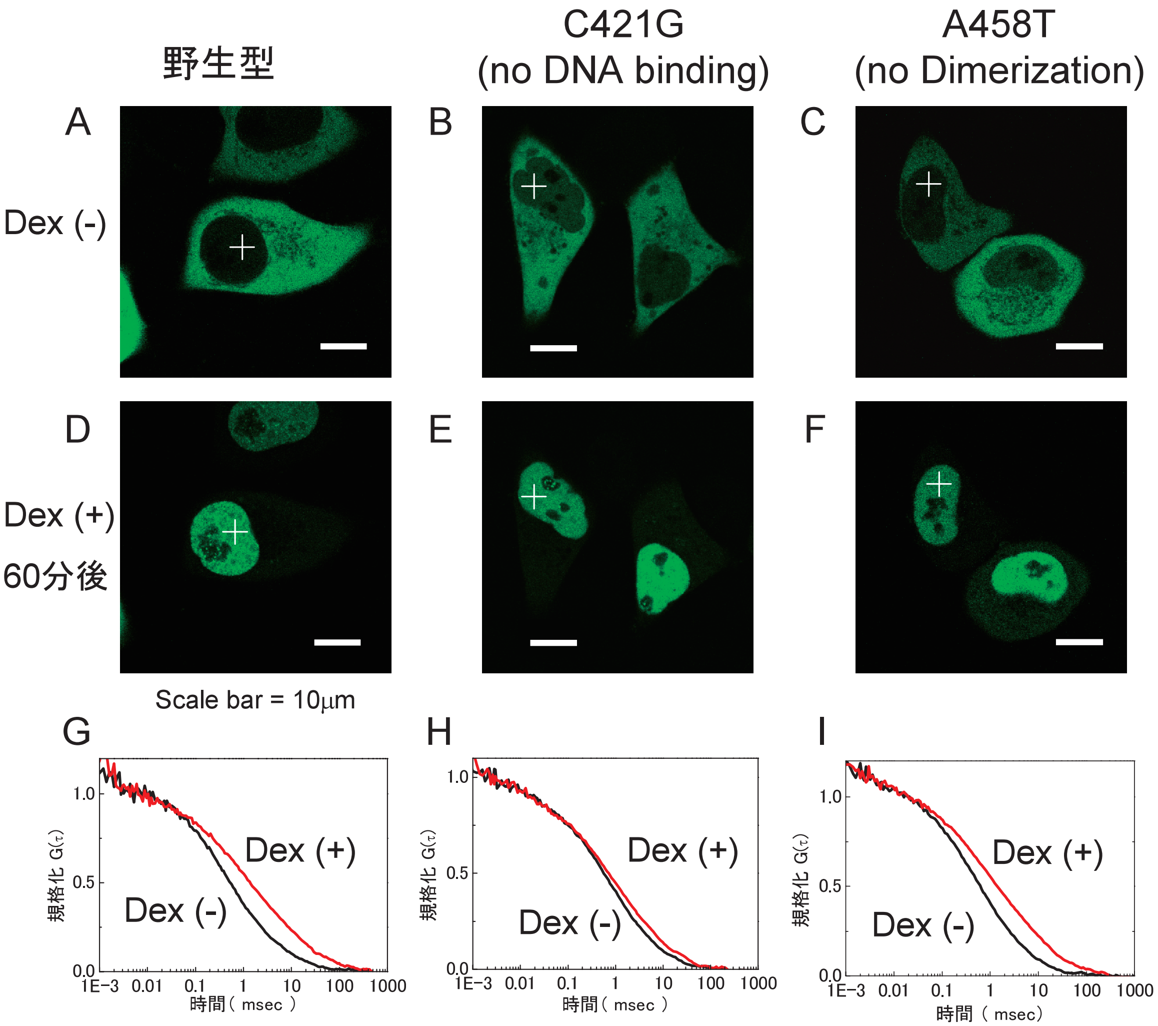
野生型
C421G
(no DNA binding)
A458T
(no Dimerization)
A
B
C
Dex (-)
D
E
F
Dex (+)
60分後
Scale bar = 10μm
G
H
I
規格化 G(τ)
1.0
0.5
0.0
Dex (+)
Dex (-)
1E−3 0.01 0.1 1 10 100 1000
時間 (msec)

図5

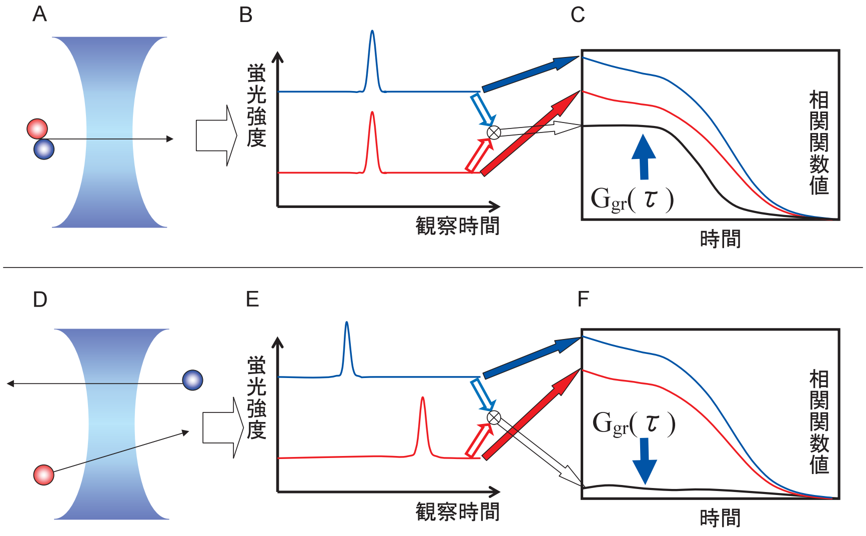
A
B
C
蛍光強度
観察時間
相関関数値
$G_{gr}(\tau)$
時間
D
E
F
蛍光強度
観察時間
相関関数値
$G_{gr}(\tau)$
時間

図6

図 5　EGFP-GR の野生型，および変異体を発現した HeLa 細胞の共焦点蛍光画像と蛍光相関関数

A，D，G：EGFP-GR 野生型，B，E，H：DNA 結合能を持たない変異体，C，F，I：二量体を形成しない変異体．上段（A，B，C）は Dex 添加前，中段（D，E，F）は 1 µM Dex 添加 60 分後の蛍光画像を示す．
下段（G，H，I）は Dex 添加前後での FCS 測定による蛍光相関関数．

図 6　蛍光相互相関分光法の概念図

A，D　2 種類の蛍光分子の動き．　B，E　観察される蛍光強度変化．　C，F　蛍光強度シグナルから求められる蛍光自己相関関数（赤，青）と相互相関関数（黒）．
2 種類の蛍光色素になんらかの相互作用があると（A），赤と青の同時シグナル変化が検出され（B），赤色蛍光，青色蛍光の自己相関関数と，二つの掛け合わせである相互相関関数が求められる（C）．2 種類の蛍光色素に相互作用がないと（D），赤と青のシグナルに同時性はなく（E），そのために低い相互相関関数となる（F）．

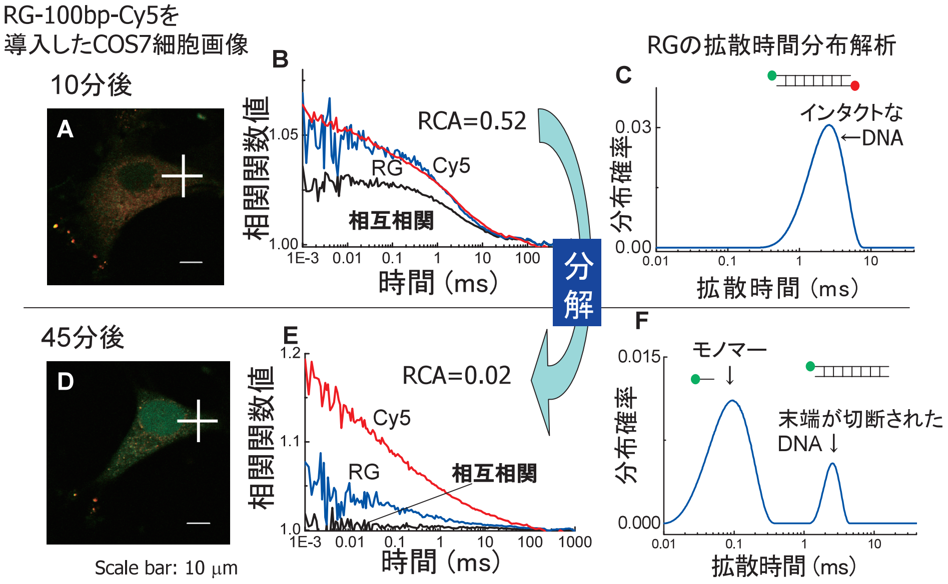

図 7　生細胞における蛍光標識 100bpDNA の FCCS 解析

A，B，C　DNA 導入後 10 分後．D，E，F　導入 45 分後．
A，D　細胞にローダミングリーン（RG）と Cy5 で標識した 100bpDNA を導入した蛍光顕微鏡画像．
B，E　蛍光相関関数．C，F　RG の蛍光に注目して相関解析を行い，様々な長さの DNA 鎖長が予想されたので，ここでは拡散時間の分布で解析した．
導入 10 分後では蛍光は細胞質に観察されたが（A），45 分後では核内にも検出された（D）．10 分後では黒曲線で示される相互相関関数値は高いが（B），45 分後では低くなる（E）．切断されない分子の割合を示す RCA（relative cross amplitude）も 0.52 から 0.02 へと低下した．RCA は FCCS 曲線の y 軸切片値を赤色蛍光または青色蛍光の一つの FCS 曲線の y 軸切片値で割った値であり，結合している分子の割合を示す指標となる．拡散時間分布から完全な長さの DNA の高い割合（C）から 45 分後にはモノマーの割合が高く且つ鎖長の長いままの DNA が検出された．F の結果から標識蛍光色素が遊離した分子であることから末端の蛍光色素が切断された分子であることが推定された．

4.　拡散時間と分子量変化

4-1　DNA 鎖長と拡散時間

タンパク質や核酸の分子量を見積もることは生化学における重要な分析手段である．例えば棒状分子であるDNAの分子量の変化はDNA鎖長に直接比例するので[18,19]，目的とするDNAを識別・同定・分画・精製する時に通常よく利用されている．また見かけの分子量の変化はリガンドの結合や解離を示し相互作用の目安となる．DNA-DNAハイブリダイゼーションの場合，プローブ一本鎖DNAの視点からすると標的配列を含む長鎖一本鎖との結合は見かけの分子量の増加として見なされる．従って，FCSを用いて蛍光標識一本鎖DNAをハイブリダイゼーションのプローブとして利用し時間変化を追うなどや[20,21]，PCR産物定量の応用などに利用されている[22,23]．さらにDNA鎖をランダムに蛍光標識を行い，制限酵素での切断産物の蛍光強度と鎖長の対応からRFLPs（restriction fragment length polymorphisims）への応用も可能である[24,25]．

4-2　タンパク質の大きさと拡散時間

球状分子の例として蛍光修飾をしたタンパク質の測定例を示す．細胞内のタンパク質の折れたたみを助けるタンパク質群は分子シャペロンと呼ばれている．そのなかでも大腸菌シャペロニン（GroEL）は構造のよく分かっているシャペロンである．その構造は60 kDaサブユニット14個が結合した840 kDaで直径14 nm軸長15 nmのほぼ球状と仮定できる構造を持っている．GroEL並びにGroELの基質として知られるラクトアルブミンとペプシン，アポシトクロム *c* のそれぞれにテトラメチルローダミンで蛍光修飾を行い，その拡散時間と分子量の関係をFCSを用いて調べると，分子量の増加と相関関数の変化が良い一致を示した．従って，相関時間の変化からGroELと各基質との結合定数を結合・非結合分子などを物理的に分けることなく，求めることができる[26,27]．また，**図**4に示すように球状タンパク質が直鎖状に結合した，GFPタンデム型の場合は溶液中ならびに細胞内でも大まかには棒状分子と同じ拡散速度になることが示されている[28]．このように，FCSの測定から得られる拡散速度とタンパク質の分子量の間には定量的な関係が得られるので，タンパク質相互作用の解析に応用可能であることが示された．

5.　FCSによる細胞内相互作用の測定

5-1　核内転写因子　グルココルチコイドレセプター

グルココルチコイドレセプター（GR）はリガンドであるステロイドホルモンと結合することで，細胞質から核内へと移行し，特定のDNA配列と結合し様々な遺伝子の転写を調節している核内転写因子の一つである．GRは古くから多くの生化学的な研究が行われ構造やその機能はよく研究されてきている．しかし，一方では医薬品としてのステロイド剤の副作用などの問題で知られるように実際の生体や細胞内での動態は不明なことがまだ多く，その活性を安全にコントロールできるまでには理解できていない．私たちはリガンド刺激によるGRの細胞核内の拡散速度の変化を定量化し，機能の解明を目指した．まずGFPの結合した野生型GFP-GR（WT）を構築し，LSMで観察するとリガンド刺激で細胞質から核へ移行した（**図**5AD）．一方，DNAに結合しない変異体（C421G）と二量化しない変異体（A458T）も野生型（WT）と同じくリガンド刺激により，細胞質から核へ移行することが観察された（図5BE, CF）．すなわち蛍光顕微鏡画像からはいずれの変異体もWTと同じような機能を有している結果となった．次に細胞質内と核内を区別してFCSによる測定を行った．細胞質内ではリガンド添加前後で相関曲線に大きな変化は生じなかったものの，核内ではWT，A458TとC421Gがそれぞれ特徴的な変化を見せた．WTはリガンド添加後，時間とともに相関曲線が右にシフトしていく様子が観察された（図5G）．すなわちリガンド添加後の核内では，単純なGFP-GRの拡散運動と，動きの遅くなったGFP-GRの動きの重ね合わせとして観測されたと考えられる．一方，C421Gはリガンド刺激前後で変化が見られず（図5H），A458TはWTほどではないが相関曲線は右へシフトした（図5I）．特に遅い動きに注目し解析を繰り返し行ったところ，WTのGFP-GRはリガンド添加によって拡散定数にして数倍も遅くなっていることが明らかになった[29]．DNAに結合しない変異体であるC421Gはリガンド刺激により核内での拡散速度が変化しないことから，細胞質から核へ移行するものの，核内では特徴的な相互作用はしていないと考えられる．一方，二量化しない変異体であるA458TはWTほどではないが拡散速度が低下したことからWTやC421Gと同じくリガンド刺激により細胞質から核へ移行して，さらに他の転写因子と何らかの相互作用をしていることが推察される．このことは阻害剤であるRU486添加実験からも確認され，遺伝子発現にいたる二量体形成や複合体形成の安定性との関連を示唆した[29]．GRをはじめとする核内の様々なタンパク質のダイナミックな性質については遅い動きに注目したFRAPとの比較を行った報告がある[30]．最近，ショウジョウバエ唾液腺細胞内におけるホメオティック選択遺伝子の一つであるScr（sex combs reduced）ペプチドとDNAとの間の解離定数（K_d）をFCSを用いて求め，細胞内におけるScrペプチドとDNA相互作用の様式を推定した興味深い報告[31]が出た．また，後述するFCCSを用いてエストロゲン受容体（ER）のサブタイプと転写共役因子（TIR2）とのヘテロダイマーの解離定数が細胞核内で求められている[32]．

5-2　タンパク質凝集

細胞内における異常なタンパク質凝集の蓄積や超分子重合体はプリオン病，アルツハイマー病，パーキンソン病をはじめとする神経変性疾患の原因の一つと考えられ，新しいタンパク質科学の分野としても注目されている[33]．これらの中でもポリグルタミンタンパク質の凝集によって神経細胞死が引き起こされるポリグルタミン病の一つにハンチントン舞踏病がある．これらのタンパク質凝集過程の試験管内，ならびにもっと直接的に細胞内での分子機構を明らかにすることは神経変性疾患の治療や予防の戦略を考える上で重要である．細胞を穏やかに破砕・抽出することで，ポリグルタミンの凝集過程[34]やヒトシャペロンタンパク質CCTが，凝集体が大きくなることを阻止するとともに，細胞毒性を低減していることがFCS測定から示された[35]．またモデル系ではあるがFCSを用いることで通常のイメージングなどの方法では検出できないようなミクロな凝集体の形成過程をモニターすることも可能である．BSE（bovine spongiform encephalopathy）の原因タンパク質として知られるプリオンタンパク質はある条件下で凝集体を形成するが，非変性条件で保持されている低濃度のrecPrP（recombinant prion protein，nMオーダー）を出発材料としてPrPオリゴマーの形成機構を解析した例は殆どない．我々は非変性条件で保持された低濃度のrecPrPに，低濃度のSDSを添加することによりrecPrPのオリゴマー化を誘導し，そのオリゴマー形成過程をFCSにより解析した．さらに蛍光標識モノクローナル抗体とFCCS（後述）を利用することによってオリゴマー化に先立ってPrP分子のN末端領域部分に構造変化が，続いてオリゴマー化に伴ってC末端領域部分に構造変化が生じることを明らかにした[36]．

神経細胞における凝集体タンパク質の量や細胞内分布をリアルタイムでモニターする手法の確立は多くの神経変性疾患の原因の究明に重要となろう．そのためには細胞を破砕しない生細胞中での凝集過程の直接解析や単一細胞解析などの手法が重要となる．出芽酵母による測定であるが分裂時におけるプリオン伝播に関して単一細胞観察による解析の報告がある[37,38]．またFCSは溶液や培養細胞だけでなく，例えばメダカ胚の始原生殖細胞におけるNuageと呼ばれる凝集体構造に含まれるタンパク質と細胞質に存在するタンパク質がダイナミックに交換反応をしていることを明らかにするなどをはじめ[39]，個体レベルへの応用[40,41]も始まっている．

FCSは，溶液における生体分子の動きを解析する方法であり，動きの変化から相互作用を求めることができる．均一系の溶液での測定の方法を活かし，細胞内における生体分子のその場での複合体形成の解析などに利用されてきた．しかし，拡散速度は一般に分子を球と仮定した場合，その半径に依存する．従って分子の容量としての大きさが1000倍変化しても，実際に計測される拡散速度は10倍程度しか変化せず，同じ大きさの分子同士が結合した（つまり分子量が2倍になる）程度では，相関関数の変化はわずかである．つまり，同じ大きさの2分子間の相互作用を検出する目的でFCS測定を行っても，FCSはそれほど敏感な測定方法とは言えない．次にこのようなFCSの弱点を克服する手法の一つとして蛍光相互相関分光法を紹介する．

6.　蛍光相互相関分光法（FCCS）

蛍光相互相関分光法（fluorescence cross correlation spectroscopy: FCCS）は生細胞における分子間相互作用検出に重点をおいた測定方法である．基本的にはFCSが1種類の蛍光色素の揺らぎから「分子の動き」と「分子数」を求めることができるのに対して，FCCSは2種類の蛍光色素の蛍光強度変化の同時測定から，各々の分子に関する動きと数の情報に加え，2種類の分子の「時間的・空間的同時性」すなわち相互作用を直接求める方法である[42]．次に，この「同時性」の解析から，2種類の分子の間の相互作用を検出する方法の原理と解析法について説明する．

6-1　原理

FCCSの厳密な原理と詳細な装置の説明に関しては，他の文献を参考にしていただき[43~45]，ここでは，直感的な原理の説明を試みる．2種類の蛍光色素を用意し，蛍光発光のうち，短い波長(青，シアン，緑など)を青色蛍光とし，より長い波長（オレンジや赤，近赤外など）を赤色蛍光と称し，それぞれ別々の標的分子に結合させる．青色と赤色に蛍光標識された分子同士が結合したり同一の複合体に含まれていたりする場合，分子間の距離や形態に関係なく2種類の蛍光色素は先に述べたFCSと同様の観察領域に同時に出入りし（**図6A**），青色蛍光と赤色蛍光の強度変化は同時に検出される（図6B）．もう少し詳細に述べると，まず，それぞれの蛍光分子の動きに由来する蛍光強度の揺らぎのシグナルが検出され，それぞれの蛍光自己相関関数が得られることになる．同時に，二つの蛍光の揺らぎのシグナルを重ね合わせると，相互作用している二つの分子が同時に観察視野を出入りする場合には，大部分のシグナルが同時に変化して検出される可能性が高い．この同時性の確率の高さを表したのが蛍光相互相関関数であり，同時性が大きいと相互相関は大きくなる（図6C）．反対に，2種類の蛍光標識した分子同士が相互作用しないときは，それぞれの蛍光色素が観察領域に入るために（図6D）蛍光強度変化が得られ（図6E），蛍光自己相関関数は得られるが二つのシグナルが同時に検出される可能性は低く，従って，相互相関関数は小さくなる（図6F）．

1. FCCS装置

FCCS装置は，2種類の蛍光を同時に励起ならびに検出するので，FCS装置に加えて，基本的にさらにもう一組の蛍光励起用光源としてのレーザーと検出器の追加が必要である．レーザーで励起され，発光した二色の蛍光はレーザー光と蛍光をメインダイクロイックミラーで分離透過した後，次の2番目のダイクロイックミラーで二つの蛍光が分離され，バリアフィルター（蛍光フィルター）を透過，又は反射され，各々の検出器に導かれる（図1）．FCCSでは，2種類の蛍光を同時に励起するため，二色の蛍光をいかに効率良く，かつお互いの蛍光のクロストーク（シグナルの混線，注1）なく分けるかということが重要になる．検出器の性能（単一光子測定なのか，アナログ式なのか）を含め，フィルターの性能や設定，ピンホールの大きさや数，位置の調整の有無など市販の装置はそれぞれ工夫されているので，使用者はその特性や特徴を十分理解して使う必要がある．

2. 蛍光相互相関関数

FCSで用いる自己相関関数は1種類の蛍光色素からの，従って一つの検出器からのシグナルの蛍光強度を解析していた．それに加えてさらに，FCCSでは種類の異なる蛍光色素からのシグナルの解析を行い，シグナルの変化の同時性を求める．それは観測時間tにおける青色蛍光と赤色蛍光の相関関数$G_g(\tau)$，$G_r(\tau)$と，FCSの式（1）を拡張した式（3）となる．

$$G_{gr}(\tau)=\frac{\langle I_g(t)I_r(t+\tau)\rangle}{\langle I_g(t)\rangle\langle I_r(t)\rangle} \qquad (3)$$

ここで，$I_g(t)$，$I_r(t)$は，観測時間tにおける青または赤色の蛍光強度を示す．$G_{gr}(\tau)$は2色の蛍光色素を含む分子(相互作用をしている分子複合体)の相関関数である．式（1）の分母は平均の蛍光強度（$\langle I(t)\rangle$）の2乗であるが，式（3）の相互相関関数の分母は，青色蛍光と赤色蛍光の平均強度を掛け合わせた値となっていることが分かる．

FCCSでは，前述の式（1）を用いて計算した青色蛍光と赤色蛍光の自己相関関数と，式（3）で計算された青色蛍光と赤色蛍光との相互相関関数の合計三つの相関関数曲線が得られる（図6C，F）．分子間相互作用が100%で，装置が理想的であると仮定すると，これら三つの曲線はすべて一致するはずである．しかし，波長の異なる2種類のレーザー光を回折限界まで絞って，極微小の観察領域を作ろうとした場合に，その二つの領域をサブミクロンオーダーで三次元的に一致させることは大変難しい．何故なら，波長の異なる光は溶液やガラス，また特に細胞中などの媒質中で屈折率が違うために，たとえ波長補正をしていると言われている対物レンズの場合でも観察領域を正確に重なり合わせて観察するのは困難なのである．従って，分子間相互作用が100%だったとしても，小さい相互相関しか得られないこともありうる．それらのひずみやクロストークを防ぐために高速に光源である二つのレーザーを切り替えるなど装置や手法の開発が進められている[46~48]．

細胞内でのFCCS測定で内在性のタンパク質が存在する場合は，蛍光タンパク質同士の相互作用の確率が低下するので，さらに相互相関関数の強度が低下する．それを防ぐには内在性のタンパク質を全部蛍光性タンパク質に置き換えることが必要となる．例えば，植物ホルモンであるオーキシン信号伝達因子（AUX/IAA-ARF）のGFPまたはRFP融合タンパク質を動物細胞であるHeLa細胞に発現させ，内在性タンパク質の影響をまったく受けないよう巧妙に実験系を構築し，タンパク質間相互作用の強度を比較することができた[49]．これは新規の生理活性物質のスクリーニングに応用可能だと期待される．置き換えることが困難な場合には，実験に当たってはポジティブコントロールとネガティブコントロールを取ることが求められる．ポジティブコントロールには，二つの蛍光色素が一つの分子に存在するもの（例えば，GFP-RFPタンデム二量体）を利用し，ネガティブコントロールには，相互作用しない二つの蛍光分子（例えば，GFPとRFPのそれぞれ単量体）の同時発現系を用いることが行われている[50,51]．また，蛍光プローブの組み合わせを工夫することで，励起に用いるレーザーを一つだけ利用し，励起波長による屈折率の違いを防ぐ方法もある．ローダミン色素を用いる場合や[52]，EGFR（epidermal growth factor receptor）とErbB2の二量体形成をGFPとmRFPを用いて解析した報告[53]，CFP（シアン蛍光タンパク質）とKeimaタンパク質を用いてCaM（calmodulin）-CaMK1（calmodulin dependent kinase1）の相互作用を細胞内で検出した報告[54]などがある．また近年注目されている幅広い励起波長を有する半導体ナノクリスタル（Qdot）と有機蛍光色素Alexa488を用いた抗原抗体反応検出を利用してプリオンタンパク質の検出感度を5倍感度良く検出できたといった報告[55,56]もなされている．

7. FCCSによる細胞内におけるDNA分解過程

遺伝子を細胞内へ導入することは細胞内で特定のタンパク質の発現をコントロールすることに利用され，また近年

(注1)
クロストークとは，一般的には通信回線における「混線」を意味する．ある一方の回線の信号が他の回線に漏れることで生じる．蛍光測定，特に蛍光タンパク質を用いる場合は，蛍光スペクトルが長波長側に延びる長い「すそ」のため，青色蛍光の蛍光シグナル（例えばGFPの蛍光）が赤色蛍光用の検出器で検出されることで，FCCS測定の場合，偽陽性シグナルとなる．

注目を集めている iPS 細胞等作製の根幹を成す技術でもある．現在考えられている生体（細胞）内への遺伝子導入法は，大まかにウイルスと人工ベクターの二つに分類される．ウイルスベクターは遺伝子導入効率が高いものの，免疫原性や副作用の存在が懸念されている．また人工ベクターは安全性の面では優れるものの，導入した遺伝子の発現効率が低いという問題を抱えている．人工ベクターによる遺伝子導入において，生体膜（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重要となるが[57]，現在のところ未知な部分が多い．その原因の一つは生きた細胞内に導入された DNA を直接解析できる手法がなかったためである．

そこで我々は FCS および FCCS を利用することで，細胞内に導入された外来 DNA の動きと分解の変化を直接観察することを目的として測定を行った[58]．プローブは両末端をローダミングリーンまたは Cy5 で二重標識した二重鎖 DNA である．まず，FCCS の測定からは導入した二重標識 DNA が酵素により切断されたかどうかを知ることができる．実際 FCCS の相互相関曲線の速やかな消失が観察され，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（**図 7B**，E）．また，先にも述べたが拡散時間の変化からは DNA の鎖長の変化，すなわち切断されて短くなる様子を追える．しかし FCS の解析からは 45 分の間では徐々に短くなる様子ではなく，ほぼ完全な長さの DNA 鎖と蛍光標識単量体ヌクレオチドだけが検出された（図 7C，F）．FCS と FCCS による解析の組み合わせと，そのほか DNaseI，エキソヌクレアーゼⅢ，Bal31 ヌクレアーゼなどを利用したモデル系の実験から，細胞内の DNA の分解は主に 5′-3′ エキソヌクレアーゼによる末端からの分解が主であると推定した．この推定を確認するために，外来 DNA の末端を処理しループ状にした場合や余分な配列を付与してエキソヌクレアーゼ耐性にした場合の細胞内の発現効率を比較すると，試験した 4 種の細胞（HeLa，COS7，MEF，HEK293）のうち 3 種では有意に発現が上昇したのに対し，HEK293 細胞では末端処理の効果が見られなかった．HEK239 細胞は様々なタンパク質発現効率が高いことが知られている．このことは細胞質内のエキソヌクレアーゼ活性が低いためと考えられた．以上の結果から，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機能になっており，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．このように，主に 5′-3′ エキソヌクレアーゼが細胞内での外来 DNA 分解を担っていることが推定された．この結果は，遺伝子導入に対する細胞内のバリアー機能の理解や新規の人工ベクター開発のための有用な足がかりをもたらすものと期待される．ここで用いられた非侵襲光学的な手法は拡散速度の変化から生細胞内の DNA 分解過程を解析したものであるが，細胞内でのタンパク質の分解などにも応用可能と期待される．

8.　新規相関分光法の展開

8-1　TIR-FCS

細胞膜における分子間相互作用は，細胞外シグナルの受容と細胞内シグナルへの変換を担い，その解析は細胞機能の解明に重要であり，それゆえに創薬ターゲット等の探索において注目されている．これまで細胞膜およびその近傍での分子間相互作用を単一分子レベルの感度で解析する種々の技術が研究開発されてきた．我々は蛍光標識した標的分子の細胞膜での動的な挙動を解析するために，低バックグラウンド光の観察が可能な全反射蛍光顕微鏡（total internal reflection fluorescence microscope，以下 TIRFM）光学系と，単一分子解析法である FCS とを組み合わせた全反射蛍光相関法（total internal reflection-fluorescence correlation spectroscopy，以下 TIR-FCS）測定システムの開発と，その細胞生物学への応用を目指した[59]．FCS と全反射光学系の組み合わせは古くから注目され[7]全反射顕微鏡の発展とともにいくつかの報告があったが[60~64]，生細胞における生体膜への応用はこれまでなかった．通常の FCS 測定は共焦点光学系（集光されたレーザーと検出側の結像面に設置されたピンホール）によって作り出された微小な測定領域（図 1C，0.4 μm×1 μm）を利用している．しかし，これを高々 10 nm の厚さしかない細胞膜近傍での測定に安定的に応用することは困難であった．そのため，TIRFM 光学系と FCS 装置を組み合わせて，その測定領域の光軸方向の高さを 1/200 に縮めるとともに細胞質側からのバックグラウンドシグナルを大幅に低減させ，細胞膜およびその近傍のみの観察が期待できる TIR-FCS を構築した．装置の特性を蛍光色素 FITC，および GFP のガラス表面近傍における分子拡散運動測定で確定した後，さらに，生体膜局在配列を有するファルネシル化 GFP（farnesylated GFP，以下 GFP-F）を発現する COS7 細胞を用いて，生きた細胞の細胞膜近傍での分子動態を観察した．一分子観察などとの詳細な比較の結果，速く拡散運動する分子群と遅く動いている分子群を検出し，細胞膜近傍の細胞質における三次元的拡散運動と細胞膜における側方拡散（二次元拡散）であることを確認した．構築した TIR-FCS システムは，生きた細胞の細胞膜における分子動態解析に有用であることが示された．

8-2　多点測定 FCS

これまで述べてきた FCS や FCCS 測定はすべて，1 回の測定は一点で行ってきた．しかし細胞は均一な構造ではな

く，核などの小器官，細胞骨格などの微細な構造体が多数存在し，物質の偏りが存在する．そのため，細胞内の複数箇所の任意の点を同時に測定したいという要求が出てくるのは当然である．これまでも，FCSによる細胞内複数箇所同時測定はいくつか報告があった．しかし，測定箇所の数が固定されているか[65]，ガルバノミラーのスキャンを利用すると測定箇所の数は変化可能だが測定箇所が増加すると測定時間がかかり[66]，またEM-CCDカメラを利用すると測定箇所は十分多いものの時間分解能が低いなど[67]，生体高分子の動きをすべてカバーするには不十分であった．

ところでTIR-FCSの励起光として用いる全反射光学系のエバネッセント場はガラス表面近傍を広く照射している．またTIRFM検出部の結像面に設置した1本のファイバーがFCS測定領域なので，ファイバーの数を増やすことでTIR-FCSではFCSの測定点を増やすことが理論的には可能である．そこで我々は7本のマルチモードファイバーから成るバンドル光ファイバー，七つのPMT，および複数の自己相関関数の同時計算が可能なマルチチャネル相関器等をすべて新たに作成することで多点型TIR-FCSのシステムを構築した[68]．全反射光学系を利用しているために，カバーガラス表面，すなわち生体膜の観察に限られるが，光ファイバーとその末端にPMTを設置するだけで多点測定が可能になることを実証した．実際，この装置を用いて，COS7細胞の細胞膜近傍の七つの測定点での同時測定に成功した．得られた自己相関関数はいずれも2成分モデルでフィットでき，測定で得られた拡散定数は生体膜における遅い拡散と，生体膜近傍の細胞質における早い拡散が測定された．この新たに構築した装置を用いて多点同時測定が可能であることが実証された．時間分解能はPMTを利用したことにより約1マイクロ秒であり，ほぼすべての生体高分子の拡散時間に対応できることが示された．COS7細胞膜でのGFP-Fの測定からは生体膜中での分布には偏りがあることが分かったが，それでも拡散速度はほぼ等しいことから，生体膜における分画（コンパートメント）の存在[69]を示唆するものと考えている．現在，この手法をチャンネルタンパク質や輸送タンパク質などの機能的な膜タンパク質の構造変化と機能の関連に応用することを進めている．さらに多点にする利点として測定点と測定点の間の相関（空間相関，後述）をとることで，物質の「流れ方向」と「速度」というこれまでにない新たな情報も得られる可能性が示唆された．細胞内の物流や情報の流れの様子を知る手がかりが得られたのである．

8-3　空間相関

現在の先端的顕微鏡観察の発展は光の波長の限界を超え，細胞内の複雑な状況を光の波長以下の解像度で可視化する，超解像顕微鏡法を可能としている[70,71]．その場その時でのタンパク質の存在と状態を探ることは生命機能を明らかにする上でますます有効で重要な方法と認識されている[72,73]．多種類の蛍光タンパク質の発見や開発は，それらの細胞内の発現量の組み合わせで多色・精緻・複雑な構造を明らかにすること[74]だけではなく，ダイナミック細胞像を理解することに期待が集まっている．これまでのFCS/FCCSはシグナルの時間変化に注目して分子のダイナミックな動きの情報（時間相関）を得ていた．これに対して，空間上のシグナルの分布・配置に注目して分子同士の位置関係（空間相関）を得て，さらにその時間変化（time lapse）を加味することでダイナミックな生体分子の時空間変化と機能を理解しようとする試みがなされている．すでにICS（image correlation spectroscopy），ICCS（image cross correlation spectroscopy），RICS（raster image correlation spectroscopy），temporal ICS, spatiotemporal ICS[75〜77]などの手法が実用化され新たな展開が始まり，目が離せない．

9.　お　わ　り　に

本総説では筆者らが開発をしてきた蛍光相関法の基礎的な研究について紹介した．蛍光相関法は相関分光法という幅広い研究分野の一つであり，特に蛍光測定の高感度性を兼ね備えた蛍光相関分光法は一分子検出感度を有し究極の検出法の一つである．今後の展開としては，どのような光源，つまり2光子[32]や多光子励起レーザーを利用するのか，またどのような検出手段を用いるのかが重要になってくる．既に表面増強ラマン[78]や超解像顕微鏡法の一つであるSTED（stimulated emission depletion）[79]を組み合わせた報告があり生物分野での様々な方向への広がりが期待される．しかし一方ではFCS/FCCSから得られる結果は基本的に「分子の大きさ」と「数」という実にシンプルな値である．そのことは基本的な測定方法であることを示している．つまり，研究者がどのような目的を持って，またアイデアを持って利用するのかが重要であることを示す．筆者は細胞の中の生化学的現象を生きたままの状態で，三次元的に任意の場所の，単一分子レベルでの反応，またそれに由来する物質や情報の流れの方向，速さ・量を理解することが細胞機能を知る最も重要な要素であり，研究の目標と考えている．

謝辞

本研究は，研究室内外の多くの方々との共同研究によるものです．これらの方々に心から感謝いたしますとともに，紙面の都合上紹介できなかった研究やお名前を挙げることができませんでしたことをお詫び申し上げます．私の研究の多くの部分は，FCS/FCCSの発展のためにこれまで一緒に研究を続けてきた研究室のメンバーの成果によるものです．ここに深謝いたします．

文　　献

1）Ehrenberg, M.（2008）in http://nobelprize.org/nobel_prizes/chemistry/laureates/2008/chemadv08.pdf. The Royal Swedish Academy of Sciences, Information Department.
2）Chenette, E.J.（2009）*Nat. Cell Biol.*, **11**, S13–S14.
3）Ehrenberg, M. & Rigler, R.（1974）*Chem. Phys.*, 4, 390–401.
4）Elson, E.L. & Magde, D.（1974）*Biopolymers*, **13**, 1–27.
5）Koppel, D.E.（1974）*Phys. Rev. A Gen. Phys.*, **10**, 1938–1945.
6）Magde, D., Webb, W.W., & Elson, E.（1972）*Phys. Rev. Lett.*, **29**, 705–708.
7）Thompson, N.L. & Axelrod, D.（1983）*Biophys. J.*, **43**, 103–114.
8）Thompson, N.L. & Mitchell, J.L.（2001）in Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications（Springer Series in Chemical Physics）.（Rigler, R. & Elson, E.S. eds.）, 65, pp. 438–458.
9）Kask, P., Piksarv, P., Mets, U., Pooga, M., & Lippmaa, E.（1987）*Eur. Biophys. J.*, **14**, 257–261.
10）浅井　博（1985）蛋白質核酸酵素，別冊28，246–248.
11）Webb, W.W.（2001）in Fluorescence Correlation Spectroscopy: Theory and Applications（Springer Series in Chemical Physics）.（Rigler, R. & Elson, E.S. eds.）, 65, pp. 305–330. Springer.
12）金城政孝（1999）蛋白質核酸酵素，**44**，1431–1438.
13）金城政孝（2007）講義と実習　生細胞蛍光イメージング（阪大・北大　顕微鏡コースブック）.（原口徳子，木村　宏，平岡　泰 編），pp. 101–109．共立出版，東京.
14）Widengren, J., Mets, U., & Rigler, R.（1995）*J. Phys. Chem.*, **99**, 13368–13379.
15）Chmyrov, A., Arden-Jacob, J., Zilles, A., Drexhage, K.H., & Widengren, J.（2008）*Photochem. Photobiol. Sci.*, **7**, 1378–1385.
16）Kinjo, M., Sakata, H., & Shintaro, M.（2010）in Live Cell Imaging.（Goldman, R., Swedolow, J. & Spector, D. eds.）, pp. 229–238. Cold Spring Horbour Press.
17）Vukojevic, V., Pramanik, A., Yakovleva, T., Rigler, R., Terenius, L., & Bakalkin, G.（2005）*Cell. Mol. Life Sci.*, **62**, 535–550.
18）Bjorling, S., Kinjo, M., Foldes-Papp, Z., Hagman, E., Thyberg, P., & Rigler, R.（1998）*Biochemistry*, **37**, 12971–12978.
19）金城政孝，小山富康（1995）日本バイオレオロジー学会誌，**9**(2)，74–83.
20）Kinjo, M. & Rigler, R.（1995）*Nucleic Acids Res.*, **23**, 1795–1799.
21）Schwille, P., Oehlenschlager, F., & Walter, N.G.（1996）*Biochemistry*, **35**, 10182–10193.
22）Kinjo, M.（1998）*Anal. Chim. Acta*, **365**, 43–48.
23）Kinjo, M.（1998）*Biotechniques*, **25**, 706–715.
24）Kinjo, M., Nishimura, G., Koyama, T., Mets, U., & Rigler, R.（1998）*Anal. Biochem.*, **260**, 166–172.
25）西村吾朗，金城政孝（1999）生物物理，**39**(2)，81–85.
26）Pack, C.G., Aoki, K., Taguchi, H., Yoshida, M., Kinjo, M., & Tamura, M.（2000）*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **267**, 300–304.
27）Pack, C.G., Nishimura, G., Tamura, M., Aoki, K., Taguchi, H., Yoshida, M., & Kinjo, M.（1999）*Cytometry*, **36**, 247–253.
28）Pack, C., Saito, K., Tamura, M., & Kinjo, M.（2006）*Biophys. J.*, **91**, 3921–3936.
29）Mikuni, S., Tamura, M., & Kinjo, M.（2007）*FEBS Lett.*, **581**, 389–393.
30）Mueller, F., Mazza, D., Stasevich, T.J., & McNally, J.G.（2010）*Curr. Opin. Cell Biol.*, **22**, 403–411.
31）Vukojevic, V., Papadopoulos, D.K., Terenius, L., Gehring, W. J., & Rigler, R.（2010）*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **107**, 4093–4098.
32）Savatier, J., Jalaguier, S., Ferguson, M.L., Cavailles, V., & Royer, C.A.（2010）*Biochemistry*, **49**, 772–781.
33）李　昊，小澤大作，後藤祐児（2009）生化学，**81**（8），667–687.
34）Takahashi, Y., Okamoto, Y., Popiel, H.A., Fujikake, N., Toda, T., Kinjo, M., & Nagai, Y.（2007）*J. Biol. Chem.*, **282**, 24039–24048.
35）Kitamura, A., Kubota, H., Pack, C.G., Matsumoto, G., Hirayama, S., Takahashi, Y., Kimura, H., Kinjo, M., Morimoto, R.I., & Nagata, K.（2006）*Nat. Cell Biol.*, **8**, 1163–1170.
36）Sakata, H., Horiuchi, M., Takahashi, I., & Kinjo, M.（2010）*Curr. Pharm. Biotechnol.*, **11**, 87–95.
37）Kawai-Noma, S., Pack, C.G., Tsuji, T., Kinjo, M., & Taguchi, H.（2009）*Genes Cells*, **14**, 1045–1054.
38）Kawai-Noma, S., Ayano, S., Pack, C.G., Kinjo, M., Yoshida, M., Yasuda, K., & Taguchi, H.（2006）*Genes Cells*, **11**, 1085–1096.
39）Nagao, I., Aoki, Y., Tanaka, M., & Kinjo, M.（2008）*FEBS J.*, **275**, 341–349.
40）Yu, S.R., Burkhardt, M., Nowak, M., Ries, J., Petrasek, Z., Scholpp, S., Schwille, P., & Brand, M.（2009）*Nature*, **461**, 533–536.
41）Shi, X.K., Foo, Y.H., Sudhaharan, T., Chong, S.W., Korzh, V., Ahmed, S., & Wohland, T.（2009）*Biophys. J.*, **97**, 678–686.
42）Schwille, P., MeyerAlmes, F.J., & Rigler, R.（1997）*Biophys. J.*, **72**, 1878–1886.
43）三國新太郎，武藤秀樹，金城政孝（2007）講義と実習　生細胞蛍光イメージング（阪大・北大　顕微鏡コースブック）.（原口徳子，木村　宏，平岡　泰 編），pp. 198–205．共立出版，東京.
44）Bacia, K. & Schwille, P.（2007）*NATURE PROTOCOLS*, **2**, 2842–2856.
45）Bacia, K., Kim, S.A., & Schwille, P.（2006）*Nat. Methods*, **3**, 83–89.
46）Muller, B.K., Zaychikov, E., Brauchle, C. & Lamb, D.C.（2005）*Biophys. J.*, **89**, 3508–3522.
47）Thews, E., Gerken, M., Eckert, R., Zapfel, J., Tietz, C., & Wrachtrup, J.（2005）*Biophys. J.*, **89**, 2069–2076.
48）Takahashi, Y., Nishimura, J., Suzuki, A., Ishibashi, K., Kinjo, M., & Miyawaki, A.（2008）*Cell Struct. Funct.*, **33**, 143–150.
49）Muto, H., Nagao, I., Demura, T., Fukuda, H., Kinjo, M., & Yamamoto, K.T.（2006）*Plant Cell Physiol.*, **47**, 1095–1101.
50）Saito, K., Wada, I., Tamura, M., & Kinjo, M.（2004）*Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **324**, 849–854.
51）Kohl, T., Haustein, E., & Schwille, P.（2005）*Biophys. J.*, **89**, 2770–2782.
52）Hwang, L.C. & Wohland, T.（2005）*J. Chem. Phys.*, **122**, 114708–114711
53）Liu, P., Sudhaharan, T., Koh, R.M.L., Hwang, L.C., Ahmed, S., Maruyama, I.N., & Wohland, T.（2007）*Biophys. J.*, **93**, 684–698.
54）Kogure, T., Karasawa, S., Araki, T., Saito, K., Kinjo, M., & Miyawaki, A.（2006）*Nat. Biotechnol.*, **24**, 577–581.
55）Fujii, F. & Kinjo, M.（2007）*Chembiochem*, **8**, 2199–2203.
56）藤井文彦，坂田啓司，金城政孝（2008）生物物理，**48**(5)，290–293.

57）Verkman, A.S.（2002）*Trends Biochem. Sci*., **27**, 27–33.
58）Sasaki, A. & Kinjo, M.（2010）*J. Control. Release*, **143**, 104–111.
59）Ohsugi, Y., Saito, K., Tamura, M., & Kinjo, M.（2006）*Biophys. J*., **91**, 3456–3464.
60）Hassler, K., Leutenegger, M., Rigler, P., Rao, R., Rigler, R., Gosch, M., & Lasser, T.（2005）*Opt. Express*, **13**, 7415–7423.
61）Pero, J.K., Haas, E.M., & Thompson, N.L.（2006）*Journal of Physical Chemistry B*, **110**, 10910–10918.
62）Hassler, K., Rigler, P., Blom, H., Rigler, R., Widengren, J., & Lasser, T.（2007）*Opt. Express*, **15**, 5366–5375.
63）Thompson, N.L. & Steele, B.L.（2007）*NATURE PROTOCOLS*, **2**, 878–890.
64）Ries, J., Petrov, E.P., & Schwille, P.（2008）*Biophys. J*., **95**, 390–399.
65）Blom, H., Johansson, M., Gosch, M., Sigmundsson, T., Holm, J., Hard, S., & Rigler, R.（2002）*Appl. Opt*., **41**, 6614–6620.
66）Takahashi, Y., Sawada, R., Ishibashi, K., Mikuni, S., & Kinjo, M.（2005）*Curr. Pharm. Biotechnol*., **6**, 159–165.
67）Kannan, B., Har, J.Y., Liu, P., Maruyama, I., Ding, J.L., & Wohland, T.（2006）*Anal. Chem*., **78**, 3444–3451.
68）Ohsugi, Y. & Kinjo, M.（2009）*J. Biomed. Opt*., **14**, O14030–4.
69）Kusumi, A., Nakada, C., Ritchie, K., Murase, K., Suzuki, K., Murakoshi, H., Kasai, R.S., Kondo, J., & Fujiwara, T.（2005）*Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct*, **34**, 351–378.
70）Hell, S.W.（2009）*Nat. Methods*, **6**, 24–32.
71）藤田克昌（2010）生物物理，**50**(4)，174–179.
72）Lippincott-Schwartz, J. & Patterson, G.H.（2009）*Trends Cell Biol*., **19**, 555–565.
73）Fernández-Suárez, M. & Ting, A.Y.（2008）*Nat. Rev. Mol. Cell Biol*., **9**, 929–943.
74）Livet, J., Weissman, T.A., Kang, H., Draft, R.W., Lu, J., Bennis, R.A., Sanes, J.R., & Lichtman, J.W.（2007）*Nature*, **450**, 56–62.
75）Arai, S., Noda, Y., Kainuma, S., Wada, I., & Yoda, K.（2008）*Curr. Biol*., **18**, 987–991.
76）Kolin, D.L. & Wiseman, P.W.（2007）*Cell Biochem. Biophys*., **49**, 141–164.
77）Digman, M.A. & Gratton, E.（2009）*Microsc. Res. Tech*., **72**, 323–332.
78）Habuchi, S., Cotlet, M., Gronheid, R., Dirix, G., Michiels, J., Vanderleyden, J., De Schryver, F.C., & Hofkens, J.（2003）*J. Am. Chem. Soc*., **125**, 8446–8447.
79）Eggeling, C., Ringemann, C., Medda, R., Schwarzmann, G., Sandhoff, K., Polyakova, S., Belov, V.N., Hein, B., von Middendorff, C., Schonle, A., & Hell, S.W.（2009）*Nature*, **457**, 1159–1162.