

今回は、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescence resonance energy transfer: FRET, 「フレット」と読む) という現象とその生物における応用について紹介します。

### 1. FRET とはどのような現象か

はじめに FRET とはどのような現象なのかを定性的に説明します。図 1 に示すように、2 つの蛍光分子 D と A からなる系を考えます。便宜的に、蛍光分子 D の吸収および蛍光スペクトルのピークはそれぞれ 400 nm と 500 nm とし、蛍光分子 A の吸収および蛍光スペクトルのピークをそれぞれ 450 nm と 650 nm とします。蛍光分子 D の蛍光スペクトルと蛍光分子 A の吸収スペクトルが重なりあっていることが後ほど重要になります。この系に対して、波長 400 nm の光を照射すると、蛍光分子 D はこの光によって励起され、波長 550 nm 付近の蛍光を発します。これに対して、蛍光分子 A は波長 400 nm 付近には吸収がないため、励起されないで蛍光は出ません。

次に、図 1 右上のように蛍光分子 D と蛍光分子 A が十分に近づいた場合を考えます。同様に波長 400 nm の光を照射すると、蛍光分子 D はこの光によって励起されるのですが、先ほどとは異なり、蛍光分子 A から 650 nm 付近の蛍光が出るようになります。逆に、蛍光分子 D からの蛍光は弱くなります。このように、本来蛍光分子 D から生じるべき蛍光のエネルギーが、蛍光分子 A が近傍に存在することにより、蛍光分子 A に非輻射的に伝播し、蛍光分子 A の蛍光の発光に使われてしまいます。これが FRET と呼ばれる現象です。

一般に、蛍光分子 D は蛍光分子 A に対してエネルギーを与えるほうの分子なのでドナー、蛍光分子 A は蛍光分子 D からエネルギー A を受けとる分子なのでアクセプターと呼ばれています。

なお、上ではドナーとアクセプターは異種分子として考えましたが、励起スペクトルと蛍光スペクトルの重なりがあれば、同種分子でも FRET は起こ

り得ます。またアクセプター側の分子は必ずしも蛍光を発する必要はなく、吸収があれば FRET が起こり得ます。

さて、上では 2 つの蛍光分子が十分近接したときに FRET が起こると述べましたが、実際にどの程度近づくと FRET が起こるのでしょうか。一般的なドナーとアクセプター間の距離と FRET 効率との関係は、図 1 下の曲線のようにになります。目安として効率が 50% になる距離 (フェルスター半径) は、一般的な小分子では、おおむね 5~10 nm 程度になります<sup>1)</sup>。

なお、FRET 効率は、2 つの蛍光分子の距離だけではなくて、ドナーの蛍光スペクトルとアクセプターの吸収スペクトルとの重なり具合によっても変化しますし、ドナーの蛍光モーメントとアクセプターの吸収モーメントの交差角によっても変化します。

### 2. 生物における応用

さて、FRET の原理は上述のとおりですが、生物においては、蛍光分子を他の生体分子に結合させ

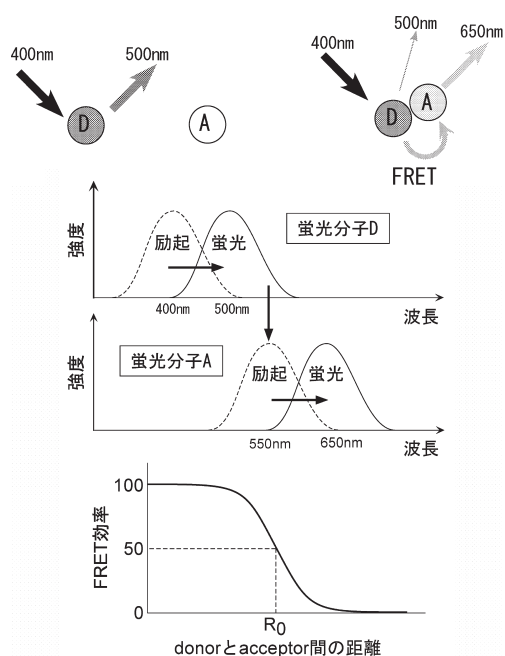


図1 FRET の原理。

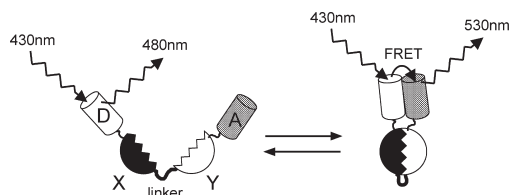


図2 分子内 FRET.

ることによって（蛍光ラベリング），初めて応用が可能となります。

まず，FRET 効率が2つの蛍光分子間の距離に依存することを利用した細胞内のイオン濃度センサーとしての例を紹介します．図2のように分子 X に蛍光分子 D を接続し，分子 Y に蛍光分子 A を接続します．さらに，分子 X と分子 Y には別の分子（リンカー）で接続します．ここで，測定したいイオンが分子 X あるいは分子 Y（あるいはリンカー）に作用すると，分子 X と Y が結合するようなペアを選んでおくことが重要です．測定したいイオンがこれらの分子に作用すると，分子 X と Y が結合し，その結果，蛍光分子 D と A の距離が縮まり，D から A へと FRET が起こり，分子 A からの蛍光が観察されるようになります．このような距離変化型のセンサーとして，カルシウムイオン濃度やリン酸化反応などの指示薬が開発されています<sup>2,3)</sup>。

上の例では，分子 X, Y, D, A とリンカーはすべて結合されており，全体として1つの分子として振る舞い，FRET はその結合分子内で起こるので「分子内 FRET」と呼ばれます．このほか「分子間 FRET」というものもあります（図3）．これは，分子 X と Y はリンカーで結合されていない点で上の例とは異なります．例えば，細胞に外界から何らかの刺激があったときに，分子 X あるいは分子 Y の構造が変化し，分子 X と分子 Y とが結合すると FRET が起こります．すなわちオン/オフ型のセンサーです．このようにして，例えば，細胞内で特定の分子ペアがいつ，どこで結合したか否かを可視化することができます。

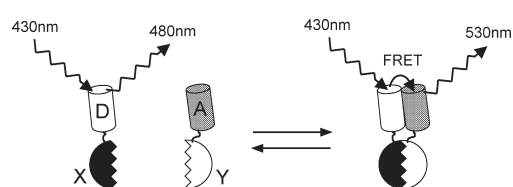


図3 分子間 FRET.

最後に，FRET の測定法を簡単に述べます．原理的には，スペクトルアナライザー等で蛍光のスペクトルを測ればよいのですが，簡単にはレシオ法が有効です．これは，上例においては，ドナーの蛍光波長（480 nm）とアクセプターの蛍光波長（530 nm）付近の2枚バンドパスフィルター（例えば，半値幅 10 nm）を用いて，順に2つの蛍光画像を取得して，その比をとることによって FRET を二次元的に可視化することができます。

以上，FRET の原理とその生物での応用例を簡単に紹介しました．現在では，遺伝子工学的に特定の生体分子に蛍光タンパク質を結合することが比較的簡単にできます．また，高感度 CCD カメラ等の微弱光検出技術の後追いもあって，生体内における分子レベルでのさまざまなやり取りを FRET を用いて可視化することが可能となっています<sup>4)</sup>。

（理化学研究所脳科学総合研究センター 深野 天）

## 文 献

- 1) J. R. Lakowicz: *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 2nd ed. (Kluwer Academic/Plenum Publishers, 1999).
- 2) Miyawaki *et al.*: "Fluorescent indicators for  $\text{Ca}^{2+}$  based on green fluorescent proteins and calmodulin," *Nature*, **388** (1997) 882-887.
- 3) Mochizuku *et al.*: "Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1," *Nature*, **411** (2001) 1065-1068.
- 4) 宮脇敦史編：実験医学別冊，ポストゲノム時代の実験講座③ GFP とバイオイメーjing グー蛍光タンパク質の発現と検出の基本から生体機能の可視化まで（羊土社，2000）。