

「FACSによる蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)を利用した分子プローブの活性測定」

大阪大学微生物病研究所 情報伝達分野 寺井 健太、松田 道行

Keyword: FRET、CFP、YFP、蛍光タンパク

1. 概要

21世紀の生物学のゴールの一つが、細胞内の個々の分子の情報がインプットされ、それらの動態を再現できる仮想空間上のバーチャル細胞の作製にあることは疑いない。バーチャル細胞の作成はすでに多くの研究者によって開始されているが、これまでのプログラムの多くは、試験管内のデータをパラメータとして転用している。しかしながら、我々はこの試験管内の生化学的データが、実際の細胞内での分子の挙動をどこまで正確に反映し得るか大いに疑問を感じている。なぜなら、伝達分子の多くは他の多くの分子と複合体を作りながら複雑な制御機構をつけており、1個、あるいはせいぜい2、3個の分子種の存在下で解析された試験管内のデータが生体内の事象を反映しうとは思えない場合が多々あるからである。そこで、バーチャル細胞作成のためのパラメータの蓄積を目標に、我々は情報伝達分子の動態を生きた細胞内で解析するための、蛍光共鳴エネルギー移動 (fluorescent resonance energy transfer, FRET) を応用した分子プローブの開発を行っている。

2. FRETとは

FRETとは、励起されたある蛍光物質(ドナー)のエネルギーが、ごく近傍に存在する他の蛍光物質(アクセプター)に無放射遷移する現象をさす。多くの場合、アクセプターが基底状態に戻る際に蛍光を発するので、それによりFRETが起きたことが観察できる。われわれが通常用いている系を具体例に取り説明する。緑色蛍光蛋白(GFP)の二つの変異体シアン蛍光蛋白(CFP)と黄色蛍光蛋白(YFP)を十分に近い距離(5 nm以下)に置き、CFPを励起する。するとFRETにより、CFPからYFPへのエネルギー移動が起きて、YFPが励起状態になる。このYFPが基底

状態に戻る時に黄色の蛍光が観察される。従ってシアン色の蛍光の減弱と黄色蛍光の出現が、FRETが起きていることを示す証拠となる。この原理を利用して、情報伝達系における最も重要なイベントである分子間の相互作用を検出するプローブが作成できる。FRETプローブには、CFPとYFPが一つの分子内に存在する1分子タイプのもの、別々に分かれている2分子タイプのものがある(図1)。前者は高いS/N比を有するが、開発に多くの時間を要する。後者は容易に作成できるもののS/N比が通常低く、解析に時間を要する。大まかな使い分けとしては、細胞の空間情報が必要な場合1分子タイプのを、空間情報があまり重要でない場合は2分子タイプのを使用すると考えるといいだろう。

2分子タイプのFRETプローブは、シグナルノイズ比(S/N比)が低いために、統計的に有意なデータを得るためには数多くの細胞を解析する必要がある。これまではFRETは細胞の画像から計測していたので、このサンプル数を確保するのに多くの時間を費やしてきた。この問題を打開するために、われわれはBD FACSAriaセルソーターを用いたフローサイトメトリーによるFRET解析方法を開発した。同機にはオプションとしてCFPを励起できる407 nmのレーザーが装備できるので、CFPとYFPを用いたFRET解析が可能となっている。この方法により多くのサンプルを解析することが可能になり、微量なFRET効率の変化も統計的に有意な差をもって検出することができる。また、感度が高いために、蛍光プローブを過剰発現する必要がなくなり、より生理的な条件でFRETを測定することが可能になった。

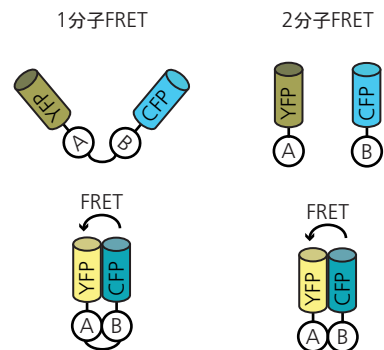


図1 1分子FRETプローブと2分子FRETプローブ

3. BD FACSAriaをCFPとYFPを使ったFRET解析用に最適化

CFPとYFPとを使ったFRET解析には、標準のBD FACSAriaに以下の最適化を加える必要がある。

1. 407 nmの励起光を発する固体レーザー：CFPを励起するために必須である。
2. CFPの蛍光を観察するのに適したBand path filter：標準では450 nm ± 20 nmのFilterだが、470 nm ± 20 nmのFilter (470AF40、Omega Optical, Inc. を用いることにより、CFP由来の蛍光を2倍ほど明るく検出できる (図2)) 図にはCFPの蛍光プロフィールと各Band path filterの透過率を示している。この作業は、費用対効果の高い改良なので強くお勧めする。BD FACSAriaのBand path filterは容易に交換できるので、例えば中央機器室においてあるような機械でも、自分たちが用いる蛍光物質のプロフィールを参照し、適したfilterを選ぶことでS/N比をあげることができる。

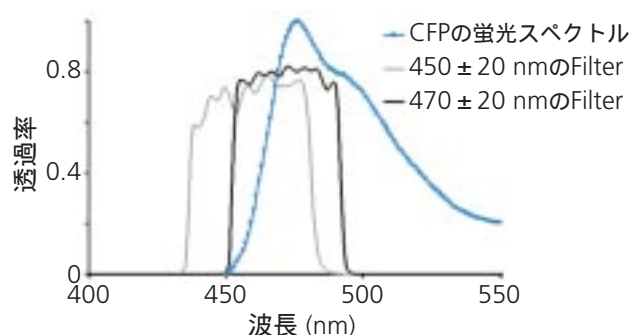


図2 CFPの蛍光プロフィールとBand path filterの透過率

3. 色素名の変更：標準のBD FACSAriaのチャンネルには蛍光色素の名前が付けられているが、我々はこれらのチャンネルの名は“励起波長”+“測定波長”という名に変えている (例: 407-470) 。この設定はInstrument configurationで行える。自分たちが用いている蛍光たんぱく質、蛍光色素の最適な励起波長と蛍光波長を調べることにより、誰がどのような蛍光物質を用いても、即座に理解し対応できるようにするためである (図3))
4. FRET解析用ソフト：我々は解析用ソフトに標準添付のDiva softwareに加え WinList (Verity Software House, Inc. <http://www.vsh.com/>) を用いている。Diva softwareはBD FACSAriaのコントロールとデータ解析が行えるソフトなのだが、欠点として、生データをExcelに転送することができない、Scatter plotのパラメータに、複雑な計算式で処理したデータを加えることができない、の二点がある。FRETを定量するためにはいくつかの補正が必要なので、WinListあるいはそれに替わるソフトは必須である。

Parameter	Laser	Detector
FCS	Blue	FCS
SSC	Blue	F
488-530	Blue	E
488-576	Blue	D
488-610	Blue	C
488-695	Blue	B
488-780	Blue	A
633-660	Red	B
633-780	Red	A
407-530	Violet	A
407-470	Violet	B

図3 当研究室におけるFACSAriaの構成

4. FACSを用いたFRET解析の方法

以下では、我々の開発した1分子タイプ、2分子タイプのプローブを例にあげながら、Flow cytometryを用いてFRET効率の変化を検出し、情報伝達分子の動態を解析する技術と方法を説明する。

4.1. 細胞の準備

以下に示すFlow cytometryの系では293F cell(Invitrogen)を用いている。我々が知る限り、浮遊系の細胞で一過性に遺伝子導入し実験するにあたって、手間と費用が最もかからない細胞である。また、培地 FreeStyle 293 Expression Medium、Invitrogen に由来する自家蛍光が420 nm ± 10 nm で励起した際に、検出の障害になるほど大きくないことも確認しており、計測する際に培地交換の必要がないのも用いている理由のひとつである。我々はTransfection後24から36時間で解析を行っている。

4.2. 1分子プローブの解析

4.2.1. 1分子プローブの構造

1分子プローブの解析は2分子に比べ遥かに簡単である。解析の手順が少ないためにノイズが増える要因や失敗も少ない。407励起による蛍光をCFP由来の蛍光、FRETによるYFP由来の蛍光、それぞれをダイクロイックミラー、バンドパスフィルターで分光し、その蛍光強度の比を取ることでFRET効率を近似できる (Fig. 4) 用いている光学系は、407 nmの励起光をあてた細胞より発した蛍光を、502 nmより長波側を透過し、短波側を反射するダイクロイックミラーを用いてYFP由来の蛍光、CFP由来の蛍光を大まかに分離する。更に、それぞれの波長に適した470 ± 20 nm、530 ± 15 nmのバンドパスフィルターを用いて厳密にCFP由来、YFP由来の蛍光をphotomultiplier tube (PMT) を用いて検出している。

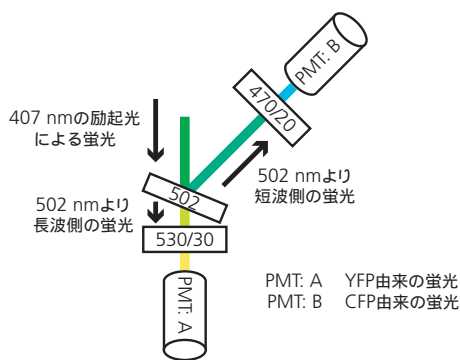


図4 FACS Ariaの光学系

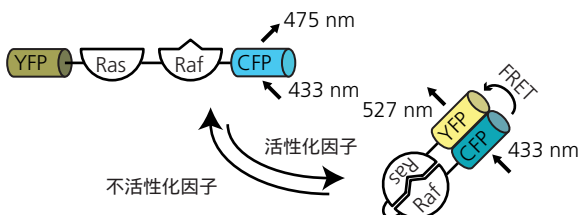


図5 Raichu-Rasの構造

ここでは、1分子プローブの例として、癌遺伝子産物RasからRafへの情報伝播の様子を一例として提示する。我々は以前に、YFP、Ras、RafのRas結合領域、CFPのそれぞれをN末より直列で連結したRaichu-Rasという1分子FRETタイプのプローブを作製した (図5 (Mochizuki et al, 2001))。Rasが不活性化状態のときは、RasとRafは乖離しており、CFPとYFPの距離が遠いためCFPを励起してもFRETが起きにくい。Rasが活性化されるとRafと結合し、CFPとYFPの距離が近くなるためにFRETがより強く起こり、YFP由来の蛍光が増加する。図はRaichu-Ras発現細胞を420 nm ± 10 nm で細胞を励起した際に得られる蛍光プロフィールである (図6) この細胞にRasの活性化因子であるSosを加えることにより、青い線から赤い線に変化する。この蛍光プロフィールの変化をバンドパスフィルターにてCFP由来と、FRETによって発しているYFP由来の蛍光強度を測り、その比を取ることで、どれくらいFRET効率が変化したか計算できる。FRETが起きていなければYFP由来の蛍光強度/CFP由来の蛍光強度は低い値になり、起きていれば高い値となる。

このRaichu-RasのYFP由来とCFP由来の蛍光強度を、BD FACSAriaを用いて計測したものを以下に具体例として提示する。注意すべきことは、我々が観測している蛍光強度の変化は、Flow cytometryを専門としている研究者の常識から考えると非常に小さい変化であるということである。CFPとYFPのペアを用いたFRETによる蛍光強度の変化は、せいぜい6倍程度である (化学蛍光物質を用いた際には10倍以上になることもある) このため対数表示でYFPの蛍光のみを計っても、その変化は検出することが難しい。しかし、ここでFRETの効率測定にはCFPとYFPの比率を採るので、実際の変化量はすくなくとも、S/N比はかなり高く、FRETの変化を測定することができる。なお、FRET効率の厳密な理解は宮脇博士の総説を参照されたい⁽¹⁾。

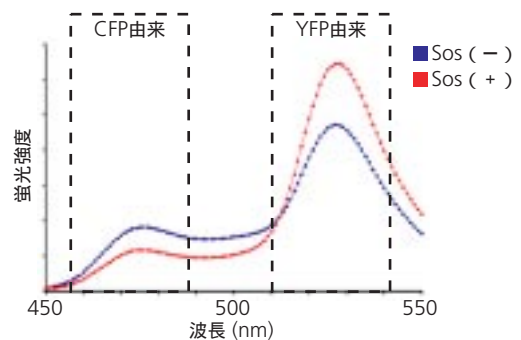


図6 Raichu-Rasの蛍光プロフィール

- 4.2.2. 1分子FRETプローブを使った具体的な実験方法
- 293F細胞にRaichu-RasおよびRas活性化因子Sosの発現プラスミドをトランスフェクションし、24時間から36時間培養する。
 - FSC、SSCを用いて細胞画分を得る。
 - Instrument Parameterのタブから 407-470チャンネル、407-530チャンネル、488-530チャンネル、の3チャンネルを加える。また、RatioのタブからRatio: 407-530/407-470を追加し、これら4チャンネルを測定する。Diva softwareではサンプル測定後にRatioパラメータを新たに加えて解析することは不可能なので、サンプル測定前に設定しておかなくてはならない(とても重要)
 - 407-470チャンネルと488-530チャンネルを用いてプローブが適切にFoldingしている画分を得る(図7A)。407-470チャンネルと488-530チャンネルで展開すると、図のようになる。十分にCFPとYFPのFoldingが行われていれば、理論的にはCFPとYFPの発現量比は、同じ分子数なので、407-470チャンネルと488-530チャンネルの蛍光強度比は常に一定となる。しかしながら、実際にはYFPはCFPよりFoldingが早いので、細胞によってはYFP

図7 Raichu-Rasの解析結果:

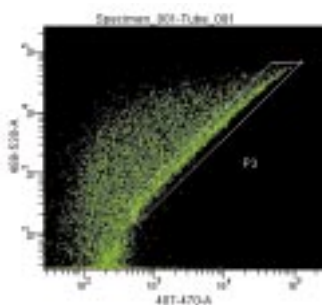


図7A 407-470チャンネルと488-530チャンネルにおける蛍光強度

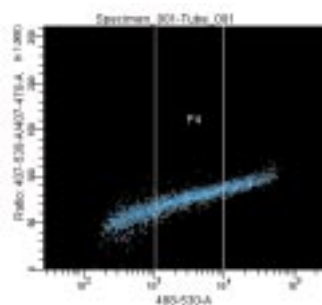


図7B Ratio: 407-530/407-470と488-530チャンネルを用いた散布図

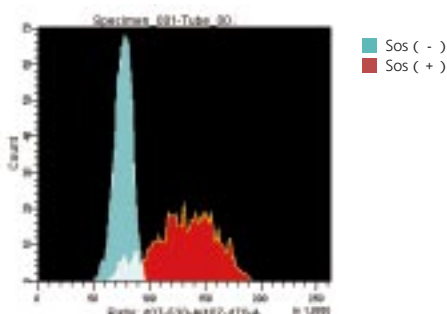


図7C Rasの活性化因子であるSosの有無による Ratio: 407-530/407-470の値 (Total 1000細胞)

の蛍光が強い画分にくる。発現比率が異なる細胞はノイズの原因となるので、この画分をはじく。このようにして、CFPとYFPが均等の分子数を発現している細胞を我々は解析に用いている。

- つぎに、細胞内での発現量をそろえるために、YFPの蛍光強度の一定の範囲を(1オーダー程)をGatingする(図7B)
- Ratio: 407-530/407-470すなわち、FRETの蛍光とCFPの蛍光の比率、の変化を比べる(図7C)である。この値がRasの活性化因子であるSosの発現により増加している。この結果より、RasがSosによって活性化され、FRETがよりよく起こっている状態になっていることがわかる。重ね合わせた図はPhotoshop等の画像編集ソフトを用いて作成できる。

4.3 分子プローブの解析

4.3.1. 光学的補正方法

1分子FRETプローブとは異なり、2分子間のFRETを解析する際には光学的補正が必要となる。我々が407-530チャンネルで得た蛍光強度は、3つの要素に由来する蛍光の和である(図8)。一つは、我々が計測すべき、FRETによって蛍光を発したYFP由来のもの、すなわち、励起されたCFPのエネルギーがYFPに移行したことによるYFPが発する蛍光である。二つ目はCFPの蛍光のBleed throughによるものである。Bleed throughとは、YFPチャンネルにおけるCFPの蛍光漏れのことである。三つ目は励起光によるYFPのCross excitationである。Cross-excitationとは407 nmの励起光がYFPを直接励起してしまう現象のことである。つまり

“407-530”チャンネルの蛍光 = “FRET由来の蛍光” + “CFPのBleed through” + “YFPのCross excitation”

となる。以下、(407-530)(407-470)(488-530)はそれぞれのチャンネルでの蛍光強度を示す。Bleed throughとCross excitationの強度はCFPとYFPの分子数に比例する。ここで、(CFPの分子数)(YFPの分子数)がそれぞれの蛍光チャンネルである(407-470)(488-530)に相関すると近似する。すると

(CFPのBleed through) = A (CFPの分子数) = (407-470)

(YFPのCross excitation) = B (YFPの分子数) = (488-530)

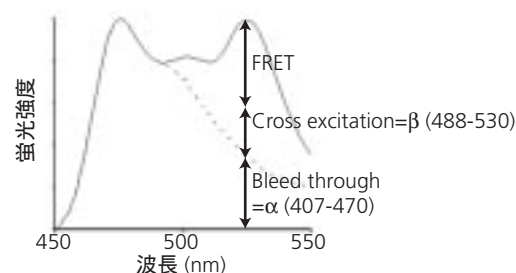


図8 407-530チャンネルで得た蛍光強度の由来

これらを式に代入すると

$$(407-530) = (\text{FRET由来の蛍光}) + A(\text{CFPの分子数}) + B(\text{YFPの分子数})$$
$$(407-530) = (\text{FRET由来の蛍光}) + (407-470) + (488-530)$$

と記述することができる。A、B、 k はそれぞれ用いる Filter set、photo multiplier tube (PMT) の電圧に依存する定数である。また k はCFPのみ、YFPのみを単独で発現した細胞を用意し、それらの $(407-530)$ $(407-470)$ $(488-530)$ の3チャンネルを計測することにより算出可能である。

CFPのみ発現している細胞では、

$$(\text{FRET由来の蛍光}) = 0$$
$$(\text{YFPのCross excitation}) = 0$$

が成り立つので

$$(407-530) = (407-470)$$

であり k が求められる。また、YFPのみ発現している細胞では

$$(\text{FRET由来の蛍光}) = 0$$
$$(\text{CFPのBleed through}) = 0$$

であるので

$$(407-530) = (488-530)$$

より k が求められる。

以上の計算式より

$$(\text{FRET由来の蛍光}) = (407-530) - (407-470) - (488-530)$$

が計算可能となり、FRETに由来した蛍光のみを解析できる。

この (FRET由来の蛍光) の値はCFPとYFPが結合している絶対数に比例し、CFPとYFPが多く発現している細胞ほど高い値を示す。例えば、CFPとYFPがそれぞれ100分子/cellずつ発現している細胞と、CFPとYFPがそれぞれ10000分子/cellずつ発現している細胞では、 (FRET由来の蛍光) の蛍光強度はおのずと異なるはずである。このため、個々の細胞間で比べる際には (FRET由来の蛍光) を (CFPの分子数) に関連する $(407-470)$ で割った値を用いる必要がある。

$$(\text{FRET由来の蛍光}) / (407-470) = ((407-530) / (407-470)) - ((488-530) / (407-470))$$

この値はCFP 1個に対して、YFPがどういう割合で結合しているかを反映する。詳細は、これらの補正式を用いてプローブを作製した文献にあたっていただきたい⁽⁴⁾。

くどいようであるが2分子プローブは、このような複雑な補正をしないと407-530チャンネルで得たIntensityはCFP、またはYFPの分子数に依存してしまうことをさらに解説する。上記の式を変形すると

$$(407-530) / (407-470) = (\text{FRET由来の蛍光}) / (407-470) + k + ((488-530) / (407-470))$$

となる。 $(407-530) / (407-470)$ の値、つまり1分子プローブを用いて解析した際にFRET効率として算出したRatio: $407-530/407-470$ の値は、 (FRET由来の蛍光) に変化がなくても $(488-530)$ が大きくなることにより増加する。このため、2分子プローブを用いた際にはRatio: $407-530/407-470$ のみでは判断できない。

1分子プローブではなぜ補正が不要かの説明を補足しておく。

1分子プローブではCFPとYFPが1:1で発現するので、YFPとCFPの分子数比は1である。そのため

$$(\text{YFPの分子数}) / (\text{CFPの分子数}) = 1$$

$$(488-530) / (407-470) = k (\text{定数})$$

$$(407-530) / (407-470) = (\text{FRET由来の蛍光}) / (407-470) + k$$

$$(407-530) / (407-470) = (\text{FRET由来の蛍光}) / (407-470) + \text{定数}$$

となる。式より、Ratio: $407-530/407-470$ の値は (FRET由来の蛍光) のみに依存した変数になるため、1分子プローブでは、2分子プローブのような補正は不要となる。このことは1分子プローブの方がシグナルノイズ比も低くなることを意味している。

4.3.2. 2分子FRETプローブを使った具体的な実験方法
 二つの分子間の結合を生細胞で観察するのに2分子FRETプローブは最適である。ここではモデルとして低分子量GタンパクのRasとRasのエフェクター分子であるセリン・スレオニンリン酸化酵素Rafを観察する系をモデルとして説明する。293FにCFP-RasV12(Rasの恒常活性化型変異体で、Rafに結合することができる)のみ、 YFP-Rafのみ、 CFP-RasV12とYFP-Raf、この3通りをトランスフェクションし24時間から36時間培養する。

1. FSC、SSCを用いて細胞画分を得る
2. 407-470チャンネル、407-530チャンネル、488-530チャンネル、の3チャンネルを測定する。
3. データをWinList(<http://www.vsh.com/>)にて解析する。FACSDiva上で得られたExperiment内のSpecimenを右クリックし、Export FCS Files、File version 2.0でExportする。
4. WinList上で細胞画分をGateし、Gate内に存在する細胞の生データをText形式でoutputし、Microsoft Excel上で開きなおす。この際、パソコンの処理能力の都合上、18bitで示しているデータは10bitに直す必要がある。また、我々は発現しているYFP、CFPの分子数を均一にするために、CFPの蛍光強度、YFPの蛍光強度が一定の範囲内のデータを用いて処理している。

5. Excelを用いてYFP-Rafのみを発現した細胞のデータを用いて (YFPのcross excitationの程度を示す定数)を算出する。理論的には蛍光強度に依存しない定数になるはずなのだが、様々な理由 PMTの特異性など、例えば2倍明るくなった蛍光を2倍として観測せず、1.9倍として結果が出てきてしまうなど)のため、我々は1次の関数で近似している。 $y = (407-530) / (488-530)$ なので、Y軸に $(407-530) / (488-530)$ で散布図を作成し、近似曲線を作製する(図9A)
6. CFP-RasV12のみを発現した細胞のデータを用いて (CFPのspectrol bleed throughの程度を示す定数)を算出する(図9B)
7. Microsoft Excel上で(FRET由来の蛍光)(407-470) = (407-530)(407-470) - (488-530)(407-470) を計算し、X軸に(407-470) Y軸に(FRET由来の蛍光)(407-470) で散布図を作成する(図9C) 理論的には FRET由来の蛍光 (407-470) は (407-470) の蛍光強度に依存しないグラフとなるはずである。ならない場合は、補正が正確に行われていない可能性が高い。
8. 我々は FRET由来の蛍光 (407-470) の値からヒストグラムを作成し、結果の判定に用いている。図は、CFP-RasV12とYFP-Rafのデータと、CFP-RasV12とYFP-RafR188L(RafのRasに結合する領域に変異を加え、Rasに結合できなくなった変異体)とのデータを示している(図9D) CFP-RasV12とYFP-Rafの分子間ではFRETが観測できるが、CFP-RasV12とYFP-RafR188Lの組み合わせでは、検出できないことがよりはっきりとわかる。

図9 2分子プローブの解析方法と結果:

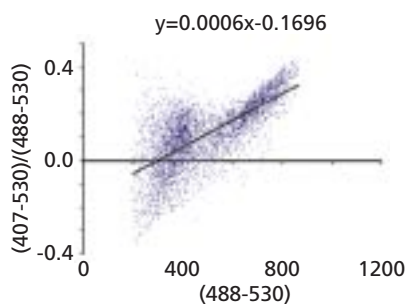


図9A YFPの補正式

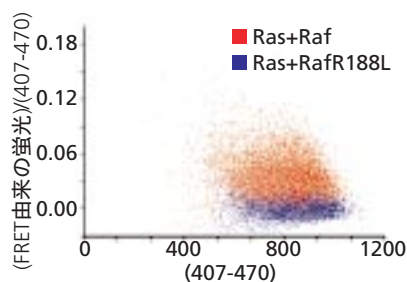


図9C (FRET由来の蛍光)(407-470) の値と407-470チャンネルを用いた散布図

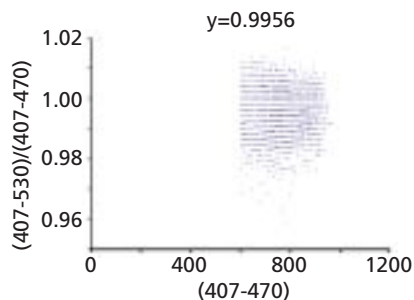


図9B CFPの補正式

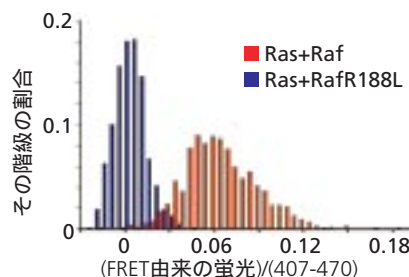


図9D (FRET由来の蛍光)(407-470) の値の変化

4.3.3. 2分子FRETプローブを使った実験へのアドバイス

4.3.3.1. 分子数の算出

2分子FRETの実験のコツの1つに“ YFP-tagの分子が細胞内においてCFP-tagの分子より多く発現していること”が挙げられる。例えばCFP-tagが100個、YFP-tagが1個ではFRETはMAXでも100個に1個しか起こらない。CFP-tagが100個、YFP-tagが100個以上ならば、FRETはMAXで100個である。そこで、CFPとYFPとの分子数を簡便に比較する方法を二つ紹介する。1番目の方法は、CFP-long spacer-YFPという分子を用いる。この分子においてはCFPとYFPが1対1で発現しているが、FRETがほとんど起きていないことが確認されている。この分子を発現させた細胞の蛍光強度を解析し、キャリブレーションに用いる。すなわち、実験に供与する細胞をまったく同じ条件で解析して、CFPとYFPの蛍光強度比から、もとの分子数比を計測する。もう一つの方法は、CFPとYFPとをそれぞれ恒常的に発現する細胞をSub-cloningして用意しておく。この細胞内にCFPとYFPとが、何分子/cell発現しているかを定量的ウェスタンブロットング法(大腸菌で作成したGFPをキャリブレーションに用いる)により計測する。この細胞をFACSで解析し、蛍光強度のキャリブレーションに用いる。これにより、自分たちが計測している細胞内にCFP、またはYFPが何分子/cell発現しているかを常に意識しながら実験することが可能となる。

4.3.3.2. 2分子プローブの開発手順

まず大切なことは、ポジティブコントロールを用意することである。上述のRasとRafの場合だと、Rafに恒常的に結合していることが知られているRasV12を用意することに相当する。さらに、細胞内で実際、どれくらいの割合で結合しているかがわかる手段が欲しい。RasとRafの場合だと、細胞質に存在するRafが細胞膜へ移行するので、顕微鏡下で、大部分のRafがRasV12変異体に結合できることは容易に確認できる。少なくとも10%程度は結合していないとFRETを観察するのは厳しいだろう。

このポジティブコントロールとなる蛋白にCFPとYFPとをそれぞれ結合させてFRETが起っているかどうかを観察する。まずは、

プローブとなる蛋白のN末、C末に蛍光蛋白を結合させたものを用意するので、FRETは、2×2の4通りについてテストすることになる。前述のとおり、FRET観察を容易にするためには、CFPを融合させた分子より、YFPを融合させた分子の方が多く発現していることが必要であるので、それを考慮に入れて、どちらの蛋白にYFPを融合させるかを考える。

ポジティブコントロールにしたプローブのセットでFRETが観察できなければ、YFPあるいはCFPを挿入する場所を変え、CFPとYFPがより近傍になるような配置を探す。“ FRET由来の蛍光”/“ 407-470”の値が0.2から0.3以上になることが理想である。

GFPのC末11アミノ酸はフレキシブルであることが知られているので、リンカーは通常必要ない。CFPあるいはYFPを目的とする蛋白のC末に挿入する場合は、フォールディングを高めるためにリンカーを入れた方がよい場合もある。

ネガティブコントロールは、様々な方法で作製可能である。結合できなくなる変異をどちらかの蛋白に入れるのがもっともよいが、簡便にはYFPのみをアクセプターとして発現させる、方法が挙げられる。

補足

タンパクによってはN末端、C末端にGFPを結合させるとその本来の機能を失うものもある。例えばRasのC末にGFPを結合させるとRasの局在が変化する、ある分子のN末にYFPを結合させると上流分子と結合しなくなる、などである。また、YFP-tagの分子、CFP-tagの分子が結合しているにもかかわらず、タンパクのN末端、C末端のどちら側にGFPを付けるかによってFRET効率が変ることがある。例を挙げると、CFP-RasV12とYFP-Rafの組み合わせはFRETがよく観察できるが、CFP-RasV12とRaf-YFPではタンパク同士は結合しているにもかかわらず、FRETが観察できないなどである。このような組み合わせは良いネガティブコントロールとして用いることができる。

おわりに

我々はBD FACS Ariaを用いる前までは、顕微鏡を主なツールとしてFRETの解析を行っていた。BD FACS Ariaを用いた系は、顕微鏡と比べ、どわわけFRET変化量が上がるわけではないが、多くの細胞をこなせることにより、微細な変化を、有意差のある変化として捕らえることが可能となった。我々は、今回示した系を用いて薬剤等のスクリーニングにも応用しよう試みている。原理的には、例として示した系を用いてRas-Rafの相互作用を阻害する低分子化合物をスクリーニングできるはずである。更には、これらのFRETの系を用いた発現クローニングにも挑戦したいと考えている。

従来の細胞を可溶化しELISA等で検出する系では、RasとRafの相互作用を直接的に阻害する分子は同定可能である。しかし、この系では間接的にRasとRafの結合を阻害する分子、例えばRasの活性化因子を阻害する分子等は同定不可能であり、まったく別の系を作製しなくてはならない。これに対し、我々が示したFRETを用いた系では、細胞内においてRasとRafの相互作用を検出しているため、Rasの活性化因子を阻害しても、RasとRafの結合を競合阻害しても、Rasの不活性化因子を活性化しても、同様の結果が得られる。つまり、今までは検出できなかったために、注目されてなかった分子や化合物などを同定する可能性がある。現在、この新たな可能性が、薬剤開発のbreakthroughとなることを目指して研究している。

参考文献

1. Miyawaki A (2003) Visualization of the spatial and temporal dynamics of intracellular signaling. *Dev Cell* 4: 295-305
2. Mochizuki N, Yamashita S, Kurokawa K, Ohba Y, Nagai T, Miyawaki A, Matsuda M (2001) Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1. *Nature* 411: 1065-1068
3. Sorkin A, McClure M, Huang F, Carter R (2000) Interaction of EGF receptor and grb2 in living cells visualized by fluorescence resonance energy transfer (FRET) microscopy. *Curr Biol* 10: 1395-1398
4. Terai K, Matsuda M (2005) Ras binding opens c-Raf to expose the docking site for mitogen-activated protein kinase kinase. *EMBO Rep* 6: 251-255

プロフィール

寺井 健太

2002年、北海道大学医学部卒。現在、大阪大学医学部博士課程4年。この4年間はFRETを用いて分子の構造変化と活性変化をテーマに研究してきました。来年度からは愛車と共に、アメリカに雄飛してきます。

松田 道行

大阪大学微生物病研究所 情報伝達分野教授

東京大学医学部卒業後、病理学教室にて腫瘍ウイルスの研究を行う。大学院修了後、国立予防衛生研究所(現感染症研究所) ロックフェラー大学、国立国際医療センター研究所を移動しながら癌遺伝子の研究を行ってきた。2001年より現職。「自分の専門に捕らわれず、研究のゴールに向かって必要な技術は何でもトライすること」をモットーとしている。だから、FRETもFACSも、そしておそらくは病理学も、ちょっと詳しいアマチュアのレベルを超えない。最近ではシミュレーションモデルの構築も始めている。



日本ベクトン・ディッキンソン株式会社
東京都港区赤坂8-5-26 赤坂DSビル 〒107-0052

www.bd.com/jp/

お客様情報センター

製品関連・資料請求 / 納期・在庫

☎ 0120-8555-90

Fax: 024-593-5761

BD Biosciencesに関する技術的、学術的なお問い合わせ先
アプリケーションホットライン Tel: 03-5805-9960
技術研究室 E-Mail: tech_cell@bd.com

機器修理・メンテナンス ☎ 0120-7099-12

試薬カスタマーサポート ☎ 0120-4890-77

E-Mail: tech_cell@bd.com

64-116-00

R0-0604-000.5-588