(19)日本国特許庁(JP)　(12)公開特許公報(A)　(11)特許出願公開番号
特開2006-136271
(P2006-136271A)
(43)公開日　平成18年6月1日(2006.6.1)

(51)Int.Cl.		F I		テーマコード（参考）
C12N 15/09	(2006.01)	C12N 15/00	ZNAA	4B024
C07K 14/435	(2006.01)	C07K 14/435		4B063
C07K 19/00	(2006.01)	C07K 19/00		4B065
C12N 1/15	(2006.01)	C12N 1/15		4H045
C12N 1/19	(2006.01)	C12N 1/19		

審査請求 未請求　請求項の数 12　ＯＬ　（全 19 頁）　最終頁に続く

(21)出願番号　特願2004-330267 (P2004-330267)
(22)出願日　平成16年11月15日 (2004.11.15)

(71)出願人　503359821
独立行政法人理化学研究所
埼玉県和光市広沢２番１号
(74)代理人　110000109
特許業務法人特許事務所サイクス
(72)発明者　永井　健治
埼玉県和光市広沢２番１号　独立行政法人理化学研究所内
(72)発明者　宮脇　敦史
埼玉県和光市広沢２番１号　独立行政法人理化学研究所内

Ｆターム(参考)　4B024 AA11 BA80 CA04 CA07 DA03
EA04 GA13 HA01 HA11
4B063 QA01 QA13 QQ08 QQ79 QR33
QR77 QR80 QS36 QS38 QX02
最終頁に続く

(54)【発明の名称】蛍光蛋白質

(57)【要約】
【課題】　刺激光依存的に蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のアクセプターを出現させることにより、任意の細胞内小器官、細胞又は組織を多色で標識することを可能とする蛍光蛋白質を提供すること。
【解決手段】　ドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との融合蛋白質から成り、刺激光照射前はドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛋白質が蛍光を発することができ、刺激光照射後は、ドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との間で分子内FRETが生じることによりアクセプター蛋白質が蛍光を発することができ、ドナー蛋白質の蛍光とアクセプター蛋白質の蛍光とが互いに異なる波長の蛍光であることを特徴とする、蛍光蛋白質。
【選択図】　なし

【特許請求の範囲】
【請求項１】
ドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との融合蛋白質から成り、刺激光照射前はドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛋白質が蛍光を発することができ、刺激光照射後は、ドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との間で分子内FRETが生じることによりアクセプター蛋白質が蛍光を発することができ、ドナー蛋白質の蛍光とアクセプター蛋白質の蛍光とが互いに異なる波長の蛍光であることを特徴とする、蛍光蛋白質。
【請求項２】
ドナー蛍光蛋白質がＣＦＰ変異体であり、アクセプター蛍光蛋白質がＰＡ－ＧＦＰ変異体である、請求項１に記載の蛍光蛋白質。
【請求項３】
刺激光が紫外光又は紫色光である、請求項１又は２に記載の蛍光蛋白質。
【請求項４】
ドナー蛍光蛋白質が、ＣＦＰのＣ末端の１１アミノ酸を欠失させたＣＦＰ変異体であり、アクセプター蛍光蛋白質が、ＰＡ－ＧＦＰのＮ末端の３アミノ酸を欠失させたＰＡ－ＧＦＰ変異体である、請求項１から３の何れかに記載の蛍光蛋白質。
【請求項５】
ドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質とがリンカー配列を介して融合している、請求項１から４の何れかに記載の蛍光蛋白質。
【請求項６】
以下の何れかのアミノ酸配列を有する、請求項１から５の何れかに記載の蛍光蛋白質。
（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列；又は、
（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列：
【請求項７】
請求項６に記載の蛍光蛋白質をコードするＤＮＡ。
【請求項８】
請求項７に記載のＤＮＡを有する組み換えベクター。
【請求項９】
請求項６に記載のＤＮＡ又は請求項７に記載の組み換えベクターを有する形質転換体。
【請求項１０】
請求項１から６に記載の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質。
【請求項１１】
請求項１０に記載の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法。
【請求項１２】
請求項１から６の何れかに記載の蛍光蛋白質、請求項７に記載のＤＮＡ、請求項８に記載の組み換えベクター、請求項９に記載の形質転換体、又は請求項１０に記載の融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キット。
【発明の詳細な説明】
【技術分野】
【０００１】
本発明は、新規な蛍光蛋白質に関する。より詳細には、本発明は、光照射依存的な蛍光エネルギー移動を利用した波長変換型の蛍光蛋白質及びその利用に関する。
【背景技術】
【０００２】
クラゲのエクオレア・ビクトリア（Aequorea victoria）に由来する緑色蛍光蛋白質（ＧＦＰ）は、生物系において多くの用途を有する。最近、ランダム突然変異誘発法および半合理的(semi-rational)突然変異誘発法に基づいて、色を変化させたり、折りたたみ特

性を改善したり、輝度を高めたり、あるいはｐＨ感受性を改変したといった様々なＧＦＰ変異体が作製されている。遺伝子組み換え技術により他の蛋白質をＧＦＰ等の蛍光蛋白質に融合させて、それらの発現および輸送のモニタリングを行うことが行われている。

【０００３】

最もよく使用されるＧＦＰ変異体の一つとして黄色蛍光蛋白質（ＹＦＰ）が挙げられる。ＹＦＰは、クラゲ（Aequorea）ＧＦＰ変異体の中でも最長波長の蛍光を示す。大部分のＹＦＰのεおよびΦは、それぞれ60,000～100,000$M^{-1}cm^{-1}$および0.6～0.8であり（Tsien, R. Y. (1998). Ann. Rev. Biochem. 67, 509-544）、これらの値は、一般的な蛍光団（フルオレセインおよびローダミンなど）の値に匹敵する。また、ＧＦＰ変異体の他の例として、シアン蛍光蛋白質（ＣＦＰ）があり、ＥＣＦＰ（enhanced cyan fluorescent protein)が知られている。また、イソギンチャク（Discoma sp.）からは赤色蛍光蛋白質（ＲＦＰ）も単離されており、DasRedが知られている。このように蛍光蛋白質は、緑色、黄色、シアン色、赤色の４種が次々と開発されスペクトルの範囲は大幅に広がっている。

【０００４】

また、光照射によって色が変化する蛍光蛋白質を利用することにより、光によって特定の細胞や器官をマーキング（optical marking）することが可能となる。このような光照射依存的な細胞や組織などの標識については、ＰＡ－ＧＦＰ（非特許文献１）やkaede（非特許文献２）の利用が挙げられる。しかしながら、ＰＡ－ＧＦＰは無蛍光の状態から蛍光が出現するという特徴ゆえに刺激光照射前はどこに標本があるのか分かりづらいという問題がある。また、kaedeは刺激光照射により緑から赤に変換するが、双方の色に応じた励起光が必要となり煩雑であり、さらにkaedeは４量体を形成するため任意のタンパク質と連結させたものの動態観察には向いていなかった。

【０００５】

【非特許文献１】Patterson GH and Lippincott-Schwartz J, Science 297, 1873-1877 (2002)

【非特許文献２】Ando R et al, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99, 12651-12656 (2002)

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【０００６】

本発明は、刺激光依存的に蛍光共鳴エネルギー移動（ＦＲＥＴ）のアクセプターを出現させることにより、任意の細胞内小器官、細胞又は組織を多色で標識することを可能とする蛍光蛋白質を提供することを解決すべき課題とした。

【課題を解決するための手段】

【０００７】

本発明者らは上記課題を解決するために鋭意検討した結果、互いに異なる波長の蛍光を発することができるドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質とを融合し、光刺激前はドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛋白質が蛍光を発することができ、光刺激後は、ドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との間で分子内FRETが生じてアクセプター蛋白質が蛍光を発することができる蛍光蛋白質を構築することにより、刺激光依存的に蛍光タンパク質の蛍光スペクトルを変化させることができることを見出した。本発明はこれらの知見に基づいて完成したものである。

【０００８】

即ち、本発明によれば、ドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との融合蛋白質から成り、刺激光照射前はドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛋白質が蛍光を発することができ、刺激光照射後は、ドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との間で分子内FRETが生じることによりアクセプター蛋白質が蛍光を発することができ、ドナー蛋白質の蛍光とアクセプター蛋白質の蛍光とが互いに異なる波長の蛍光であることを特徴とする、蛍光蛋白質が提供される。

【０００９】

好ましくは、ドナー蛍光蛋白質はＣＦＰ変異体であり、アクセプター蛍光蛋白質がＰＡ－ＧＦＰ変異体である。

好ましくは、刺激光は紫外光又は紫色光である。

好ましくは、ドナー蛍光蛋白質は、ＣＦＰのＣ末端の１１アミノ酸を欠失させたＣＦＰ変異体であり、アクセプター蛍光蛋白質は、ＰＡ－ＧＦＰのＮ末端の３アミノ酸を欠失させたＰＡ－ＧＦＰ変異体である。

好ましくは、ドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質とはリンカー配列を介して融合している。

【００１０】

好ましくは、本発明の蛍光蛋白質は、以下の何れかのアミノ酸配列を有する。

（ａ）配列番号２に記載のアミノ酸配列；又は、

（ｂ）配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列：

【００１１】

本発明の別の側面によれば、上記した本発明の蛍光蛋白質をコードするＤＮＡが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のＤＮＡを有する組み換えベクターが提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明のＤＮＡ又は組み換えベクターを有する形質転換体が提供される。

【００１２】

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質とから成る融合蛍光蛋白質が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させることを特徴とする、細胞内における蛋白質の局在または動態を分析する方法が提供される。

本発明のさらに別の側面によれば、上記した本発明の蛍光蛋白質、ＤＮＡ、組み換えベクター、形質転換体、又は融合蛍光蛋白質を含む、蛍光試薬キットが提供される。

【発明の効果】

【００１３】

本発明により、刺激光照射前の標本の確認が簡便になったのみならず、１つの励起光で観察が可能になった。また多量体を形成しないため、任意のタンパク質と連結させることにより動態解析もより定量的に行えるようになった。

【発明を実施するための最良の形態】

【００１４】

以下、本発明の実施の形態について詳細に説明する。

（１）本発明の蛍光蛋白質

本発明の蛍光蛋白質は、ドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との融合蛋白質から成り、刺激光照射前はドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛋白質が蛍光を発することができ、刺激光照射後は、ドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との間で分子内FRETが生じることによりアクセプター蛋白質が蛍光を発することができ、ドナー蛋白質の蛍光とアクセプター蛋白質の蛍光とが互いに異なる波長の蛍光であることを特徴とする蛍光蛋白質である。

【００１５】

本発明で用いるドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質の組み合わせは、上記した本発明の蛍光蛋白質の作用効果を達成できるものであれば特に限定されない。ドナー蛍光蛋白質及びアクセプター蛍光蛋白質としては、例えば、シアン蛍光蛋白質（ＣＦＰ）、黄色蛍光蛋白質（ＹＥＰ）、緑色蛋白質（ＧＦＰ）、赤色蛍光蛋白質（ＲＥＰ）、青色蛍光蛋白質（ＢＦＰ）又はそれらの変異体などが使用できる。

【００１６】

本明細書で言う、シアン蛍光蛋白質、黄色蛍光蛋白質、緑色蛋白質、赤色蛍光蛋白質、青色蛍光蛋白質又はそれらの変異体とは、各々公知の蛍光蛋白質だけでなく、それらの変異体（例えば、上記蛍光蛋白質の蛍光強度を増強した、ＥＣＦＰ、ＥＹＦＰ、ＥＧＦＰ、ＥＲＦＰ、ＥＢＦＰなど）の全てを包含する意味である。例えば、緑色蛍光蛋白質の遺伝子は単離され配列も決定されている(Prasher, D.C. ら(1992), "Primary structure of the Aequorea victoria green fluorescent protein", Gene 111：229－233)。その他の蛍光蛋白質又はその変異体のアミノ酸配列も多数報告されており、例えば、Roger Y.Tsien, Annu.Rev.Biochem.1998. 67:509-44、並びにその引用文献に記載されている。緑色蛍光蛋白質（ＧＦＰ）、黄色蛍光蛋白質（ＹＦＰ）またはそれらの変異体としては、例えば、オワンクラゲ（例えば、エクオレア・ビクトリア（Aequorea victoria））由来のものを使用できる。

【００１７】

本発明で用いる蛍光蛋白質をコードする遺伝子の塩基配列などは公知である。蛍光蛋白質をコードする遺伝子は市販のものを使用することもできる。例えば、クロンテック社から市販されている、ＥＧＦＰベクター、ＥＹＦＰベクター、ＥＣＦＰベクター、ＥＢＦＰベクターなどを用いることができる。

【００１８】

本発明で用いることができる蛍光ドナー／蛍光アクセプターの組み合わせとしては、ＣＦＰ又はその変異体／ＧＦＰ又はその変異体、又はＢＦＰ又はその変異体／ＧＦＰ又はその変異体などが挙げられるが、これらに限定されるものではない。好ましくは、ドナー蛍光蛋白質はＣＦＰ変異体であり、アクセプター蛍光蛋白質はＰＡ－ＧＦＰ変異体である。

【００１９】

本発明の実施例では、ＣＦＰとＰＡ－ＧＦＰをそれぞれＦＲＥＴのドナー及びアクセプターとして利用することにより、刺激光依存的にシアン色から緑黄色に変換する蛋白質（Phamret）を作製することに成功した。具体的には、ドナー蛍光蛋白質として、ＣＦＰのＣ末端の１１アミノ酸を欠失させたＣＦＰ変異体を使用し、アクセプター蛍光蛋白質として、ＰＡ－ＧＦＰのＮ末端の３アミノ酸を欠失させたＰＡ－ＧＦＰ変異体を使用した。

【００２０】

本発明の蛍光蛋白質では、刺激光照射前はドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛋白質が蛍光を発し、刺激光照射後は、ドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との間で分子内FRETが生じることによりアクセプター蛋白質が蛍光を発する。ここで用いる刺激光は、好ましくは、紫外光又は紫色光である。紫外光又は紫色光の照射時間は特に限定されないが、例えば数ミリ秒から１０分間程度行うことができる。

【００２１】

また、ドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質とがリンカー配列を介して融合していてもよい。リンカー配列としては数個（例えば１～５個程度）のアミノ酸配列が挙げられる。

【００２２】

本発明の蛍光蛋白質の具体例としては、

（１）　配列番号２に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質、又は

（２）　配列番号２に記載のアミノ酸配列において１から数個のアミノ酸の欠失、置換及び／又は付加を有するアミノ酸配列を有し、かつドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との融合蛋白質から成り、刺激光照射前はドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛋白質が蛍光を発することができ、刺激光照射後は、ドナー蛋白質の励起光を照射することによりドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との間で分子内FRETが生じることによりアクセプター蛋白質が蛍光を発することができ、ドナー蛋白質の蛍光とアクセプター蛋白質の蛍光とが互いに異なる波長の蛍光であることを特徴とする蛍光蛋白質

が挙げられる。

【００２３】

本明細書で言う「１から数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加を有するアミノ酸配列」における「１から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、１から２０個、好ましくは１から１０個、より好ましくは１から７個、さらに好ましくは１から５個、特に好ましくは１から３個程度を意味する。

【００２４】

上記した配列番号２に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質（Phamret）の場合は、ドナー蛍光蛋白質として、ＣＦＰのＣ末端の１１アミノ酸を欠失させたＣＦＰ変異体を使用し、アクセプター蛍光蛋白質として、ＰＡ－ＧＦＰのＮ末端の３アミノ酸を欠失させたＰＡ－ＧＦＰ変異体を使用している。そして、刺激光（４００ｎｍ）照射前はドナー蛋白質の励起光（４５８ｎｍ）を照射することによりドナー蛋白質が蛍光（４８０ｎｍ）を発することができ、刺激光（４００ｎｍ）照射後は、ドナー蛋白質の励起光（４５８ｎｍ）を照射することによりドナー蛍光蛋白質とアクセプター蛍光蛋白質との間で分子内FRETが生じることによりアクセプター蛋白質が蛍光（５２０ｎｍ）を発することができる。

【００２５】

本発明の蛍光蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

【００２６】

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず蛍光蛋白質をコードするＤＮＡを入手することが必要である。ドナー蛍光蛋白質およびアクセプター蛍光蛋白質として使用する各種の蛍光蛋白質のアミノ酸配列及び塩基配列は当業者に公知で、これらをコードするＤＮＡは市販品から入手することが可能であるか、またはＰＣＲ等の通常の遺伝子組み換え手法によりクローニングすることができる。このようにして入手したドナー蛍光蛋白質およびアクセプター蛍光蛋白質をコードするＤＮＡを順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、本発明の蛍光蛋白質をコードするＤＮＡを構築することができる。このＤＮＡを適当な発現系に導入することにより、本発明の蛍光蛋白質を産生することができる。発現系での発現については本明細書中後記する。

【００２７】

（２）本発明のＤＮＡ

本発明によれば、本発明の蛍光蛋白質をコードするＤＮＡが提供される。

配列番号２に記載のアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質をコードするＤＮＡとしては、配列番号１に記載の塩基配列を有するＤＮＡが挙げられる。また、配列番号１に記載の塩基配列において、１から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列を有するＤＮＡであって、本明細書中上記した特徴を有する本発明の蛍光蛋白質をコードするＤＮＡも、本発明の範囲内に含まれる。

【００２８】

本明細書で言う「１から数個の塩基の欠失、置換及び／又は付加を有する塩基配列」における「１から数個」の範囲は特には限定されないが、例えば、１から５０個、好ましくは１から３０個、より好ましくは１から２０個、さらに好ましくは１から１０個、特に好ましくは１から５個程度を意味する。

【００２９】

本発明のＤＮＡは、例えばホスホアミダイト法などにより合成することができるし、特異的プライマーを用いたポリメラーゼ連鎖反応（ＰＣＲ）によって製造することもできる。本発明のＤＮＡ又はその断片の作製方法については、本明細書中上述した通りである。

【００３０】

また、所定の核酸配列に所望の変異を導入する方法は当業者に公知である。例えば、部位特異的変異誘発法、縮重オリゴヌクレオチドを用いるＰＣＲ、核酸を含む細胞の変異誘発剤又は放射線への露出等の公知の技術を適宜使用することによって、変異を有するＤＮＡを構築することができる。このような公知の技術は、例えば、Molecular Cloning: A laboratory Mannual, 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N Y.,1989、並びにCurrent Protocols in Molecular Biology, Supplement 1～38, John Wi

ley & Sons (1987-1997)に記載されている。

【００３１】

（３）本発明の組み換えベクター

本発明のＤＮＡは適当なベクター中に挿入して使用することができる。本発明で用いるベクターの種類は特に限定されず、例えば、自立的に複製するベクター（例えばプラスミド等）でもよいし、あるいは、宿主細胞に導入された際に宿主細胞のゲノムに組み込まれ、組み込まれた染色体と共に複製されるものであってもよい。

【００３２】

好ましくは、本発明で用いるベクターは発現ベクターである。発現ベクターにおいて本発明のＤＮＡは、転写に必要な要素（例えば、プロモータ等）が機能的に連結されている。プロモータは宿主細胞において転写活性を示すＤＮＡ配列であり、宿主の種類に応じて適宜することができる。

【００３３】

細菌細胞で作動可能なプロモータとしては、バチルス・ステアロテルモフィルス・マルトジェニック・アミラーゼ遺伝子(Bacillusstearothermophilus maltogenic amylase gene)、バチルス・リケニホルミスαアミラーゼ遺伝子(Bacillus licheniformis alpha-amylase gene)、バチルス・アミロリケファチエンス・BANアミラーゼ遺伝子(Bacillus amyloliquefaciens BAN amylase gene)、バチルス・サブチリス・アルカリプロテアーゼ遺伝子(Bacillus Ｓubtilis alkaline protease gene)もしくはバチルス・プミルス・キシロシダーゼ遺伝子(Bacillus pumilus xylosldase gene)のプロモータ、またはファージ・ラムダのP_R若しくはP_Lプロモータ、大腸菌の lac、trp若しくはtacプロモータなどが挙げられる。

【００３４】

哺乳動物細胞で作動可能なプロモータの例としては、ＳＶ４０プロモータ、ＭＴ－１（メタロチオネイン遺伝子）プロモータ、またはアデノウイルス２主後期プロモータなどがある。昆虫細胞で作動可能なプロモータの例としては、ポリヘドリンプロモータ、Ｐ１０プロモータ、オートグラファ・カリホルニカ・ポリヘドロシス塩基性蛋白プロモータ、バキュウロウイルス即時型初期遺伝子１プロモータ、またはバキュウロウイルス３９Ｋ遅延型初期遺伝子プロモータ等がある。酵母宿主細胞で作動可能なプロモータの例としては、酵母解糖系遺伝子由来のプロモータ、アルコールデヒドロゲナーゼ遺伝子プロモータ、ＴＰＩ１プロモータ、ＡＤＨ2-4cプロモータなどが挙げられる。

糸状菌細胞で作動可能なプロモータの例としては、ＡＤＨ３プロモータまたはｔｐｉＡプロモータなどがある。

【００３５】

また、本発明のＤＮＡは必要に応じて、例えばヒト成長ホルモンターミネータまたは真菌宿主についてはＴＰＩ１ターミネータ若しくはＡＤＨ３ターミネータのような適切なターミネータに機能的に結合されてもよい。本発明の組み換えベクターは更に、ポリアデニレーションシグナル(例えばＳＶ４０またはアデノウイルス５Ｅ１ｂ領域由来のもの)、転写エンハンサ配列（例えばＳＶ４０エンハンサ）および翻訳エンハンサ配列（例えばアデノウイルス ＶＡ ＲＮＡ をコードするもの）のような要素を有していてもよい。

【００３６】

本発明の組み換えベクターは更に、該ベクターが宿主細胞内で複製することを可能にするＤＮＡ配列を具備してもよく、その一例としてはＳＶ４０複製起点（宿主細胞が哺乳類細胞のとき）が挙げられる。

【００３７】

本発明の組み換えベクターはさらに選択マーカーを含有してもよい。選択マーカーとしては、例えば、ジヒドロ葉酸レダクターゼ（ＤＨＦＲ）またはシゾサッカロマイセス・ポンベＴＰＩ遺伝子等のようなその補体が宿主細胞に欠けている遺伝子、または例えばアンピシリン、カナマイシン、テトラサイクリン、クロラムフェニコール、ネオマイシン若しくはヒグロマイシンのような薬剤耐性遺伝子を挙げることができる。

【００３８】
本発明のＤＮＡ、プロモータ、および所望によりターミネータおよび／または分泌シグナル配列をそれぞれ連結し、これらを適切なベクターに挿入する方法は当業者に周知である。
【００３９】
（４）本発明の形質転換体
本発明のＤＮＡ又は組み換えベクターを適当な宿主に導入することによって形質転換体を作製することができる。
本発明のＤＮＡまたは組み換えベクターを導入される宿主細胞は、本発明のＤＮＡ構築物を発現できれば任意の細胞でよく、細菌、酵母、真菌および高等真核細胞等が挙げられる。
【００４０】
細菌細胞の例としては、バチルスまたはストレプトマイセス等のグラム陽性菌又は大腸菌等のグラム陰性菌が挙げられる。これら細菌の形質転換は、プロトプラスト法、または公知の方法でコンピテント細胞を用いることにより行えばよい。
【００４１】
哺乳類細胞の例としては、ＨＥＫ２９３細胞、ＨｅＬａ細胞、ＣＯＳ細胞、ＢＨＫ細胞、ＣＨＬ細胞またはＣＨＯ細胞等が挙げられる。哺乳類細胞を形質転換し、該細胞に導入されたＤＮＡ配列を発現させる方法も公知であり、例えば、エレクトロポーレーション法、リン酸カルシウム法、リポフェクション法等を用いることができる。
【００４２】
酵母細胞の例としては、サッカロマイセスまたはシゾサッカロマイセスに属する細胞が挙げられ、例えば、サッカロマイセス・セレビシエ(Saccharomyces cerevislae)またはサッカロマイセス・クルイベリ(Ｓaccharomyces kluyveri)等が挙げられる。酵母宿主への組み換えベクターの導入方法としては、例えば、エレクトロポレーション法、スフェロブラスト法、酢酸リチウム法等を挙げることができる。
【００４３】
他の真菌細胞の例は、糸状菌、例えばアスペルギルス、ニューロスポラ、フザリウム、またはトリコデルマに属する細胞である。宿主細胞として糸状菌を用いる場合、ＤＮＡ構築物を宿主染色体に組み込んで組換え宿主細胞を得ることにより形質転換を行うことができる。ＤＮＡ構築物の宿主染色体への組み込みは、公知の方法に従い、例えば相同組換えまたは異種組換えにより行うことができる。
【００４４】
昆虫細胞を宿主として用いる場合には、組換え遺伝子導入ベクターおよびバキュロウイルスを昆虫細胞に共導入して昆虫細胞培養上清中に組換えウイルスを得た後、さらに組換えウイルスを昆虫細胞に感染させ、蛋白質を発現させることができる（例えば、Baculovirus Expression Vectors, A Laboratory Manual；及びカレント・プロトコールズ・イン・モレキュラー・バイオロジー、Bio/Technology, 6, 47(1988)等に記載）。
【００４５】
バキュロウイルスとしては、例えば、ヨトウガ科昆虫に感染するウイルスであるアウトグラファ・カリフォルニカ・ヌクレアー・ポリヘドロシス・ウイルス(Autographa californica nuclear polyhedrosis virus)等を用いることができる。
【００４６】
昆虫細胞としては、Spodoptera frugiperdaの卵巣細胞であるＳｆ９、Ｓｆ２１〔バキュロウイルス・エクスプレッション・ベクターズ、ア・ラボラトリー・マニュアル、ダブリュー・エイチ・フリーマン・アンド・カンパニー(W. H. Freeman and Company)、ニューヨーク(New York)、(1992)〕、Trichoplusia niの卵巣細胞であるＨｉＦｉｖｅ(インビトロジェン社製)等を用いることができる。
【００４７】
組換えウイルスを調製するための、昆虫細胞への組換え遺伝子導入ベクターと上記バキ

ュロウイルスの共導入方法としては、例えば、リン酸カルシウム法又はリポフェクション法等を挙げることができる。

【００４８】

上記の形質転換体は、導入されたＤＮＡ構築物の発現を可能にする条件下で適切な栄養培地中で培養する。形質転換体の培養物から、本発明の蛍光融合蛋白質を単離精製するには、通常の蛋白質の単離、精製法を用いればよい。

【００４９】

例えば、本発明の蛋白質が、細胞内に溶解状態で発現した場合には、培養終了後、細胞を遠心分離により回収し水系緩衝液に懸濁後、超音波破砕機等により細胞を破砕し、無細胞抽出液を得る。該無細胞抽出液を遠心分離することにより得られた上清から、通常の蛋白質の単離精製法、即ち、溶媒抽出法、硫安等による塩析法、脱塩法、有機溶媒による沈殿法、ジエチルアミノエチル(DEAE)セファロース等のレジンを用いた陰イオン交換クロマトグラフィー法、S-Sepharose FF(ファルマシア社製)等のレジンを用いた陽イオン交換クロマトグラフィー法、ブチルセファロース、フェニルセファロース等のレジンを用いた疎水性クロマトグラフィー法、分子篩を用いたゲルろ過法、アフィニティークロマトグラフィ一法、クロマトフォーカシング法、等電点電気泳動等の電気泳動法等の手法を単独あるいは組み合わせて用い、精製標品を得ることができる。

【００５０】

（５）本発明の蛍光蛋白質及びそれを含む融合蛋白質の利用

本発明の蛍光蛋白質を他の蛋白質と融合させることにより、融合蛋白質を構築することができる。

本発明の融合蛋白質の取得方法については特に制限はなく、化学合成により合成した蛋白質でもよいし、遺伝子組み換え技術による作製した組み換え蛋白質でもよい。

【００５１】

組み換え蛋白質を作製する場合には、先ず当該蛋白質をコードするＤＮＡを入手することが必要である。本明細書中上記した方法により、本発明の蛍光蛋白質をコードするＤＮＡを入手することができる。また同様に、融合すべき蛋白質をコードするＤＮＡ断片も入手する。次いで、これらのＤＮＡ断片を順番に遺伝子組み換え技術により連結することにより、所望の融合蛋白質をコードするＤＮＡを得ることができる。このＤＮＡを適当な発現系に導入することにより、本発明の融合蛋白質を産生することができる。

【００５２】

本発明の蛍光蛋白質は、特に、標識としての利用価値が高い。即ち、本発明の蛍光蛋白質を被検アミノ酸配列との融合蛋白質として精製し、マイクロインジェクション法などの手法により細胞内に導入し、該融合蛋白質の分布を経時的に観察すれば、被検アミノ酸配列の細胞内におけるターゲッティング活性を検出することが可能である。

【００５３】

本発明の蛍光蛋白質を融合させる他の蛋白質（被検アミノ酸配列）の種類は特に限定されるものではないが、例えば、細胞内に局在する蛋白質、細胞内小器官に特異的な蛋白質、ターゲティングシグナル（例えば、核移行シグナル、ミトコンドリアプレ配列）等が好適である。なお、本発明の蛍光蛋白質は、マイクロインジェクション法などにより細胞内に導入する以外に、細胞内で発現させて用いることも可能である。この場合には、本発明の蛍光蛋白質をコードするＤＮＡが発現可能に挿入されたベクターが宿主細胞に導入される。

【００５４】

また、本発明の蛍光蛋白質は、レポーター蛋白質としてプロモーター活性の測定に用いることも可能である。即ち、被検プロモーターの下流に、本発明の蛍光蛋白質をコードするＤＮＡが配置されたベクターを構築し、これを宿主細胞に導入し、該細胞から発せられる本発明の蛍光蛋白質の蛍光を検出することにより、被検プロモーターの活性を測定することが可能である。被検プロモーターとしては、宿主細胞内で機能するものであれば、特に制限はない。

【００５５】
上記被検アミノ酸配列のターゲティング活性の検出やプロモーター活性の測定において用いられるベクターとしては、特に制限はないが、例えば、動物細胞用ベクターでは、「pNEO」（P. Southern, and P. Berg (1982) J. MOl. Appl. Genet. 1:327）、「pCAGGS」（H.Niwa,K.Yamamura,and J.Miyazaki. Gene 108,193-200(1991)）、「pRc/CMV」（インビトロゲン社製）、「pCDM8」（インビトロゲン社製）などが、酵母用ベクターでは、「pRS303」,「pRS304」,「pRS305」,「pRS306」,「pRS313」,「pRS314」,「pRS315」,[pRS316]（R.S.Sikorski and P.Hieter (1989) Genetics 122: 19-27）、「pRS423」,「pRS424」,「pRS425」,「pRS426」（T.W.Christianson, R.S.Sikorski, M.Dante, J.H.Shero, and P. Hieter (1992) Gene 110: 119-122）などが好適に用いられる。

【００５６】
また、使用可能な細胞の種類も特に限定されず、各種の動物細胞、例えば、L細胞、BalbC-3T3細胞、NIH3T3細胞、CHO(Chinese hamster ovary)細胞、HeLa細胞、NRK(normal rat kidney)細胞、「Saccharomyces cerevisiae」などの酵母細胞や大腸菌（E. coli）細胞などを使用することができる。ベクターの宿主細胞への導入は、例えば、リン酸カルシウム法やエレクトロポレーション法などの常法により行うことができる。

【００５７】
上記のようにして得た、本発明の蛍光蛋白質と他の蛋白質（蛋白質Ｘとする）とを融合させた融合蛍光蛋白質を細胞内で発現させ、発する蛍光をモニターすることにより、細胞内における蛋白質Ｘの局在や動態を分析することが可能になる。即ち、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするＤＮＡで形質転換またはトランスフェクトした細胞を蛍光顕微鏡で観察することにより細胞内における蛋白質Ｘの局在や動態を可視化して分析することができる。

【００５８】
例えば、蛋白質Ｘとして細胞内オルガネラに特異的な蛋白質を利用することにより、核、ミトコンドリア、小胞体、ゴルジ体、分泌小胞、ペルオキソームなどの分布や動きを観察できる。
また、例えば、神経細胞の軸索、樹状突起などは発生途中の個体の中で著しく複雑な走向の変化を示すので、こういった部位を蛍光ラベルすることにより動的解析が可能になる。

【００５９】
本発明の蛍光蛋白質の蛍光は、生細胞のまま検出することが可能である。この検出は、例えば、蛍光顕微鏡（カールツァイス社 アキシオフォト フィルターセット09）や画像解析装置（ATTO デジタルイメージアナライザー）などを用いて行うことが可能である。

【００６０】
顕微鏡の種類は目的に応じて適宜選択できる。経時変化を追跡するなど頻回の観察を必要とする場合には、通常の落射型蛍光顕微鏡が好ましい。細胞内の詳細な局在を追及したい場合など、解像度を重視する場合は、共焦点レーザー顕微鏡の方が好ましい。顕微鏡システムとしては、細胞の生理状態を保ち、コンタミネーションを防止する観点から、倒立型顕微鏡が好ましい。正立顕微鏡を使用する場合、高倍率レンズを用いる際には水浸レンズを用いることができる。フィルターセットは蛍光蛋白質の蛍光波長に応じて適切なものを選択できる。また、蛍光顕微鏡を用いた生細胞での経時観察を行う場合には、短時間で撮影を行うべきなので、高感度冷却ＣＣＤカメラを使用する。冷却ＣＣＤカメラは、ＣＣＤを冷却することにより熱雑音を下げ、微弱な蛍光像を短時間露光で鮮明に撮影することができる。

【００６１】
（６）本発明のキット
本発明によれば、本明細書に記載した蛋白質、融合蛋白質、ＤＮＡ、組み換えベクター又は形質転換体から選択される少なくとも1種以上を含むことを特徴とする、細胞内成分の局在の分析及び／又は生理活性物質の分析のためのキットが提供される。本発明のキッ

トは、それ自体既知の通常用いられる材料及び手法で調製することができる。

【００６２】

蛍光蛋白質又はＤＮＡなどの試薬は、適当な溶媒に溶解することにより保存に適した形態に調製することができる。溶媒としては、水、エタノール、各種緩衝液などを用いることができる。

以下の実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明は実施例によって限定されるものではない。

【実施例】

【００６３】

実施例１：Phamretの遺伝子構築

先ず、pEGFP-N1（クロンテック）及びpECFP-N1（クロンテック）を鋳型に、5'-ATTGGATCCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'（配列番号３）と、5'-GCAGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'（配列番号４）をプライマーに用いてＰＣＲを行い、ＰＣＲ産物を制限酵素BamHIとEcoRIで切断し、pRSETBのBamHI-EcoRIサイトに挿入して、それぞれEGFP/pRSETB、ECFP/pRSETBを構築した。

次に、文献(Patterson and Lippincott-Schwartz Science 297, 1873-1877, 2002)を参考にしてEGFP遺伝子からPA-GFP遺伝子を構築した。EGFPタンパク質の６４番目のロイシンをフェニルアラニン、６５番目のスレオニンをセリン、２０３番目のスレオニンをヒスチジン、２０６番目のアラニンをリジンに置換するために、EGFP/pRSETBを鋳型に以下の3つのプライマーを用い、文献(Sawano and Miyawaki Nucleic Acids Res. 28:E78, 2000)に記載の方法により変異導入を行った。

【００６４】

5'-GTGACCACCTTCAGCTACGGCGTG-3'（配列番号５）
5'-TACCTGAGCCACCAGTCCGCC-3'（配列番号６）
5'-TACCAGTCCAAGCTGAGCAAA-3'（配列番号７）

【００６５】

次に、ECFPタンパク質の成熟効率を向上させ、かつ多量体形成を防ぐために７２番目のセリンをアラニン、１７５番目のセリンをグリシンに、２０６番目のアラニンをリジンに置換したmSECFPをコードする遺伝子を構築した。方法は上記と同様で、ECFP/pRSETBを鋳型として以下のプライマーを用いて変異を導入した。

5'-CAGTGCTTCGCCCGCTACCCC-3'（配列番号８）
5'-GAGGACGGCGGCGTGCAGCTC-3'（配列番号９）
5'-CACCAGTCCAAGCTGAGCAAA-3'（配列番号１０）

【００６６】

次に、mSECFP/pRSETBを鋳型に、5'-ATTGGATCCCACCATGGTGAGCAAGGGCGAG-3'（配列番号３），5'-CGGGGTACCGGCGGCGGTCACGAACTCCAG-3'（配列番号１１）をプライマーに用いてPCRを行い、PCR産物を制限酵素BamHIとKpnIで切断し、PRSETBのBamHI-KpnIサイトに挿入した（mSEGFPdC11/pRSETB）。次いで、PA-GFP/pRSETBを鋳型に、5'-CGGGGTACCAAGGGCGAGGAGCTGTTCACC-3'（配列番号１２），5'-GCAGAATTCTTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'（配列番号４）をプライマーに用いてPCRを行い、PCR産物を制限酵素KpnIとEcoRIで切断し、mSEGFPdC11/pRSETBのKpnI-EcoRIサイトに挿入してPhamret/pRSETBを構築した。本発明の蛍光蛋白質Phamretの塩基配列を配列表の配列番号１に示し、アミノ酸配列を配列表の配列番号２に示す。

【００６７】

哺乳類細胞でPhamretを発現させるためにPhamret/pRSETBをBamHIとEcoRIで切断して、pcDNA3のBamHI-EcoRIサイトに挿入し、Phamret/pcDNA3を構築した。Phamretの構造を図１に示す。

【００６８】

実施例２：Phamretを安定発現する哺乳類培養細胞の作成

35mmプラスチック皿上で培養されている$1x10^5$個のHeLaS3細胞にリポフェクション法に

より1μgのPhamret/pcDNA3をトランスフェクションした。24時間後トリプシン処理により分散させ、10cmプラスチック皿に撒きなおした。さらに２４時間後500μg/mlのジェネティシンを加えた。２週間後、蛍光性の細胞コロニーをピックアップし35mmプラスチック皿に撒き、増殖させた後-80℃に凍結保存した。保存にはセルバンカーを使用した。

【００６９】

実施例３：Phamretの紫色光照射による色変換

凍結保存しているPhamret安定発現HeLaS3細胞を融解し、10cmプラスチック皿に撒いた。２日後トリプシン処理により、分散させコラーゲンコートした35mmのガラスボトム皿に$3x10^5$個撒いた。24時間後、培地をHank's balanced salt solutionに置換し、顕微鏡下における色変換実験を行った。顕微鏡にはオリンパス社のFV1000共焦点レーザー顕微鏡を、対物レンズにはPLANApo x60 NA1.2 Waterを使用した。マルチアルゴンレーザーの458nmライン(最大出力3mW)のレーザー光(レーザーパワー2%)でPhamretを励起し、470～500nm(ドナーチャネル)と510～560nm（アクセプターチャネル）の２つの蛍光を同時に取得した。405nmのレーザー光照射前はドナーチャネルの蛍光が強いのに対し(図２Ａ、Ｄ)、405nmのレーザー光(最大出力25mW)を1.2%のレーザーパワーで細胞質(○印１)に照射すると、速やかにPhamretが色変換しアクセプターチャネルの蛍光が強くなった（図２Ｂ、Ｃ）。別の細胞の核領域（○印２）に405nmレーザーを照射すると、核領域のみ色変換が生じアクセプターチャネルの蛍光が強くなった(図２Ｃ、Ｆ)。405nmを細胞質の局所あるいは核の一部領域に照射しているにもかかわらず、細胞質全体または核全体が色変換しているのはPhamretの拡散によるものである。また、色変換したPhamretが核内に進入しない(図２Ｅ)、あるいは核外に流出しない(図２Ｆ)のはPhamretの分子量が60Kdaあり、核膜孔を自由拡散できる最大分子量の50Kdaよりも大きいためである。以上の結果から、Phamretによる細胞内コンパートメントのマーキングが可能であることが証明された。

【００７０】

実施例４：色変換後のPhamret内におけるmSECFPからPA-GFPへのFRET効率

Phamretの405nm光照射による色変換がmSECFPからPA-GFPへのFRETによるものであることを定量的に調べるためにFV1000の波長スキャン機能を利用して色変換前後のスペクトルを測定した。本測定のために、405nmの紫色光を１分以上にわたって細胞に照射することにより完全に色変換を行った。色変換前のスペクトルはmSECFPからの蛍光が優勢であるのに対し(図３の白丸)、色変換後はPA-GFPからの蛍光が優勢になっている(図３の黒丸)。この時mSECFPからの蛍光が減少していることからmSECFPからPA-GFPへのFRETが生じていること、その効率は約90%であることが明らかとなった。

【００７１】

上記の実施例１から４に記載した通り、Phamret（Ｃ末端側11アミノ酸を削ったＣＦＰとＮ末端側3アミノ酸を削ったＰＡ-ＧＦＰをＫｐｎＩサイト（Gly－Thr）を介してタンデムに連結させたタンパク質）においては、刺激光（紫外光又は紫色光）（例えば、400nm）を照射する前は、455～490nm（例えば、458nm）の光励起によりCFPからの発光（480nm）が見られるのに対し、刺激光照射後はPA-GFPが光変換する結果、CFPの励起エネルギーが分子内蛍光共鳴エネルギー移動（分子内FRET）によりPA-GFPに移動し、PA-GFPからの発光（520nm）が見られるようになる（図４）。

【図面の簡単な説明】

【００７２】

【図１】図１は、Phamretの構造模式図を示す。

【図２】図２は、Phamret発現HeLa細胞の光刺激による色変換を示す。

【図３】図３は、Phamretの色変換前後のスペクトルを示す。

【図４】図４は、Phamretの構造及び特徴の模式図を示す。

【配列表フリーテキスト】

【００７３】

SEQUENCE LISTING

<110> RIKEN

<120> Fluorescent proteins
<130> A41842A
<160> 12
<210> 1
<211> 1401
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: recombinant DNA
<400> 1

```
atg gtg agc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg 48
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
  1               5                  10                  15
gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac agg ttc agc gtg tcc ggc 96
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly
             20                  25                  30
gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc 144
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
         35                  40                  45
tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc 192
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
     50                  55                  60
ctg acc tgg ggc gtg cag tgc ttc gcc cgc tac ccc gac cac atg aag 240
Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65                  70                  75                  80
cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag 288
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
                 85                  90                  95
cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag 336
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
            100                 105                 110
gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc 384
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
        115                 120                 125
atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac 432
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
    130                 135                 140
aac tac atc agc cac aac gtc tat atc acc gcc gac aag cag aag aac 480
Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145                 150                 155                 160
ggc atc aag gcc cac ttc aag atc cgc cac aac atc gag gac ggc ggc 528
Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly
                165                 170                 175
gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc 576
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
            180                 185                 190
ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc acc cag tcc aag ctg 624
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu
        195                 200                 205
agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc 672
```

```
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
    210                 215                 220
gtg acc gcc gcc ggt acc aag ggc gag gag ctg ttc acc ggg gtg gtg 720
Val Thr Ala Ala Gly Thr Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
225                 230                 235                 240
ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta aac ggc cac aag ttc agc 768
Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser
                245                 250                 255
gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc tac ggc aag ctg acc ctg 816
Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu
            260                 265                 270
aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc gtg ccc tgg ccc acc ctc 864
Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
        275                 280                 285
gtg acc acc ttc agc tac ggc gtg cag tgc ttc agc cgc tac ccc gac 912
Val Thr Thr Phe Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp
    290                 295                 300
cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc gcc atg ccc gaa ggc tac 960
His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
305                 310                 315                 320
gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac gac ggc aac tac aag acc 1008
Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
                325                 330                 335
cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc ctg gtg aac cgc atc gag 1056
Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
            340                 345                 350
ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc aac atc ctg ggg cac aag 1104
Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
        355                 360                 365
ctg gag tac aac tac aac agc cac aac gtc tat atc atg gcc gac aag 1152
Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys
    370                 375                 380
cag aag aac ggc atc aag gcc aac ttc aag atc cgc cac aac atc gag 1200
Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
385                 390                 395                 400
gac ggc acg gtg cag ctc gcc gac cac tac cag cag aac acc ccc atc 1248
Asp Gly Thr Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
                405                 410                 415
ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac cac tac ctg agc cac cag 1296
Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser His Gln
            420                 425                 430
tcc aag ctg agc aaa gac ccc aac gag aag cgc gat cac atg gtc ctg 1344
Ser Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
        435                 440                 445
ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act ctc ggc atg gac gag ctg 1392
Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
    450                 455                 460
tac aag taa                                                     1401
Tyr Lys
465
```

<210> 2
<211> 466
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: recombinant fused fluorescent protein
<400> 2

```
Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu
  1               5                  10                  15
Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Arg Phe Ser Val Ser Gly
             20                  25                  30
Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile
         35                  40                  45
Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr
     50                  55                  60
Leu Thr Trp Gly Val Gln Cys Phe Ala Arg Tyr Pro Asp His Met Lys
 65                  70                  75                  80
Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu
                 85                  90                  95
Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu
            100                 105                 110
Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly
        115                 120                 125
Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr
    130                 135                 140
Asn Tyr Ile Ser His Asn Val Tyr Ile Thr Ala Asp Lys Gln Lys Asn
145                 150                 155                 160
Gly Ile Lys Ala His Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Gly
                165                 170                 175
Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly
            180                 185                 190
Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Lys Leu
        195                 200                 205
Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe
    210                 215                 220
Val Thr Ala Ala Gly Thr Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val
225                 230                 235                 240
Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser
                245                 250                 255
Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu
            260                 265                 270
Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu
        275                 280                 285
Val Thr Thr Phe Ser Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp
    290                 295                 300
His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr
305                 310                 315                 320
Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr
                325                 330                 335
Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu
```

340 345 350
Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys
355 360 365
Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys
370 375 380
Gln Lys Asn Gly Ile Lys Ala Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu
385 390 395 400
Asp Gly Thr Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile
405 410 415
Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser His Gln
420 425 430
Ser Lys Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu
435 440 445
Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu
450 455 460
Tyr Lys
465

<210> 3
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 3
attggatccc accatggtga gcaagggcga g 31

<210> 4
<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 4
gcagaattct tacttgtaca gctcgtccat g 31

<210> 5
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 5
gtgaccacct tcagctacgg cgtg 24

<210> 6
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 6
tacctgagcc accagtccgc c 21

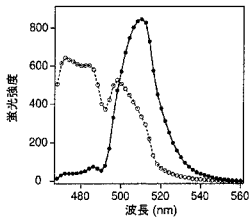
<210> 7

<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 7
taccagtcca agctgagcaa a 21
<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 8
cagtgcttcg cccgctaccc c 21
<210> 9
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 9
gaggacggcg gcgtgcagct c 21
<210> 10
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 10
caccagtcca agctgagcaa a 21
<210> 11
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 11
cggggtaccg gcggcggtca cgaactccag 30
<210> 12
<211> 30
<212> DNA
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: Synthetic DNA
<400> 12
cggggtacca agggcgagga gctgttcacc 30

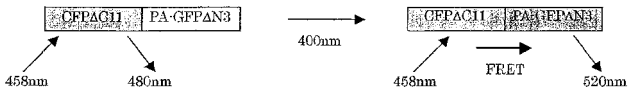
【図１】


MSECFPΔC11
GT
PA-GFPΔN3

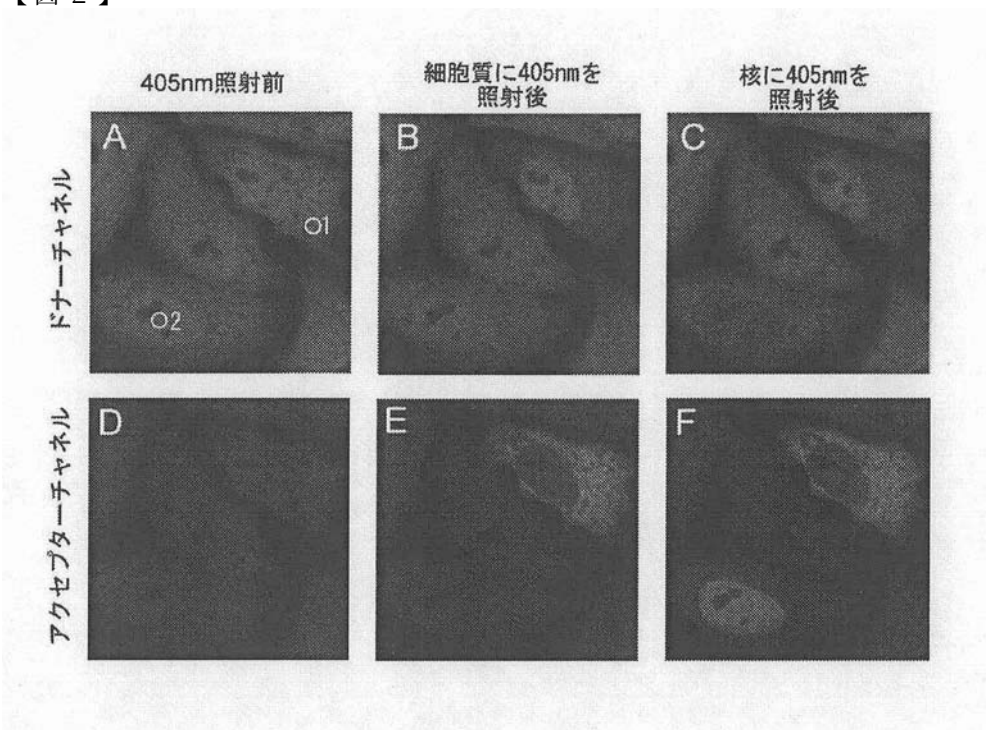
【図３】


蛍光強度
800
600
400
200
0
480
500
520
540
560
波長 (nm)

【図４】


CFPΔC11
PA-GFPΔN3
458nm
480nm
400nm
CFPΔC11
PA-GFPΔN3
458nm
FRET
520nm

【図２】


405nm照射前
細胞質に405nmを照射後
核に405nmを照射後
ドナーチャネル
アクセプターチャネル
A
B
C
D
E
F
O1
O2

フロントページの続き

(51)Int.Cl.			FI			テーマコード（参考）
C12N	***1/21***	***(2006.01)***	C12N	1/21		
C12Q	***1/02***	***(2006.01)***	C12Q	1/02		
G01N	***33/533***	***(2006.01)***	G01N	33/533		
C12N	***5/10***	***(2006.01)***	C12N	5/00	A	

Fターム(参考) 4B065 AA90Y AA93X AB01 AC14 BA02 CA24 CA46
4H045 AA10 AA30 BA10 BA41 CA40 EA50 FA72 FA74