

(12) 特許協力条約に基づいて公開された国際出願

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局

(43) 国際公開日
2016 年 11 月 17 日(17.11.2016)



(10) 国際公開番号

WO 2016/182019 A1

- (51) 国際特許分類:
C07K 14/435 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) G01N 21/64 (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2016/064132
- (22) 国際出願日: 2016 年 5 月 12 日(12.05.2016)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2015-097655 2015 年 5 月 12 日(12.05.2015) JP
- (71) 出願人: 国立大学法人大阪大学(OSAKA UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 Osaka (JP).
- (72) 発明者: 永井健治(NAGAI Takeharu); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 高内大貴(TAKAUCHI Hiroki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 新井由之(ARAI Yoshiyuki); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP). 中野雅

裕(NAKANO Masahiro); 〒5650871 大阪府吹田市山田丘 1 番 1 号 国立大学法人大阪大学内 Osaka (JP).

(74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ(IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満橋 1 丁目 8 番 30 号 OAP タワー 26 階 Osaka (JP).

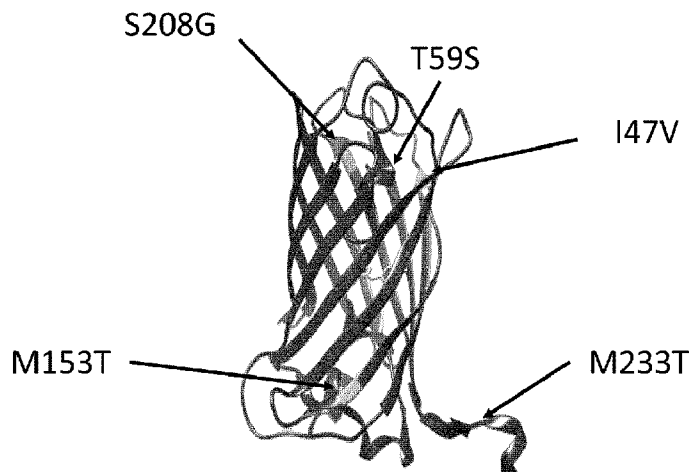
(81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の広域保護が可能): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), ヨーロッパ (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,

[続葉有]

(54) Title: FLUORESCENT PROTEIN

(54) 発明の名称: 蛍光蛋白質



(57) Abstract: Provided is a light switching type fluorescent protein in which the on/off states of the fluorescence and all fluorescence excitation wavelengths are independent, wherein a recovering rate from a non-fluorescent state to a fluorescent state is enhanced due to thermal equilibration. In an embodiment, a fluorescent protein having an amino acid sequence in which at least S208G mutation is introduced into SEQ ID NO: 1 is provided. In another embodiment, a fluorescent protein having an amino acid sequence in which at least three mutations, i.e., I47V, M153T, and S208G are introduced into SEQ ID NO: 1 is provided. In another embodiment, a fluorescent protein having an amino acid sequence in which at least five mutations, i.e., I47V, T59S, M153T, S208G, and M233T are introduced into SEQ ID NO: 1 is provided. In another embodiment, a fluorescent protein having an amino acid sequence in which at least six mutations, i.e., I47V, T59S, M69Q, M153T, S208G, and M233T are introduced into SEQ ID NO: 1 is provided.

(57) 要約:

[続葉有]



WO 2016/182019 A1



ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV,
MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK,
SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ,
GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

添付公開書類:

- 国際調査報告（条約第 21 条(3)）
- 明細書の別個の部分として表した配列リスト（規則 5.2(a)）

蛍光性の on/off 及び蛍光励起波長の全てが独立したタイプの光切替型蛍光蛋白質であって、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が向上した蛍光蛋白質の提供。一実施形態において、配列番号 1 に少なくとも S 2 0 8 G の変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。その他の実施形態において、配列番号 1 に少なくとも I 4 7 V、M 1 5 3 T、及び S 2 0 8 G の 3 つの変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。さらにその他の実施形態において、配列番号 1 に少なくとも I 4 7 V、T 5 9 S、M 1 5 3 T、S 2 0 8 G、及び M 2 3 3 T の 5 つの変異導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。さらにその他の実施形態において、配列番号 1 に少なくとも I 4 7 V、T 5 9 S、M 6 9 Q、M 1 5 3 T、S 2 0 8 G、及び M 2 3 3 T の 6 つの変異導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

明 細 書

発明の名称： 蛍光蛋白質

技術分野

[0001] 本開示は、蛍光蛋白質、該蛋白質のDNA、ベクター、及び形質転換体、並びにそれらを用いたイメージング方法に関する。

背景技術

[0002] 蛍光蛋白質によってライブセルイメージングが簡便に実施可能となり、細胞内の様々な構造や機能が解明されてきている。近年では、可逆的に蛍光性を光切替可能な蛍光蛋白質 (Reversibly Photo-Switchable Fluorescent Protein, RSFP) を利用した超解像法が開発され、光学顕微鏡の回折限界を超えたイメージングが可能となっている。RSFPとしては、例えば、1) 蛍光励起しない特定の波長の光照射によって無蛍光性から蛍光性になり、蛍光励起のための光照射によって蛍光性から無蛍光性になるネガティブ光切替型 (例えば、Dronpa (特許文献1)、rsEGFP)、2) 蛍光励起のための光照射によって無蛍光性から蛍光性になり、蛍光励起しない特定の波長の光照射によって蛍光性から無蛍光性になるポジティブ光切替型 (例えば、Padron (非特許文献1))、及び、3) 蛍光性のon/off及び蛍光励起波長の全てが独立したタイプ (例えば、Dreiklang (非特許文献2)) がある。

先行技術文献

特許文献

[0003] 特許文献1：W02005/113772

非特許文献

[0004] 非特許文献1：Tanja Brakemann et al, J. Biol. Chem. 2010, 285:14603-14609

非特許文献2：Tanja Brakemann et al, Nat Biotechnol. 29 (2011):942-947

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] 前記3)のタイプの光切替型蛍光蛋白質では、Dreiklangが報告されて以降、改変型は報告されていない。DreiklangはPALM (Photo Activated Localization Microscopy) と呼ばれる超解像顕微鏡法や、PALM以外の他の超解像顕微鏡法にも適用可能であるといった長所があるが、光スイッチング速度が遅く、超解像時の時間分解能の遅さが問題となっていた。

[0006] 本開示は、一又は複数の実施形態において、蛍光性のon/off及び蛍光励起波長の全てが独立したタイプの光切替型蛍光蛋白質の改変体を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] 本開示は、一又は複数の実施形態において、配列番号1のアミノ酸配列に少なくともS208Gの変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質に関する。

[0008] 本開示は、その他の一又は複数の実施形態において、配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、M153T、及びS208Gの3つの変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質に関する。

本開示は、その他の一又は複数の実施形態において、配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、T59S、M153T、S208G、及びM233Tの5つの変異導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質に関する。

本開示は、その他の一又は複数の実施形態において、配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、T59S、M69Q、M153T、S208G、及びM233Tの6つの変異導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質に関する。

[0009] 本開示は、その他の一又は複数の実施形態において、本開示に係る蛍光蛋白質を含む融合蛋白質に関する。

[0010] 本開示は、その他の一又は複数の実施形態において、本開示に係る蛍光蛋白質又は融合蛋白質を用いるイメージング方法に関する。

発明の効果

[0011] 本開示によれば、一又は複数の実施形態において、蛍光性のon/off及び蛍

光励起波長の全てが独立したタイプの光切替型蛍光蛋白質であって、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が向上した蛍光蛋白質を提供できる。その他の一又は複数の実施形態において、本開示によれば、蛍光性のon/off及び蛍光励起波長の全てが独立したタイプの光切替型蛍光蛋白質であって、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度がDreiklang（配列番号1）よりも向上した蛍光蛋白質を提供できる。

[0012] 本開示に係る蛍光蛋白質によれば、一又は複数の実施形態において、超解像イメージングにおける空間解像能及び時間解像能を向上できる。

図面の簡単な説明

[0013] [図1]図1は、Dreiklang（配列番号1）、PSFP2（配列番号2）、PSFP3（配列番号3）、及びPSFP4（配列番号4）のアミノ酸配列のアライメントである。

[図2]図2は、PSFP3におけるDreiklangからの5つの変異の箇所を示す図である。

[図3]図3は、PSFP2、PSFP3、PSFP4及びDreiklangについて、光を照射して蛍光性がoffになった後、熱平衡によって蛍光性がon状態になるまでの回復速度を、測定したグラフの一例である。

[図4]図4は、PSFP2、PSFP3、及びDreiklangについて、蛍光性onからoffへの光切替の速さを測定したグラフの一例である。

[図5]図5は、PSFP2、PSFP3、PSFP4及びDreiklangについて、ブリーチングによる蛍光の経時変化を測定したグラフの一例である。

[図6]図6は、PSFP3とDreiklangについて、連続光切替の一例を示すグラフである。

[図7]図7は、PSFP3の融合蛋白質の局在化を観察した一例を示すイメージである。

[図8]図8は、DSSM（Decoupled stochastic switching microscopy）の測定原理を説明する図である。

[図9]図9は、PSFP3を用いたビメンチンの全視野顕微鏡の画像の一例（左）

と超解像顕微鏡観察（DSSM）の画像の一例である（右）。

[図10]図 1 0 は、局在化したPSFP3の融合蛋白質の蛍光の光切替を観察した一例を示すイメージである。

[図11]図 1 1 は、PSFP3の融合蛋白質の局在化を観察したその他の例を示すイメージである。

[図12]図 1 2 は、タイムラプス超解像イメージングの観察スキームの一例の概要を示す図である。

[図13]図 1 3 は、タイムラプス超解像イメージングの観察の一例を示すイメージである。

発明を実施するための形態

[0014] 本開示は、無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なるタイプの光切替型蛍光蛋白質であるDreiklang（配列番号 1）にS208Gの変異を導入する事で、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度（蛍光性が0ffから自発的に0nになる速度）がDreiklangに比べて3倍となり、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度（0nから0ffへの光切替速度）がDreiklangに比べて2倍になる、という知見に基づく。

[0015] 本開示は、また、S208Gの変異に加えてI47VとM153Tの合計3つの変異をDreiklangに導入した蛍光蛋白質（PSFP2）は、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度がDreiklangに比べて3倍となり、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度がDreiklangに比べて2倍になり、さらに、S208Gの単独変異導入時に比べて蛍光状態における輝度が上昇するという知見に基づく。

[0016] 本開示は、さらにまた、前記PSFP2にT59SとM233Tの2つ変異を導入した蛍光蛋白質（すなわち、DreiklangにS208G、I47V、M153T、T59S、及びM233Tの5つ変異を導入した蛍光蛋白質）（PSFP3）は、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度がDreiklangに比べて3.7倍に向上する、という知見に基づく。

[0017] PSFP3における5つの変異の箇所は、Dreiklangにおいて図2に示すような

部位に位置する。これらの変異の箇所はいずれもDreiklangの発色団がある β バレル構造から離れた箇所であり、これらの箇所の変異が、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度の向上、及び、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度の向上をもたらすことは技術常識から予測できない効果といえる。なお、本発明の範囲及び本発明の効果は、上述した又は後述する効果に関する「 $\times$ 倍」という数値に限定して解釈されない。

[0018] 本開示は、さらにまた、前記PSFP3にM69Qの変異を導入した蛍光蛋白質（すなわち、DreiklangにS208G、I47V、M153T、T59S、M233T、及びM69Qの6つ変異を導入した蛍光蛋白質）（PSFP4）は、蛍光の光安定性（ブリーチングによる蛍光の減衰抑制）がDreiklangに比べて2.8倍に向上する、という知見に基づく。

[0019] [蛍光蛋白質]

本開示に係る蛍光蛋白質は、無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なるタイプの光切替型蛍光蛋白質である。配列番号1のアミノ酸配列からなるタンパク質であるDreiklangは、このタイプの光切替型蛍光蛋白質である。

[0020] 本開示において「光切替型蛍光蛋白質」とは、一又は複数の実施形態において、蛍光性状態のonとoff（すなわち、蛍光性と無蛍光性）を波長の異なる2つの光照射によって制御ができ、かつ、onとoffの切り替えが繰り返し行うことができる蛋白質をいう。

[0021] 本開示において“ X_1nX_2 ”で表される変異は、一般的な変異の表記方法であって、アミノ酸配列のn番目のアミノ酸残基 X_1 （一文字表記のアミノ酸残基）が、アミノ酸残基 X_2 （一文字表記のアミノ酸残基）に置換される変異を表す。

[0022] 本開示は、一態様として、配列番号1のアミノ酸配列に、少なくともS208Gの変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質に関する。

上記S208Gの変異が導入されることで、該変異の導入前と比較して、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が向上する。その他の一又は複数の

実施形態においては、上記S208Gの変異が導入されることで、該変異の導入前と比較して、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が向上し、かつ、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度が向上されうる。

[0023] 本開示に係る蛍光蛋白質の一又は複数の実施形態として、配列番号1のアミノ酸配列に、S208Gの変異と、I47V、T59S、M69Q、M153T、及びM233Tからなる群から選択される1又は2～5つの変異とが少なくとも導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。

本実施形態の蛍光蛋白質は、該変異の導入前と比較して、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が向上した光切替型蛍光蛋白質となりうる。

前記変異のうち、I47V若しくはM153T、又は、I47V及びM153Tの変異は、蛍光の輝度の向上に貢献しうる。

前記変異のうち、T59S若しくはM233T、又は、T59S及びM233Tの変異は、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度の向上に貢献し得る。

前記変異のうち、M69Qの変異は、蛍光の光安定性の向上に寄与しうる。

[0024] 本開示に係る蛍光蛋白質の一又は複数の実施形態として、配列番号1のアミノ酸配列に、少なくともI47V、M153T、及びS208Gの3つの変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。配列番号1に前記3つの変異が導入されたアミノ酸配列が配列番号2（PSFP2）である。

本実施形態の蛍光蛋白質では、S208Gの変異に加えてI47V及びM153Tの変異が導入されることで、S208Gのみが導入された場合に比べて、蛍光状態における輝度が向上されうる。

[0025] 本開示に係る蛍光蛋白質の一又は複数の実施形態として、配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、T59S、M153T、S208G、及びM233Tの5つの変異導入されたアミノ酸配列を有するが挙げられる。配列番号1に前記5つの変異が導入されたアミノ酸配列が配列番号3（PSFP3）である。

本実施形態の蛍光蛋白質では、I47V、M153T、及びS208Gの変異に加えてT59S及びM233Tの変異が導入されることで、T59S及びM233Tの変異導入前に比べて、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度がいっそう向上されうる。

[0026] 配列番号 1 のアミノ酸配列に少なくとも I47V、T59S、M69Q、M153T、S208G、及び M233T の 6 つの変異導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質が挙げられる。配列番号 1 に前記 6 つの変異が導入されたアミノ酸配列が配列番号 4 (PSFP4) である。

本実施形態の蛍光蛋白質では、I47V、T59S、M153T、S208G、及び M233T の 5 つの変異に加えて M69Q の変異が導入されることで、M69Q の変異導入前に比べて、蛍光の光安定性が向上されうる。

[0027] 本開示において、「熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度」、「光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度」、及び「蛍光の光安定性」は、実施例に記載の方法で測定及び評価されうる。

[0028] 本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が Dreiklang (配列番号 1) のそれよりも速いことが好ましい。

本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度が Dreiklang (配列番号 1) のそれよりも速いことが好ましい。

本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、蛍光の光安定性が Dreiklang (配列番号 1) のそれよりも高いことが好ましい。

[0029] 本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なるタイプの光切替型蛍光蛋白質の機能を維持できる範囲で、前記 6 つの変異 (I47V、T59S、M69Q、M153T、S208G、及び M233T) 以外の変異を有していてもよい。前記 6 つの変異以外の変異としては、1 から数個のアミノ酸の欠失、置換、及び／又は付加が挙げられ、「1 から数個」とは、一又は複数の実施形態において、1 ～ 4、1 ～ 3、1 ～ 2、又は 1 個を含む。

本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、前記 6 つの変異以外の変異を含む場合であっても、熱平衡による無蛍光性から蛍光性へ

の回復速度がDreiklang（配列番号1）のそれよりも速いことが好ましい。

本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、前記6つの変異以外の変異を含む場合であっても、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度がDreiklang（配列番号1）のそれよりも速いことが好ましい。

本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、前記6つの変異以外の変異を含む場合であっても、蛍光の光安定性がDreiklang（配列番号1）のそれよりも高いことが好ましい。

[0030] 本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、化学合成により合成した蛋白質であってもよいし、遺伝子組み換え技術により作製した組み換え蛋白質であってもよい。遺伝子組み換え技術による組み換え蛋白質の作製としては、一又は複数の実施形態において、本開示に係る蛍光蛋白質をコードする遺伝子を含有する発現ベクターで形質転換した宿主を用いて作製する方法が挙げられる。

[0031] 本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、上述した本開示に係る蛍光蛋白質が他の蛋白質又はペプチドと融合した融合蛋白質であって、該蛍光蛋白質の部分が、無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なる光切替型蛍光蛋白質として機能可能な融合蛋白質である。

本開示に係る融合蛋白質は、一又は複数の実施形態において、該蛍光蛋白質の部分は、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度がDreiklang（配列番号1）のそれよりも速いことが好ましい。

本開示に係る融合蛋白質は、一又は複数の実施形態において、該蛍光蛋白質の部分は、光照射により蛍光性から無蛍光性となる速度がDreiklang（配列番号1）のそれよりも速いことが好ましい。

本開示に係る融合蛋白質は、一又は複数の実施形態において、該蛍光蛋白質の部分は、蛍光の光安定性がDreiklang（配列番号1）のそれよりも高いことが好ましい。

[0032] 本開示に係る融合蛋白質において、本開示に係る蛍光蛋白質に結合（融合

）される蛋白質は、限定されない一又は複数の実施形態において、シグナル配列、発現タグ、又は、蛋白質（必要に応じてリンカー配列）が挙げられる。前記シグナル配列及び前記蛋白質としては、一又は複数の実施形態において、イメージングをする観点から、細胞内の細胞骨格（マイクロフィラメント、中間径フィラメント、微小管）や細胞小器官（核、小胞体、ゴルジ体、ミトコンドリア、エンドソーム、リソソーム等）に局在化できるシグナル配列や蛋白質が挙げられる。

[0033] 本開示に係る蛍光蛋白質は、光切替速度が速く、また繰り返しの蛍光の読み出しが可能であるため、一又は複数の実施形態において、超解像イメージング、超高密度光メモリー及び超高感度蛍光イメージング等に用いることができる。また、本開示に係る蛍光蛋白質は、一又は複数の実施形態において、光切替型蛍光蛋白質を利用した蛍光性機能指示薬、発光蛋白質、発光性機能指示薬として使用することができる。

[0034] [DNA]

本開示は、一態様において、本開示に係る蛍光蛋白質又は本開示に係る融合蛋白質をコードするDNAに関する。本開示のDNAによれば、一又は複数の実施形態において、本開示のDNAを含む組み換えベクターを宿主に導入することによって、本開示に係る蛍光蛋白質を発現し、産生することができる。本開示のDNAは、一又は複数の実施形態において、特異的プライマーを用いたPCRや、ホスホアミダイト法等によって製造することができる。

[0035] [ベクター]

本開示は、一態様において、本開示に係る蛍光蛋白質又は本開示に係る融合蛋白質を発現可能なベクターに関する。本開示のベクターは、一又は複数の実施形態において、本開示のDNAを有するベクターである。本開示のベクターは、一又は複数の実施形態において、本開示のDNAを適当なベクターに挿入することによって得ることができる。本開示のDNAを挿入するベクターとしては、一又は複数の実施形態において、宿主中で複製可能なもの

であれば特に制限されず、プラスミド、及びファージ等が挙げられる。

[0036] プラスミドとしては、一又は複数の実施形態において、大腸菌由来のプラスミド、枯菌草由来のプラスミド、及び酵母菌由来のプラスミド等が挙げられる。

[0037] [形質転換体]

本開示は、一態様において、本開示に係る蛍光蛋白質又は本開示に係る融合蛋白質を発現する形質転換体に関する。本開示の形質転換体は、一又は複数の実施形態において、本開示に係る蛍光蛋白質又は本開示に係る融合蛋白質を発現する細胞、又は、該細胞を含む組織、器官、生体である。また、本開示は、一又は複数の実施形態において、本開示のDNA又は組み換えベクターを有する形質転換体に関する。本開示の形質転換体は、一又は複数の実施形態において、本開示のDNA又は組み換えベクターを宿主に導入することによって作成することができる。

[0038] 宿主としては、一又は複数の実施形態において、通常使用される公知の微生物、及び培養細胞等が挙げられる。微生物としては、一又は複数の実施形態において、大腸菌又は酵母等が挙げられる。培養細胞としては、一又は複数の実施形態において、動物細胞（例えば、CHO細胞、HEK-293細胞、又はCOS細胞）又は昆虫細胞（例えば、BmN4細胞）等が挙げられる。

[0039] [イメージング方法]

本開示は、一態様において、本開示に係る蛍光蛋白質若しくは本開示に係る融合蛋白質、本開示のDNA、又は、本開示のベクターを用いるイメージング方法に関する。本開示のイメージング方法は、一又は複数の実施形態において、本開示に係る蛍光蛋白質又は本開示に係る融合蛋白質を細胞等に導入すること、本開示に係る蛍光蛋白質又は本開示に係る融合蛋白質の光切替を行い蛍光性をon及び／又はoffすること、及び／又は、本開示に係る蛍光蛋白質又は本開示に係る融合蛋白質の蛍光シグナルを検出することを含む。本開示のイメージング方法は、一又は複数の実施形態において、超解像イメー

ジングであって、一又は複数の実施形態において、DSSM (Decoupled stochastic switching microscopy)、PALM (photoactivated localization microscopy)、STORM (stochastic optical reconstruction microscopy)、RESOLFT (reversible saturable optical fluorescence transition)、又は、SOFI (superresolution optical fluctuation imaging) が挙げられる。本開示に係る蛍光蛋白質は、自発的に蛍光性がOnになる速度（熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度）が向上しているため、一又は複数の実施形態において、簡便な超解像イメージング法であるDSSMに好ましく利用できる。

[0040] [フォトクロミック材料]

本開示に係る蛍光蛋白質は、フォトクロミズム効果を示すため、一又は複数の実施形態において、CD、DVD、ホログラフィー記録媒体、スマートカードなどの光記録媒体の用途、広告板、蛍光板、TV、コンピュータモニターなどの表示素子の用途、或いは、レンズ、バイオセンサー、バイオチップ、フォトクロミック繊維素材などの用途に適用できるフォトクロミック材料とすることができる。

[0041] 本開示はさらに以下の限定されない一又は複数の実施形態に関する。

〔1〕 配列番号1のアミノ酸配列に少なくともS208Gの変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。

〔2〕 配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、M153T、及びS208Gの3つの変異が導入されたアミノ酸配列を有する、〔1〕に記載の蛍光蛋白質。

〔3〕 配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、T59S、M153T、S208G、及びM233Tの5つの変異導入されたアミノ酸配列を有する、〔1〕又は〔2〕に記載の蛍光蛋白質。

〔4〕 配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、T59S、M69Q、M153T、S208G、及びM233Tの6つの変異導入されたアミノ酸配列を有する、〔1〕から〔3〕のいずれかに記載の蛍光蛋白質。

〔5〕 配列番号2から4のいずれかのアミノ酸配列を有する、〔1〕から

〔４〕のいずれかに記載の蛍光蛋白質。

〔６〕 〔１〕から〔５〕のいずれかに記載の蛋白質のアミノ酸配列において１から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なり、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が配列番号１のアミノ酸配列からなる蛋白質のそれよりも速い、蛍光蛋白質。

〔７〕 〔１〕から〔６〕のいずれかに記載の蛍光蛋白質が融合された融合蛋白質であって、該蛍光蛋白質の部分は、無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なり、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が配列番号１のアミノ酸配列からなる蛋白質のそれよりも速い、融合蛋白質。

〔８〕 〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の蛋白質をコードする塩基配列を有するＤＮＡ。

〔９〕 〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の蛋白質を発現可能な、或いは、〔８〕に記載のＤＮＡを有するベクター。

〔１０〕 〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の蛋白質を発現する形質転換体。

〔１１〕 〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の蛋白質、〔８〕に記載のＤＮＡ、〔９〕に記載のベクター、又は、〔１０〕に記載の形質転換体を用いるイメージング方法。

〔１２〕 前記イメージング方法が、超解像蛍光顕微鏡観察法である、〔１１〕に記載のイメージング方法。

〔１３〕 〔１〕から〔７〕のいずれかに記載の蛋白質を含むフォトクロミック材料。

[0042] 以下、実施例により本開示をさらに詳細に説明するが、これらは例示的なものであって、本開示はこれら実施例に制限されるものではない。

実施例

[0043] [光切替型蛍光蛋白質 (PSFP) の作製]

無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なる光切替型蛍光蛋白質であるDreiklang (配列番号4のアミノ酸配列からなる蛋白質) に下記変異1、3及び4の3つの変異を導入して光切替型蛍光蛋白質PSFP2を作成した (配列番号2のアミノ酸配列からなる蛋白質)。

PSFP2に、さらに、下記変異2及び5の2つの変異を導入して光切替型蛍光蛋白質PSFP3を作成した (配列番号3のアミノ酸配列からなる蛋白質)。変異1～5の5つの変異箇所を図1及び図2に示す。

PSFP3に、さらに、M69Qの変異を導入して光切替型蛍光蛋白質PSFP4を作成した (配列番号4のアミノ酸配列からなる蛋白質)。

変異1 : I47V

変異2 : T59S

変異3 : M153T

変異4 : S208G

変異5 : M233T

[0044] [バクテリア発現ベクターの作製]

PSFPのバクテリア発現ベクターは、PSFP (PSFP2, PSFP3及びPSFP4) をコードする遺伝子 (それぞれ、配列番号5, 6及び7) をバクテリア発現ベクターpRSET_Bに導入して作製した。同様にDreiklangについても同様にバクテリア発現ベクターを作製した。

[0045] [哺乳類発現ベクターの作製]

PSFPの哺乳類発現ベクターは、PSFP (PSFP2, PSFP3及びPSFP4) をコードする遺伝子を哺乳類発現ベクターpcDNA3に導入して作製した。

また、下記のシグナル配列又はシグナル蛋白質をPSFP (PSFP2, PSFP3及びPSFP4) と融合させた融合蛍光蛋白質の哺乳類発現ベクターも作製した。すなわち、1) ヒトシトクロムcオキシダーゼのサブユニットV_{III} (COX-VIII) の前駆体由来の重複ミトコンドリア標的シグナル、2) β -N-アセチ

ルグルコサニルグリコペプチド β -1, 4-ガラクトシルトランスフェラーゼのゴルジ体局在シグナル配列、3) DNA結合蛋白質H2B、及び4) 核小体蛋白質フィブリラリンを、それぞれ、ミトコンドリア、ゴルジ体、核、及び核小体を標的とするため、PSFPに融合させた。

さらに、 β アクチン、ビメンチン、パキシリン、ザイキシン、及びクラスリンをそれぞれPSFPと17アミノ酸長のリンカー配列(GGSGGSGGSGGSGGQFQ: 配列番号8)を介して融合させた融合蛋白質の哺乳類発現ベクターも作製した。

[0046] [PSFPの精製]

N末にポリヒスチジンタグを持つPSFP (PSFP2, PSFP3及びPSFP4) をバクテリア発現ベクターpRSETBに導入し、大腸菌で発現させた。23℃65時間LB培地で培養した後、菌体をフレンチプレスで破碎し、上清をNi-NTAアガロースアフィニティカラム (Qiagen社製)、及びPD-10カラム (GE Healthcare社製) によるゲルろ過で精製し、さらに、AKTA 10S (GE Healthcare) Hi-load 20/60 Superdex 200 pgカラムで再精製した。

[0047] [PSFPのキャラクタライゼーション]

PSFP (PSFP2, PSFP3及びPSFP4) の蛍光励起、並びに、蛍光性の光切替のon及びoffは、それぞれ、 $475 \pm 28 \text{ nm}$ 、 $360 \pm 20 \text{ nm}$ 、及び $410 \pm 10 \text{ nm}$ のLED光源で行った。吸収スペクトルは、V-630 BIO スペクトロフォトメーター (JASCO社製) を用いて測定した。蛍光励起及び蛍光発光スペクトルはF-7000 蛍光スペクトロフォトメーター (Hitachi社製) を用いて測定した。モル吸光係数は、ブラッドフォードアッセイにより測定した既知濃度の精製蛋白質の吸光度を使用して計算した。蛍光量子収率は、QuantaaurusQY-C11347 (浜ホトニクス社製) を使用して測定した。この測定において蛋白質吸光度を0.05未満に調節した。上記全ての測定は、20 mM HEPESバッファー中の蛋白質を用い、生理学的pH条件下で行った。

光誘導on/offの量子収率は、吸光度における照射依存変化をV-630 BIO スペクトロフォトメーター (JASCO社製) にて測定することで算出した。具体的

な方法は、Gayda, S., Nienhaus, K. & Nienhaus, G. U. Biophysical journal 103, 2521-31 (2012). に記載される方法に従った。

蛍光性offからonへの熱緩和時間の測定は、10 mlの20 μ M蛋白質溶液（20 mM HEPESバッファ、pH 7.4）を測定前に438 $\pm$ 20 nm波長光で蛍光性offしてから、蛍光スペクトルを測定した。

[0048] [熱平衡によるoff状態からの回復速度]

蛍光性がoffの状態からの熱平衡により蛍光性がonの状態となる回復速度を、PSFP2, PSFP3及びPSFP4について測定し、そのカウンターパートであるDreiklangと比較した。具体的には、蛍光性の回復は511nmの吸収スペクトルを測定した。その結果、熱平衡による回復速度の時定数は、PSFP2が218秒、PSFP3が298秒、PSFP4が526秒、Dreiklangが603秒であった（表1、図3）。

[0049] [表1]

(表1)

熱平衡による回復速度の時定数			
Dreiklang (sec)	PSFP2 (sec)	PSFP3 (sec)	PSFP4 (sec)
603	218	298	526

[0050] [光切替速度]

PSFP（PSFP2及びPSFP3）の光切替特性をそのカウンターパートであるDreiklangと比較した。蛍光性onからoffへの光切替の半減期（ $t_{1/2}$ ）は、PSFP2が4.3秒、PSFP3が2.4秒、Dreiklangが8.8秒であった（表2、図4）。

[0051]

[表2]

(表2)

	光切替の半減期 ($t_{1/2}$)		
Switch-Off	Dreiklang (sec)	PSFP2 (sec)	PSFP3 (sec)
	8.8	4.3	2.4

[0052] [光安定性]

PSFP (PSFP2, PSFP3及びPSFP4) の蛍光性のブリーチングによる蛍光の減衰を、そのカウンターパートであるDreiklangと比較した。具体的には、それぞれの試料に励起光を照射し、蛍光強度の変化を測定した。その結果、蛍光の減衰の半減期 ($t_{1/2}$) は、PSFP2が48秒、PSFP3が78秒、PSFP4が123秒、Dreiklangが43秒であった (表3、図5)。

[0053] [表3]

(表3)

蛍光の減衰の半減期 ($t_{1/2}$)			
Dreiklang (sec)	PSFP2 (sec)	PSFP3 (sec)	PSFP4 (sec)
43	48	78	123

[0054] [光切替サイクル数]

実施例1の蛍光蛋白質における蛍光性on/offのスピードの向上と光安定性の向上により、光切替回数の向上をもたらした (図6)。すなわち、蛍光強度が50%減少するまでのサイクル数は、PSFP3が230サイクル、Dreiklangが195サイクルであった。

[0055] [融合蛍光蛋白質の局在]

HeLa細胞で、PSFP3単独、又は、PSFP3と β アクチン、パキシリン若しくはビメンチンとの融合蛋白質を発現させて蛍光顕微鏡観察した。その結果を図7に示す。同図に示す通り、PSFP3単独では細胞質と核に局在し、 β アクチン、パキシリン若しくはビメンチンとの融合蛋白質は、それぞれ、アクチン、パキシリン、及びビメンチンに局在し、かつ、蛍光性を示した。

[0056] [DSSMによる超解像イメージング]

PSFP3とビメンチンとの融合蛋白質をHeLa細胞で発現させ、DSSM (Decoupled stochastic switching microscopy) による超解像イメージングを行った。DSSMイメージングの概要は図8に示す。すなわち、初めに、蛍光性がon状態であるPSFP3に、405 nmの光を照射する事で蛍光性をoffにする。PSFP3は熱平衡により自発的に蛍光性がonになる。次に、488 nmの励起光を照射し、1分子蛍光観察を行うと同時に蛍光分子を褪色させることにより、画面上の1分子輝点をまばらに計測した。その結果を広視野イメージ（左）とともに図9に示す。本実施例のDSSMによる超解像イメージングにおいて、空間分解能34 nm、及び時間分解能20秒という従来報告されてきた値より高い空間分解能値、及び時間分解能での取得に成功した。

[0057] [局在した融合蛍光蛋白質の蛍光光切替の一例]

上記で作製したビメンチン-PSFP3融合蛋白質を発現させた、生きたHeLa細胞で、蛍光の光切替を行って観察した。具体的には、515 nmの励起光を照射しつつ、405 nmの光で蛍光性をoffにし、その後、365 nmの光で蛍光性をonにする光切替を行った。結果を図10に示す。

同図に示す通り、生きたHeLa細胞の局在した融合蛍光蛋白質において、光切替が観察された。

[0058] [融合蛍光蛋白質の局在（追加）]

β アクチン、パキシリン、及びビメンチンに加え、チューブリン、ザイキシン、Src型チロシンキナーゼLyn、ヒストンH2B、Smac/DIABLO、フィブリリン、クラスリン、ゴルジ体、小胞体（ER）、ミトコンドリア、核膜孔（Nucleopore）のタンパク質又は局在化シグナルとのPSFP3融合蛋白質を作製し、H

HeLa細胞内で発現させて蛍光顕微鏡観察した。その結果を図11に示す。同図に示す通り、各融合蛋白質は、それぞれ局在し、かつ、蛍光性を示した。

[0059] [PSFPを発現するアデノ随伴ウイルス (AAV) ベクター]

2種類のプロモータ (CAGとhSyn) に結合したPSFP3遺伝子を有するpAAV-CAG-PSFP3及びpAAV2-hSyn-PSFP3を用い、AAVベクターを作製した。これらのAAVベクターを、それぞれ、HEK293T細胞及び海馬神経細胞の初代培養細胞に感染させたところ、PSFP3の発現と蛍光が確認された。

[0060] [LifeAct-PSFP3融合蛋白質]

F-アクチン (G-アクチンの糸状重合体) へ結合するペプチドLifeAct (J. Riedlら、Nature Methods 5, 605-607, 2008) とのPSFP3融合蛋白質をコードする遺伝子を有する発現ベクターを作製した (LifeAct-PSFP3-pcDNA3)。

[0061] [タイムラプス超解像イメージング]

上記LifeAct-PSFP3融合蛋白を生きたHeLa細胞で発現させ、図12に示すような、DSSMイメージングを繰り返し行うタイムラプス超解像イメージングを行った。その結果を図13に示す。

図13に示す通り、タイムラプス超解像イメージングにより、アクチンネットワークの形態変化が観察できた。

配列表フリーテキスト

[0062] 配列番号1 : Dreiklangのアミノ酸配列

配列番号2 : PSFP2のアミノ酸配列

配列番号3 : PSFP3のアミノ酸配列

配列番号4 : PSFP4のアミノ酸配列

配列番号5 : PSFP2の塩基配列

配列番号6 : PSFP3の塩基配列

配列番号7 : PSFP4の塩基配列

配列番号8 : リンカーのアミノ酸配列

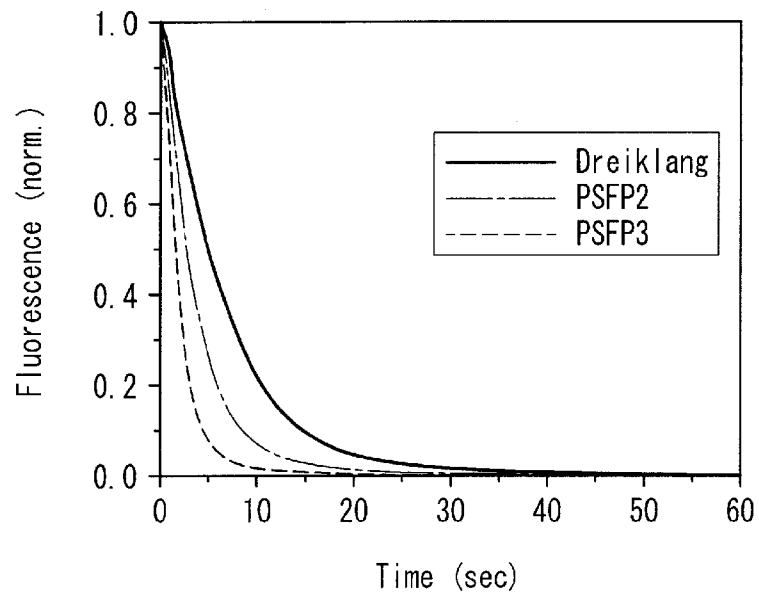
請求の範囲

- [請求項1] 配列番号1のアミノ酸配列に少なくともS208Gの変異が導入されたアミノ酸配列を有する蛍光蛋白質。
- [請求項2] 配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、M153T、及びS208Gの3つの変異が導入されたアミノ酸配列を有する、請求項1に記載の蛍光蛋白質。
- [請求項3] 配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、T59S、M153T、S208G、及びM233Tの5つの変異導入されたアミノ酸配列を有する、請求項1又は2に記載の蛍光蛋白質。
- [請求項4] 配列番号1のアミノ酸配列に少なくともI47V、T59S、M69Q、M153T、S208G、及びM233Tの6つの変異導入されたアミノ酸配列を有する、請求項1から3のいずれかに記載の蛍光蛋白質。
- [請求項5] 配列番号2から4のいずれかのアミノ酸配列を有する、請求項1から4のいずれかに記載の蛍光蛋白質。
- [請求項6] 請求項1から5のいずれかに記載の蛋白質のアミノ酸配列において1から数個のアミノ酸が欠失、置換、及び／又は付加されたアミノ酸配列を有し、無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なり、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が配列番号1のアミノ酸配列からなる蛋白質のそれよりも速い、蛍光蛋白質。
- [請求項7] 請求項1から6のいずれかに記載の蛍光蛋白質が融合された融合蛋白質であって、該蛍光蛋白質の部分は、無蛍光性から蛍光性とするための波長と蛍光性から無蛍光性とするための波長と蛍光励起のための波長とが全て異なり、熱平衡による無蛍光性から蛍光性への回復速度が配列番号1のアミノ酸配列からなる蛋白質のそれよりも速い、融合蛋白質。
- [請求項8] 請求項1から7のいずれかに記載の蛋白質をコードする塩基配列を

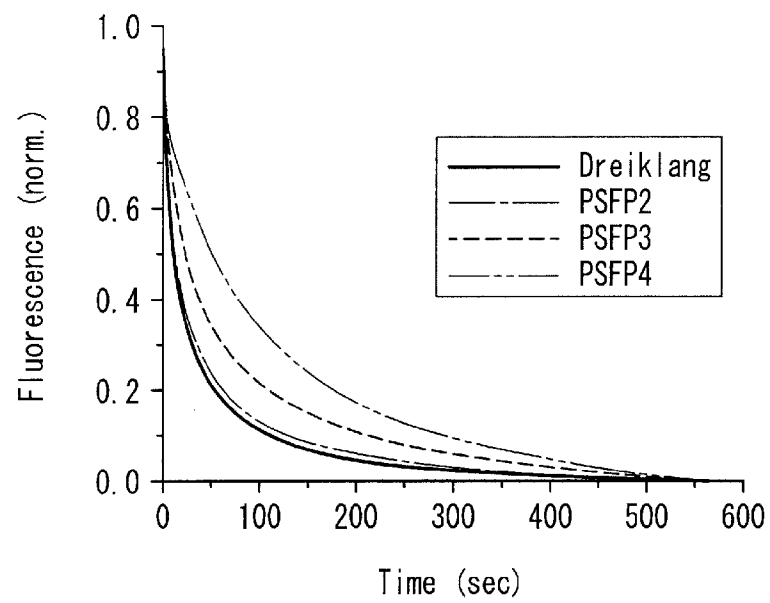
有するDNA。

- [請求項9] 請求項1から7のいずれかに記載の蛋白質を発現可能な、或いは、請求項8に記載のDNAを有するベクター。
- [請求項10] 請求項1から7のいずれかに記載の蛋白質を発現する形質転換体。
- [請求項11] 請求項1から7のいずれかに記載の蛋白質、請求項8に記載のDNA、請求項9に記載のベクター、又は、請求項10に記載の形質転換体を用いるイメージング方法。
- [請求項12] 前記イメージング方法が、超解像蛍光顕微鏡観察法である、請求項11に記載のイメージング方法。
- [請求項13] 請求項1から7のいずれかに記載の蛋白質を含むフォトクロミック材料。

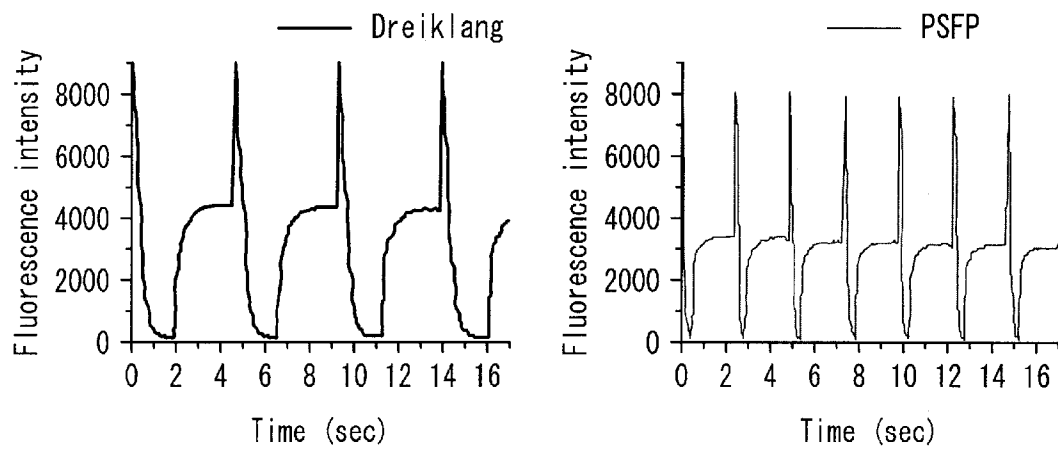
[図4]



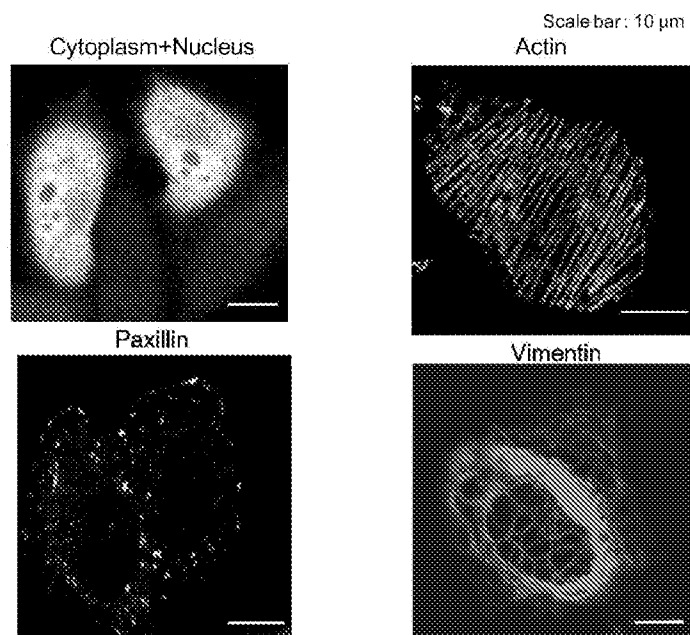
[図5]



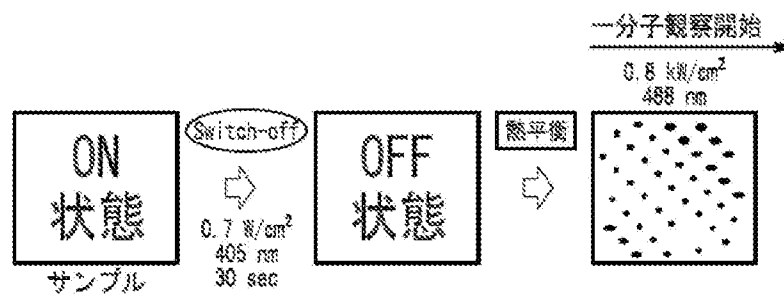
[図6]



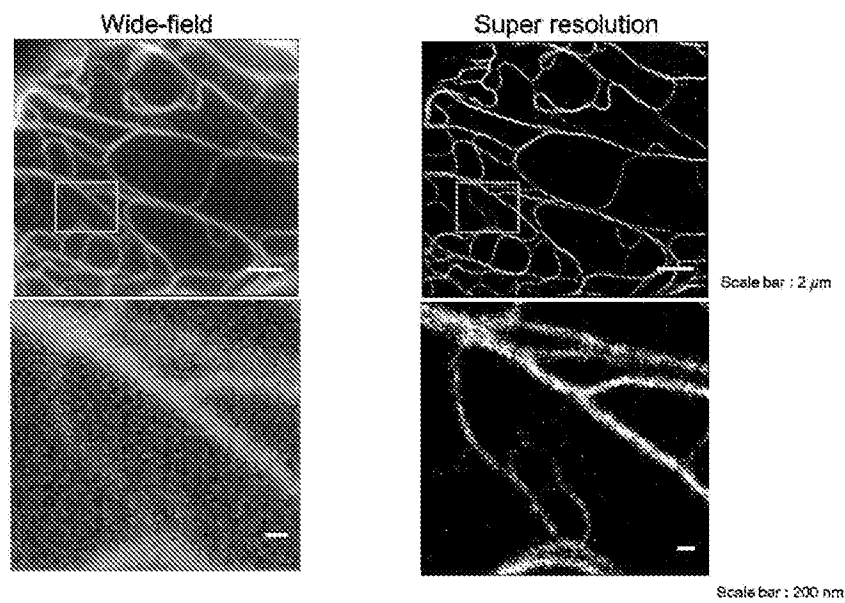
[図7]



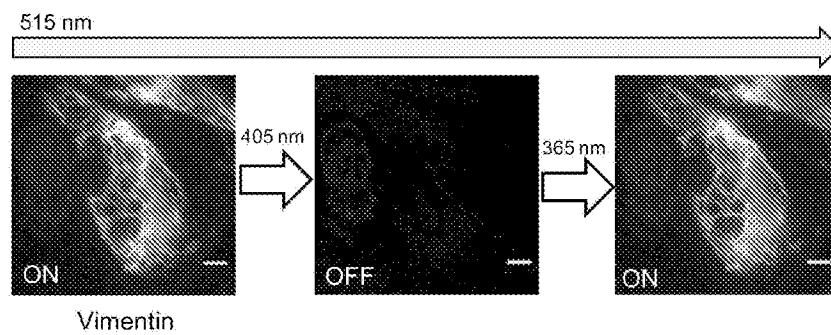
[図8]



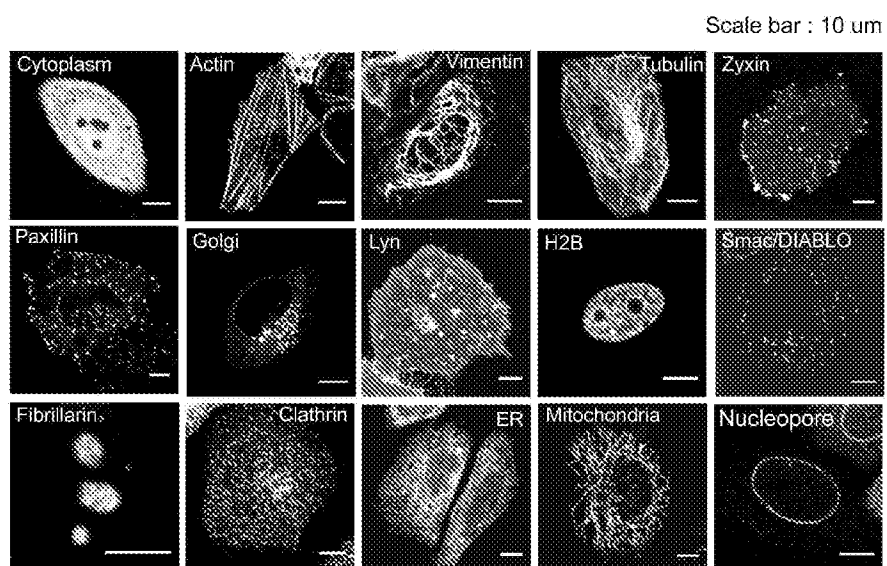
[図9]



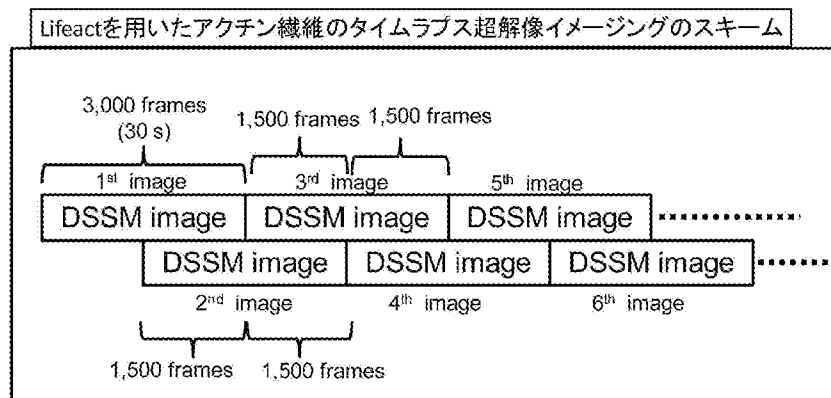
[図10]



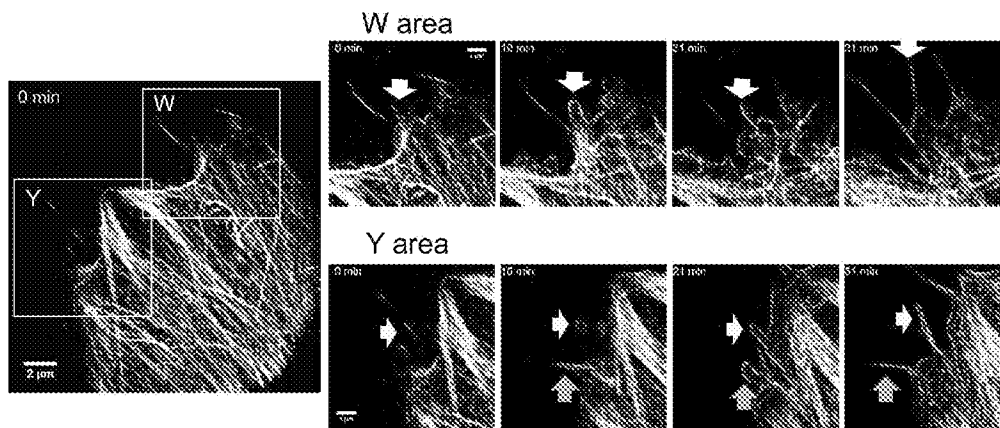
[図11]



[図12]



[図13]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/064132

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K14/435(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K1/00-19/00, C12N15/00-15/90

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2016
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2016	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2016

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII), CAPplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	WO 2012/045733 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E.V.), 12 April 2012 (12.04.2012), abstract; SEQ ID NO:4, 68, 125 & EP 2436690 A1	1, 6-13 2-5
X A	JENSEN NA et al., Coordinate-targeted and coordinate-stochastic super-resolution microscopy with the reversibly switchable fluorescent protein Dreiklang, Chemphyschem., 2014, 15(4), pp.756-762, ISSN: 1439-4235, particularly, abstract, page 759, right column, 2nd paragraph	1, 6-13 2-5

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
03 August 2016 (03.08.16)

Date of mailing of the international search report
16 August 2016 (16.08.16)

Name and mailing address of the ISA/
Japan Patent Office
3-4-3, Kasumigaseki, Chiyoda-ku,
Tokyo 100-8915, Japan

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2016/064132

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X A	BRAKEMANN T et al., A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching, Nat. Biotechnol., 2011, 29(10), pp.942-947, ISSN: 1087-0156, particularly, abstract, page 942, right column, 2nd paragraph	1, 6-13 2-5
A	WO 2015/037674 A1 (Osaka University), 19 March 2015 (19.03.2015), paragraph [0002]; examples (Family: none)	1-13

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K14/435(2006.01)i, C07K19/00(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i,
C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, C12N15/09(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C07K1/00-19/00, C12N15/00-15/90

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2016年
日本国実用新案登録公報	1996-2016年
日本国登録実用新案公報	1994-2016年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII), Cplus/MEDLINE/BIOSIS/WPIDS (STN), UniProt/GeneSeq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	WO 2012/045733 A1 (MAX-PLANCK-GESELLSCHAFT ZUR FÖRDERUNG DER WISSENSCHAFTEN E. V.) 2012.04.12, 要約、配列番号4, 68, 125 & EP 2436690 A1	1, 6-13 2-5
X A	JENSEN NA et al., Coordinate-targeted and coordinate-stochastic super-resolution microscopy with the reversibly switchable fluorescent protein Dreiklang, Chemphyschem., 2014, 15(4), pp.756-762, ISSN: 1439-4235, 特に、要約、759頁右欄第2段落	1, 6-13 2-5

☑ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの

「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの

「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)

「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献

「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.08.2016

国際調査報告の発送日

16.08.2016

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

竹内 祐樹

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

4B

5082

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求項の番号
X A	BRAKEMANN T et al., A reversibly photoswitchable GFP-like protein with fluorescence excitation decoupled from switching, Nat. Biotechnol., 2011, 29(10), pp.942-947, ISSN: 1087-0156, 特に、要約、9 4 2 頁右欄第 2 段落	1, 6 - 1 3 2 - 5
A	WO 2015/037674 A1 (国立大学法人大阪大学) 2015.03.19, [0 0 0 2]、実施例 (ファミリーなし)	1 - 1 3