

(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
2018年6月7日(07.06.2018)



(10) 国際公開番号

WO 2018/100803 A1

(51) 国際特許分類:

C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2017/028174

(22) 国際出願日: 2017年8月3日(03.08.2017)

(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 2016-232746 2016年11月30日(30.11.2016) JP

(71) 出願人: NECソリューションイノベータ株式会社(NEC SOLUTION INNOVATORS,

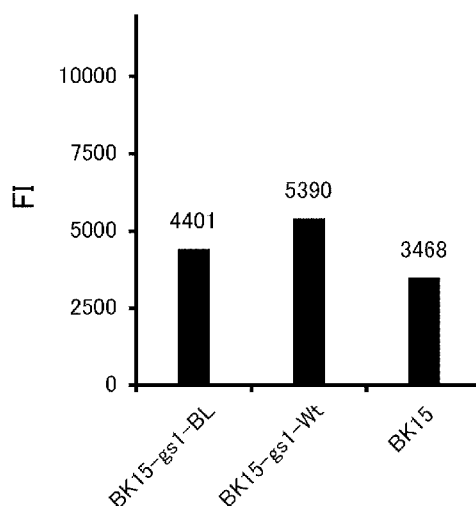
LTD.) [JP/JP]; 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: 清水 晃 尚 (SHIMIZU Akihisa); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 白鳥 行大 (SHIRATORI Ikuo); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 堀井 克紀 (HORII Katsunori); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP). 和賀 巖 (WAGA Iwao); 〒1368627 東京都江東区新木場一丁目18番7号 NECソリューションイノベータ株式会社内 Tokyo (JP).

(54) Title: FLUORESCENT PROTEIN COMPLEX AND LIGHT-EMITTING METHOD OF FLUORESCENT PROTEIN

(54) 発明の名称: 蛍光タンパク質複合体、および蛍光タンパク質の発光方法

[図1]



(57) Abstract: The purpose of the present invention is to provide a novel fluorescent protein. This FRET-type fluorescent protein complex is characterized by the following: including a first fluorescent protein and a second fluorescent protein; the first fluorescent protein and the second fluorescent protein being coupled; and the combination of the first fluorescent protein and the second fluorescent protein being such that the fluorescence wavelength (L1) of the first fluorescent protein overlaps the excitation wavelength (E2) of the second fluorescent protein.

(57) 要約: 新たな蛍光タンパク質を提供する。本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体は、第1蛍光タンパク質と第2蛍光タンパク質とを含み、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが連結されており、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質との組み合わせは、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長(L1)と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長(E2)とが、重複している組み合わせであることを特徴とする。



WO 2018/100803 A1



(74) 代理人: 辻丸 光一郎, 外(TSUJIMARU Koichiro et al.); 〒6008813 京都府京都市下京区中堂寺南町 1 3 4 京都リサーチパーク 1 号館 3 0 1 号室 Kyoto (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, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, 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, 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))

明 細 書

発明の名称：

蛍光タンパク質複合体、および蛍光タンパク質の発光方法

技術分野

[0001] 本発明は、蛍光タンパク質複合体、および蛍光タンパク質の発光方法に関する。

背景技術

[0002] 蛍光タンパク質として、GFP (Green Fluorescent Protein) および YFP (Yellow Fluorescent Protein) 等が、一般的に用いられている（非特許文献1）。前記蛍光タンパク質は、研究等の様々な用途に使用されている。

先行技術文献

非特許文献

[0003] 非特許文献1: Chalfie M et al., “Green fluorescent protein as a marker for gene expression”, Science, February 1994, Vol.263, no.5148, p802-805.

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0004] しかし、前記蛍光タンパク質は、それぞれ特有の励起波長および最大励起波長、ならびに蛍光波長および発光極大波長を有しているため、前記蛍光タンパク質を励起により発光させ、その発光を検出するには、それぞれの励起条件および発光検出条件により、光学的に使用が制限される場合がある。

[0005] そこで、本発明は、例えば、蛍光タンパク質に依存する光学的な条件を広げることができる、新たな蛍光タンパク質を提供することを目的とする。

課題を解決するための手段

[0006] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、

第1蛍光タンパク質と第2蛍光タンパク質とを含み、
前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが連結されており、
前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質との組み合わせは、前記
第1蛍光タンパク質の蛍光波長（L1）と、前記第2蛍光タンパク質の励起
波長（E2）とが、重複している組み合わせであることを特徴とする。

[0007] 本発明の蛍光タンパク質の発光方法は、
前記本発明の蛍光タンパク質複合体に、前記蛍光タンパク質複合体における
前記第1蛍光タンパク質の励起波長の光を照射する工程を含み、
前記第1蛍光タンパク質に、前記第1蛍光タンパク質の励起波長の光を照射
することで、前記第1蛍光タンパク質を発光させ、
前記第1蛍光タンパク質の発光により、前記蛍光タンパク質複合体における
前記第2蛍光タンパク質を励起して、前記第2蛍光タンパク質を発光させる
ことを特徴とする。

[0008] 本発明の蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子は、
第1蛍光タンパク質をコードする第1核酸配列と、第2蛍光タンパク質をコ
ードする第2核酸配列とを含み、
前記第1核酸配列と前記第2核酸配列とは、前記第1蛍光タンパク質と前記
第2蛍光タンパク質とが連結された複合体として発現されるように、連結さ
れており、
前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質の組み合わせは、前記第
1蛍光タンパク質の蛍光波長（L1）と、前記第2蛍光タンパク質の励起波
長（E2）とが、重複している組み合わせであることを特徴とする。

[0009] 本発明の発現ベクターは、前記本発明の蛍光タンパク質複合体をコードす
る遺伝子を含むことを特徴とする。

[0010] 本発明の形質転換体は、前記本発明の蛍光タンパク質複合体をコードする
遺伝子または前記発現ベクターを含むことを特徴とする。

発明の効果

[0011] 本発明によれば、前記第1蛍光タンパク質と前記蛍光タンパク質とを前述

の条件で組合せることにより、例えば、外部からの励起光が、前記第2蛍光タンパク質の励起条件とは異なる場合や最大励起波長から外れている場合であっても、前記第1蛍光タンパク質の発光による励起により、前記第2蛍光タンパク質を発光することができる。このため、本発明によれば、例えば、蛍光タンパク質を単独で使用する場合と比較して、より広い光学的条件の設定が可能になる。

図面の簡単な説明

[0012] [図1]図1は、実施例2において、励起波長400nmおよび蛍光検出波長516nmでの蛍光強度を示すグラフである。

[図2]図2(A)は、実施例3において、励起波長400nmおよび所定の蛍光波長域における蛍光強度を示すグラフであり、図2(B)は、所定の蛍光波長域における最大蛍光強度を示すグラフである。

[図3]図3は、実施例3において、励起波長および蛍光波長における蛍光強度を示すグラフである。

[図4]図4(A)は、実施例4において、励起波長400nmおよび所定の蛍光波長域における蛍光強度を示すグラフであり、図4(B)は、所定の蛍光波長域における最大蛍光強度を示すグラフである。

[図5]図5は、実施例4において、励起波長および蛍光波長における蛍光強度を示すグラフである。

発明を実施するための形態

[0013] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第2蛍光タンパク質が、前記第1蛍光タンパク質の励起波長(E_1)で前記第2蛍光タンパク質を励起した際の発光強度(I_{2E_1})と、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長(L_1)で前記第2蛍光タンパク質を励起した際の発光強度(I_{2L_1})とが、 $I_{2E_1} < I_{2L_1}$ の関係を満たすタンパク質である。

[0014] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが、異なるタンパク質である。

[0015] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第1蛍光タンパク質の最

大励起波長と前記第2蛍光タンパク質の最大励起波長とが異なる。

[0016] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（ L_1 ）と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長（ E_2 ）とが、350～650nmの波長を含む。

[0017] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（ L_1 ）が、前記第2蛍光タンパク質の最大励起波長（ E_{2max} ）を含む。

[0018] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第2蛍光タンパク質の蛍光波長（ L_2 ）が、490～650nmの範囲を含む。

[0019] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが、リンカーを介して連結されている。

[0020] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記リンカーが、ペプチドリリンカーである。

[0021] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記ペプチドリリンカーが、グリシンセリンリンカー領域を含む。

[0022] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記グリシンセリンリンカー領域が、配列番号48（GGGGS）のアミノ酸配列からなるペプチド単位を有する。

[0023] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記グリシンセリンリンカー領域が、前記ペプチド単位が1～3個連結されたリンカーである。

[0024] 本発明の発光タンパク質の発光方法は、例えば、さらに、前記第2蛍光タンパク質の発光の検出工程を含む。

[0025] 本発明の遺伝子は、例えば、前記第1核酸配列と前記第2核酸配列とが、リンカーをコードする核酸配列を介して連結されている。

[0026] <蛍光タンパク質複合体>

本発明の蛍光タンパク質複合体は、前述のように、
第1蛍光タンパク質と第2蛍光タンパク質とを含み、
前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが連結されており、

前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質との組み合わせは、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（L1）と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長（E2）とが、重複している組み合わせであることを特徴とする。

[0027] 本発明の蛍光タンパク質複合体は、後述するように、前記第1蛍光タンパク質の発光により、前記第2蛍光タンパク質を励起させることから、例えば、FRET型蛍光タンパク質複合体ということもできる。なお、本発明は、いわゆる「FRET（蛍光エネルギー移動）」の機能によって限定されるものではない。

[0028] 本発明において、前記第1蛍光タンパク質および前記第2蛍光タンパク質は、前述のように、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（L1）と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長（E2）とが、重複している組み合わせであればよく、その他の条件は、特に制限されない。

[0029] 本発明において、「蛍光タンパク質の励起波長」とは、その蛍光タンパク質を発光できる励起光の波長をいい、「蛍光タンパク質の蛍光波長」とは、その蛍光タンパク質が励起によって発光した、前記蛍光の波長という。

[0030] 本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体によれば、例えば、目的の蛍光タンパク質の発光を、その蛍光タンパク質に特有の励起光を外部から照射しなくても、間接的に前記蛍光タンパク質の発光を生じさせることができる。すなわち、本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体の場合、例えば、前記目的の蛍光タンパク質を前記第2蛍光タンパク質とし、前記第2蛍光タンパク質の励起波長と重複する蛍光波長の発光を示す蛍光タンパク質を前記第1蛍光タンパク質とする。このような構成とすることで、例えば、前記第2蛍光タンパク質の励起波長ではなく、前記第1蛍光タンパク質の励起波長を外部から照射することで、前記第1蛍光タンパク質を励起して発光させ、その発光により、前記第2蛍光タンパク質を間接的に励起させ、発光させることができる。

[0031] また、本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体によれば、例えば、前記第1蛍光タンパク質または前記第2蛍光タンパク質を単独で使用する場合よ

りも、より強い蛍光強度の発光を得ることもできる。

[0032] 本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体において、前記第2蛍光タンパク質は、前記第1蛍光タンパク質の発光によって励起される。このため、前記第2蛍光タンパク質は、例えば、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長で励起されるタンパク質である。前記第2蛍光タンパク質は、前記第1蛍光タンパク質の発光によって励起され、発光できるタンパク質であればよく、例えば、前記第1蛍光タンパク質に照射される励起光によって、発光してもよいし、発光しなくてもよい。

[0033] 本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体によれば、例えば、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質を、それぞれ単独で励起して発光させる場合と比較して、より強い発光強度の発光を得ることもできる。

[0034] 本発明において、前記第2蛍光タンパク質は、例えば、前記第1蛍光タンパク質の励起波長 (E_1) で前記第2蛍光タンパク質を励起した際の発光強度 ($I_{2_{E_1}}$) と、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長 (L_1) で前記第2蛍光タンパク質を励起した際の発光強度 ($I_{2_{L_1}}$) とが、 $I_{2_{E_1}} < I_{2_{L_1}}$ の関係を満たすタンパク質があげられる。このような第2蛍光タンパク質であれば、本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第1タンパク質の励起波長 (E_1) で前記第2蛍光タンパク質を励起する場合よりも、前記第1蛍光タンパク質が発光した蛍光波長 (L_1) によって、間接的に前記第2蛍光タンパク質が励起され、より強い発光を示すことができる。

[0035] 前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長 (L_1) と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長 (E_2) とは、前述のように、重複する波長を含んでいればよい。前記重複する波長は、特に制限されず、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質の種類に応じて、適宜設定できる。

[0036] 前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長 (L_1) は、例えば、前記第2蛍光タンパク質の最大励起波長 ($E_{2_{max}}$) を含んでもよい。この場合、本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体において、前記第1蛍光タンパク質の発光による、前記第2蛍光タンパク質の励起で、例えば、前記第2蛍光タンパク質

を、より効率よく、強い強度で発光させることができる。

[0037] 前記第1蛍光タンパク質の蛍光極大波長 ($L_{1_{max}}$) は、例えば、511～519 nmである。

[0038] 前記第2蛍光タンパク質の最大励起波長 ($E_{2_{max}}$) は、例えば、501～509 nm、506～514 nmである。前記第2蛍光タンパク質の蛍光極大波長 ($L_{2_{max}}$) は、例えば、511～519 nm、516～524 nmである。

[0039] 前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とは、例えば、同じタンパク質でもよいし、異なるタンパク質でもよい。前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが、同じ励起波長域の場合、例えば、前記励起波長域に含まれる所定の励起波長 (E_1) で前記第1蛍光タンパク質を励起し、前記第1蛍光タンパク質を発光させ、前記励起波長域に含まれる前記蛍光波長 (L_1) で前記第2蛍光タンパク質 (前記第1蛍光タンパク質と同一) を励起し、発光させることができる。

[0040] 前記第1蛍光タンパク質の最大励起波長 ($E_{1_{max}}$) と前記第2蛍光タンパク質の最大励起波長 ($E_{2_{max}}$) との差は、特に制限されない。

[0041] 前記第1蛍光タンパク質の最大励起波長 ($E_{1_{max}}$) は、特に制限されず、例えば、396～404 nm、401～409 nmの範囲である。前記第1蛍光タンパク質の励起波長 (E_1) は、特に制限されず、例えば、350～650 nmの範囲を含む。

[0042] 前記第2蛍光タンパク質の最大励起波長 ($E_{2_{max}}$) は、特に制限されず、例えば、前述の通りである。前記第2蛍光タンパク質の励起波長 (E_2) は、特に制限されない。

[0043] 前記第1蛍光タンパク質および前記第2蛍光タンパク質は、それぞれ、例えば、励起波長の変移により得られる蛍光のピークが、1つでもよいし、2つ以上でもよい。後者の場合、例えば、励起波長は、所望のピークを含む蛍光波長の発光を生じる範囲に設定することができる。

[0044] 本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第1蛍光タン

パク質と前記第2蛍光タンパク質とが、直接的に連結してもよいし、間接的に連結してもよい。後者の場合、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とは、例えば、リンカーを介して連結されている。

[0045] 前記リンカーは、特に制限されず、例えば、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが、それぞれ独立して性質を維持できればよい。前記リンカーは、例えば、ペプチドリinkerである。

[0046] 前記ペプチドリinkerは、特に制限されず、例えば、グリシンセリンリンカー領域を含むペプチドリinkerがあげられる。グリシンセリンリンカーは、グリシン残基とセリン残基とを含むペプチドである。前記ペプチドリinkerは、例えば、前記グリシンセリンリンカー領域のみからなる形態でもよいし、前記グリシンセリンリンカー領域を含む形態でもよい。前記グリシンセリンリンカーは、以下、「GSリンカー」、前記グリシンセリンリンカー領域は、以下、「GSリンカー領域」ともいう。

[0047] 前記グリシンセリンリンカー領域は、例えば、配列番号48 (GGGGS) のアミノ酸配列からなるペプチド単位を有する。前記グリシンセリンリンカー領域において、前記ペプチド単位の個数 (n) は、特に制限されず、n は、正の整数であり、例えば、1～3であり、1～2である。前記ペプチド単位を2個以上有する場合、前記グリシンセリンリンカー領域は、例えば、(GGGGS)_nで表される。

[0048] 前記ペプチドリinkerは、前述のように、前記グリシンセリンリンカー領域を含む形態でもよく、この場合、前記グリシンセリンリンカー領域以外の領域は、特に制限されない。本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体を、例えば、遺伝子工学的に調製する場合、後述する本発明の発現ベクター等を用いて合成できる。前記発現ベクターは、例えば、前記第1蛍光タンパク質をコードする核酸配列と、前記第2蛍光タンパク質をコードする核酸配列と、任意で前記グリシンセリンリンカー領域をコードする核酸配列とを、制限酵素部位を利用して、骨格となるベクターに連結することで構築することができる。このため、前記ペプチドリinkerにおける前記その他の領域は、例

えば、前記核酸配列を連結するための制限酵素部位に由来するペプチド領域であってもよい。前記ペプチドリinkerにおいて、前記グリシンセリンリンカー領域以外のその他の領域は、特に制限されず、例えば、その長さ（アミノ酸残基数）は、1～3、1～2である。また、前記ペプチドリinkerにおいて、前記その他の領域の位置は、特に制限されず、例えば、前記グリシンセリンリンカーのC末端側でもよいし、N末端側でもよいし、C末端側とN末端側の両方であってもよい。

[0049] 前記ペプチドリinkerの長さ（アミノ酸残基数）は、特に制限されず、その下限は、例えば、1、5、8、10、13であり、その上限は、例えば、18、15、13、10、8である。

[0050] 本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体は、例えば、前記第1蛍光タンパク質の上流側に、さらに、ペプチド付加領域を有してもよい。本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体を、例えば、遺伝子工学的に調製する場合、後述する本発明の発現ベクター等を用いて合成できる。前記発現ベクターは、例えば、前記第1蛍光タンパク質をコードする核酸配列と、前記第2蛍光タンパク質をコードする核酸配列と、任意で前記グリシンセリンリンカー領域をコードする核酸配列とを、制限酵素部位を利用して、骨格となるベクターに連結することで構築することができる。このため、例えば、前記発現ベクターに連結するための制限酵素部位に由来するペプチド領域が、前記ペプチド付加領域として付加されてもよい。前記ペプチド付加領域の長さ（アミノ酸残基数）は、特に制限されず、例えば、1～4であり、1～3であり、1～2である。

[0051] 本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体について、以下に具体例をあげるが、本発明は、これらの例には何ら制限されない。

[0052] 本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体は、前述のように、前記第1蛍光タンパク質の発光によって、前記第2蛍光タンパク質を励起し、前記第2蛍光タンパク質を発光させることができる。このため、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質との組合せとしては、ブラックライトで励起

されるタンパク質を前記第2蛍光タンパク質とし、UVライトで励起され且つブラックライトの波長域の発光を生じるタンパク質を前記第1蛍光タンパク質とする組合せが例示できる。ブラックライトで蛍光タンパク質を励起する場合、例えば、励起により発光する蛍光波長がブラックライトの波長と重複すると、発光を視覚化するために、光学フィルタを介した発光の視認が必要になる場合がある。他方、UVライトの場合、例えば、ブラックライト時のような光学フィルタを介した発光の視認を回避することができる。このため、前記第1蛍光タンパク質として、UVライトで励起され且つ励起によりブラックライト波長域に含まれる蛍光波長の発光を生じる蛍光タンパク質を第1蛍光タンパク質として使用すれば、前記第1蛍光タンパク質をUVライトで励起することにより、前記第1蛍光タンパク質を発光させることができる。そして、その発光は、ブラックライト波長域に含まれる蛍光波長であるため、この発光によって、ブラックライトを使用することなく、前記第2蛍光タンパク質を励起し、発光させることが可能となる。

[0053] このような第1蛍光タンパク質と第2蛍光タンパク質との組合せとしては、例えば、以下のような組合せが例示できる。

[0054] [表1]

組合せ1	第1蛍光タンパク質	第2蛍光タンパク質
光学的特性	励起波長：350-650nm 最大励起波長：391-399nm 蛍光波長：350-650 蛍光極大波長：511-519	励起波長：350-600nm 最大励起波長：501-509nm 蛍光波長：350-650nm 蛍光極大波長：511-519nm
組合せ1	配列番号28のアミノ酸配列からなるタンパク質（BK15）	配列番号3のアミノ酸配列からなるタンパク質（BL）

[0055]

[表2]

組合せ 1	第 1 蛍光タンパク質	第 2 蛍光タンパク質
光学的特性	励起波長 : 350-650 nm 最大励起波長 : 391-399 nm 蛍光波長 : 350-650 nm 蛍光極大波長 : 511-519 nm	励起波長 : 350-600 nm 最大励起波長 : 506-514 nm 蛍光波長 : 350-650 nm 蛍光極大波長 : 516-524 nm
組合せ 2	配列番号 28 のアミノ酸配列からなるタンパク質 (BK15)	配列番号 49 のアミノ酸配列からなるタンパク質 (Wt)

[0056] [表3]

配列番号 28 BK15 (F1-27)	<u>M</u> TTFKIESRIHG N LN G EKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMGYGFYHFASFP KGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF R YTYEFNKIIGDVECI G HGFPSQSPIFKDTI VKSCPTVDLMLPMSGNI I ASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVE ETLT K ENLAIVEYQQVFNSAPRDM
配列番号 3 BL (F1-2)	<u>M</u> TTFKIESRIHG N LN G EKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSHCMGYGFYHFASFP KGT K NIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF R YTYEFNKIIGDVECI G HGFPSQSPIFKDTI VKTCPTVDLMLPMSGNI I ASSYAKAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVE ETH T KENLAMVEYQQVFNSAPRDM
配列番号 49 Wt	<u>M</u> TTFKIESRIHG N LN G EKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSHCMGYGFYHFASFP KGT K NIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF R YTYEFNKIIGDVECI G HGFPSQSPIFKDTI VKSCPTVDLMLPMSGNI I ASSYARAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVE ETH T KENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0057] 前記第 1 蛍光タンパク質と前記第 2 蛍光タンパク質は、直接的または間接的に連結されて、前記 FRET 型蛍光タンパク質複合体の構成要件として存在する。このため、例えば、前記 FRET 型蛍光タンパク質複合体を遺伝子工学的に発現させる場合、前記複合体の開始コドンは、前記第 1 蛍光タンパク質の 1 番目のメチオニン残基をコードするため、前記第 2 蛍光タンパク質の 1 番目のメチオニン残基は、欠失してもよい。

[0058] また、前記第 1 蛍光タンパク質、前記ペプチドリンカーにおけるグリシンセリンリンカー領域、および前記第 2 蛍光タンパク質の組合せとしては、例えば、以下のような組合せが例示できる。

[0059]

[表4]

組合せ	第 1 蛍光タンパク質	第 2 蛍光タンパク質	ペプチド リンカー	励起波長	検出 蛍光波長
1	BK15	BL	(GGGGS) _n N _m	486-404nm	511-519nm
2	BK15	Wt	(GGGGS) _n N _m	396-409nm	516-524nm

[0060] 前記表 4 において、前記ペプチドリンカーにおける G S リンカー領域 (G G G S)_n の繰り返し単位の数 n は、特に制限されず、例えば、1 ~ 3 であり、また、前記ペプチドリンカーにおけるその他の領域 N_m のアミノ酸残基 N は、特に制限されず、任意のアミノ酸 (X a a) であり、例えば、全てが同じであっても異なってもよく、繰り返し単位の数 m は、特に制限されず、前記ペプチド付加領域と同様である。

[0061] 前記表 4 に示す組合せの F R E T 型蛍光タンパク質複合体は、例えば、以下の配列で表すことができる。

[0062] [表5]

組合せ 1 BK15-L-BL 配列番号 5 0	MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMGYGFYHFASFP KGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFYTYEFNKIIGDVECIGHGFSPSQSPIFKDTI VKSCPTVDLMLPMSGNI IASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVE ETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM (GGGGS) _n N _m MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSHCMGYGFYHFASFPKGT KNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFYTYEFNKIIGDVECIGHGFSPSQSPIFKDTIVKTCPTVDLMLPMSGNI IASSYAKAFQLKDGS FYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHKENLAMVEYQQVFNSAPRDM
組合せ 2 BK15-L-W t 配列番号 5 1	MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMGYGFYHFASFP KGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFYTYEFNKIIGDVECIGHGFSPSQSPIFKDTI VKSCPTVDLMLPMSGNI IASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVE ETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM (GGGGS) _n N _m MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSHCMGYGFYHFASFPKGT KNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFYTYEFNKIIGDVECIGHGFSPSQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLPMSGNI IASSYARAFQLKDGS FYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0063] 前記第 1 蛍光タンパク質および前記第 2 蛍光タンパク質は、例えば、前述の他に、以下に示す蛍光タンパク質を、組合せて使用することもできる。

[0064] (F 1) 配列番号 1 のアミノ酸配列からなり、前記配列番号 1 のアミノ酸配列において、5 2 番目のアミノ酸 X a a₅₂ が、任意のアミノ酸であり、1

33番目のアミノ酸Xaa₁₃₃が、任意のアミノ酸であり、154番目のアミノ酸Xaa₁₅₄が、任意のアミノ酸であるタンパク質

(F2) 前記(F1)の52番目のアミノ酸Xaa₅₂、133番目のアミノ酸Xaa₁₃₃、および154番目のアミノ酸Xaa₁₅₄以外のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質

(F3) 前記(F1)の52番目のアミノ酸Xaa₅₂、133番目のアミノ酸Xaa₁₃₃、および154番目のアミノ酸Xaa₁₅₄以外のアミノ酸配列に対して、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質

[0065] 前記配列番号1のアミノ酸配列を有するタンパク質において、52番目、133番目、および154番目のアミノ酸は、例えば、前記タンパク質の発色団と相互作用すると推定される。前記タンパク質は、例えば、52番目、133番目、および154番目のアミノ酸を任意のアミノ酸とすることにより、前記タンパク質の蛍光活性を調整でき、例えば、相対的に低い波長の励起光（例えば、紫外線（以下同様））においても、より強い蛍光を発するタンパク質や、同一強度の励起光で励起した際に、より強い蛍光を発するタンパク質を得られる。

[0066] 前記(F1)における配列番号1のアミノ酸配列は、以下の通りである。以下のアミノ酸配列において、3箇所の四角で囲んだアミノ酸(X)は、1箇所目のアミノ酸が、Xaa₅₂、2箇所目のアミノ酸が、Xaa₁₃₃、3箇所目のアミノ酸が、Xaa₁₅₄に対応するアミノ酸である。また、2箇所の下線を引いたアミノ酸(X)は、1箇所目のアミノ酸が、Xaa₁₉₈、2箇所目のアミノ酸が、Xaa₂₀₅に対応するアミノ酸である。

[0067] (F1)

(F1)のアミノ酸配列（配列番号1）

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSXCMGYGFYHFASFPGTKNIYLHAAT
 NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFPSQSPIFKDITVKXCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
 XAFQLKDGsfyTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0068] 前記 (F 1) において、 $X a a_{52}$ は、任意のアミノ酸である。前記任意のアミノ酸は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYであり、好ましくは、C、F、H、K、M、またはTであり、例えば、相対的に低い波長の励起光においても、より強い蛍光を発することから、より好ましくは、C、M、またはTである。また、前記 (F 1) において、 $X a a_{52}$ は、例えば、同一強度の励起光で励起した際に、より強い蛍光を発することから、より好ましくは、Hである。

[0069] 前記 (F 1) において、 $X a a_{133}$ は、任意のアミノ酸である。前記任意のアミノ酸は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYであり、好ましくは、L、Q、S、またはTである。また、前記 (F 1) において、 $X a a_{133}$ は、例えば、同一強度の励起光で励起した際に、より強い蛍光を発することから、より好ましくは、Tである。

[0070] 前記 (F 1) において、 $X a a_{154}$ は、任意のアミノ酸である。前記任意のアミノ酸は、A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W、またはYであり、好ましくは、A、H、I、K、L、Q、V、またはYであり、例えば、相対的に低い波長の励起光においても、より強い蛍光を発することから、より好ましくは、A、I、L、V、またはYである。また、前記 (F 1) において、 $X a a_{154}$ は、例えば、同一強度の励起光で励起した際に、より強い蛍光を発することから、より好ましくは、Kである。

[0071] 前記 (F 1) において、 $X a a_{52}$ 、 $X a a_{133}$ 、および $X a a_{154}$ の組合せは、特に制限されず、例えば、

$X a a_{52}$ は、例えば、C、F、H、K、M、またはTであり、

$X a a_{133}$ は、例えば、L、Q、S、またはTであり、

$X a a_{154}$ は、例えば、A、H、I、K、L、Q、V、またはYである。

[0072] 前記 (F 1) において、 $X a a_{52}$ 、 $X a a_{133}$ 、および $X a a_{154}$ の組合せは、例えば、相対的に低い波長の励起光においても、より強い蛍光を発する

ことから、好ましくは、

Xaa_{52} は、例えば、C、M、またはTであり、

Xaa_{133} は、例えば、L、Q、S、またはTであり、

Xaa_{154} は、例えば、A、I、L、V、またはYである。

以下、前記(F1)がこのような Xaa_{52} 、 Xaa_{133} 、および Xaa_{154} の組合せを有する場合、前記(F1)を、(B1)ともいい、前記(F2)および(F3)において、前記(F1)が(B1)の場合、前記(F2)および(F3)を、それぞれ、(B2)および(B3)ともいう。また、以下の説明において、前記(B2)および(B3)は、例えば、前記(F2)および(F3)の説明において、(F1)を(B1)に、(F2)を(B2)に、(F3)を(B3)に、それぞれ読み替えて、その説明を援用できる。

[0073] 前記タンパク質において、 Xaa_{52} 、 Xaa_{133} 、および Xaa_{154} の組合せは、例えば、下記($aa1$)～($aa11$)および($aa12$)のいずれか1つの組合せである。また、前記タンパク質において、 Xaa_{52} 、 Xaa_{133} 、および Xaa_{154} の組合せは、例えば、相対的に低い波長の励起光においても、より強い蛍光を発することから、下記($aa1$)、($aa3$)、($aa6$)、($aa9$)、($aa10$)、または($aa12$)が好ましく、下記($aa1$)、または($aa9$)の組合せがより好ましい。また、前記タンパク質において、 Xaa_{52} 、 Xaa_{133} 、および Xaa_{154} の組合せは、例えば、同一強度の励起光で励起した際に、より強い蛍光を発することから、下記($aa2$)の組合せが好ましい。前記タンパク質は、例えば、 Xaa_{52} 、 Xaa_{133} 、および Xaa_{154} の組合せが、それぞれ、H、SおよびRの組合せ、ならびにD、SおよびRの組合せのタンパク質を除く。

[0074]

[表6]

	Xaa ₅₂	Xaa ₁₃₃	Xaa ₁₅₄
(a a 1)	T	S	Y
(a a 2)	H	T	K
(a a 3)	C	L	L
(a a 4)	C	S	H
(a a 5)	T	S	H
(a a 6)	M	L	V
(a a 7)	F	S	Q
(a a 8)	K	T	A
(a a 9)	C	Q	L
(a a 1 0)	T	T	I
(a a 1 1)	K	S	Q
(a a 1 2)	M	L	A

[0075] 前記タンパク質において、X a a ₂₀₅は、例えば、相対的に低い波長の励起光においても、より強い蛍光を発することから、Iに置換されていることが好ましい。また、前記タンパク質において、X a a ₁₉₈は、例えば、相対的に低い波長の励起光においても、より強い蛍光を発することから、LまたはHに置換されていることが好ましい。前記新規タンパク質において、198番目および205番目のアミノ酸は、例えば、それぞれが、前記タンパク質の発色団と相互作用すると推定される。このため、198番目および205番目のアミノ酸の少なくとも一方について、上述の置換を行なうことにより、相対的に低い波長の励起光においても、より強い蛍光を発するタンパク質を得られると推定される。前記新規タンパク質において、X a a ₁₉₈およびX a a ₂₀₅は、例えば、相対的に低い波長の励起光においても、さらに強い蛍光を発することから、LおよびIの組合せ、またはHおよびIの組合せに、それぞれ置換されていることがより好ましい。

[0076] 前記(F1)のタンパク質は、例えば、配列番号2～47からなる群から選択された少なくとも1つのアミノ酸配列からなるタンパク質があげられる。前記(F1)が配列番号2～47のアミノ酸配列からなるタンパク質である場合、前記(F1)は、それぞれ、(F1-1)～(F1-46)ともい

い、前記（F 2）は、それぞれ、（F 2－1）～（F 2－46）ともいい、前記（F 3）は、それぞれ、（F 3－1）～（F 3－46）ともいう。

[0077] 前記（B 1）のタンパク質は、例えば、配列番号2、4、7、10、11、13、および14～47からなる群から選択された少なくとも1つのアミノ酸配列からなるタンパク質があげられる。前記（B 1）における各配列番号のアミノ酸配列からなるタンパク質の説明は、前記（F 1）における各配列番号のアミノ酸配列からなるタンパク質の説明を援用できる。

[0078] 前記（F 1）における配列番号2～47のアミノ酸配列は、以下の通りである。前記配列番号2～13のアミノ酸配列は、前記配列番号1のアミノ酸配列において、X a a₅₂、X a a₁₃₃、およびX a a₁₅₄の組合せが、それぞれ、前記（a a 1）～（a a 12）の組合せの場合に対応する。前記配列番号14～28のアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列において、X a a₅₂、X a a₁₃₃、およびX a a₁₅₄の組合せが、前記（a a 1）の組合せの場合に対応する。前記配列番号29～47のアミノ酸配列は、配列番号1のアミノ酸配列において、X a a₅₂、X a a₁₃₃、およびX a a₁₅₄の組合せが、前記（a a 9）の組合せの場合に対応する。

[0079] （F 1－1）

（F 1－1）のアミノ酸配列（配列番号2）

MTTFKIESRIHG¹NLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS²TCMGYGFYHFASFPKGT³KNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶SCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
YAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH⁷TKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0080] （F 1－2）

（F 1－2）のアミノ酸配列（配列番号3）

MTTFKIESRIHG¹NLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS²TCMGYGFYHFASFPKGT³KNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶T⁷CPTVDLMLPMSGNIIASSYA
KAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH⁸TKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0081] （F 1－3）

(F 1 - 3) のアミノ酸配列 (配列番号 4)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶CPTVDLMLPMSGNI⁷IASSYA
AFQLKDG⁸SFYTA⁹EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹⁰TKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0082] (F 1 - 4)

(F 1 - 4) のアミノ酸配列 (配列番号 5)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶SCPTVDLMLPMSGNI⁷IASSYA
HAFQLKDG⁸SFYTA⁹EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹⁰TKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0083] (F 1 - 5)

(F 1 - 5) のアミノ酸配列 (配列番号 6)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶SCPTVDLMLPMSGNI⁷IASSYA
HAFQLKDG⁸SFYTA⁹EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹⁰TKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0084] (F 1 - 6)

(F 1 - 6) のアミノ酸配列 (配列番号 7)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶CPTVDLMLPMSGNI⁷IASSYA
HAFQLKDG⁸SFYTA⁹EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹⁰TKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0085] (F 1 - 7)

(F 1 - 7) のアミノ酸配列 (配列番号 8)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶SCPTVDLMLPMSGNI⁷IASSYA
HAFQLKDG⁸SFYTA⁹EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹⁰TKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0086] (F 1 - 8)

(F 1 - 8) のアミノ酸配列 (配列番号 9)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶CPTVDLMLPMSGNI⁷IASSYA
HAFQLKDG⁸SFYTA⁹EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹⁰TKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0087] (F 1 - 9)

(F 1 - 9) のアミノ酸配列 (配列番号 1 0)

MTTFKIESRIHG^QNLNGEK^QFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^QCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF^QFRYTYEFNKIIGDVECI^QGHGFPSQSPIFKDTIVK^QCPTVDLMLPMSGNI^QIASSYA
^QAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH^QTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0088] (F 1 - 1 0)

(F 1 - 1 0) のアミノ酸配列 (配列番号 1 1)

MTTFKIESRIHG^TNLNGEK^TFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF^TFRYTYEFNKIIGDVECI^TGHGFPSQSPIFKDTIVK^TCPTVDLMLPMSGNI^TIASSYA
^TAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH^TTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0089] (F 1 - 1 1)

(F 1 - 1 1) のアミノ酸配列 (配列番号 1 2)

MTTFKIESRIHG^KNLNGEK^KFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^KCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF^KFRYTYEFNKIIGDVECI^KGHGFPSQSPIFKDTIVK^KCPTVDLMLPMSGNI^KIASSYA
^KAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH^KTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0090] (F 1 - 1 2)

(F 1 - 1 2) のアミノ酸配列 (配列番号 1 3)

MTTFKIESRIHG^MNLNGEK^MFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^MCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF^MFRYTYEFNKIIGDVECI^MGHGFPSQSPIFKDTIVK^MCPTVDLMLPMSGNI^MIASSYA
^MAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH^MTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0091] (F 1 - 1 3)

(F 1 - 1 3) のアミノ酸配列 (配列番号 1 4)

MTTFKIESRIHG^LNLNGEK^LFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^LCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF^LFRYTYEFNKIIGDVECI^LGHGFPSQSPIFKDTIVK^LCPTVDLMLPMSGNI^LIASSYA
^LAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH^LTKENLA^LIVEYQQVFNSAPRDM

[0092] (F 1 - 1 4)

(F 1 - 1 4) のアミノ酸配列 (配列番号 1 5)

MTTFKIESRIHG^TNLNGEK^TFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF^TFRYTYEFNKIIGDVECI^TGHGFPSQSPIFKDTIVK^TCPTVDLMLPMSGNI^TIASSYA
^TAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET^TTKENLA^TIVEYQQVFNSAPRDM

[0093] (F 1 - 1 5)

(F 1 - 1 5) のアミノ酸配列 (配列番号 1 6)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNILHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFPSPQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
YAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFLKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0094] (F 1 - 1 6)

(F 1 - 1 6) のアミノ酸配列 (配列番号 1 7)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNILHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFPSPQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMPGNI IASSYA
YAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0095] (F 1 - 1 7)

(F 1 - 1 7) のアミノ酸配列 (配列番号 1 8)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGIKNILHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFPSPQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
YAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0096] (F 1 - 1 8)

(F 1 - 1 8) のアミノ酸配列 (配列番号 1 9)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLT^TCMGYGFYHFASFPKGTKNILHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFPSPQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
YAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0097] (F 1 - 1 9)

(F 1 - 1 9) のアミノ酸配列 (配列番号 2 0)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNILHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFPSPQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNI IVSSYA
YAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0098] (F 1 - 2 0)

(F 1 - 2 0) のアミノ酸配列 (配列番号 2 1)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNILHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFPSPQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMTGNI ITSSYA
YAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0099] (F 1 - 2 1)

(F 1 - 2 1) のアミノ酸配列 (配列番号 2 2)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGVGEEGRLEIEMRTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECI GHGFPSQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNIIVSSYA
YAFQLKDGTFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0100] (F 1 - 2 2)

(F 1 - 2 2) のアミノ酸配列 (配列番号 2 3)

MTTFKIESRIHGNLNGEEFELVGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECI GHGFPSQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMPGNI IASSYA
YAFQLKDGsfYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0101] (F 1 - 2 3)

(F 1 - 2 3) のアミノ酸配列 (配列番号 2 4)

MTTFKIESRIHGNLNGEEFELVGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKG^IKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECI GHGFPSQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
YAFQLKDGsfYTAEVKNNIDFRNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0102] (F 1 - 2 4)

(F 1 - 2 4) のアミノ酸配列 (配列番号 2 5)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKG^IKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGVLEVNFRTYEF^DKIIGDVECI GHGFPSQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
YAFQLKDGsfYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0103] (F 1 - 2 5)

(F 1 - 2 5) のアミノ酸配列 (配列番号 2 6)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEF^DKIIGDVECI GHGFPSQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
YAFQLKDGsfYTAEVKNNIDFKNPIHESFLKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0104] (F 1 - 2 6)

(F 1 - 2 6) のアミノ酸配列 (配列番号 2 7)

MTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^TSMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECI GHGFPSQSPIFKDTIVK^SCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
YAFQLKDGsfYTA^DVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET_LTENLA_IVEYQQVFNSAPRDM

[0105] (F 1 - 2 7)

(F 1 - 2 7) のアミノ酸配列 (配列番号 2 8)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLT³CMGYGFYHFASFPKG⁴IKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSPIFKDTIVK⁷SCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
YAFQLKDGSFYTA⁸EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET⁹LTKENLAIVEYQQVFNSAPRDM

[0106] (F 1 - 2 8)

(F 1 - 2 8) のアミノ酸配列 (配列番号 2 9)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKG⁴TKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSPIFKDTIVK⁷QCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
LAFQLKDGSFYTA⁸EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET⁹YTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0107] (F 1 - 2 9)

(F 1 - 2 9) のアミノ酸配列 (配列番号 3 0)

MTTFKIESRI¹RGNLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKG⁴TKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYELNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSPIFKDTIVK⁷QCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
LAFRLKDGSFYTA⁸EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET⁹YTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0108] (F 1 - 3 0)

(F 1 - 3 0) のアミノ酸配列 (配列番号 3 1)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKG⁴TKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSPIFKDTIVK⁷QCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
LAFQLKDGSFYTA⁸EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTYRRVEET⁹YTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0109] (F 1 - 3 1)

(F 1 - 3 1) のアミノ酸配列 (配列番号 3 2)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSPIFKDTIVK⁷QCPTVDLMLPVSGNIIASSYA
LAFQLKDGSFYTA⁸EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET⁹YTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0110] (F 1 - 3 2)

(F 1 - 3 2) のアミノ酸配列 (配列番号 3 3)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³CMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
HGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSPIFKDTIVR⁷QCPTVDLMLPVSGNIIASSYA
LAFQLKDGSFYTA⁸EVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEET⁹YTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0111] (F 1 - 3 3)

(F 1 - 3 3) のアミノ酸配列 (配列番号 3 4)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKGAKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶QCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
LAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH⁷TENLAIVEYQQVFNSAPRDM

[0112] (F 1 - 3 4)

(F 1 - 3 4) のアミノ酸配列 (配列番号 3 5)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶QCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
LAFQLRDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETY⁷TENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0113] (F 1 - 3 5)

(F 1 - 3 5) のアミノ酸配列 (配列番号 3 6)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶QCPTVDLMLPVSRIIASSYA
LAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETY⁷TENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0114] (F 1 - 3 6)

(F 1 - 3 6) のアミノ酸配列 (配列番号 3 7)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶QCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
LAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETY⁷TENLAMVEYQQVFNSAPRDV

[0115] (F 1 - 3 7)

(F 1 - 3 7) のアミノ酸配列 (配列番号 3 8)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
HGGYTNRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSPIFKDTIVK⁷QCPTVDLMLPMSGNIIASSYA
LAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETY⁸TENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0116] (F 1 - 3 8)

(F 1 - 3 8) のアミノ酸配列 (配列番号 3 9)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁴RYTYEFNKIIGDVECI⁵GHGFPSQSPIFKDTIVK⁶QYPTVDLMLPMSGNIIASSYA
LAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH⁷TENLAIVEYQQVFNSAPRDM

[0117] (F 1 - 3 9)

(F 1 - 3 9) のアミノ酸配列 (配列番号 4 0)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSP⁷IFKDTIVK⁸QCPTVDLMLPMSGNI⁹IASSYA
LAFQLKDG¹⁰SFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETY¹¹T¹²KENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0118] (F 1 - 4 0)

(F 1 - 4 0) のアミノ酸配列 (配列番号 4 1)

MTTFKIESRIQG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSP⁷IFKDTIVK⁸QCPTVDLMLPMSGNI⁹IASSYA
LAFQLKDG¹⁰SFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETY¹¹T¹²KENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0119] (F 1 - 4 1)

(F 1 - 4 1) のアミノ酸配列 (配列番号 4 2)

MTTFKIESRIQG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSP⁷IFKDTIVK⁸QCPTVDLMLPMSGNI⁹IASSYA
LAFQLKDG¹⁰SFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹¹T¹²KENLAIVEYQQVFNSAPRDI

[0120] (F 1 - 4 2)

(F 1 - 4 2) のアミノ酸配列 (配列番号 4 3)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSP⁷IFKDTIVK⁸QWPTVDLMLPMSGNI⁹IASSYA
LAFQLKDG¹⁰SFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹¹T¹²KENLAIVEYQQVFNSAPRDM

[0121] (F 1 - 4 3)

(F 1 - 4 3) のアミノ酸配列 (配列番号 4 4)

MTTFKIESRIHG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNF⁵RYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSP⁷IFKDTIVK⁸QWPTVDLMLPMSGNI⁹IASSYA
LAFQLKDG¹⁰SFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETH¹¹T¹²KENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0122] (F 1 - 4 4)

(F 1 - 4 4) のアミノ酸配列 (配列番号 4 5)

MTTFKIESRIQG¹NLNGEK²FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS³QCMGYGFYHFASFPKG⁴TENIYLHAAT
NGGYTNTRKEIYEDGGIL⁵KVNFRYTYEFNKIIGDVECI⁶GHGFPSQSP⁷IFKDTIVK⁸QCPTVDLMLPMSGNI⁹IASSYA
LAFQLKDG¹⁰SFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETY¹¹T¹²KENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0123] (F 1 - 4 5)

(F 1 - 4 5) のアミノ酸配列 (配列番号 4 6)

MTTFKIESRIQGNLNGEKFEVLGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^QCMGYGFYHFASFPKGTENIYLHAAT
 NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIGHGFPSQSPIFKDTIVK^QCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
^LAFQLEDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETYTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0124] (F 1 - 4 6)

(F 1 - 4 6) のアミノ酸配列 (配列番号 4 7)

MTTFKIESRIRGNLNGEKFEVLGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLS^QCMGYGFYHFASFPKGTENIYLHAAT
 NGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIGHGFPSQSPIFKDTIVK^QCPTVDLMLPMSGNI IASSYA
^LAFQLKDGsfyTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETYTKENLAMVEYQQVFNSAPRDM

[0125] 前記 (F 2) のタンパク質は、例えば、前記 (F 1) の $Xa a_{52}$ 、 $Xa a_{133}$ 、および $Xa a_{154}$ が保存され、前記 (F 1) のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質ということもできる。前記 (F 2) において、「1もしくは数個」は、例えば、前記 (F 2) が、前記蛍光活性を有する範囲であればよい。前記 (F 2) のアミノ酸配列において、「1もしくは数個」は、例えば、1～43個、1～33個、1～22個、1～11個、1～9個、1～7個、1～5個、1～3個、1または2個である。本発明において、個数の数値範囲は、例えば、その範囲に属する正の整数を全て開示するものである。つまり、例えば、「1～5個」との記載は、「1、2、3、4、5個」の全ての開示を意味する (以下、同様)。前記 (F 1) において、 $Xa a_{205}$ が、I に置換されている場合、前記 (F 2) のタンパク質は、前記 (F 1) の $Xa a_{205}$ が保存されていることが好ましい。この場合、前記 (F 2) のタンパク質は、例えば、前記 (F 1) の $Xa a_{52}$ 、 $Xa a_{133}$ 、 $Xa a_{154}$ 、および $Xa a_{205}$ が保存され、前記 (F 1) のアミノ酸配列において、1もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質である。また、前記 (F 1) において、 $Xa a_{198}$ が、L または H に置換されている場合、前記 (F 2) のタンパク質は、前記 (F 1) の $Xa a_{198}$ が保存されていることが好ましい。この場合、前記 (F 2) のタンパク質は、例えば、前

記 (F 1) の X a a₅₂、X a a₁₃₃、X a a₁₅₄、および X a a₁₉₈ が保存され、前記 (F 1) のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質である。前記 (F 1) において、X a a₁₉₈ および X a a₂₀₅ が、L および I の組合せ、または H および I の組合せに、それぞれ置換されている場合、前記 (F 2) のタンパク質は、前記 (F 1) の X a a₁₉₈ および X a a₂₀₅ が保存されていることが好ましい。この場合、前記 (F 2) のタンパク質は、例えば、前記 (F 1) の X a a₅₂、X a a₁₃₃、X a a₁₅₄、X a a₁₉₈、および X a a₂₀₅ が保存され、前記 (F 1) のアミノ酸配列において、1 もしくは数個のアミノ酸が欠失、置換、挿入および／または付加されたアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質である。前記「1 もしくは数個」は、例えば、前述の説明を援用できる。

[0126] 前記 (F 3) のタンパク質は、前記 (F 1) の X a a₅₂、X a a₁₃₃、および X a a₁₅₄ が保存され、前記 (F 1) のアミノ酸配列に対して、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質ということもできる。前記 (F 3) において、「同一性」は、例えば、前記 (F 3) が、前記蛍光活性を有する範囲であればよい。前記 (F 3) のアミノ酸配列において、「同一性」は、例えば、80%以上、85%以上、90%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上である。前記「同一性」は、例えば、BLAST、FASTA等の解析ソフトウェアを用いて、デフォルトのパラメータにより算出できる（以下、同様）。前記 (F 1) において、X a a₂₀₅ が、I に置換されている場合、前記 (F 3) のタンパク質は、前記 (F 1) の X a a₂₀₅ が保存されていることが好ましい。この場合、前記 (F 3) のタンパク質は、例えば、前記 (F 1) の X a a₅₂、X a a₁₃₃、X a a₁₅₄、および X a a₂₀₅ が保存され、前記 (F 1) のアミノ酸配列に対して、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質である。また、前記 (F 1) において、X a a₁₉₈ が、L または H に置換されている場合、前記 (F 3) のタンパク質は、前

記（F 1）のX a a₁₉₈が保存されていることが好ましい。この場合、前記（F 3）のタンパク質は、例えば、前記（F 1）のX a a₅₂、X a a₁₃₃、X a a₁₅₄、およびX a a₁₉₈が保存され、前記（F 1）のアミノ酸配列に対して、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質である。前記（F 1）において、X a a₁₉₈およびX a a₂₀₅が、LおよびIの組合せ、またはHおよびIの組合せに、それぞれ置換されている場合、前記（F 3）のタンパク質は、前記（F 1）のX a a₁₉₈およびX a a₂₀₅が保存されていることが好ましい。この場合、前記（F 3）のタンパク質は、例えば、前記（F 1）のX a a₅₂、X a a₁₃₃、X a a₁₅₄、X a a₁₉₈、およびX a a₂₀₅が保存され、前記（F 1）のアミノ酸配列に対して、80%以上の同一性を有するアミノ酸配列からなり、蛍光活性を有するタンパク質である。前記「同一性」は、例えば、前述の説明を援用できる。

[0127] 前記蛍光タンパク質は、例えば、以下のような化学的特性を有する。なお、以下で示す励起波長、励起極大波長、蛍光波長および蛍光極大波長は、例えば、350～650 nmの波長の範囲における化学的特性である。

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：386～514 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：506～524 nm

[0128] 前記（F 1-1）～（F 1-46）のタンパク質は、例えば、それぞれ、以下のような化学的特性を有する。なお、前記（F 1-1）～（F 1-46）の励起波長または蛍光波長において、複数の蛍光強度の極大値が存在する場合、複数の励起極大波長および蛍光極大波長を示している。

[0129] （F 1-1）

励起波長：350～560 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0130] (F 1 - 2)

励起波長：350～600 nm

励起極大波長：501～509 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0131] (F 1 - 3)

励起波長：350～620 nm

励起極大波長：396～404 nm、506～514 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：516～524 nm

[0132] (F 1 - 4)

励起波長：350～625 nm

励起極大波長：496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0133] (F 1 - 5)

励起波長：350～615 nm

励起極大波長：501～509 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0134] (F 1 - 6)

励起波長：350～625 nm

励起極大波長：391～399 nm、506～514 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：516～524 nm

[0135] (F 1 - 7)

励起波長：350～625 nm

励起極大波長：476～484 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：506～514 nm

[0136] (F 1 - 8)

励起波長：350～605 nm

励起極大波長：496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0137] (F 1 - 9)

励起波長：350～615 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0138] (F 1 - 10)

励起波長：350～590 nm

励起極大波長：391～399 nm、506～514 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：516～524 nm

[0139] (F 1 - 11)

励起波長：350～575 nm

励起極大波長：476～484 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：506～514 nm

[0140] (F 1 - 12)

励起波長：350～595 nm

励起極大波長：386～394 nm、506～514 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：516～524 nm

[0141] (F 1 - 13)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0142] (F 1 - 1 4)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0143] (F 1 - 1 5)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0144] (F 1 - 1 6)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：391～399 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0145] (F 1 - 1 7)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0146] (F 1 - 1 8)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0147] (F 1 - 19)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0148] (F 1 - 20)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：391～399 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0149] (F 1 - 21)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：391～399 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0150] (F 1 - 22)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0151] (F 1 - 23)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：391～399 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0152] (F 1 - 24)

励起波長：350～645 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0153] (F 1 - 2 5)

励起波長：350～580 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0154] (F 1 - 2 6)

励起波長：350～560 nm

励起極大波長：396～404 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0155] (F 1 - 2 7)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：391～399 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0156] (F 1 - 2 8)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0157] (F 1 - 2 9)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0158] (F 1 - 3 0)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0159] (F 1 - 3 1)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0160] (F 1 - 3 2)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0161] (F 1 - 3 3)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0162] (F 1 - 3 4)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0163] (F 1 - 3 5)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：406～414 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0164] (F 1 - 3 6)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、501～509 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0165] (F 1 - 3 7)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0166] (F 1 - 3 8)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0167] (F 1 - 3 9)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：416～424 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0168] (F 1 - 4 0)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0169] (F 1 - 4 1)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0170] (F 1 - 4 2)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：416～424 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0171] (F 1 - 4 3)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：421～429 nm、501～509 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0172] (F 1 - 4 4)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0173] (F 1 - 4 5)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0174] (F 1 - 4 6)

励起波長：350～650 nm

励起極大波長：401～409 nm、496～504 nm

蛍光波長：350～650 nm

蛍光極大波長：511～519 nm

[0175] 前記励起波長、前記励起極大波長、前記蛍光波長、および前記蛍光極大波長の測定方法は、特に制限されず、例えば、JIS K0120に基づいて行うことができる。

[0176] <蛍光タンパク質の発光方法>

本発明の蛍光タンパク質の発光方法は、前述のように、前記本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体に、前記FRET型蛍光タンパク質複合体における前記第1蛍光タンパク質の励起波長の光を照射する工程を含み、前記第1蛍光タンパク質に、前記第1蛍光タンパク質の励起波長の光を照射することで、前記第1蛍光タンパク質を発光させ、前記第1蛍光タンパク質の発光により、前記FRET型蛍光タンパク質複合体における前記第2蛍光タンパク質を励起して、前記第2蛍光タンパク質を発光させることを特徴とする。

[0177] 本発明の発光方法は、前記本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体を使用し、前記FRET型蛍光タンパク質複合体における前記第1蛍光タンパク質に対して、前記第1蛍光タンパク質が発光する条件の励起光を照射し、前記第1蛍光タンパク質の発光により、前記第2蛍光タンパク質を発光させればよく、その他の構成は、何ら制限されない。

[0178] 前記照射工程において、前記FRET型蛍光タンパク質複合体に照射する光の波長は、特に制限されず、前記第1蛍光タンパク質の励起波長であり、且つ、励起による前記第1蛍光タンパク質の発光が、前記第2蛍光タンパク質の励起波長を含む条件であればよい。前記第1蛍光タンパク質の励起波長および蛍光波長、ならびに前記第2蛍光タンパク質の励起波長および蛍光波長は、例えば、本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体の記載を援用できる。

[0179] 本発明の発光方法は、例えば、さらに、前記第2蛍光タンパク質の発光を検出する検出工程を含んでもよい。この場合、本発明の発光方法は、例えば、本発明の発光の検出方法ということもできる。

[0180] 本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体において例示した前記表1、表2、表3、および表5の組合せの場合、例えば、以下のような、励起と蛍光検出が可能となる。なお、本発明は、これには制限されない。

[0181] 前記FRET型蛍光タンパク質複合体の場合、前記第1蛍光タンパク質は、例えば、UVライトの波長域の照射光により励起が可能である。そして、前記照射光の励起による前記第1蛍光タンパク質の発光は、前記第2蛍光タンパク質の励起波長を含むため、これにより前記第2蛍光タンパク質を発光させ、前記発光を検出することができる。前記第2蛍光タンパク質を単体で使用する場合、例示した前記第2蛍光タンパク質の励起波長がブラックライトの波長域であると、例えば、ブラックライトの照射光が照射される。しかし、前記第2蛍光タンパク質の発光が、前記ブラックライトの波長と重複すると、前記第2蛍光タンパク質の発光を、直接視認することができず、発光以外の光をカットする光学フィルタ（例えば、商品名SC-52、富士フィルム社製）を介して、視認する必要がある。しかしながら、前記FRET型蛍光タンパク質複合体の場合、外部からの励起光は、前記第1蛍光タンパク質に応じて設定でき、前記第2蛍光タンパク質は、前記第1蛍光タンパク質の発光により励起されるため、前述のような前記ブラックライトの使用による問題も解消できる。また、前記FRET型蛍光タンパク質複合体の場合、前記第2蛍光タンパク質を単独で使用する場合よりも、例えば、より強い蛍光強度の発光を得ることもできる。

[0182] <遺伝子>

本発明の遺伝子は、前述のように、FRET型蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子であり、第1蛍光タンパク質をコードする第1核酸配列と、第2蛍光タンパク質をコードする第2核酸配列とを含み、前記第1核酸配列と前記第2核酸配列とは、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが連結された複合体として発現されるように、連結されており、前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質の組み合わせは、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（L1）と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長（E

2) とが、重複している組み合わせであることを特徴とする。本発明の遺伝子によれば、例えば、これを発現させることで、前記本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体を容易に製造できる。

[0183] 本発明の遺伝子は、例えば、前記第 1 核酸配列と前記第 2 蛍光タンパク質とが、リンカーをコードする核酸配列を介して連結されている。

[0184] 本発明の遺伝子は、前記本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体をコードすればよく、その他の構成等は何ら制限されない。本発明の遺伝子は、例えば、前記第 1 蛍光タンパク質、前記第 2 蛍光タンパク質、および任意の前記リンカーのアミノ酸配列に応じて、適宜、それらをコードするコドンからなる核酸配列に置き換えることで設計できる。

[0185] 本発明の遺伝子を構成するポリヌクレオチドは、例えば、公知の遺伝子工学的手法または合成手法によって製造できる。

[0186] <発現ベクター>

本発明の発現ベクターは、前述のように、前記本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子を含むことを特徴とする。本発明の発現ベクターによれば、例えば、前記発現ベクターを宿主に導入することで、前記本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体を容易に製造できる。本発明の発現ベクターは、例えば、前記本発明の遺伝子の説明等を援用できる。

[0187] 前記発現ベクターは、例えば、前記本発明の遺伝子がコードする前記 F R E T 型蛍光タンパク質複合体を発現可能なように、機能的に、前記遺伝子を構成するポリヌクレオチドを含んでいればよく、その他の構成は、特に制限されない。

[0188] 前記発現ベクターは、例えば、骨格となるベクター（以下、「基本ベクター」ともいう。）に、前記ポリヌクレオチドを挿入することで作製できる。前記ベクターの種類は、特に制限されず、例えば、前記宿主の種類に応じて、適宜決定できる。前記ベクターは、ウイルスベクターおよび非ウイルスベクターがあげられる。前記ベクターは、例えば、バイナリーベクターが好ましい。植物に形質転換を行う場合、前記ベクターは、T-DNA 型バイナリ

ーベクターが好ましい。アグロバクテリウムを使用する方法により、植物に形質転換を行う場合、前記ベクターは、例えば、pB1121ベクター、pPZP202ベクター、pBINPLUSベクター、pBIN19ベクター、pBIG2113N、pBIG2113SF、pRI101DNAベクター（TaKaRa社製）、pRI201DNAベクター（TaKaRa社製）、pRI909DNAベクター（TaKaRa社製）、pRI910DNAベクター（TaKaRa社製）等があげられる。大腸菌等の微生物に形質転換を行う場合、前記ベクターは、例えば、pETDuet-1ベクター（ノバジェン社）、pQE-80Lベクター（QIAGEN社）、pBlue-script II-SKベクター、pET101/D-TOPOベクター（Invitrogen社製）、pGEX-6P-1ベクター（Amersham Biosciences社製）、pcDNA3.2/V5-GW/D-TOPOベクター（Invitrogen社製）、pEGFPベクター、pcDNA3.1-hygro⁽⁻⁾ベクター（Invitrogen社製）等があげられる。

[0189] 前記発現ベクターは、例えば、前記ポリヌクレオチドの発現および前記ポリヌクレオチドがコードする前記本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体の発現を調節する、調節配列を有することが好ましい。前記調節配列は、例えば、プロモーター、ターミネーター、エンハンサー、ポリアデニル化シグナル配列、複製起点配列（ori）等があげられる。前記発現ベクターにおいて、前記調節配列の配置は特に制限されない。前記発現ベクターにおいて、前記調節配列は、例えば、前記ポリヌクレオチドの発現およびこれがコードする前記FRET型蛍光タンパク質複合体の発現を、機能的に調節できるように配置されていればよく、公知の方法に基づいて配置できる。前記調節配列は、例えば、前記基本ベクターが予め備える配列を利用してもよいし、前記基本ベクターに、さらに、前記調節配列を挿入してもよいし、前記基本ベクターが備える調節配列を、他の調節配列に置き換えてもよい。

[0190] 前記発現ベクターは、例えば、さらに、選択マーカーのコード配列を有し

てもよい。前記選択マーカーは、例えば、薬剤耐性マーカー、蛍光タンパク質マーカー、酵素マーカー、細胞表面レセプターマーカー等があげられる。

[0191] < F R E T 型蛍光タンパク質複合体の製造方法 >

本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体の製造方法は、特に制限されず、例えば、遺伝子工学的手法により製造してもよいし、公知の合成方法により製造してもよい。前者の場合、本発明の製造方法は、前記本発明の遺伝子を発現させる発現工程を含む。これにより、本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体の製造方法は、例えば、前記本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体を容易に製造できる。

[0192] 前記本発明の遺伝子の発現は、例えば、前記遺伝子を構成するポリヌクレオチドの発現であり、前記本発明の発現ベクターを使用して行ってもよい。

[0193] 前記ポリヌクレオチドを発現させる方法は、特に制限されず、公知の方法が採用でき、例えば、無細胞タンパク質合成系を使用してもよいし、宿主を使用してもよい。

[0194] 前者の場合、無細胞タンパク質合成系において前記ポリヌクレオチドを発現させることが好ましい。この場合、前記ポリヌクレオチドの発現には、発現ベクターを使用してもよい。前記無細胞タンパク質合成系は、例えば、細胞抽出液と、各種成分を含むバッファーと、目的のポリヌクレオチドが導入された発現ベクターとを用いて、公知の方法により行うことができ、例えば、市販の試薬キットが使用できる。

[0195] 後者の場合、例えば、前記ポリヌクレオチドが導入された前記宿主を使用し、前記宿主の培養により、前記宿主において前記ポリヌクレオチドを発現させることが好ましい。このように、例えば、前記ポリヌクレオチドを宿主に導入することで、本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体を合成する形質転換体を製造でき、また、前記形質転換体の培養により、本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体を合成できる。

[0196] 前記宿主は、例えば、微生物、植物、動物、昆虫またはこれらの培養細胞等の非ヒト宿主、単離したヒト細胞またはその培養細胞等があげられ、好ま

しくは、植物である。前記宿主が植物の場合、前記植物は、例えば、植物体またはその部分であってもよい。前記植物体の部分は、例えば、器官、組織、細胞または栄養繁殖体等があげられる。前記器官は、例えば、花弁、花冠、花、葉、種子、果実、茎、根等があげられる。前記組織は、例えば、前記器官の部分である。前記細胞は、例えば、前記植物体またはその組織から採取した細胞、前記細胞の培養細胞、プロトプラスト、カルス等があげられる。前記植物の由来は、特に制限されず、例えば、アブラナ科、ナス科、イネ科、マメ科、バラ科、ナデシコ科、キク科、リンドウ科、ゴマノハグサ科、クマツヅラ科、サクラソウ科、サボテン科、ラン科等があげられる。前記アブラナ科は、例えば、シロイヌナズナ (Arabidopsis thaliana) 等のシロイヌナズナ属等があげられる。前記ナス科は、例えば、タバコ (Nicotiana tabacum) 等のタバコ属、ペチュニア (Petunia × hybrida) 等のツクバネアサガオ属 (Petunia)、ニーレンベルギア (Nierembergia hippoamarnica) 等のアマモドキ属、カリブラコア (Calibrachoa hybrid Cultivar) 等のカリブラコア属等があげられる。前記イネ科は、例えば、トウモロコシ (Zea mays) 等のトウモロコシ属、イネ (Oryza sativa) 等のイネ属等があげられる。前記マメ科は、例えば、ダイズ (Glycine max) 等のダイズ属等があげられる。前記バラ科は、例えば、バラ (Rosa) 等のバラ属があげられる。前記ナデシコ科は、例えば、カーネーション (Dianthus caryophyllus) 等のナデシコ属等があげられる。前記キク科は、例えば、栽培ギク (Chrysanthemum morifolium) 等のキク属、ガーベラ (Gerbera cvs.) 等のガーベラ (オオセンボンヤリ) 属等があげられる。前記リンドウ科は、例えば、トルコキキョウ (Eustoma grandiflorum) 等のユーストマ属等があげられる。前記ゴマノハグサ科は、例えば、トレニア (Torenia fournieri) 等のトレニア属等があげられる。前記クマツヅラ科は、例えば、

バーベナ (Garden verbena) 等のバーベナ属等があげられる。前記サクラソウ科は、例えば、シクラメン (Cyclamen persicum) 等のシクラメン属等があげられる。前記サボテン科は、例えば、アウストロキリンドロプンティア属、アストロフィツム属、エキノカクツス属、エキノセレウス属、エキノプシス属、エピフィラム属、オプンティア属、カニバサボテン属、カマエセレウス属、キリンドロプンティア属、ギムノカリキウム属、シャコバサボテン属、セレニセレウス属、テフロカクツス属、ネオブクスバウミア属、ネオライモンディア属、ノパレア属、フェロカクツス属、マミラリア属、メロカクツス属、リプサリス属、ロセオカクツス属、ロフォフォラ属等があげられる。前記ラン科は、例えば、ファレノプシス (Phalaenopsis cvs.) 等のファレノプシス (コチョウラン) 属、シンビジウム (Cymbidium cvs.) 等のシンビジウム (シュンラン) 属、デンドロビウムのノビル系 (Dendrobium nobile hybrids)、デンドロビウムのデンファレ系 (D. phalaenopsis hybrids) 等のデンドロビウム (セッコク) 属、オンシジウム (Oncidium cvs.) 等のオンシジウム属、カトレア (Cattleya cvs.) 等のカトレア属等があげられる。前記微生物は、例えば、真核生物、原核生物等があげられる。前記原核生物は、例えば、大腸菌 (Escherichia coli) 等のエッシャーヒア属、シュードモナス・プチダ (Pseudomonas putida) 等のシュードモナス属等の細菌があげられる。前記真核生物は、例えば、サッカロミセス・セレビスエ (Saccharomyces cerevisiae) 等の酵母等があげられる。前記動物細胞は、例えば、COS細胞、CHO細胞等があげられ、前記昆虫細胞は、例えば、Sf9、Sf21等があげられる。

[0197] 前記ポリヌクレオチドを前記宿主に導入する方法、すわなち、前記宿主の形質転換の方法は、特に制限されず、例えば、前記発現ベクターを用いて導入する方法でもよいし、前記発現ベクターを用いずに導入する公知の方法で

もよい。後者の場合、前記導入方法は、例えば、前記宿主の種類に応じて、適宜設定できる。前記導入方法は、例えば、ヒートショック法、酢酸リチウム法、パーティクルガン等の遺伝子銃による導入法、リン酸カルシウム法、ポリエチレングリコール法、リポソームを用いるリポフェクション法、エレクトロポレーション法、超音波核酸導入法、DEAEーデキストラン法、微小ガラス管等を用いた直接注入法、ハイドロダイナミック法、カチオニックリポソーム法、導入補助剤を用いる方法、アグロバクテリウムを介する方法等があげられる。前記リポソームは、例えば、リポフェクタミンおよびカチオニックリポソーム等があげられ、前記導入補助剤は、例えば、アテロコラーゲン、ナノ粒子およびポリマー等があげられる。前記宿主が植物の場合、前記導入方法は、アグロバクテリウムを介する方法が好ましい。前記本発明の遺伝子を構成するポリヌクレオチドは、例えば、前記本発明の発現ベクターにより前記宿主に導入してもよい。

[0198] 前記宿主の培養の方法は、特に制限されず、前記宿主の種類に応じて適宜設定できる。前記宿主の培養に使用する培地は、特に制限されず、前記宿主の種類に応じて適宜決定できる。

[0199] 前記宿主の培養に使用する培地の形態は、特に制限されず、例えば、固体培地、液体培地、寒天培地等、従来公知の培地を適宜使用できる。前記培地に含まれる成分は、特に制限されない。前記培地は、例えば、市販の培地を含んでもよい。前記宿主が植物である場合、前記植物の市販培地は、特に制限されず、例えば、Murashige-Skoog (MS) 培地等があげられる。前記宿主が植物細胞である場合、前記植物細胞の市販培地は、特に制限されず、例えば、ハイポネックス培地、MS培地、Gamborg B5 (B5) 培地、White培地等があげられる。前記宿主が微生物である場合、前記微生物の市販培地は、特に制限されず、例えば、LB培地、スーパーブロス培地、M9培地等があげられる。前記培地は、例えば、1種類を単独で使用してもよいし、2種類以上を併用してもよい。前記培地のpHは、特に制限されず、例えば、pH 6～8の範囲、pH 6.5～7.5の範囲である。

[0200] 前記宿主の培養方法は、特に制限されず、例えば、前記宿主の種類に応じて、適宜決定できる。前記宿主が植物の場合、前記培養方法は、例えば、前記植物を土壌栽培、水性栽培する方法等があげられる。前記植物が植物細胞の場合、前記培養方法は、例えば、カルス培養、根の培養、胚珠培養、胚培養等があげられる。

[0201] 前記宿主の培養時の培養温度は、特に制限されず、例えば、前記宿主の種類に応じて、適宜決定できる。前記宿主が植物の場合、前記培養温度は、例えば、植物の生育可能温度、生育最適温度等があげられる。具体的には、前記培養温度は、例えば、15～40℃の範囲、30～37℃の範囲等で行うことができる。前記宿主が植物細胞の場合、前記培養温度は、例えば、植物細胞の生育可能温度、生育最適温度等があげられる。具体的には、前記培養温度は、例えば、15～40℃の範囲、30～37℃の範囲等で行うことができる。

[0202] 前記宿主は、例えば、好氣的条件下で培養してもよく、嫌氣的条件下で培養してもよい。前記好氣的条件または嫌氣的条件は、特に制限されず、従来公知の方法を用いて設定できる。

[0203] <形質転換体>

本発明の形質転換体は、前記本発明の遺伝子または前記発現ベクターを含むことを特徴とする。本発明の形質転換体は、前記本発明の遺伝子または前記発現ベクターを含むことが特徴であり、その他の構成および条件は、特に制限されない。本発明の形質転換体は、前記本発明の遺伝子または前記発現ベクターを含むため、例えば、蛍光活性を有する。本発明の形質転換体は、例えば、前記本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体等の説明を援用できる。

[0204] 本発明において、前記形質転換体は、特に制限されず、動物、植物等があげられるが、植物が好ましい。前記形質転換体が動物である場合、前記形質転換体としては、例えば、ヒト大腸がん細胞等のがん細胞があげられる。前記形質転換体が植物である場合、前記植物および植物の由来は、特に制限さ

れず、例えば、前述の説明を援用できる。具体的に、前記植物は、例えば、植物体またはその部分であってもよい。前記植物体の部分は、例えば、器官、組織、細胞または栄養繁殖体等があげられる。前記器官は、例えば、花弁、花冠、花、葉、種子、果実、茎、根等があげられる。前記組織は、例えば、前記器官の部分である。前記細胞は、例えば、前記植物体またはその組織から採取した細胞、前記細胞の培養細胞、プロトプラスト、カルス等があげられる。

[0205] 本発明において、前記形質転換体が植物の場合、本発明の形質転換体は、例えば、さらに繁殖させることができる。この際、本発明の形質転換体は、前記繁殖材料として使用できる。前記繁殖材料は、特に制限されず、例えば、前記形質転換体の全体でもよいし、部分でもよい。前記形質転換体が、前記植物体またはその部分の場合、前記繁殖材料は、例えば、種子、果実、シュート、塊茎等の茎、塊根等の根、株、プロトプラスト、カルス等があげられる。

[0206] 本発明の形質転換体の繁殖方法は、特に制限されず、公知の方法が採用できる。前記繁殖方法は、例えば、有性生殖および無性生殖のいずれでもよく、好ましくは無性生殖である。前記無性生殖による繁殖は、例えば、栄養繁殖 (vegetative propagation) があげられ、栄養生殖 (vegetative reproduction) ともいう。前記栄養繁殖の方法は、特に制限されず、前記植物体またはその部分の場合、例えば、挿し芽、挿し木による繁殖、器官からの植物個体への細分化、カルスによる増殖等があげられる。前記器官は、例えば、前述したような葉、茎、根等が利用できる。

[0207] 前記形質転換体を栄養繁殖することにより得られる繁殖体を、以下、本発明の栄養繁殖体という。本発明の栄養繁殖体は、前記本発明の形質転換体と同一の性質を有することが好ましい。本発明の栄養繁殖体は、前記形質転換体と同様に、特に制限されず、例えば、植物体またはその部分があげられる。

[0208] また、前記形質転換体を有性生殖した場合、例えば、種子、これから生育

した生育体等の子孫が得られる。本発明の子孫は、前記本発明の形質転換体と同一の性質を得ることが好ましい。本発明の子孫は、例えば、前記形質転換体と同様に、例えば、植物体またはその部分のいずれでもよい。

[0209] 本発明の形質転換体は、例えば、さらに加工してもよい。加工する前記形質転換体の種類は、特に制限されず、例えば、花、葉、枝等があげられる。前記形質転換体の加工品は、特に制限されず、例えば、花、葉、枝等を乾燥させたポプリ、押し花、ドライフラワー、プリザーブドフラワー、樹脂密封品等があげられる。また、本発明の加工品は、例えば、前記形質転換体の栄養繁殖体、器官、組織または細胞の加工品でもよい。

[0210] <形質転換体の製造方法>

本発明の形質転換体の製造方法は、宿主に、本発明の遺伝子または前記発現ベクターを導入する導入工程を含むことを特徴とする。本発明の形質転換体の製造方法は、宿主に、本発明の遺伝子または前記発現ベクターを導入する導入工程を含むことを特徴とし、その他の工程および条件は、特に制限されない。本発明の形質転換体の製造方法によれば、例えば、前記本発明の形質転換体を容易に製造できる。

[0211] 本発明の形質転換体の製造方法は、さらに、前記宿主に、前記遺伝子を発現させる発現工程を含んでいてもよい。

[0212] 前記導入工程において、本発明の遺伝子または前記発現ベクターを前記宿主に導入する方法は、特に制限されず、例えば、前記本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体の製造方法における前記ポリヌクレオチドを前記宿主に導入する方法の説明を援用できる。本発明の製造方法において、前記宿主は、植物が好ましい。

[0213] 前記発現工程は、例えば、宿主内で、本発明の遺伝子から本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体を発現させる工程である。前記発現工程において、前記宿主は、例えば、本発明の遺伝子または前記発現ベクターが導入された形質転換体であることが好ましく、前記形質転換体の培養により、前記宿主において本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体を発現させることが好

ましい。

[0214] 前記宿主が植物の場合、本発明の形質転換体の製造方法は、さらに、前記導入工程により得られた形質転換体を繁殖する繁殖工程を含んでもよい。前記繁殖工程における繁殖方法は、例えば、前述の説明を援用できる。また、本発明の形質転換体の製造方法は、繁殖した形質転換体から採種する採種工程を含んでもよく、さらに、前記採種工程で得られた種子から生育体を生育する生育工程を含んでもよい。

実施例

[0215] 次に、本発明の実施例について説明する。ただし、本発明は、下記実施例により制限されない。

[0216] [実施例 1]

本発明の FRET 型蛍光タンパク質複合体を調製した。

[0217] (1) 発現ベクターの構築

前記表 5 に示す組合せ 1 および 2 について、それぞれ、下記表 7 および 8 に示すアミノ酸配列からなる蛍光タンパク質複合体 6 種類を設計した。また、組合せ 3 として、下記表 9 に示すアミノ酸配列からなる蛍光タンパク質複合体 3 種類を設計した。前記蛍光タンパク質複合体は、それぞれ、GS リンカー領域の繰り返し単位の数を変化させた。また、前記蛍光タンパク質複合体には、N 末端側に下線部に示す領域を付加した。下記アミノ酸配列において、前記下線部の領域は、開始コドンに該当するメチオニン残基、ヒスチジンタグ (His6 タグ) および GS リンカーから構成される。また、下記アミノ酸配列において、四角で囲んだリンカー領域中の AAA は、後述する発現ベクターの構築における制限酵素部位に由来するアミノ酸配列である。前記組合せ 1 および 2 は、FRET 型蛍光タンパク質複合体であり、前記組合せ 3 は、非 FRET 型蛍光タンパク質複合体である。

[0218]

[表7]

組合せ 1

組合せ 1-1 BK15-gs1-BL (n=1) 配列番号 5 2	MHHHHHHGGSMTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLTTTCMG YGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFP SQSPIFKDITVKSCPTVDLMLPMSGNI I ASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM (GGGGS) AAA TTFKIESRIHGNLNGEKFEL VGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLSHCMGYGFYHFASFPGTKNIYLHAATNGGYTNTRK E IYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFPSQSPIFKDITVKTCPTVDLMLPMSGNI I ASS YAKAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHTKENLAMVEYQQVFNSAP RDM
組合せ 1-2 BK15-gs2-BL (n=2) 配列番号 5 3	MHHHHHHGGSMTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLTTTCMG YGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFP SQSPIFKDITVKSCPTVDLMLPMSGNI I ASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM (GGGGSGGGGS) AAA TTFKIESRIHGNLNG EKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLSHCMGYGFYHFASFPGTKNIYLHAATNGGY TNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFPSQSPIFKDITVKTCPTVDLMLPMSGN I I ASSYAKAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHTKENLAMVEYQQV FNSAPRDM
組合せ 1-3 BK15-gs3-BL (n=3) 配列番号 5 4	MHHHHHHGGSMTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLTTTCMG YGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFP SQSPIFKDITVKSCPTVDLMLPMSGNI I ASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM (GGGGSGGGSGGGGS) AAA TTFKIESRIH GNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLSHCMGYGFYHFASFPGTKNIYLHAA TNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFPSQSPIFKDITVKTCPTVDLML PMSGNI I ASSYAKAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHTKENLAMV EYQQVFNSAPRDM

[表8]

組合せ 2

組合せ 2-1 BK15-gs1-W t (n=1) 配列番号 5 5	MHHHHHHGGSM TTFKIESRIHG NLNG EK FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMG YGFYHFASFPKG IKN IYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLPMSGNI IASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNDIFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM (GGGGS) AAA TTFKIESRIHG NLNG EK FEL VGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSHCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAATNGGYTNTRK EIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLPMSGNI IASS YARAFQLKDGSFYTAEVKNNDIFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHKENLAMVEYQQVFNSAP RDM
組合せ 2-2 BK15-gs2-W t (n=2) 配列番号 5 6	MHHHHHHGGSM TTFKIESRIHG NLNG EK FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMG YGFYHFASFPKG IKN IYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLPMSGNI IASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNDIFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM (GGGSGGGGS) AAA TTFKIESRIHG NLNG EK FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSHCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAATNGGY TNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLPMSGN I IASSYARAFQLKDGSFYTAEVKNNDIFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHKENLAMVEYQQV FNSAPRDM
組合せ 2-3 BK15-gs3-W t (n=3) 配列番号 5 7	MHHHHHHGGSM TTFKIESRIHG NLNG EK FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMG YGFYHFASFPKG IKN IYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLPMSGNI IASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNDIFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM (GGGSGGGSGGGGS) AAA TTFKIESRIH GNLNG EK FELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSHCMGYGFYHFASFPKGTKNIYLHAA TNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLML PMSGNI IASSYARAFQLKDGSFYTAEVKNNDIFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETHKENLAMV EYQQVFNSAPRDM

[表9]

組合せ 3

組合せ 3-1 BK15-gs1-BK15 (n=1) 配列番号 5 8	MHHHHHHGGSMTTFKIESRIHGNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMG YGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLMSGNI IASSYAYAFQLKDGsfyAEVKNNIDFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM(GGGGS)AAATTFKIESRIHGNGEKFEL VGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMGYGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGYTNTRK EIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFPsqspIFKDTIVKSCPTVDLMLMSGNI IASS YAYAFQLKDGsfyAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAP RDM
組合せ 3-2 BK15-gs2-BK15 (n=2) 配列番号 5 9	MHHHHHHGGSMTTFKIESRIHGNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMG YGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLMSGNI IASSYAYAFQLKDGsfyAEVKNNIDFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM(GGGSGGGGS)AAATTFKIESRIHGNG EKfELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMGYGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGY TNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFPsqspIFKDTIVKSCPTVDLMLMSGN I IASSYAYAFQLKDGsfyAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQV FNSAPRDM
組合せ 3-3 BK15-gs3-BK15 (n=3) 配列番号 6 0	MHHHHHHGGSMTTFKIESRIHGNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMG YGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLMSGNI IASSYAYAFQLKDGsfyAEVKNNIDFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM(GGGSGGGSGGGGS)AAATTFKIESRIH GNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMGYGFYHFASFPGIKNIYLHAA TNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVEICIGHGFPsqspIFKDTIVKSCPTVDLML PMSGNI IASSYAYAFQLKDGsfyAEVKNNIDFKNPIHESFSKSGPMFTHRRVEETLTENLAIV EYQQVFNSAPRDM

[0219] 前記 F R E T 型蛍光タンパク質複合体の各領域をコードするポリヌクレオチドを調製し、制限酵素で処理し、pEGFPベクター (clontech) のマルチクローニングサイト間に、EGFP領域に代えて、前記各 F R E T 型蛍光タンパク質複合体をコードするポリヌクレオチドを挿入した。これを、前記各 F R E T 型蛍光タンパク質複合体を発現する発現ベクターとした。前記各発現ベクターに挿入された、前記表 7 ~ 9 の F R E T 型蛍光タンパク質複合体をコードするポリヌクレオチドの塩基配列を、下記表 10 ~ 12 に示す。

[0220]

[表10]

組合せ 1

組合せ 1-1 BK15-gs1-BL (n=1) 配列番号 6 1	ATGCATCATCATCATCATGCGCGCAGCATGACAACCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTCTCCCTTCTGCTGACCACTTGCATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAACCTGAAGGACGGCTCTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCAGTTTACCCACAGACGTGTCGAGGAGACTCTCACCAGGAGAACCTTGCCATAGTGGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACAGCGCGCGACAA CCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCATGGCAACCTCAACGGGGAGAAGTTGAGTTGGTTGGAGGT GGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTC TCCCTTCTGCTGTCCCACTGCATGGGTTACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGA CTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAACAAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTAT GAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACTTCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGA CGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGA CTTGTCACCGGTGGACCTGATGTTGCCGATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTAAG GCCTTCCAACCTGAAGGACGGCTCTTCTACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAA TCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCGGGGCCCAGTTTACCCACAGACGTGTCGAGGAGACTC ACACCAAGGAGAACCTTGCCATGGTGGAGTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATG TAG
組合せ 1-2 BK15-gs2-BL (n=2) 配列番号 6 2	ATGCATCATCATCATCATCATGCGCGCAGCATGACAACCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTCTCCCTTCTGCTGACCACTTGCATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAACCTGAAGGACGGCTCTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCAGTTTACCCACAGACGTGTCGAGGAGACTCTCACCAGGAGAACCTTGCCATAGTGGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACAGCGGAGGTGGCT CTGCGGCGCGACAACCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCATGGCAACCTCAACGGGGAGAAGTTC

	GAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGATGAAGACTAAAGATAA ACCACTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGTCCCACTGCATGGGTACGGGTTCTACCACTTCGCCA GCTTCCCAAAGGGGACTAAGAATCTATCTTCATGCTGCAACAAACGGAGGTTACACCAACACC AGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACTCCGTTACACTTACGAGTTCAA CAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGAGTCCGATCTTCAAGG ACACGATCGTGAAGACTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCGATGTCCGGGAACATCATCGCC AGCTCCTACGCTAAGGCCTTCCAAGTGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGCAGAAGTCAAGAACAA CATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTGGGGGCCATGTTACCCACAGAC GTGTCGAGGAGACTCACACCAAGGAGAACCTTGCCATGGTGGAGTACCAGCAGGTTTCAACAGC GCCCCAAGAGACATGTAG
組合せ 1-3 BK15-gs3-BL (n=3) 配列番号 6 3	ATGCATCATCATCATCATGCGGGCAGCATGACAACCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCACTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGCATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGATTAAGAATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAAGTGAAGGACGGCTCTTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTCGAGGAGACTCTCACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACGGCGGAGGTGGCT CTGGCGGTGGCGGATCGGCGGCCGCGACAACCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCATGGCAACCTC AACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGAT GAAGACTAAAGATAAACCACTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGTCCCACTGCATGGGTACGGGT TCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGACTAAGAATCTATCTTCATGCTGCAACAAACGGA GGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACTCCGTTA CACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGA GTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGACTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCGATGTCC GGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTAAGGCCTTCCAAGTGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGC AGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTGGGGGCCA TGTTACCCACAGACGTGTCGAGGAGACTCACACCAAGGAGAACCTTGCCATGGTGGAGTACCAG CAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGTAG

[表11]

組合せ 2

組合せ 2-1 BK15-gs1-W t (n=1) 配列番号 6 4	ATGCATCATCATCATCATCATGGCGGCAGCATGACAACCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCAGTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAACTGAAGGACGGCTCTTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTCTACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACGCGGCCGACAAA CCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCATGGCAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGT GGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCAGTGGCATTCTC TCCCTTCCTGCTGTCCACTGCATGGGTTACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGA CTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAACAAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTAT GAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACTTCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGA CGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGT CGTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCGATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTAGA GCCTTCCAACTGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAA TCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCGGGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTC ACACCAAGGAGAACCTTGCCATGGTGGAGTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATG TAG
組合せ 2-2 BK15-gs2-W t (n=2) 配列番号 6 5	ATGCATCATCATCATCATCATGGCGGCAGCATGACAACCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCAGTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAACTGAAGGACGGCTCTTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTCTACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACGCGGAGGTGGCT CTGCGGCCGACAACTTCAAATCGAGTCCCGGATCCATGGCAACCTCAACGGGGAGAAGTTC

	GAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGATGAAGACTAAAGATAA ACCACTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGTCCCACTGCATGGGTACGGGTCTACCACTTCGCCA GCTTCCCAAAGGGGACTAAGAATCTATCTTCATGCTGCAACAAACGGAGGTTACACCAACACC AGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACTTCGGTTACACTTACGAGTTCAA CAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGAGTCCGATCTTCAAGG ACACGATCGTGAAGTCGTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCGATGTCCGGGAACATCATCGCC AGCTCCTACGCTAGAGCCTTCCAATGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGCAGAAGTCAAGAACAA CATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCGGGGCCCATGTTACCCACAGAC GTGTGAGGAGACTCACACCAAGGAGAACCTTGCCATGGTGGAGTACCAGCAGGTTTTCAACAGC GCCCCAAGAGACATGTAG
組合せ 2-3 BK15-gs3-W t (n=3) 配列番号 6 6	ATGCATCATCATCATCATGCGGCGAGCATGACAACCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCACTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGCATGGGT TACGGGTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGATTAAGAATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCTTCCAATGAAGGACGGCTCTTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTCTACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGGA GTACCAGCAGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGTTTACGGCGAGGTGGCT CTGGCGGTGGCGGATCGGCGGCCGCAACCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCATGGCAACCTC AACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGAT GAAGACTAAAGATAAACCACTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGTCCCACTGCATGGGTACGGGT TCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGACTAAGAATCTATCTTCATGCTGCAACAAACGGA GGTTACACCAACACAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACTTCGGTTA CACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGA GTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGTCGTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCGATGTCC GGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTAGAGCCTTCCAATGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGC AGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCGGGGCCCA TGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTCACACCAAGGAGAACCTTGCCATGGTGGAGTACCAG CAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGTAG

[表12]

組合せ 3

組合せ 3-1 BK15-gs1-BK15 (n=1) 配列番号 6 7	ATGCATCATCATCATCATGCGGCGAGCATGACAACCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGCGATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAAGTGAAGGACGGCTCTTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTCTACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACGCGGCCGCGACAA CCTTCAAATCGAGTCCCGATCCACGGCAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGT GGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTC TCCCTTCCTGCTGACCACTTGCGATGGGTACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCAAAGGGGA TTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAACGAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTAT GAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACTTCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGA CGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGA GTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCaATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTAC GCCTTCCAAGTGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAA TCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCAGGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTC TCACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGGAGTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATG TAG
組合せ 3-2 BK15-gs2-BK15 (n=2) 配列番号 6 8	ATGCATCATCATCATCATCATGCGGCGAGCATGACAACCTTCAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGCGATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAAGTGAAGGACGGCTCTTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTCTACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACGCGGAGGTGGCT CTGCGGCCGCGACAACCTTCAAATCGAGTCCCGATCCACGGCAACCTCAACGGGGAGAAGTTC

	GAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGATGAAGACTAAAGATAA ACCACTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGCATGGGTTACGGGTTCTACCACTTCGCCA GCTTCCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAACGAACGGAGGTTACACCAACACC AGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACTTCGGTTACACTTACGAGTTCAA CAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGAGTCCGATCTTCAAGG ACACGATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCaATGTCCGGGAACATCATCGCC AGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAACCTGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGCAGAAGTCAAGAACAA CATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCCTTCTCGAAGTCAGGGCCCATGTTACCCACAGAC GTGTCGAGGAGACTCTACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGGAGTACCAGCAGGTTTTCAACAGC GCCCCAAGAGACATGTAG
組合せ 3-3 BK15-gs3-BK15 (n=3) 配列番号 69	ATGCATCATCATCATCATGCGGCGAGCATGACAACCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGCATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACAGCATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAACCTGAAGGACGGCTCTTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCCTTCTCGAAGTCA GGGCCCCATGTTACCCACAGACGTGTCGAGGAGACTCTACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACGGCGAGGTGGCT CTGGCGGTGGCGGATCGGCGGCGCGACAACCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCACGGCAACCTC AACGGGGAGAAGTTGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGATTGAGAT GAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTCTCCCTTCCTGCTGACCACTTGCATGGGTTACGGGT TCTACCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAACGAACGGA GGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGGAGGTCAACTTCCGTTA CACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGA GTCCGATCTTCAAGGACAGCATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCaATGTCC GGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAACCTGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGC AGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCCCTTCTCGAAGTCAGGGCCCA TGTTACCCACAGACGTGTCGAGGAGACTCTACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGGAGTACCAG CAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGTAG

[0221] なお、ネガティブコントロールとして、BK15のみを導入した発現ベクター、BLのみを導入した発現ベクターを、同様にして構築した。下記表に、前記BK15単独または前記BL単独の発現ベクターにより発現されるタンパク質のアミノ酸配列およびそれをコードするポリヌクレオチドの塩基配列を示す。なお、下記アミノ酸配列において、下線部は、前記FRET型蛍

光タンパク質複合体と同様である。

[0222] [表13]

BK15 配列番号 70	<u>MHHHHHHGGSMTTFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLTTCMG</u> YGFYHFASFPGIKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGHP SQSPIFKDTIVKSCPTVDLMLMSGNI IASSYAYAFQLKDGSFYTAEVKNNIDFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETLTENLAIVEYQQVFNSAPRDM
BK15 配列番号 71	<u>ATGCATCATCATCATCAT</u> ATGGCGGCAGCATGACAACCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCACGG CAACCTCAACGGGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCCTCGAGA TTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTCTCCCTTCTGCTGACCACTTGCATGGGT TACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCAAAGGGGATTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAAC GAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACT TCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCA AGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGAGTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCC AATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTACGCCTTCCAACGAAGGACGGCTCTTTCT ACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCTTCTCGAAGTCA GGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTCTCACCAGGAGAACCTTGCCATAGTGGA GTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGGGTGGAGGCGGTTACGCGGCCGCGACAA CCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCACGGCAACCTCAACGGGGAAGTTGAGTTGGTTGGAGGT GGAGTAGGTGAGGAGGTCGCCTCGAGATTGAGATGAAGACTAAAGATAAACCCTGGCATTCTC TCCCTTCTGCTGACCACTTGCATGGGTTACGGGTTCTACCACTTCGCCAGCTTCCAAAGGGGA TTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAACGAACGGAGGTTACACCAACACCAGGAAGGAGATCTAT GAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACTTCCGTTACACTTACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGA CGTCGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGAGTCCGATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGA GTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCaATGTCCGGGAACATCATCGCCAGCTCCTACGCTTAC GCCTTCCAACGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGCAGAAGTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAA TCCAATCCACGAGTCCTTCTCGAAGTCAGGGCCCATGTTACCCACAGACGTGTGAGGAGACTC TCACCAAGGAGAACCTTGCCATAGTGGAGTACCAGCAGGTTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATG TAG

[0223]

[表14]

BL 配列番号 7 2	MHHHHHHGGSMITFKIESRIHGNLNGEKFELVGGGVGEEGRLEIEMKTKDKPLAFSPFLLSHCMG YGFYHFASFPGTKNIYLHAATNGGYTNTRKEIYEDGGILEVNFRTYEFNKIIGDVECIHGFP SQSPIFKDTIVKTCPTVDLMLPMSGNI I ASSYAKAFQLKDG SFYTA EVKNNIDFKNPIHESFSKS GPMFTHRRVEETHKENLAMVEYQQVFNSAPRDM
BL 配列番号 7 3	ATGCATCATCATCATCATCATGACAACCTTCAAAATCGAGTCCCGGATCCATGGCAACCTCAACG GGGAGAAGTTCGAGTTGGTTGGAGGTGGAGTAGGTGAGGAGGGTCGCTCGAGATTGAGATGAAG ACTAAAGATAAACCACTGGCATTCTCTCCCTTCTGCTGTCCCACTGCATGGGTTACGGTTCTA CCACTTCGCCAGCTTCCCAAAGGGGACTAAGAACATCTATCTTCATGCTGCAACAAACGGAGGTT ACACCAACACCAGGAAGGAGATCTATGAAGACGGCGGCATCTTGAGGTCAACTCCGTTACACT TACGAGTTCAACAAGATCATCGGTGACGTGAGTGCATTGGACATGGATTCCCAAGTCAGAGTCC GATCTTCAAGGACACGATCGTGAAGACTTGTCCACGGTGGACCTGATGTTGCCGATGTCCGGGA ACATCATCGCCAGCTCCTACGCTAAGGCCTTCCAACCTGAAGGACGGCTCTTTCTACACGGCAGAA GTCAAGAACAACATAGACTTCAAGAATCCAATCCACGAGTCTTCTCGAAGTCGGGGCCCATGTT CACCCACAGACGTGTCGAGGAGACTCACACCAAGGAGAACCTTGCCATGGTGGAGTACCAGCAGG TTTTCAACAGCGCCCCAAGAGACATGTAG

[0224] (2) 大腸菌への導入

大腸菌DH5 α 株に、前記各発現ベクターを、それぞれ単独で、ヒートショック法により形質導入した。得られた形質転換体を、抗生物質（アンピシリン）100 μ g/mLを含有するLB培地を用いて、37℃で16～18時間培養した。そして、培養した菌体を集菌し、得られたペレットを、プロテアーゼ阻害剤（complete, EDTA-free、ロシュ社製）1錠を含むPBS溶液40mLを用いて、2回洗浄した。前記洗浄後のペレットを、前記プロテアーゼ阻害剤を含むPBS溶液1.5mLに懸濁した。つぎに、得られた懸濁液を、超音波ホモジナイザー（QSONICA、ワケンビーテック株式会社製）を用いて、Amp25%、1分間の条件で、2回超音波処理した。そして、前記処理後の懸濁液を、1300rpm、4℃の条件で、10分間遠心し、得られた上清を回収した。各発現ベクターを導入した形質転換体から得られた上清を、前記表7～9に示すFRET型蛍光タンパク質複合体サンプルとした。前記各上清中のタンパク質濃度は、前記各上清に、Protein Assay（Bio Rad社製）を添加後、マイクロプレートリーダー（Infinite（登録商標）M1000Pro

、TECAN社製）を用いて、562nmにおける吸光度を測定することにより決定した。

[0225] [実施例2]

本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体の蛍光活性を確認した。

[0226] 前記実施例1で調製した、BK15-gs1-BL、BK15-gs1-Wtの上清サンプルを、2μmol/Lとなるように希釈した。これら希釈サンプル50μLについて、前記マイクロプレートリーダーを用い、下記測定条件で蛍光強度（FI）を測定した。また、ネガティブコントロールであるBK15の上清サンプルについても、同様に測定した。プレートは、HTS 384well C-Flat Fluorescence Black Plate (#781076、greiner bio-one)を使用した。

[0227] (測定条件)

励起波長：400nm（バンド幅：5nm）

蛍光（検出）波長：516nm（バンド幅：5nm）

レーザー強度（Gain）：105

[0228] 励起波長（Ex）400nm、蛍光波長（Em）516nmに固定した結果を、図1に示す。図1は、各FRET型蛍光タンパク質複合体について、上記条件での蛍光強度（FI）を示すグラフである。図1に示すように、BK15単独と比較して、BK15と、BLまたはWtとを連結したFRET型蛍光タンパク質複合体は、より強い蛍光強度の発光を示した。前記FRET型蛍光タンパク質複合体において前記第2蛍光タンパク質に該当するBLおよびWtは、外部からの励起波長400nmよりも、前記複合体内のBK15の蛍光波長512nmにおいて、より強い蛍光強度を示す。このため、BK15とBLまたはWtとを連結したFRET型蛍光タンパク質複合体とすることで、前記複合体内の励起によって、BK15単独よりも強い発光強度を実現できる。また、BLまたはWt単独の場合、それらを発光させるには、例えば、励起波長507～508nmの照射が必要であるが、その場合、得られる発光の波長516～517nmであるため、発光の視認には、他

の光をカットする光学フィルムの使用が必要になる。しかしながら、前記 F R E T 型蛍光タンパク質複合体は、B L または W t に適した励起波長（507～508 nm）の光ではなく、B K 1 5 を発光させる励起波長（400 nm）の光の照射が可能であり、さらに B K 1 5 の発光により、B L または W t を励起して発光させることができる。このため、前述のような光学フィルムも不要である。

[0229] [実施例 3]

本発明の F R E T 型蛍光タンパク質複合体の蛍光活性を確認した。

[0230] 前記実施例 1 で調製した、B K 1 5 - g s 2 - B L、B K 1 5 - g s 2 - W t および B K 1 5 - g s 2 - B K 1 5 の上清サンプルを、 $2 \mu\text{mol/L}$ となるように希釈した。これら希釈サンプル $50 \mu\text{L}$ について、前記マイクロプレートリーダーを用い、下記測定条件で、前記実施例 2 と同様にして、蛍光強度（F I）を測定した。また、ネガティブコントロールである B K 1 5 の上清サンプルおよび B L の上清サンプルについても、同様に測定した。

[0231] (測定条件)

励起波長：350～650 nm（バンド幅：5 nm）

蛍光（検出）波長：350～650 nm（バンド幅：5 nm）

レーザー強度（G a i n）：105

[0232] 励起波長（E x）が400 nmであり、蛍光検出波長（E m）が400～600 nmの場合の結果を、図 2（A）に示し、前記図 2（A）における最も高い蛍光強度の結果を、図 2（B）に示す。また、表 15 に、最大の蛍光強度および前記蛍光強度を示した蛍光検出波長を示す。

[0233] 図 2（A）および（B）に示すように、B K 単独および B L 単独の場合と比較して、各 F R E T 型蛍光タンパク質複合体によれば、蛍光強度が有意に増加し、具体的には、蛍光極大波長における蛍光強度が有意に増加した。また、図 2（A）および表 15 に示すように、前記第 1 蛍光タンパク質として B K 1 5 を使用し、前記第 2 蛍光タンパク質として前記第 1 蛍光タンパク質とは別の蛍光タンパク質である B L または W t を使用した B K 1 5 - g s 2

ーBLおよびBK15-gs2-Wtは、最も高い蛍光強度を示す波長が、BK単独よりも長波長側にシフトした。これらの結果から、前記第1蛍光タンパク質であるBK15が400nmの励起光で励起され、それにより得られる発光により、前記第2蛍光タンパク質（BL、Wt）がさらに励起され、発光したことがわかる。なお、図示していないが、Wt単独の結果は、BLと同様である。

[0234] [表15]

	F1	Em max (nm)
BK15-gs2-BL	6040	515 nm
BK15-gs2-Wt	9104	517 nm
BK15-gs2-BK15	7190	512 nm
BK15	4477	512 nm
BL	201	517 nm

[0235] また、励起波長の全範囲および蛍光波長の全範囲の測定結果を、図3に示す。図3の各図は、X軸方向が、励起波長を示し、Y軸方向が、蛍光波長を示し、Z軸方向が、蛍光強度を示す。また、表16に、発光ピークの発光強度、最大励起波長、発光極大波長を示す。

[0236] 図3に示すように、BK15単独は、400nm等の低波長域では、発光ピークを示すものの、その強度F1は、15,000程度であった。他方、BL単独は、400nmを含む低波長域では発光ピークは示さないが、高波長域の強度F1は、BK15よりも一桁大きい150,000を示した。これに対して、前記FRET型蛍光タンパク質複合体は、いずれも、400nm等の低波長域のピークの他に、高波長域においてもピークが確認できた。この結果からも、前記FRET型蛍光タンパク質複合体は、前記図2で述べたように、400nmで励起した場合、第1蛍光タンパク質のBK15が励起され発光し、この発光によって、さらに第2蛍光タンパク質であるBL、Wtが励起され発光していることがわかる。

[0237]

[表16]

	Peak1			Peak2		
	F1	Ex max (nm)	Em max (nm)	F1	Ex max (nm)	Em max (nm)
BK15-gs2-BL	27238	396-404	511-519	149404	501-509	511-519
BK15-gs2-Wt	38881	401-409	516-524	199834	506-514	516-524
BK15-gs2-BK15	29426	401-409	511-519			
BK15	18181	396-404	511-519			
BL				171375	501-509	511-519

[0238] [実施例4]

本発明のFRET型蛍光タンパク質複合体の蛍光活性を確認した。

[0239] 前記実施例1で調製した、BK15-gs3-BL、BK15-gs3-WtおよびBK15-gs3-BK15の上清サンプルを、 $2\mu\text{mol/L}$ となるように希釈した。これら希釈サンプル $50\mu\text{L}$ について、前記マイクロプレートリーダーを用い、下記測定条件で、前記実施例2と同様にして、蛍光強度(FI)を測定した。また、ネガティブコントロールであるBK15の上清サンプルおよびBLの上清サンプルについても、同様に測定した。

[0240] (測定条件)

励起波長：350～650nm (バンド幅：5nm)

蛍光(検出)波長：350～650nm (バンド幅：5nm)

レーザー強度(Gain)：105

[0241] 励起波長(Ex)が400nmであり、蛍光検出波長(Em)が400～600nmの場合の結果を、図4(A)に示し、前記図4(A)における最も高い蛍光強度の結果を、図4(B)に示す。また、表17に、最大の蛍光強度および前記蛍光強度を示した蛍光検出波長を示す。

[0242] 図4(A)および(B)に示すように、BK単独およびBL単独の場合と比較して、各FRET型蛍光タンパク質複合体によれば、蛍光強度が有意に増加し、具体的には、蛍光極大波長における蛍光強度が有意に増加した。また、図4(A)および表17に示すように、前記第1蛍光タンパク質としてBK15を使用し、前記第2蛍光タンパク質として前記第1蛍光タンパク質

とは別の蛍光タンパク質であるBLまたはWtを使用したBK15-gs3-BLおよびBK15-gs3-Wtは、最も高い蛍光強度を示す波長が、BK単独よりも長波長側にシフトした。これらの結果から、前記第1蛍光タンパク質であるBK15が400nmの励起光で励起され、それにより得られる発光により、前記第2蛍光タンパク質（BL、Wt）がさらに励起され、発光したことがわかる。なお、図示していないが、Wt単独の結果は、BLと同様である。

[0243] [表17]

	F1	Em max (nm)
BK15-gs3-BL	6050	515 nm
BK15-gs3-Wt	7785	517 nm
BK15-gs3-BK15	7023	513 nm
BK15	4477	512 nm
BL	201	517 nm

[0244] また、励起波長の全範囲および蛍光波長の全範囲の測定結果を、図5に示す。図5の各図は、図4と同様に、X軸方向が、励起波長を示し、Y軸方向が、蛍光波長を示し、Z軸方向が、蛍光強度を示す。また、表18に、最大の蛍光強度および前記蛍光強度を示した蛍光検出波長を示す。前述のように、BK15単独は、400nm等の低波長域では、発光ピークを示すものの、その強度F1は、15,000程度であった。他方、BL単独は、400nmを含む低波長域では発光ピークは示さないが、高波長域の強度F1は、BK15よりも一桁大きい150,000を示した。これに対して、図5に示すように、前記FRET型蛍光タンパク質複合体は、いずれも、400nm等の低波長域のピークの他に、高波長域においてもピークが確認できた。この結果からも、前記FRET型蛍光タンパク質複合体は、前記図4で述べたように、400nmで励起した場合、第1蛍光タンパク質のBK15が励起され発光し、この発光によって、さらに第2蛍光タンパク質であるBL、Wtが励起され発光していることがわかる。

[0245]

[表18]

	Peak1			Peak2		
	Fl	Ex max (nm)	Em max (nm)	Fl	Ex max (nm)	Em max (nm)
BK15-gs3-BL	26268	396-404	511-519	134371	501-509	511-519
BK15-gs3-Wt	32103	396-404	516-524	161489	506-514	516-524
BK15-gs3-BK15	28335	396-404	511-519			
BK15	18181	396-404	511-519			
BL				171375	501-509	511-519

[0246] 以上、実施形態および実施例を参照して本発明を説明したが、本発明は、上記実施形態および実施例に限定されるものではない。本発明の構成や詳細には、本発明のスコープ内で当業者が理解しうる様々な変更をできる。

[0247] この出願は、2016年11月30日に出願された日本出願特願2016-232746を基礎とする優先権を主張し、その開示の全てをここに取り込む。

[0248] <付記>

上記の実施形態および実施例の一部または全部は、以下の付記のように記載されうるが、以下には限られない。

(付記1)

第1蛍光タンパク質と第2蛍光タンパク質とを含み、
前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが連結されており、
前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質との組み合わせは、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長(L1)と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長(E2)とが、重複している組み合わせであることを特徴とする蛍光タンパク質複合体。

(付記2)

前記第2蛍光タンパク質は、

前記第1蛍光タンパク質の励起波長(E1)で前記第2蛍光タンパク質を励起した際の発光強度(I_{2E1})と、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長(L1)で前記第2蛍光タンパク質を励起した際の発光強度(I_{2L1})とが、

$I_{2E1} < I_{2L1}$ の関係を満たすタンパク質である、付記 1 記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 3)

前記第 1 蛍光タンパク質と前記第 2 蛍光タンパク質とが、異なるタンパク質である、付記 1 または 2 記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 4)

前記第 1 蛍光タンパク質の最大励起波長と前記第 2 蛍光タンパク質の最大励起波長とが異なる、付記 3 記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 5)

前記第 1 蛍光タンパク質の蛍光波長 ($L1$) と、前記第 2 蛍光タンパク質の励起波長 ($E2$) とが、 $350 \sim 650 \text{ nm}$ の波長を含む、付記 1 から 4 のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 6)

前記第 1 蛍光タンパク質の蛍光波長 ($L1$) が、前記第 2 蛍光タンパク質の最大励起波長 ($E2_{max}$) を含む、付記 1 から 5 のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 7)

前記第 2 蛍光タンパク質の蛍光波長 ($L2$) が、 $490 \sim 650 \text{ nm}$ の範囲を含む、付記 1 から 6 のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 8)

前記第 1 蛍光タンパク質と前記第 2 蛍光タンパク質とが、リンカーを介して連結されている、付記 1 から 7 のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 9)

前記リンカーが、ペプチドリinkerである、付記 8 記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 10)

前記ペプチドリinkerが、グリシンセリンリンカー領域を含む、付記 9 記載

の蛍光タンパク質複合体。

(付記 1 1)

前記グリシンセリンリンカー領域が、配列番号 48 (GGGGS) のアミノ酸配列からなるペプチド単位を有する、付記 10 記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 1 2)

前記グリシンセリンリンカー領域が、前記ペプチド単位が 1～3 個連結されたリンカーである、付記 11 記載の蛍光タンパク質複合体。

(付記 1 3)

付記 1 から 12 のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体に、前記蛍光タンパク質複合体における前記第 1 蛍光タンパク質の励起波長の光を照射する工程を含み、

前記第 1 蛍光タンパク質に、前記第 1 蛍光タンパク質の励起波長の光を照射することで、前記第 1 蛍光タンパク質を発光させ、

前記第 1 蛍光タンパク質の発光により、前記蛍光タンパク質複合体における前記第 2 蛍光タンパク質を励起して、前記第 2 蛍光タンパク質を発光させることを特徴とする蛍光タンパク質の発光方法。

(付記 1 4)

さらに、前記第 2 蛍光タンパク質の発光の検出工程を含む、付記 13 記載の発光方法。

(付記 1 5)

第 1 蛍光タンパク質をコードする第 1 核酸配列と、第 2 蛍光タンパク質をコードする第 2 核酸配列とを含み、

前記第 1 核酸配列と前記第 2 核酸配列とは、前記第 1 蛍光タンパク質と前記第 2 蛍光タンパク質とが連結された複合体として発現されるように、連結されており、

前記第 1 蛍光タンパク質と前記第 2 蛍光タンパク質の組み合わせは、前記第 1 蛍光タンパク質の蛍光波長 (L1) と、前記第 2 蛍光タンパク質の励起波

長（E2）とが、重複している組み合わせであることを特徴とする、蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子。

（付記16）

前記第1核酸配列と前記第2核酸配列とが、リンカーをコードする核酸配列を介して連結されている、付記15記載の遺伝子。

（付記17）

付記15または16記載の蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子を含むことを特徴とする発現ベクター。

（付記18）

付記15または16記載の蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子または付記17記載の発現ベクターを含むことを特徴とする形質転換体。

産業上の利用可能性

[0249] 本発明によれば、前記第1蛍光タンパク質と前記蛍光タンパク質とを前述の条件で組合せることにより、例えば、外部からの励起光が、前記第2蛍光タンパク質の励起条件とは異なる場合や最大励起波長から外れている場合であっても、前記第1蛍光タンパク質の発光による励起により、前記第2蛍光タンパク質を発光することができる。このため、本発明によれば、例えば、蛍光タンパク質を単独で使用する場合と比較して、より広い光学的条件の設定が可能になる。

請求の範囲

- [請求項1] 第1蛍光タンパク質と第2蛍光タンパク質とを含み、
前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが連結されており、
前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質との組み合わせは、
前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（ L_1 ）と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長（ E_2 ）とが、重複している組み合わせであることを特徴とする蛍光タンパク質複合体。
- [請求項2] 前記第2蛍光タンパク質は、
前記第1蛍光タンパク質の励起波長（ E_1 ）で前記第2蛍光タンパク質を励起した際の発光強度（ $I_{2_{E_1}}$ ）と、前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（ L_1 ）で前記第2蛍光タンパク質を励起した際の発光強度（ $I_{2_{L_1}}$ ）とが、 $I_{2_{E_1}} < I_{2_{L_1}}$ の関係を満たすタンパク質である、請求項1記載の蛍光タンパク質複合体。
- [請求項3] 前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが、異なるタンパク質である、請求項1または2記載の蛍光タンパク質複合体。
- [請求項4] 前記第1蛍光タンパク質の最大励起波長と前記第2蛍光タンパク質の最大励起波長とが異なる、請求項3記載の蛍光タンパク質複合体。
- [請求項5] 前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（ L_1 ）と、前記第2蛍光タンパク質の励起波長（ E_2 ）とが、350～650nmの波長を含む、請求項1から4のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体。
- [請求項6] 前記第1蛍光タンパク質の蛍光波長（ L_1 ）が、前記第2蛍光タンパク質の最大励起波長（ $E_{2_{max}}$ ）を含む、請求項1から5のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体。
- [請求項7] 前記第2蛍光タンパク質の蛍光波長（ L_2 ）が、490～650nmの範囲を含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体。
- [請求項8] 前記第1蛍光タンパク質と前記第2蛍光タンパク質とが、リンカーを

介して連結されている、請求項 1 から 7 のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体。

[請求項9] 前記リンカーが、ペプチドリンカーである、請求項 8 記載の蛍光タンパク質複合体。

[請求項10] 前記ペプチドリンカーが、グリシンセリンリンカー領域を含む、請求項 9 記載の蛍光タンパク質複合体。

[請求項11] 前記グリシンセリンリンカー領域が、配列番号 48 (GGGGS) のアミノ酸配列からなるペプチド単位を有する、請求項 10 記載の蛍光タンパク質複合体。

[請求項12] 前記グリシンセリンリンカー領域が、前記ペプチド単位が 1 ～ 3 個連結されたリンカーである、請求項 11 記載の蛍光タンパク質複合体。

[請求項13] 請求項 1 から 12 のいずれか一項に記載の蛍光タンパク質複合体に、前記蛍光タンパク質複合体における前記第 1 蛍光タンパク質の励起波長の光を照射する工程を含み、
前記第 1 蛍光タンパク質に、前記第 1 蛍光タンパク質の励起波長の光を照射することで、前記第 1 蛍光タンパク質を発光させ、
前記第 1 蛍光タンパク質の発光により、前記蛍光タンパク質複合体における前記第 2 蛍光タンパク質を励起して、前記第 2 蛍光タンパク質を発光させることを特徴とする蛍光タンパク質の発光方法。

[請求項14] さらに、前記第 2 蛍光タンパク質の発光の検出工程を含む、請求項 13 記載の発光方法。

[請求項15] 第 1 蛍光タンパク質をコードする第 1 核酸配列と、第 2 蛍光タンパク質をコードする第 2 核酸配列とを含み、
前記第 1 核酸配列と前記第 2 核酸配列とは、前記第 1 蛍光タンパク質と前記第 2 蛍光タンパク質とが連結された複合体として発現されるように、連結されており、
前記第 1 蛍光タンパク質と前記第 2 蛍光タンパク質の組み合わせは、前記第 1 蛍光タンパク質の蛍光波長 (L1) と、前記第 2 蛍光タンパ

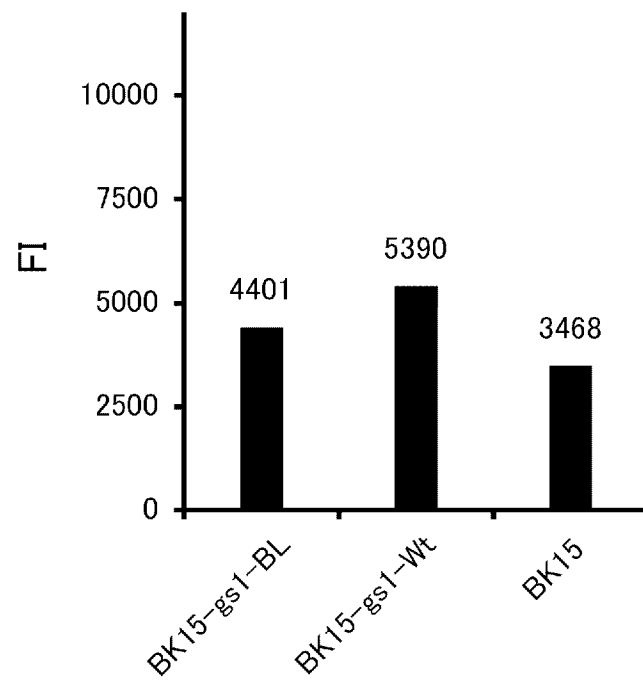
ク質の励起波長（E 2）とが、重複している組み合わせであることを特徴とする、蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子。

[請求項16] 前記第1核酸配列と前記第2核酸配列とが、リンカーをコードする核酸配列を介して連結されている、請求項15記載の遺伝子。

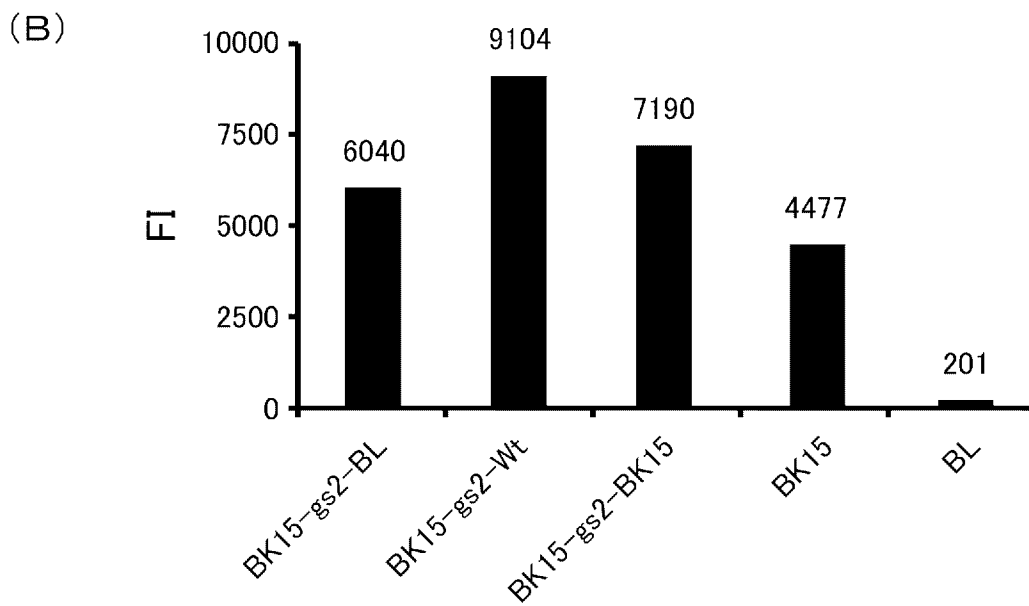
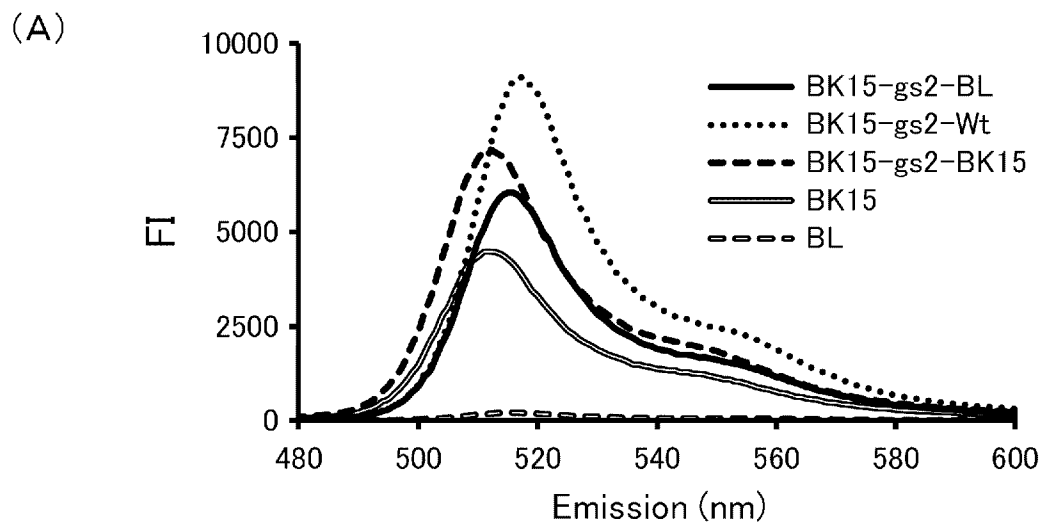
[請求項17] 請求項15または16記載の蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子を含むことを特徴とする発現ベクター。

[請求項18] 請求項15または16記載の蛍光タンパク質複合体をコードする遺伝子または請求項17記載の発現ベクターを含むことを特徴とする形質転換体。

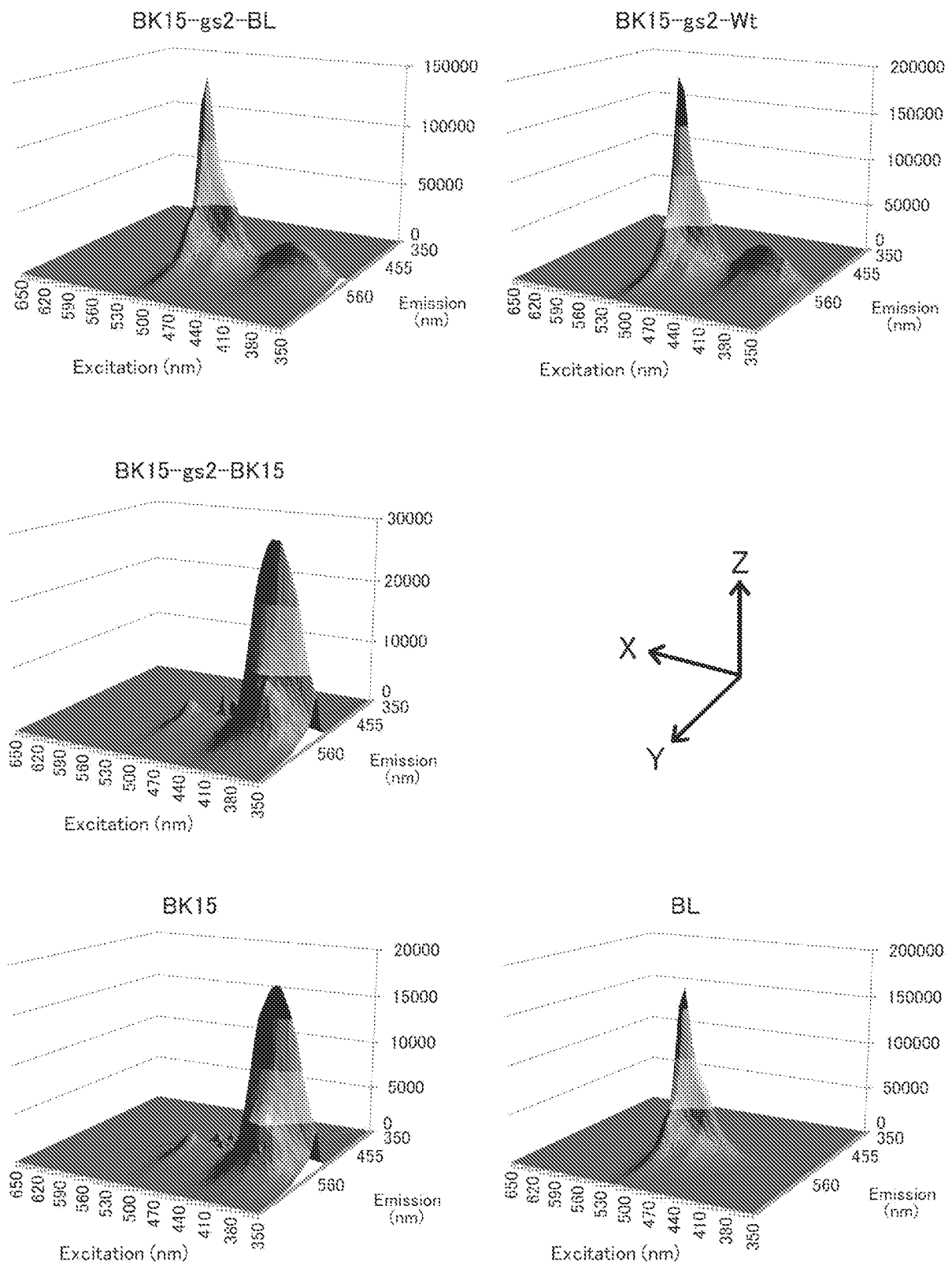
[図1]



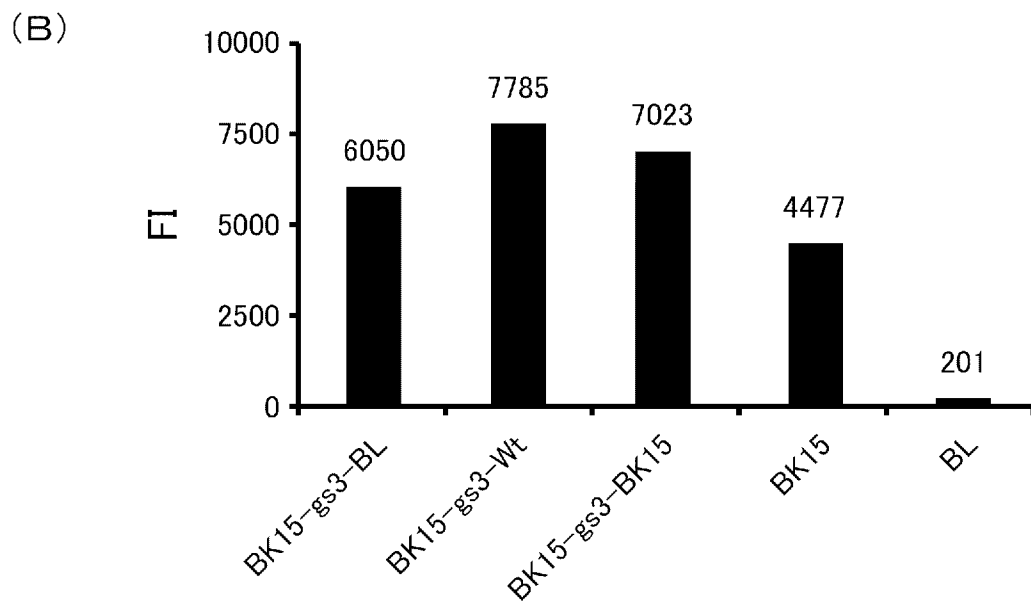
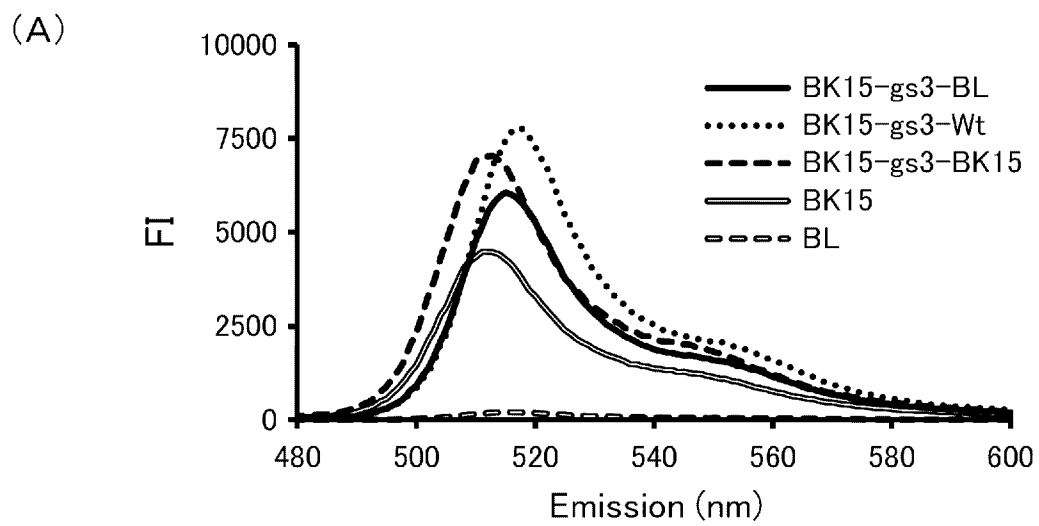
[図2]



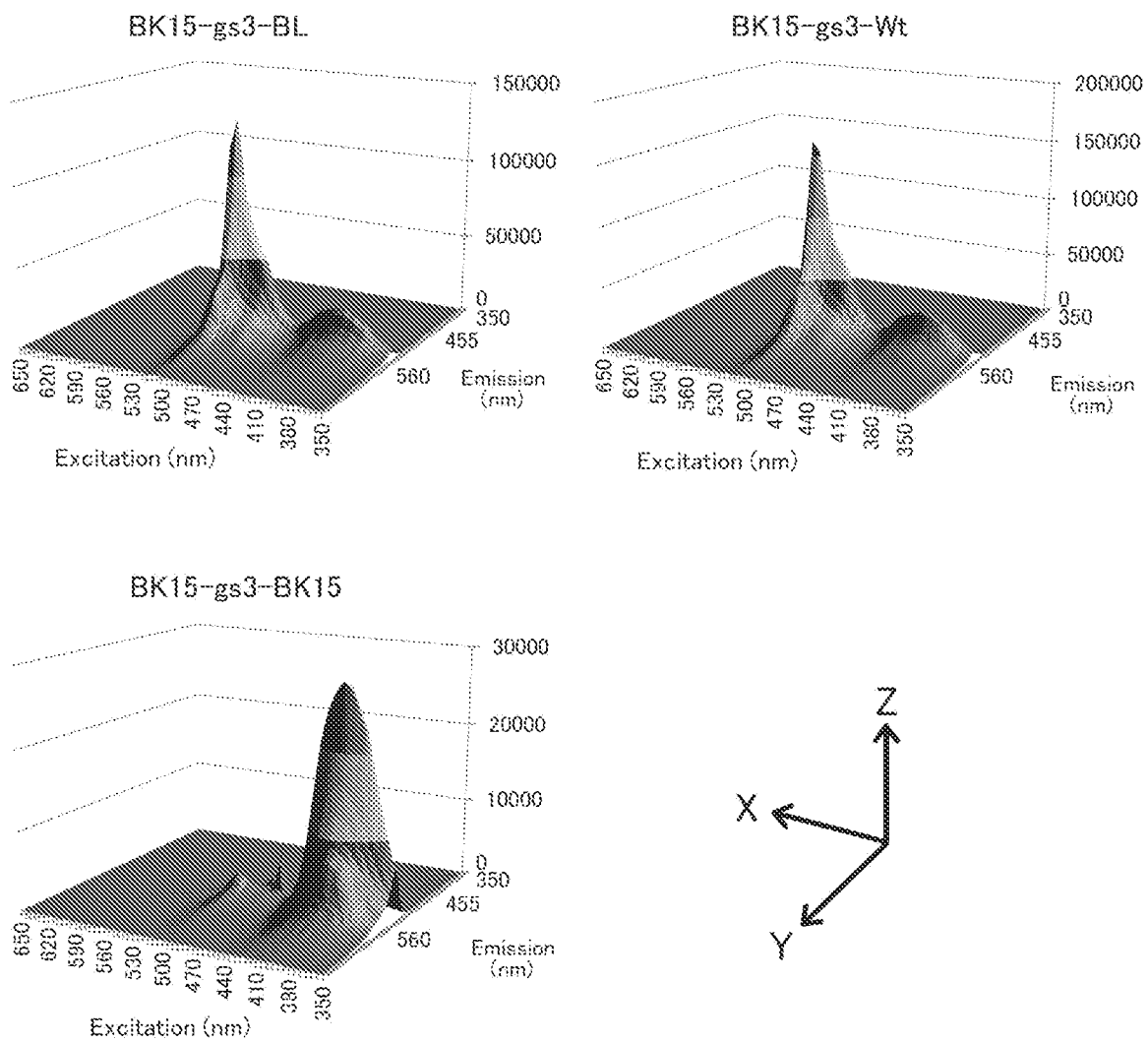
[図3]



[図4]



[図5]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2017/028174

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C12N15/09(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

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)

C12N15/09, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

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	1996-2017
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2017	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2017

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

JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamIII),
CAPLUS/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS(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	ARAI Ryoichi et al., Conformations of Variably Linked Chimeric Proteins Evaluated by Synchrotron X-ray Small-Angle Scattering, Proteins, 2004, Vol.57, No.4, pp.829-838, ABSTRACT, page 830, left column, line 27 to right column, line 3, page 831, right column, line 11 to page 832, left column, the last line	1-18
X	LI Gang et al., Construction of a linker library with widely controllable flexibility for fusion protein design, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2016.01, Vol.100, No.1, pp.215-225, Abstract, Fig. 5, page 217, left column, line 44 to right column, line 32	1-18

☐ 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
23 October 2017 (23.10.17)

Date of mailing of the international search report
31 October 2017 (31.10.17)

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

Authorized officer

Telephone No.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl. C12N15/09(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

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. C12N15/09, C07K19/00, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10

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	1971-2017年
日本国実用新案登録公報	1996-2017年
日本国登録実用新案公報	1994-2017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)
CAplus/WPIDS/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (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	ARAI Ryoichi et al., Conformations of Variably Linked Chimeric Proteins Evaluated by Synchrotron X-ray Small-Angle Scattering, Proteins, 2004, Vol. 57, No. 4, pp. 829-838, ABSTRACT、第 8 3 0 頁左欄第 2 7 行—右欄第 3 行、 第 8 3 1 頁右欄第 1 1 行—第 8 3 2 頁左欄最終行	1-18

☑ 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

23. 10. 2017

国際調査報告の発送日

31. 10. 2017

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)

厚田 一拓

4 N

5 5 7 5

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

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	LI Gang et al., Construction of a linker library with widely controllable flexibility for fusion protein design, Appl. Microbiol. Biotechnol., 2016.01, Vol.100, No.1, pp.215-225, Abstract、Fig.5、第217頁左欄第44行－右欄第32行	1-18