

(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
2025年1月2日(02.01.2025)



(10) 国際公開番号

WO 2025/005196 A1

(51) 国際特許分類:

C07K 14/435 (2006.01) C12N 1/21 (2006.01)
C12M 1/00 (2006.01) C12N 5/10 (2006.01)
C12N 1/13 (2006.01) C12N 15/09 (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) C12N 15/12 (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) C12P 21/02 (2006.01)

(21) 国際出願番号: PCT/JP2024/023407

(22) 国際出願日: 2024年6月27日(27.06.2024)

(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 2023-105343 2023年6月27日(27.06.2023) JP

(71) 出願人: 国立大学法人 東京大学 (THE UNIVERSITY OF TOKYO) [JP/JP]; 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 Tokyo (JP). 国立大学法人大阪大学 (OSAKA

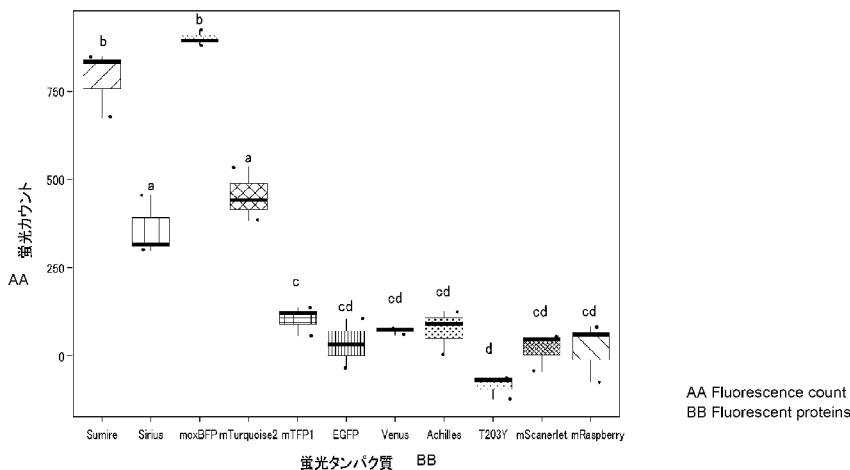
UNIVERSITY) [JP/JP]; 〒5650871 大阪府吹田市山田丘1番1号 Osaka (JP).

(72) 発明者: 田野井 慶太郎 (TANOI Keitaro); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 千葉 拓馬 (CHIBA Takuma); 〒1138654 東京都文京区本郷七丁目3番1号 国立大学法人東京大学内 Tokyo (JP). 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). 杉浦 一徳 (SUGIURA Kazunori); 〒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: 弁理士法人フィールズ国際特許事務所 (FIELDS IP ATTORNEYS PPC); 〒1000014 東京都千代田区永田町二丁目17番17号 アイオス永田町609 Tokyo (JP).

(54) Title: PROTEIN SCINTILLATOR

(54) 発明の名称: タンパク質シンチレーター



(57) Abstract: The present invention addresses the problem of providing: a protein that acts as a scintillator; and a method for designing a protein that acts as a scintillator. According to the present invention, a use of a β -barrel-type fluorescent protein as a scintillator is provided, wherein the β -barrel-type fluorescent protein has a fluorescence peak at 500 nm or less. According to the present invention, a method for designing a protein that acts as a scintillator is also provided, the method comprising (A) a step for identifying a specific amino acid residue in an amino acid sequence for a β -barrel-type fluorescent protein being mutated and (B) a step for constructing, on the basis of the amino acid sequence for the protein being mutated, an amino acid sequence having a structure such that the amino acid residue identified in the step (A) is substituted by another specific amino acid residue.

(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, CV, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IQ, IR, IS, IT, JM, JO, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MU, 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, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, 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, CV, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SC, 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, ME, 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))

(57) 要約: 本発明は、シンチレーターとして機能するタンパク質と、シンチレーターとして機能するタンパク質の設計方法の提供を目的とする。本発明によれば、シンチレーターとしてのβバレル型蛍光タンパク質の使用であって、βバレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である使用が提供される。本発明によればまた、シンチレーターとして機能するタンパク質の設計方法であって、(A) 変異対象であるβバレル型蛍光タンパク質のアミノ酸配列において、特定のアミノ酸を特定する工程と、(B) 変異対象タンパク質のアミノ酸配列に基づいて、工程(A)で特定されたアミノ酸を他の特定のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を構築する工程を含んでなる、設計方法が提供される。

明 細 書

発明の名称：タンパク質シンチレーター

関連出願の参照

[0001] 本願は、先行する日本国出願である特願2023-105343（出願日：2023年6月27日）の優先権の利益を享受するものであり、その開示内容全体は引用することにより本明細書の一部とされる。

技術分野

[0002] 本発明はタンパク質シンチレーターに関する。本発明はまた、シンチレーターとして機能するタンパク質の設計方法および製造方法、並びに放射線による光合成方法にも関する。

背景技術

[0003] これまでに生体内分子イメージングの手法の1つとして蛍光タンパク質が汎用されてきた。オワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質（a v G F P）はその発見以来、最も改変および改良がなされ、様々な活用がなされてきた蛍光タンパク質である。a v G F Pに様々な変異を導入することによって、波長や輝度、pH感受性、成熟速度など、機能が高度化した蛍光タンパク質が得られてきた。波長については、青色から赤色まで幅広い可視光を発するものが得られてきており、青色領域ではより短い波長の蛍光を発するものも得られている（非特許文献1および2）。

[0004] しかしながら、放射線（ α 線、 γ 線、 β 線、X線、電子線等）で励起され、蛍光を発するタンパク質はこれまで報告がなかった。

先行技術文献

特許文献

[0005] 非特許文献1：Sugiura K. and Nagai T., Communications Biology 5, 1172 (2022)

非特許文献2：Tomosugi W. et al., Nature Methods 6(5), 351-353 (2009)

発明の概要

[0006] 本発明者らは今般、 β バレル型蛍光タンパク質のうち短波長に蛍光ピークを有するものがシンチレーターとして機能することを見出した。本発明はこの知見に基づくものである。

[0007] 本発明は、シンチレーターとして機能するタンパク質を提供することを目的とする。本発明はまた、シンチレーターとして機能するタンパク質の設計方法および製造方法、並びに放射線でタンパク質を発光させることに伴う生物の光応答への応用利用方法を提供することを目的とする。

[0008] 本発明によれば以下の発明が提供される。

[1] シンチレーターとしての β バレル型蛍光タンパク質の使用であって、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、使用。

[2] 前記 β バレル型蛍光タンパク質が、下記(a)、(b)および(c)：

(a) 配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質、

(b) 配列番号1～4のいずれか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、かつ、 β 線または電子線により発光するタンパク質、および

(c) 配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列において、1または複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、かつ、 β 線または電子線により発光するタンパク質からなる群から選択されるタンパク質である、上記[1]に記載の使用。

[3] 前記 β バレル型蛍光タンパク質が、Sumire、Sirius、moxBFP、mTurquoise2、mTurquoise、SCFP1、SCFP2、SCFP3A、mTFP1およびoxBFPからなる群から選択される、上記[1]または[2]に記載の使用。

[4] シンチレーターとして機能するタンパク質の設計方法であって、下記工程(A)および(B)：

(A) 変異対象である β バレル型蛍光タンパク質のアミノ酸配列において、

下記（１）～（３）からなる群から選択される１個または２個以上のアミノ酸を特定する工程：

（１）配列番号１～４のいずれかのアミノ酸配列の６５位のアミノ酸に相当するアミノ酸；

（２）配列番号１～４のいずれかのアミノ酸配列の６６位のアミノ酸に相当するアミノ酸；

（３）配列番号１～４のいずれかのアミノ酸配列の２０３位のアミノ酸に相当するアミノ酸

（Ｂ）変異対象タンパク質のアミノ酸配列に基づいて、工程（Ａ）で特定された１個または２個以上のアミノ酸を下記アミノ酸に置換したアミノ酸配列を構築する工程

（１）配列番号１～４のいずれかのアミノ酸配列の６５位のアミノ酸に相当するアミノ酸：セリン（Ｓ）、グリシン（Ｇ）またはグルタミン（Ｑ）；

（２）配列番号１～４のいずれかのアミノ酸配列の６６位のアミノ酸に相当するアミノ酸：トリプトファン（Ｗ）、ヒスチジン（Ｈ）、チロシン（Ｙ）またはフェニルアラニン（Ｆ）；

（３）配列番号１～４のいずれかのアミノ酸配列の２０３位のアミノ酸に相当するアミノ酸：トレオニン（Ｔ）またはバリン（Ｖ）；

を含んでなる、設計方法。

〔５〕シンチレーターとして機能するタンパク質の調製方法であって、上記〔５〕に記載された設計方法により構築されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを宿主において発現させる工程を含んでなる、調製方法。

〔６〕 β バレル型蛍光タンパク質を β 線または電子線により発光させる、放射線による蛍光タンパク質の発光方法であって、 β バレル型蛍光タンパク質が５００ｎｍ以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、発光方法。

〔７〕 β バレル型蛍光タンパク質が非ヒト動物の体内に存在する、上記〔６〕に記載の発光方法。

〔８〕 β バレル型蛍光タンパク質を β 線または電子線により発光させ、前記

タンパク質が発する蛍光により光合成を駆動する、放射線による光合成方法であって、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、光合成方法。

[9] β バレル型蛍光タンパク質と、前記タンパク質が発する蛍光により光合成が駆動される光合成生物とを備えた光合成装置であって、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、光合成装置。

[10] β 線または電子線放出源をさらに備えた、上記[9]に記載の光合成装置。

[11] β バレル型蛍光タンパク質を発現可能に保有する光合成生物であって、前記タンパク質が発する蛍光により光合成が駆動され、かつ、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、光合成生物。

[12] 光合成生物がシアノバクテリアである、上記[11]に記載の光合成生物。

[0009] 本発明はこれまで報告がなされていないタンパク質シンチレーターを提供するものである。タンパク質シンチレーターは遺伝子操作により発現させることができるため、本発明は光遺伝学による生体機能の解明や新たな治療方法の開発に貢献するとともに、放射線による光合成技術にも貢献するものである。

図面の簡単な説明

[0010] [図1]図1は、Sumire、Sirius、moxBFP、mTurquoise2のそれぞれのアミノ酸配列を示した図である。

[図2]図2は、各蛍光タンパク質における ^{35}S 由来の放射線での発光を示す図である。各タンパク質の1分当たりの蛍光カウント値からバックグラウンド（タンパク質なしの溶液でのカウント値）を差し引いた値をプロットした。小文字のアルファベットは異符号間で有意差があることを示す（ $p < 0.05$ ）（Tukey検定）。

[図3]図3は、各蛍光タンパク質に照射した放射線強度と得られた蛍光カウントとの関係を示す図である。各タンパク質のカウント値からバックグラウンド（タンパク質なしの溶液でのカウント値）を差し引いた値をプロットした。

[図4]図4は、mTurquoise2およびmTurquoise2のアミノ酸配列203番目のトレオニン（T）をチロシン（Y）に変異させたもの（以下、T203Y変異体）の（A）励起波長スペクトルおよび（B）蛍光波長スペクトルを示す図である。

[図5]図5は、mTurquoise2およびT203Y変異体のそれぞれ立体構造および立体構造予測を示す図である。（A）は、mTurquoise2の立体構造（PDB ID：3ZTF）を示す。数値は203番目のアミノ酸残基と発色団との距離を示す。（B）はT203Y変異体の立体構造予測を示す。数値は203番目のアミノ酸残基と発色団との距離を示す図である。

発明の具体的説明

[0011] <βバレル型蛍光タンパク質>

本発明においてはβバレル型蛍光タンパク質をシンチレーターとして使用することができる。βバレル型蛍光タンパク質は、βバレルと呼ばれる樽型の立体構造を持ち、特定の波長の光を吸収した際により長波長の蛍光を発するタンパク質を意味する。

[0012] βバレル構造を有する蛍光タンパク質は当業者に周知であり、オワンクラゲ（*Aequorea victoria*）由来の緑色蛍光タンパク質（avGFP）またはavGFPと同じ折り畳み形態を有するその誘導体を含む。

[0013] 本発明においてβバレル型蛍光タンパク質としては、500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質が挙げられ、好ましくは480nm以下、450nm以下、または420nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質が挙げられる。なお、本発明において「蛍光ピーク」とは蛍光波長のピークを意味する。

- [0014] a v G F P から誘導された β バレル構造を有する蛍光タンパク質のうち、500 nm 以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質としては、例えば、紫色蛍光タンパク質、群青色蛍光タンパク質、青色蛍光タンパク質（B F P）、シアン色蛍光タンパク質（C F P）が挙げられる。
- [0015] 本発明においてタンパク質シンチレーターとして使用することができる蛍光タンパク質としては下記（a）、（b）および（c）：
- （a）配列番号 1～4 のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質、
 - （b）配列番号 1～4 のいずれか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、かつ、 β 線または電子線により発光するタンパク質、および
 - （c）配列番号 1～4 のいずれかのアミノ酸配列において、1 または複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、かつ、 β 線または電子線により発光するタンパク質
- からなる群から選択されるタンパク質が挙げられる。配列番号 1～4 のアミノ酸配列は図 1 に示される通りである。
- [0016] （a）の配列番号 1 のアミノ酸配列からなるタンパク質は、Sumire であり、414 nm に蛍光ピークを有する（非特許文献 1）。この蛍光タンパク質は a v G F P から誘導された紫色蛍光タンパク質である。
- [0017] （a）の配列番号 2 のアミノ酸配列からなるタンパク質は、Sirius であり、424 nm に蛍光ピークを有する（非特許文献 2）。この蛍光タンパク質は a v G F P から誘導された群青色蛍光タンパク質である。
- [0018] （a）の配列番号 3 のアミノ酸配列からなるタンパク質は、mox B F P であり、445 nm に蛍光ピークを有する（Heim R. & Tsien R Y, Current Biology, 6(2), pp178-182(1996)）。この蛍光タンパク質は a v G F P から誘導された青色蛍光タンパク質（B F P）である。
- [0019] （a）の配列番号 4 のアミノ酸配列からなるタンパク質は、mTurquoise 2（本明細書および図面において、「mTQ2」ということがある）であり、474 nm に蛍光ピークを有する（J. Goedhart et al., Nature

Communications Vol. 3, Article number: 751 (2012))。この蛍光タンパク質は a v G F P から誘導されたシアン色蛍光タンパク質 (C F P) である。

[0020] 本発明においては、配列番号 1～4 のアミノ酸配列におけるアミノ酸の位置の表記は、第 2 番目の V (バリン) を数えずに表記するものとする。これは野生型 G F P のアミノ酸位置番号に倣った当業界で慣用される表記である。例えば、S u m i r e (配列番号 1 のアミノ酸配列) の 6 5 位、6 6 位および 2 0 3 位のアミノ酸は、それぞれ G (グリシン)、Y (チロシン)、V (バリン) であるが、配列番号 1 の実際のアミノ酸配列 (第 2 番目の V を数える) では 6 6 位、6 7 位および 2 0 4 位のアミノ酸に対応する。

[0021] 本発明において「 β 線または電子線により発光する」とは、 β 線または電子線により基底状態から励起状態に遷移し、基底状態に戻る際に蛍光を放出することをいう。

[0022] 前記 (b) において、「同一性」は「相同性」を含む意味で用いられる。ここで「同一性」は、例えば、比較する配列同士を適切に整列 (アライメント) させたときの同一性の程度であり、前記配列間のアミノ酸の正確な一致の出現率 (%) を意味する。同一性の算出にあたっては、例えば、配列におけるギャップの存在およびアミノ酸の性質が考慮される (Wilbur, Natl. Acad. Sci. U.S.A. 80:726-730 (1983))。前記アライメントは、例えば、任意のアルゴリズムの利用により行うことができ、具体的に、B L A S T (Basic local alignment search tool) (Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 (1990))、F A S T A (Pearson et al., Methods in Enzymology 183:63-69 (1990))、S m i t h - W a t e r m a n (Meth. Enzym., 164, 765 (1988)) などの公に利用可能な相同性検索ソフトウェアを使用することができる。また、同一性の算出は、例えば、前記のような公に利用可能な相同性検索プログラムを用いて行うことができ、例えば、米国国立生物工学情報センター (N C B I) の相同性アルゴリズム B L A S T (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) において、デフォルトのパラメーターを用いることによって算出することができる。

[0023] 前記（b）における同一性は、例えば、80%以上、好ましくは85%以上、より好ましくは90%以上、さらに好ましくは91%以上、92%以上、93%以上、94%以上、95%以上、96%以上、97%以上、98%以上、99%以上または99.5%以上である。

[0024] 前記（c）のタンパク質は、配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列において、欠失、置換、挿入および付加からなる群から選択される1個または複数個の改変を有していてもよい。改変されるアミノ酸の個数は、例えば、1～47個、好ましくは1～35個、より好ましくは1～23個、さらに好ましくは1～21個、1～19個、1～16個、1～14個、1～11個、1～9個、1～7個、1～6個、1～5個または1～4個、特に好ましくは1～数個、1～3個、1～2個または1個である。改変されるアミノ酸の個数はまた、部位突然変異誘発法などの公知の方法により生じる程度の変異数、あるいは、天然に生じる程度の変異数とすることができる。このため「改変」は変異を含む意味で用いられるものとする。前記アミノ酸配列において、前記改変は、連続して生じていてもよいし、不連続に生じていてもよい。前記改変はまた、複数の同種の改変（例えば、複数の置換）であってもよいし、複数の異種の改変（例えば、1個以上の欠失と1個以上の置換の組合せ）であってもよい。

[0025] また、前記（c）におけるアミノ酸の挿入としては、例えば、アミノ酸配列の内部への挿入が挙げられる。さらに、アミノ酸の付加は、例えば、アミノ酸配列のN末端およびC末端のいずれかへの付加であっても、N末端およびC末端の両末端への付加であってもよい。

[0026] 前記アミノ酸の改変は保存的改変（例えば、保存的変異）であってもよい。「保存的改変」または「保存的変異」は、タンパク質の機能を実質的に改変しないように、1個または複数個のアミノ酸を改変し、または変異させることを意味する。前記アミノ酸の置換はまた、保存的置換であってもよい。

「保存的置換」は、タンパク質の機能を実質的に改変しないように、1個または複数個のアミノ酸を、別のアミノ酸および／またはアミノ酸誘導体に置

換することを意味する。保存的置換において、置換されるアミノ酸と置換後のアミノ酸とは、例えば、性質および／または機能が類似していることが好ましい。具体的には、疎水性および親水性の指標、極性、電荷などの化学的性質、あるいは二次構造などの物理的性質が類似していることが好ましい。このように、性質および／または機能が類似するアミノ酸またはアミノ酸誘導体は、当該技術分野において公知である。例えば、非極性アミノ酸（疎水性アミノ酸）としては、例えば、アラニン、バリン、イソロイシン、ロイシン、プロリン、トリプトファン、フェニルアラニン、メチオニンなどが挙げられる。極性アミノ酸（中性アミノ酸）は、グリシン、セリン、スレオニン、チロシン、グルタミン、アスパラギン、システインなどが挙げられる。陽電荷を有するアミノ酸（塩基性アミノ酸）は、アルギニン、ヒスチジン、リジンなどが挙げられ、負電荷を有するアミノ酸（酸性アミノ酸）は、アスパラギン酸、グルタミン酸などが挙げられる。

[0027] 本発明においてアミノ酸は、当業界で周知の以下の3文字表記又は1文字表記により特定することができる。

アラニン：A l a A

アルギニン：A r g R

アスパラギン：A s n N

アスパラギン酸：A s p D

システイン：C y s C

グルタミン：G l n Q

グルタミン酸：G l u E

グリシン：G l y G

ヒスチジン：H i s H

イソロイシン：I l e I

ロイシン：L e u L

リシン：L y s K

メチオニン：M e t M

フェニルアラニン：P h e F

プロリン：P r o P

セリン：S e r S

トレオニン：T h r T

トリプトファン：T r p W

チロシン：T y r Y

バリン：V a l V

[0028] 前記（b）および（c）のアミノ酸配列において、配列番号1～4のそれぞれのアミノ酸配列の65位、66位および／または203位のアミノ酸（特に203位のアミノ酸）は、もとの配列のままであること（改変されていないこと）が好ましい。

[0029] 前記（b）および（c）において、「 β 線または電子線により発光するタンパク質」であるか否かは、被験タンパク質の蛍光特性を指標に評価することができ、例えば、被験タンパク質に β 線または電子線を照射し、シンチレーションカウンター等を用いてシンチレーション光を測定することにより評価することができる。

[0030] タンパク質シンチレーターとして使用できるCFPとしては、mT u r q u o i s e 2 以外に、a v G F P から誘導された下記のタンパク質が挙げられる。

- ・ m T u r q u o i s e （本明細書および図面中で「m T Q」ということがある）（J. Goedhart et al., Nature Methods Vol. 7, 137-139 (2010)）
- ・ S C F P 3 A （GJ Kremers et al., Biochemistry, Vol. 45(21), 6570-6580 (2006)）
- ・ S C F P 2 （GJ Kremers et al., Biochemistry, Vol. 45(21), 6570-6580 (2006)）
- ・ S C F P 1 （GJ Kremers et al., Biochemistry, Vol. 45(21), 6570-6580 (2006)）
- ・ m T F P 1 （Hui-wang Ai et al., Biochem J. 400(3):531-540(2006)）

[0031] タンパク質シンチレーターとして使用できるBFPとしては、moxBFP以外に、avGFPから誘導された下記のタンパク質が挙げられる。

・oxBFP (Costantini Lm et al., Nature Communications, 6(1), 7670 (2015))

[0032] <放射線シンチレータータンパク質の設計方法>

本発明によればタンパク質シンチレーターの設計方法が提供される。本発明の設計方法は、(A) 変異対象である β バレル型蛍光タンパク質のアミノ酸配列において、下記(1)～(3)からなる群から選択される1個または2個以上のアミノ酸を特定する工程と(1)配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列の65位のアミノ酸に相当するアミノ酸；

(2) 配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列の66位のアミノ酸に相当するアミノ酸；

(3) 配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列の203位のアミノ酸に相当するアミノ酸

(B) 変異対象タンパク質のアミノ酸配列に基づいて、工程(A)で特定された1個または2個以上のアミノ酸を特定のアミノ酸に置換したアミノ酸配列を構築する工程とを含んでなるものである。

[0033] 工程(A)は、変異対象である β バレル型蛍光タンパク質を配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列と整列させ、配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列の特定位置のアミノ酸に相当するアミノ酸を変異対象である β バレル型蛍光タンパク質において特定することにより実施することができる。変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させる配列番号1～4のアミノ酸配列は、変異対象との同一性が最も高いものを選択することができる。

[0034] 工程(B)において、置換後のアミノ酸は以下のアミノ酸とすることができる。

(1) 配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列の65位のアミノ酸に相当するアミノ酸：セリン(S)、グリシン(G)またはグルタミン(Q)；

(2) 配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列の66位のアミノ酸に相当

するアミノ酸：トリプトファン（W）、ヒスチジン（H）、チロシン（Y）
またはフェニルアラニン（F）；

（3）配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列の203位のアミノ酸に相当するアミノ酸：トレオニン（T）またはバリン（V）

[0035] 上記（1）において、変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号3または4のアミノ酸配列の場合には、置換後の65位のアミノ酸はセリン（S）とすることができる。変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号1のアミノ酸配列の場合には、置換後の65位のアミノ酸はグリシン（G）とすることができる。変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号2のアミノ酸配列の場合には、置換後の65位のアミノ酸はグルタミン（Q）とすることができる。

[0036] 上記（2）において、変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号4のアミノ酸配列の場合には、置換後の66位のアミノ酸はトリプトファン（W）とすることができる。変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号3のアミノ酸配列の場合には、置換後の66位のアミノ酸はヒスチジン（H）とすることができる。変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号1のアミノ酸配列の場合には、置換後の66位のアミノ酸はチロシン（Y）とすることができる。変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号2のアミノ酸配列の場合には、置換後の66位のアミノ酸はフェニルアラニン（F）とすることができる。

[0037] 上記（3）において、変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号3または4のアミノ酸配列の場合には、置換後の203位のアミノ酸はトレオニン（T）とすることができる。変異対象である β バレル型蛍光タンパク質と整列させたアミノ酸配列が配列番号1または2のアミノ酸配列の場合には、置換後の203位のアミノ酸はバリン（V）とすることができる。

[0038] 変異対象である β バレル型蛍光タンパク質の特定位置（１）～（３）のいずれかのアミノ酸が既に上記のアミノ酸となっている場合にはその配列においてアミノ酸を置換する必要はない。

[0039] 上記（１）～（３）のアミノ酸のうち（３）のアミノ酸は β バレル構造の内面部位に関連する。（３）のアミノ酸を上記の通り特定アミノ酸とすることでタンパク質シンチレーターとしての機能確保を図ることができる。

[0040] 上記（１）～（３）のアミノ酸のうち（１）および（２）のアミノ酸は発光団に関連する。（１）および（２）のアミノ酸を上記の通りそれぞれ特定アミノ酸とすることでタンパク質シンチレーターとしての機能維持を図ることができる。

[0041] ＜タンパク質シンチレーターの調製方法＞

本発明によればタンパク質シンチレーターの調製方法が提供される。本発明の調製方法では、本発明の設計方法で構築したアミノ酸配列に基づいてタンパク質シンチレーターを調製することができ、具体的には、（Ｐ）本発明の設計方法により構築されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを宿主において発現させる工程を含んでなるものである。

[0042] 工程（Ｐ）は、ポリヌクレオチドを作動可能に連結してなる発現ベクターにより形質転換した宿主を培養することにより実施することができる。本発明の調製方法はまた、上記培養工程の後、培養して得られた宿主および／または培養物から発現産物を採取し、場合によっては調製対象タンパク質を単離または精製する工程をさらに含んでもよい。

[0043] 本発明において調製対象タンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドは、使用する宿主において発現可能で、かつ、タンパク質シンチレーターとして機能するタンパク質をコードするコドンで構成されたものであれば特に限定されることなく、使用する宿主において発現可能にするため、あるいは、発現量を増加させるためにコドンの最適化を行ってもよい。コドン最適化は、本分野において通常使用されている公知の方法によって行うことができる。

- [0044] 本発明の調製方法の一態様においては、調製対象タンパク質のアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを作動可能に連結してなる発現ベクターを準備し、これを用いて形質転換した宿主を培養することができる。
- [0045] 本発明の調製方法において、ポリヌクレオチドを挿入することができる発現ベクターは宿主に応じて選択することができ、本分野において通常使用されている発現ベクターであれば、特に制限はない。例えば、宿主において自立複製が可能なベクターや宿主染色体に組み込まれ得るベクターを発現ベクターとして使用することができる。宿主として大腸菌や枯草菌等の宿主微生物を用いる場合には、発現ベクターとして、例えば、pET、pBAD、pUCを用いることができる。
- [0046] 本発明において発現ベクターに連結できるプロモーターは宿主に応じて選択することができ、本分野において通常使用されているプロモーターであれば、特に限定はない。例えば、大腸菌ではtrpプロモーター、lacプロモーター、tacプロモーター、PLプロモーターのような大腸菌やファージなどに由来するプロモーターやそれらの改変体をプロモーターとして使用することができる。
- [0047] 本発明の調製方法において形質転換する宿主としては、本分野において通常使用されている宿主であれば、特に制限はない。例えば、細菌（大腸菌、枯草菌など）、酵母、糸状菌、昆虫細胞、真核細胞等の微生物または細胞を宿主として使用することができる。
- [0048] 本発明の調製方法において形質転換された宿主は、当該宿主の培養に適した培地において培養することができる。使用する培地は、宿主が生育でき、本発明の調製対象タンパク質を産生しうる栄養培地であれば特に限定されず、合成培地および天然培地のいずれであってもよい。また、時間、温度などの培養条件は、培養する宿主に適した条件を適宜選択することができる。
- [0049] <タンパク質シンチレーターとしての使用>

発光方法

本発明によればβバレル型蛍光タンパク質をβ線または電子線により発光

させる、放射線による蛍光タンパク質の発光方法が提供される。本発明の発光方法に使用する蛍光タンパク質は、前記の β バレル型蛍光タンパク質を用いることができる。

[0050] 本発明において「 β 線または電子線により発光させる」とは、 β 線または電子線により β バレル型蛍光タンパク質を基底状態から励起状態に遷移させ、基底状態に戻る際に蛍光を放出させることをいう。

[0051] 本発明の発光方法においては β 線放出源または電子線放出源を用いて β バレル型蛍光タンパク質を発光させることができる。 β 線放出源としては β 線を放出する放射性物質が挙げられる。 β 線を放出する放射性物質は特に限定されず、 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、 ^{90}Sr 、 ^{131}I 、 ^{137}Cs 等の放射性物質が挙げられる。また電子線放出源としては電子線を放出する機器が挙げられる。電子線を放出する機器（電子線放出器）は特に限定されないが、例えば、線形加速器が挙げられる。

[0052] 本発明の発光方法においては、 β 線または電子線の空気中または液体中の飛行距離や体内の透過距離を考慮して β バレル型蛍光タンパク質と β 線放出源または電子線放出源の配置を決定することができる。すなわち、本発明の発光方法は、 β バレル型蛍光タンパク質が β 線または電子線により励起されるように β 線放出源または電子線放出源と β バレル型蛍光タンパク質とを配置する工程を含むことができる。

[0053] 本発明の発光方法は、例えば、光遺伝学において利用できる。本発明の発光方法はまた、光合成においても利用できる。以下、それぞれについて説明する。

[0054] 光遺伝学への利用

本発明の発光方法においては、 β バレル型蛍光タンパク質をインビトロの細胞または組織に存在させることができる。すなわち、このような態様においては、外部から β 線または電子線を照射し、細胞または組織を透過した β 線または電子線により細胞または組織に存在する β バレル型蛍光タンパク質を発光させることができる。本発明の発光方法においてはまた、 β バレル型

蛍光タンパク質をヒトまたは非ヒト生物の内部に存在させることができる。すなわち、このような態様においては、ヒトまたは生物の外から β 線または電子線を照射し、生体を通過した β 線または電子線により体内に存在する β バレル型蛍光タンパク質を発光させることができる。非ヒト生物は特に限定されないが、非ヒト生物の非限定的例としては、マウス、ラット、サル、ウサギ等の非ヒト哺乳動物の他、昆虫、植物、微生物が挙げられる。

[0055] 光遺伝学の分野においては、光感受性タンパク質（例えば、オプシン）を細胞、組織または生体内に存在させ、光照射により細胞機能を操作する技術が知られている。本発明の発光方法においては、可視光が透過しにくい生体内に β バレル型蛍光タンパク質を存在させ、該タンパク質を β 線または電子線により発光させ、その蛍光により光感受性タンパク質を刺激し、生体内の細胞やタンパク質の機能を遠隔的に操作することができる。本発明の発光方法において β バレル型蛍光タンパク質を生体内に存在させた態様は、生体内へ光ファイバーを埋設する手術が不要である上に、 β バレル型蛍光タンパク質を標的部位において発現させることができる点で有利である。このような態様においては、光感受性タンパク質が存在する部位の近傍に β バレル型蛍光タンパク質を存在させることができ、例えば、組織特異的発現技術等により標的部位特異的に β バレル型蛍光タンパク質を発現させることができる。

[0056] 光合成への利用

本発明の発光方法においては、 β 線または電子線により発光させ、 β バレル型蛍光タンパク質の蛍光により光合成を駆動することができる。すなわち、本発明によれば、 β バレル型蛍光タンパク質を β 線または電子線により発光させ、 β バレル型蛍光タンパク質の蛍光により光合成を駆動する、放射線による光合成方法が提供される。

[0057] 本発明においては蛍光で光合成を駆動することにより光エネルギーを貯蔵可能な化学エネルギー（例えば、炭水化物）に変換することができるため、本発明は放射線のエネルギーを産業上利用可能なエネルギーに変換できる点で有利である。

[0058] 本発明の発光方法においては、例えば、光合成生物の光合成を駆動することができる。光合成生物に備わる光合成経路を利用すると、光エネルギーにより炭酸を同化して有機物を合成することができる。使用できる光合成生物としては、

スピルリナ等のシアノバクテリア（ラン藻）；

緑藻類（クロレラ、ミカヅキモ、クラミドモナス等）、ユーグレナ藻（ミドリムシ等）等の真核藻類；

コケ類、高等植物等の植物；

が挙げられる。

[0059] 本発明の光合成方法においては、 β バレル型蛍光タンパク質が発した蛍光による光合成の駆動を考慮して β バレル型蛍光タンパク質と光合成生物との組合せや配置を決定することができる。 β バレル型蛍光タンパク質と光合成生物との組合せは、 β バレル型蛍光タンパク質が発する蛍光波長と光合成生物が受容する光波長が少なくとも重複するように選択することができる。 β バレル型蛍光タンパク質と光合成生物との配置は、 β バレル型蛍光タンパク質が発する蛍光が減衰せずに光合成生物（例えば、光合成細菌）の光受容物質（例えば、集光色素タンパク質）へ到達するように決定することができ、具体的には β バレル型蛍光タンパク質と光合成生物との距離を決定することができる。

[0060] 本発明の光合成方法においてはまた、 β 線または電子線の飛行距離や透過率を考慮して β バレル型蛍光タンパク質と β 線放出源または電子線放出源との配置を決定することができる。 β 線または電子線により β バレル型蛍光タンパク質が励起され、光合成駆動に十分な蛍光が発せられる限りにおいて、 β バレル型蛍光タンパク質と β 線放出源または電子線放出源との位置関係または距離に制限はない。

[0061] 本発明においては、 β バレル型蛍光タンパク質と、前記タンパク質の蛍光により光合成が駆動される光合成生物とを備えた光合成装置が提供される。本発明の光合成装置は本発明の発光方法および本発明の光合成方法に従って

実施することができる。

[0062] 本発明の光合成装置は β 線放出源または電子線放出源を備えていなくてもよく、本発明の装置を β 線放出源または電子線放出源の近傍に設置して使用してもよい。このような態様においては、移動が困難な β 線放出源が挙げられる。本発明の光合成装置はまた、 β 線放出源または電子線放出源をさらに備えていてもよい。このような態様としては、例えば、光合成利用を目的とした使用済み核燃料等を予め準備し、使用済み核燃料をさらに備えた本発明の光合成装置が挙げられる。これらの態様においては再利用が困難な放射性廃棄物を光合成を通じて資源化することができ、さらに炭酸固定を通じて低炭素社会にも資する点で有利である。また、温度等の環境変動の影響を受けづらい点、地上部を占有せず、地下等にも設置でき、さらに積層可能である点でも有利である。

[0063] 本発明の光合成方法においてはまた、光合成生物（特に光合成微生物）中に β バレル型蛍光タンパク質を存在させることができる。このような態様においては、光合成生物の光受容物質の近傍に β バレル型蛍光タンパク質を存在させることができ、例えば、遺伝子組み換え技術により所望の部位に β バレル型蛍光タンパク質を発現させることができる。光合成生物中において光受容物質の近傍に β バレル型蛍光タンパク質を存在させることにより、 β バレル型蛍光タンパク質の蛍光エネルギーを効率的に光受容物質に移動させることができる点で有利である。すなわち、本発明の別の側面によると、 β バレル型蛍光タンパク質を発現可能に保有する光合成生物であって、前記タンパク質の蛍光により光合成が駆動される光合成生物が提供される。本発明の光合成生物は本発明の発光方法および本発明の光合成方法に従って実施することができる。光合成生物は、遺伝子組み換え技術の適用を考慮すると光合成微生物が好ましく、より好ましくはシアノバクテリアである。

実施例

[0064] 以下の例に基づき本発明をより具体的に説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

[0065] 例 1：放射線で励起され、蛍光を発するタンパク質の特定

(1) 方法

Sumire、Sirius、moxBFP、mTurquoise2、mTFP1、EGFP、Venus、Achilles、mScarlet、mRaspberryの各蛍光タンパク質をpETシステムで大腸菌で高発現させた。具体的には、それぞれの蛍光タンパク質についてC末端に6×Hisタグを付与した融合タンパク質をコードするヌクレオチド配列をT7プロモーター直後に挿入したプラスミドpRSETB (Thermo Fisher Scientific社)を作成し、これを用いて大腸菌JM109 (DE3) (Promega社)を形質転換した後、当該大腸菌を200mlのLB培地にて22℃、3日間で培養した。培養後、Ni-NTA Agarose (QIAGEN社)で蛍光タンパク質を精製した。大腸菌の形質転換に使用した、蛍光タンパク質をコードするDNA配列は以下の通りであった。Sumire：配列番号5、Sirius：配列番号6、moxBFP：配列番号7、mTurquoise2：配列番号8、mTFP1：配列番号9、EGFP：配列番号10、Venus：配列番号11、Achilles：配列番号12、mScarlet：配列番号13、mRaspberry：配列番号14。

[0066] 精製した各蛍光タンパク質溶液を96穴プレートに分注し、そこに放射性同位体³⁵Sを加え、液体シンチレーションカウンターMicroBeta2 (パーキンエルマージャパン社)により測定した。測定は、MicroBeta2 マイクロプレートR1・グロー発光測定システムにおいて、1分間測定した。

[0067] 上記に加えてmTurquoise2 (mTQ2) に対し、203番目のT (スレオニン) をY (チロシン) に置換する変異を導入した蛍光タンパク質 (以下、T203Y) を作成した。上記同様の方法でタンパク質を高発現させた後、発現タンパク質を精製し、発光試験へと共した。また、mTQ2とT203Yそれぞれの励起および発光スペクトルを測定した。大腸菌の形

質転換に使用したT203YをコードするDNA配列は、mTurquoise2（配列番号8）のDNA配列において610～612番目のACCの塩基をTATに置換したDNA配列を使用した。

[0068] （2）結果および考察

精製したそれぞれの蛍光タンパク質を10 μ M、放射性同位体³⁵Sを800Bq/ μ l、最終液量100 μ lの条件にて液体シンチレーションカウンターで測定したところ、Sumire、Sirius、moxBFP、mTurquoise2で強い蛍光カウント値が得られたが、mTFP1、EGFP、Venus、Achilles、mScarlet、mRaspberryでは非常に弱い蛍光カウント値が認められ、mTQ2にT203Yの変異を入れたものは蛍光が認められなかった（図2）。このとき発光したmTQ2に加え、mTQ2にT203Yの変異を入れたものとEGFPについて、放射線の強度依存性を調べたところ、mTQ2は照射される放射線量に応じてカウント値が直線的に増加した一方で、T203YやEGFPは放射線量を増加させてもカウント値は得られなかった（図3）。これらの結果から、500nm以下に蛍光ピークを有する β バレル型蛍光タンパク質は放射線により発光すること、特にSumire、Sirius、moxBFP、mTurquoise2は放射線により強い蛍光を発することが示された。

[0069] mTQ2が放射線で発光した一方で、変異を入れたT203Yは発光しなかった。一方でT203YはmTQ2同様、蛍光を発するタンパク質のままであった。T203Y蛍光特性を解析した結果、励起、発光のピーク波長はmTQ2と比べて長波長側にシフトした（図4）。具体的には、励起スペクトルにおいては、mTQ2での233nm、281nm、438nmの3つのピークは、それぞれT203Yにおいて256nm、284nm、455nmとなった。また、発光スペクトルのピークはmTQ2では479nmであったところ、T203Yでは515nmであった。すなわち、CFPであるmTurquoise2に対してT203Y変異を加えた場合、蛍光波長の長波長化が観察された。以下の理論に拘束される訳ではないが、T203

Y変異による蛍光ピークの長波長化がmTurquoise2のシンチレーター能低下の一因であると考えられる。以上から、mTurquoise2に対するT203Y変異についての観察結果は、Sumire、Sirius、moxBFP、mTurquoise2についての観察結果とともに、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有することと、放射線による発光現象とが相関していることを示している。

[0070] ところで、mTurquoise2と同様に β バレル型蛍光タンパク質であるEGFPに対してT203Y変異を加えた場合、吸収波長のピークが434nmから463nmにシフトするとともに、蛍光波長のピークが476nmから506nmにシフトすることが報告されている (Sawano A and Miyawaki A, Nucleic Acids Res. 2000 Aug 15;28(16):E78)。この結果は本実施例のmTurquoise2に対するT203Y変異導入で観察された結果とほぼ一致する。また、T203Y変異を加えたEGFPでは0.4あった蛍光量子収率がEGFPのT203Y変異体では0.14まで大幅に減少したことも報告されている (前掲Sawano A and Miyawaki A)。EGFPに対するT203Y変異導入で観察された蛍光量子収率の減少はmTurquoise2でも起こり得ると予想される。このため、mTurquoise2に対するT203Y変異導入で観察された結果は、T203Y変異による吸収波長の長波長化により放射線で励起されにくくなり、かつ、蛍光量子収率の低下により放射線による発光量が大幅に低下したことも一因であると考えられる。

請求の範囲

- [請求項1] シンチレーターとしての β バレル型蛍光タンパク質の使用であって、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、使用。
- [請求項2] 前記 β バレル型蛍光タンパク質が、下記（a）、（b）および（c）：
- （a）配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列からなるタンパク質、
- （b）配列番号1～4のいずれか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、かつ、 β 線または電子線により発光するタンパク質、および
- （c）配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列において、1または複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、かつ、 β 線または電子線により発光するタンパク質
- からなる群から選択されるタンパク質である、請求項1に記載の使用。
- [請求項3] 前記 β バレル型蛍光タンパク質が、Sumire、Sirius、moxBFP、mTurquoise2、mTurquoise、SCFP1、SCFP2、SCFP3A、mTFP1およびoxBFPからなる群から選択される、請求項1または2に記載の使用。
- [請求項4] シンチレーターとして機能するタンパク質の設計方法であって、下記工程（A）および（B）：
- （A）変異対象である β バレル型蛍光タンパク質のアミノ酸配列において、下記（1）～（3）からなる群から選択される1個または2個以上のアミノ酸を特定する工程：
- （1）配列番号1～4のいずれかのアミノ酸配列の65位のアミノ酸に相当するアミノ酸；

(2) 配列番号 1～4 のいずれかのアミノ酸配列の 66 位のアミノ酸に相当するアミノ酸；

(3) 配列番号 1～4 のいずれかのアミノ酸配列の 203 位のアミノ酸に相当するアミノ酸

(B) 変異対象タンパク質のアミノ酸配列に基づいて、工程 (A) で特定された 1 個または 2 個以上のアミノ酸を下記アミノ酸に置換したアミノ酸配列を構築する工程

(1) 配列番号 1～4 のいずれかのアミノ酸配列の 65 位のアミノ酸に相当するアミノ酸：セリン (S)、グリシン (G) またはグルタミン (Q)；

(2) 配列番号 1～4 のいずれかのアミノ酸配列の 66 位のアミノ酸に相当するアミノ酸：トリプトファン (W)、ヒスチジン (H)、チロシン (Y) またはフェニルアラニン (F)；

(3) 配列番号 1～4 のいずれかのアミノ酸配列の 203 位のアミノ酸に相当するアミノ酸：トレオニン (T) またはバリン (V)；

を含んでなる、設計方法。

[請求項5] シンチレーターとして機能するタンパク質の調製方法であって、請求項4に記載された設計方法により構築されたアミノ酸配列をコードするポリヌクレオチドを宿主において発現させる工程を含んでなる、調製方法。

[請求項6] β バレル型蛍光タンパク質を β 線または電子線により発光させる、放射線による蛍光タンパク質の発光方法であって、 β バレル型蛍光タンパク質が 500 nm 以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、発光方法。

[請求項7] β バレル型蛍光タンパク質が非ヒト動物の体内に存在する、請求項6に記載の発光方法。

[請求項8] β バレル型蛍光タンパク質を β 線または電子線により発光させ、前記タンパク質が発する蛍光により光合成を駆動する、放射線による光

合成方法であって、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、光合成方法。

[請求項9] β バレル型蛍光タンパク質と、前記タンパク質が発する蛍光により光合成が駆動される光合成生物とを備えた光合成装置であって、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、光合成装置。

[請求項10] β 線または電子線放出源をさらに備えた、請求項9に記載の光合成装置。

[請求項11] β バレル型蛍光タンパク質を発現可能に保有する光合成生物であって、前記タンパク質が発する蛍光により光合成が駆動され、かつ、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する蛍光タンパク質である、光合成生物。

[請求項12] 光合成生物がシアノバクテリアである、請求項11に記載の光合成生物。

[図1]

Sumire (配列番号1)

MVSKGEELFT GVPILVELD GDVNGHKFSV RGEGEDATN GKLTCLKICT TGKLPVPWPT
LVTTLQYGVA CFSRYPDHMK RHDFFKSAMP EGYVQERTIS FKDDGTYKTR AEVKFEGDTL
VNRIELKGID FKEDGNILGH KLEYNIGSN VYITADKQKN GIKANYKIRH NVEDGSVQLA
DHYQQNTPIG DGPVLLPDNH YLSVQVLSK DPNEKRDHNV LLEFRTAAGI THGMDELYK

Sirius (配列番号2)

MVSKGEELFT GVPILVELD GDVNGHRFSV SGEGEDATY GKLTCLKICT TGKLPVPWPT
LVTTLQFGL CFARYPDHMK QHDFFKSAMP EGYVQERTIF FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL
VNRIELKGID FKEDGNILGH KLEYNIGSN VYITADKQKN GIKAHFKIRH NIEDGGVQLA
DHYQQNTPIG DGPVLLPDNH YLSVQSKLSK DPNEKRDHNV LLESVTAAGI TLGMDELYK

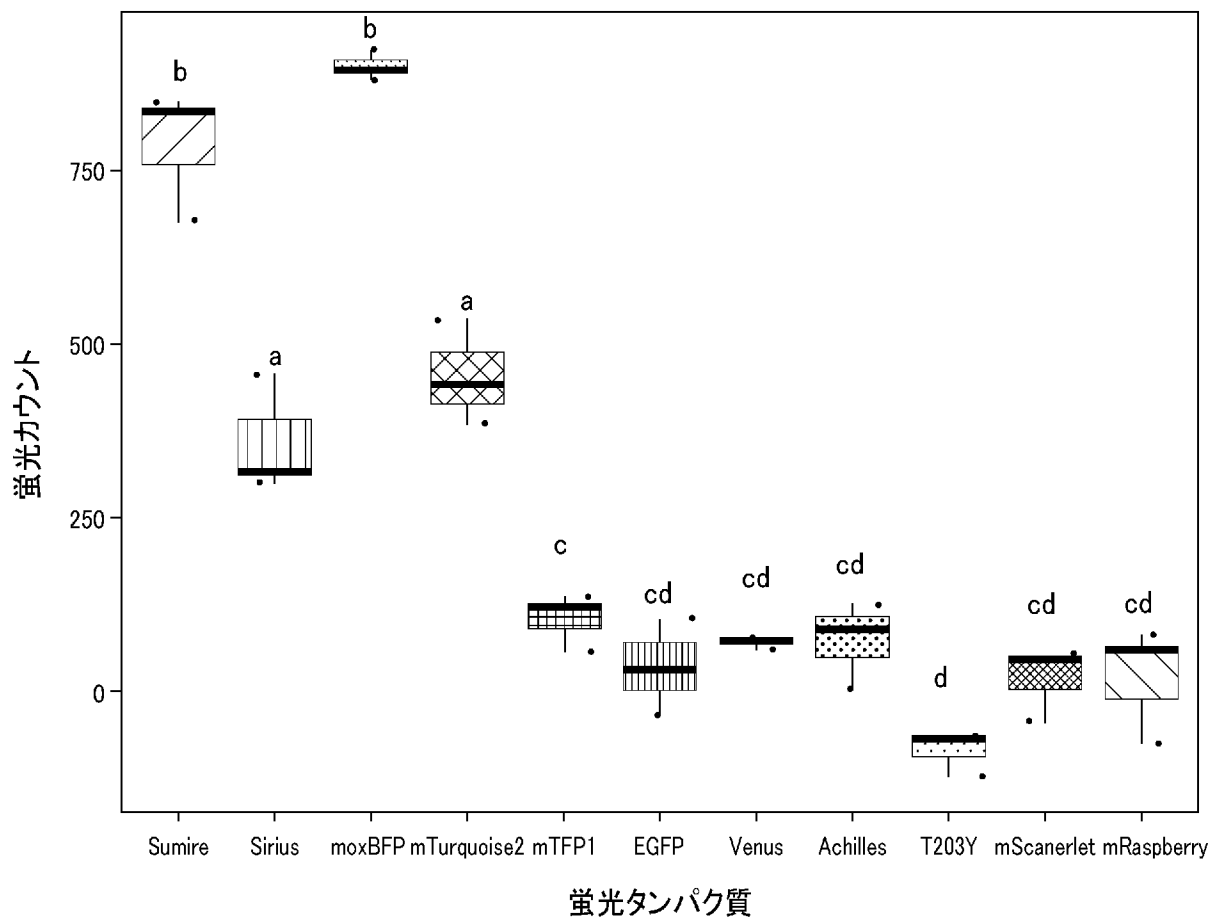
moxBFP (配列番号3)

MVSKGEELFT GVPILVELD GDVNGHKFSV RGEGEDATN GKLTCLKIST TGKLPVPWPT
LVTTLSHGVQ VFARYPDHMK QHDFFKSAMP EGYVQERTIF FKDDGTYKTR AEVKFEGDTL
VNRIELKGVQ FKEDGNILGH KLEYNFNHSHN IYIMAVKQKN GIKANFKIRH NVEDGSVQLA
DHYQQNTPIG DGPVLLPDSH YLSTQSKLSK DPNEKRDHNV LLEFRTAAGI TLGMDELYK

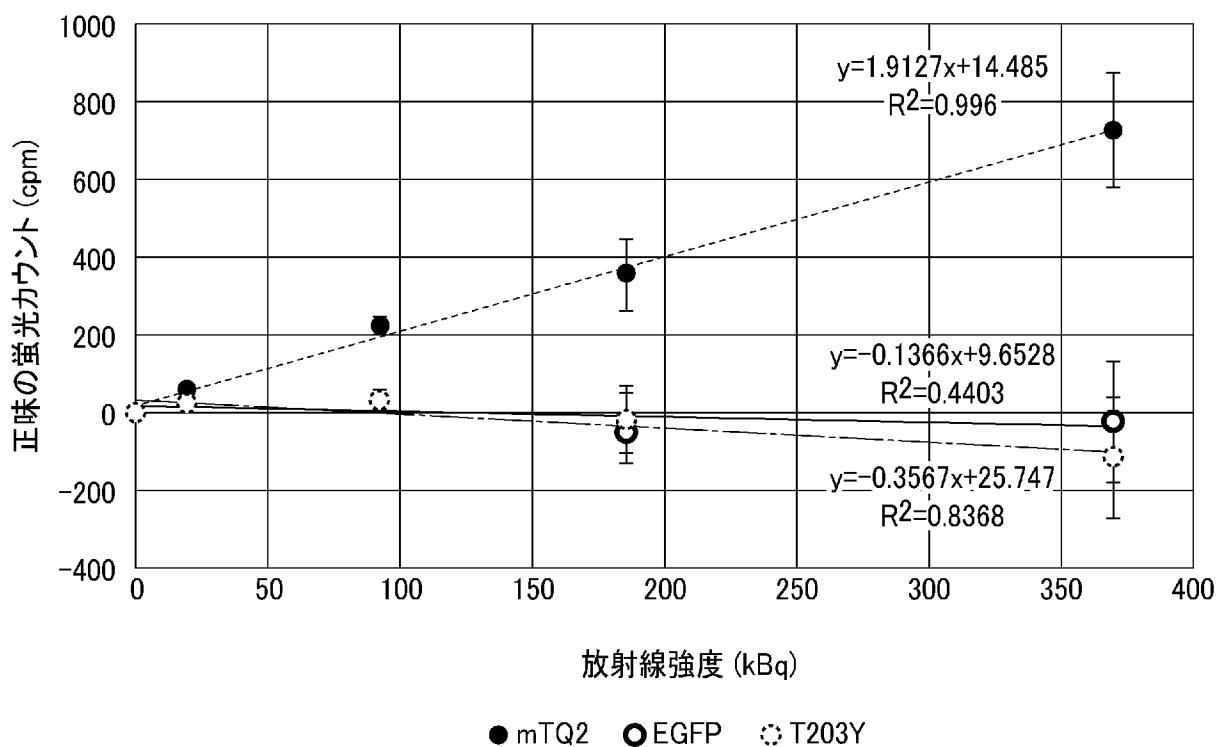
mTurquoise2 (配列番号4)

MVSKGEELFT GVPILVELD GDVNGHKFSV SGEGEDATY GKLTCLKICT TGKLPVPWPT
LVTTLSWGVS CFARYPDHMK QHDFFKSAMP EGYVQERTIF FKDDGNYKTR AEVKFEGDTL
VNRIELKGID FKEDGNILGH KLEYNFSDN VYITADKQKN GIKANFKIRH NIEDGGVQLA
DHYQQNTPIG DGPVLLPDNH YLSTQSKLSK DPNEKRDHNV LLEFVTAAGI TLGMDELYK

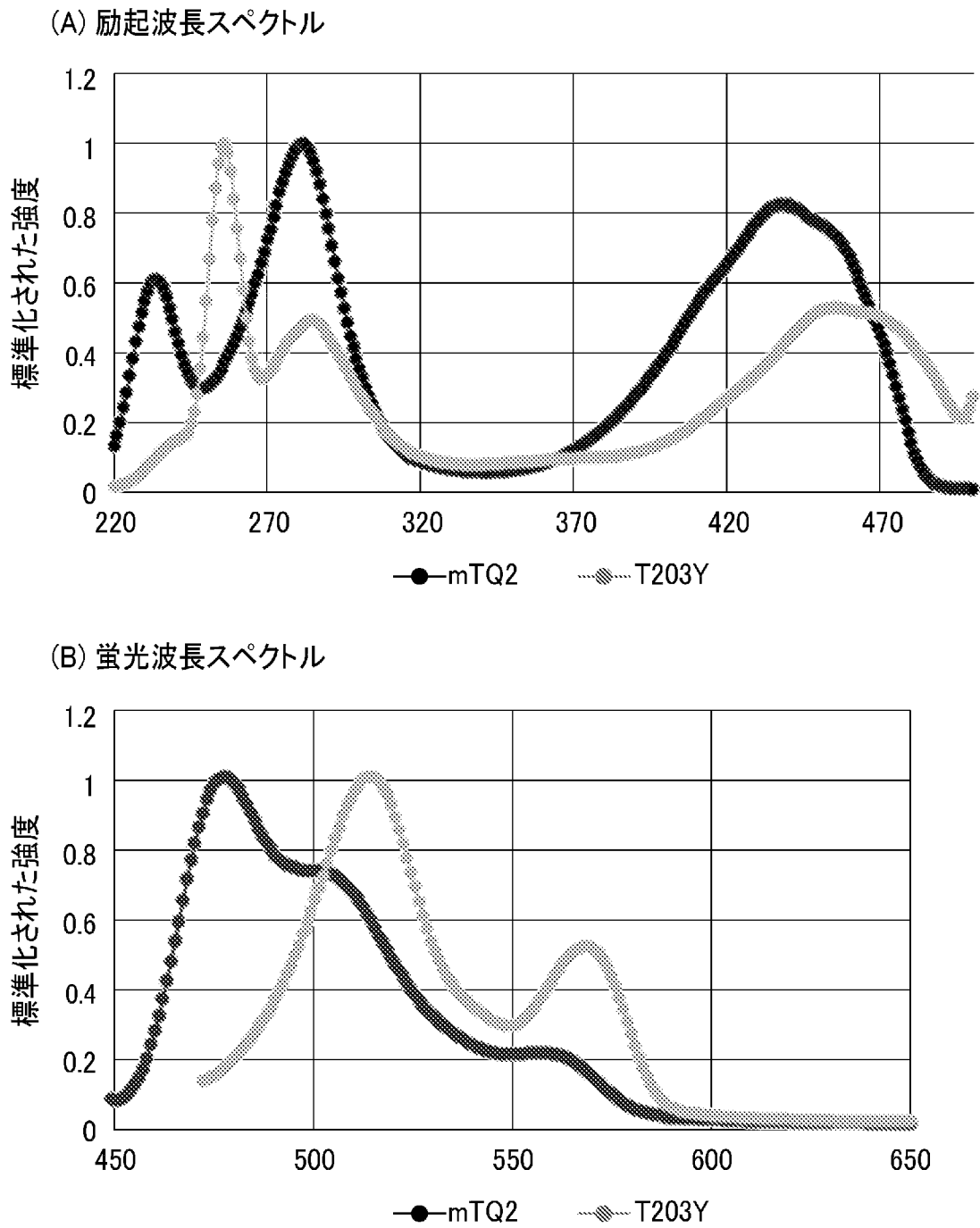
[図2]



[図3]

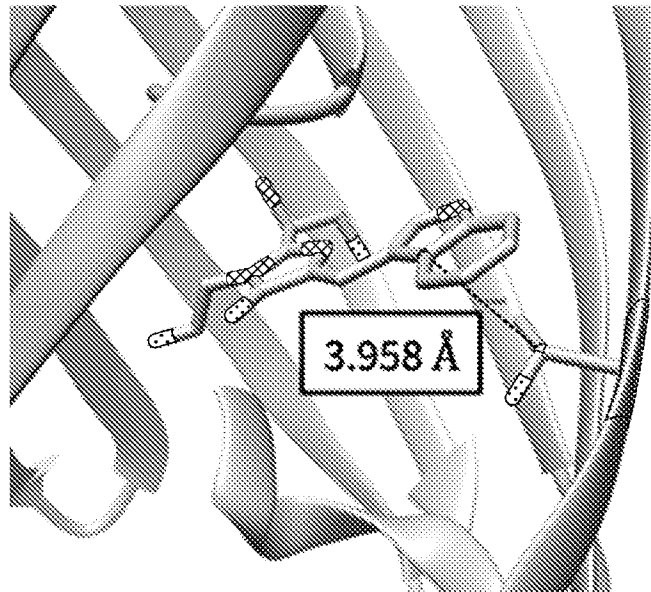


[図4]

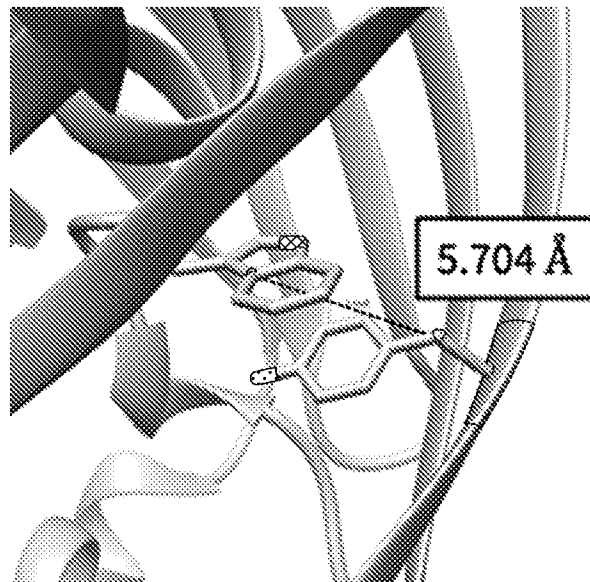


[図5]

(A)



(B)



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023407

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C07K 14/435</i> (2006.01)i; <i>C12M 1/00</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/13</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/15</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/19</i> (2006.01)i; <i>C12N 1/21</i> (2006.01)i; <i>C12N 5/10</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/09</i> (2006.01)i; <i>C12N 15/12</i> (2006.01)i; <i>C12P 21/02</i> (2006.01)i FI: C07K14/435; C12N1/13; C12P21/02 C; C12M1/00 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12; C12N15/09 Z ZNA 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; C12M1/00; C12N1/00-15/90; C12P21/02 Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched Published examined utility model applications of Japan 1922-1996 Published unexamined utility model applications of Japan 1971-2024 Registered utility model specifications of Japan 1996-2024 Published registered utility model applications of Japan 1994-2024 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamIII); Cplus/MEDLINE/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq; PubMed		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 2010/0087006 A1 (TRANSALGAE LTD.) 08 April 2010 (2010-04-08) claims, fig. 1	9, 11-12
A	entire text	1-8, 10
A	WO 2021/150937 A1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 29 July 2021 (2021-07-29) SEQ ID NO: 2	1-12
A	WO 2010/150862 A1 (UNIV HOKKAIDO NAT UNIV CORP.) 29 December 2010 (2010-12-29) SEQ ID NO: 6	1-12
A	WO 2021/226543 A2 (SEATTLE CHILDRENS HOSPITAL D/B/A SEATTLE CHILDRENS RES INSTITUTE) 11 November 2021 (2021-11-11) SEQ ID NO: 174	1-12
☒ 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 “D” document cited by the applicant in the international application “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 13 August 2024		Date of mailing of the international search report 27 August 2024
Name and mailing address of the ISA/JP Japan Patent Office (ISA/JP) 3-4-3 Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8915 Japan		Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023407

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2023/022176 A1 (PUBLIC UNIVERSITY CORPORATION YOKOHAMA CITY UNIVERSITY) 23 February 2023 (2023-02-23) SEQ ID NO: 69	1-12
A	SUGIURA, K. et al. Extension of the short wavelength side of fluorescent proteins using hydrated chromophores, and its application. Commun Biol. 2022, vol. 5:1172 p. 1, abstract, fig. 1	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2024/023407

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. ☒ forming part of the international application as filed.
 - b. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
☐ accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. ☐ With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

The claims are classified into the following inventions.

(Invention 1) Claims 1-3 and 6-8

Claims 1-3 have the special technical feature of a “use of a β barrel-type fluorescent protein as a scintillator, wherein the β barrel-type fluorescent protein has a fluorescent peak at a wavelength of at most 500 nm”, and are thus classified as invention 1.

Moreover, the invention in claims 6-8 is inventively related to claim 1 and is thus classified as invention 1.

(Invention 2) Claims 4-5

Claims 4-5 cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with the invention classified as invention 1.

Moreover, claims 4-5 are not dependent on any of the claims classified as invention 1. Furthermore, claims 4-5 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as invention 1.

Accordingly, claims 4-5 cannot be classified as invention 1.

In addition, claims 4-5 have the special technical feature of a “method for designing a protein which functions as a scintillator”, and are thus classified as invention 2.

(Invention 3) Claims 9-12

Claims 9-12 cannot be said to share a same or corresponding special technical feature with the invention classified as either invention 1 or invention 2.

Moreover, claims 9-12 are not dependent on any of the claims classified as either invention 1 or invention 2. Furthermore, claims 9-12 are not substantially identical to or similarly closely related to any of the claims classified as either invention 1 or invention 2.

Accordingly, claims 9-12 cannot be classified as either invention 1 or invention 2, and are classified as invention 3.

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☒ As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/JP2024/023407

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
US	2010/0087006	A1	08 April 2010	WO 2010/033230 A2 claims, fig. 1	
WO	2021/150937	A1	29 July 2021	US 2023/0061804 A1 SEQ ID NO: 2	
WO	2010/150862	A1	29 December 2010	(Family: none)	
WO	2021/226543	A2	11 November 2021	JP 2023-525049 A SEQ ID NO: 174	
				US 2023/0348854 A1 SEQ ID NO: 174	
WO	2023/022176	A1	23 February 2023	(Family: none)	

A. 発明の属する分野の分類（国際特許分類（IPC））

C07K 14/435(2006.01)i; C12M 1/00(2006.01)i; C12N 1/13(2006.01)i; C12N 1/15(2006.01)i;
C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/09(2006.01)i;
C12N 15/12(2006.01)i; C12P 21/02(2006.01)i
FI: C07K14/435; C12N1/13; C12P21/02 C; C12M1/00 Z; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10; C12N15/12;
C12N15/09 Z ZNA

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））

C07K1/00-19/00; C12M1/00; C12N1/00-15/90; C12P21/02

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1971-2024年
日本国実用新案登録公報1996-2024年
日本国登録実用新案公報1994-2024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/EMBASE/BIOSIS (STN); UniProt/GeneSeq; PubMed

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	US 2010/0087006 A1 (TRANSALGAE LTD) 08.04.2010 (2010 - 04 - 08) 特許請求の範囲、図 1	9, 11-12
A	全文	1-8, 10
A	WO 2021/150937 A1 (THE ROCKEFELLER UNIVERSITY) 29.07.2021 (2021 - 07 - 29) 配列番号 2	1-12
A	WO 2010/150862 A1 (国立大学法人北海道大学) 29.12.2010 (2010 - 12 - 29) 配列番号 6	1-12
A	WO 2021/226543 A2 (SEATTLE CHILDRENS HOSPITAL D/B/A SEATTLE CHILDRENS RES INSTITUTE) 11.11.2021 (2021 - 11 - 11) 配列番号 1 7 4	1-12
A	WO 2023/022176 A1 (公立大学法人横浜市立大学) 23.02.2023 (2023 - 02 - 23) 配列番号 6 9	1-12

☒ 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、一般的技术水準を示すもの
“D” 国際出願で出願人が先行技術文献として記載した文献
“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抵触するものではなく、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13. 08. 2024

国際調査報告の発送日27. 08. 2024

名称及びあて先

日本国特許庁(ISA/JP)
〒100-8915
日本国
東京都千代田区霞が関三丁目 4 番 3 号

権限のある職員（特許庁審査官）

小田 浩代 4B 8377

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

様式 PCT/ISA/210（第 2 ページ）（2 0 2 2 年 7 月）

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
A	SUGIURA, K. et al., Extension of the short wavelength side of fluorescent proteins using hydrated chromophores, and its application, Commun Biol, 2022, Vol. 5:1172 第1頁要約、図1	1-12

第 I 欄 ヌクレオチド又はアミノ酸配列（第 1 ページの 1. c の続き）

1. この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下の配列表に基づき国際調査を行った。
- a. ☒ 出願時における国際出願の一部を構成する配列表
- b. ☐ 国際出願日後に、国際調査のために提出された配列表（PCT規則13の3.1(a)）
- ☐ 配列表が出願時の国際出願の開示の範囲を超えるものではない旨の陳述書が添付されていた。
2. ☐ この国際出願で開示されたヌクレオチド又はアミノ酸配列に関して、この国際調査報告は、WIPO標準ST.26に準拠する配列表なしで有意義な国際調査をすることができる限度において作成された。
3. 補足意見：

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるとこの国際調査機関は認めた。

請求の範囲は、以下の発明に区分される。

（発明1）請求項1－3、6－8

請求項1－3は、「シンチレーターとしての β バレル型蛍光タンパク質の使用であって、 β バレル型蛍光タンパク質が500nm以下に蛍光ピークを有する」という特別な技術的特徴を有しているので、発明1に区分する。

また、請求項6－8に係る発明は、請求項1に対して発明の関連を有しているので、発明1に区分する。

（発明2）請求項4－5

請求項4－5は、発明1に区分された発明と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項4－5は、発明1に区分されたいずれの請求項の従属請求項ではない。さらに、請求項4－6は、発明1に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項4－5は、発明1に区分できない。

そして、請求項4－6は、「シンチレーターとして機能するタンパク質の設計方法」という特別な技術的特徴を有しているので、発明2に区分する。

（発明3）請求項9－12

請求項9－12は、発明1、2に区分された発明と、同一の又は対応する特別な技術的特徴を有しているとはいえない。

また、請求項9－12は、発明1、2に区分されたいずれの請求項の従属請求項ではない。さらに、請求項9－12は、発明1、2に区分されたいずれの請求項に対しても実質同一又はそれに準ずる関係にはない。

したがって、請求項9－12は、発明1、2に区分できず、発明3に区分する。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求項について作成した。
2. ☒ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求項について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求項のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったので、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求項について作成した。

追加調査手数料の異議の
申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料及び、該当する場合には、異議申立手数料の納付と共に、出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあったが、異議申立手数料が納付命令書に示した期間内に支払われなかった。
- ☐ 追加調査手数料の納付はあったが、異議申立てはなかった。

国際調査報告
パテントファミリーに関する情報

国際出願番号
PCT/JP2024/023407

引用文献			公表日	パテントファミリー文献			公表日
US	2010/0087006	A1	08.04.2010	WO	2010/033230	A2	
				特許請求の範囲、図 1			
WO	2021/150937	A1	29.07.2021	US	2023/0061804	A1	
				配列番号 2			
WO	2010/150862	A1	29.12.2010	(ファミリーなし)			
WO	2021/226543	A2	11.11.2021	JP	2023-525049	A	
				配列番号 1 7 4			
				US	2023/0348854	A1	
				配列番号 1 7 4			
WO	2023/022176	A1	23.02.2023	(ファミリーなし)			