

(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
2012年5月18日(18.05.2012)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 2012/063897 A1

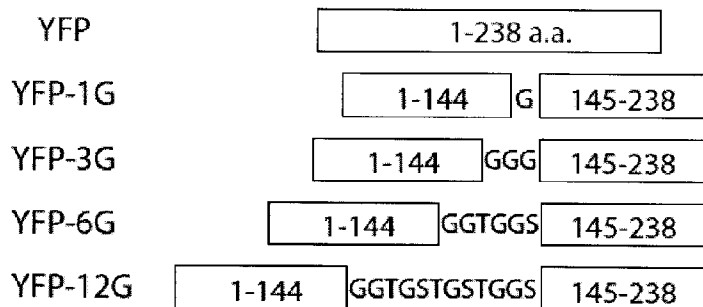
- (51) 国際特許分類:
C12N 15/09 (2006.01) *C12N 1/19* (2006.01)
A01K 67/027 (2006.01) *C12N 1/21* (2006.01)
C07K 14/435 (2006.01) *C12N 5/10* (2006.01)
C12N 1/15 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
- (21) 国際出願番号: PCT/JP2011/075932
- (22) 国際出願日: 2011年11月10日(10.11.2011)
- (25) 国際出願の言語: 日本語
- (26) 国際公開の言語: 日本語
- (30) 優先権データ:
特願 2010-254016 2010年11月12日(12.11.2010) JP
- (71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 独立行政法人科学技術振興機構(JAPAN SCIENCE AND TECHNOLOGY AGENCY) [JP/JP]; 〒3320012 埼玉県川口市本町四丁目1番8号 Saitama (JP).
- (72) 発明者: および
- (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 渡邊朋信 (WATANABE Tomonobu). 慶澤景子(YOSHIZAWA Keiko).
- (74) 代理人: 特許業務法人池内・佐藤アンドパートナーズ(IKEUCHI SATO & PARTNER PATENT ATTORNEYS); 〒5306026 大阪府大阪市北区天満
- 橋1丁目8番30号OAPタワー26階 Osaka (JP).
- (81) 指定国 (表示のない限り、全ての種類の国内保護が可能): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, 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, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, 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, ML, MR, NE, SN, TD, TG).
- 添付公開書類:
— 国際調査報告 (条約第21条(3))

[続葉有]

(54) Title: MODIFIED FLUORESCENT PROTEIN

(54) 発明の名称: 改変蛍光蛋白質

[図1]



(57) Abstract: Provided is a modified fluorescent protein which enables the detection of a power applied to a liquid where the fluorescent protein exists. A modified fluorescent protein, wherein a peptide linker is inserted into a position homologous to the position between the 144th and 145th amino acids in the amino acid sequence of a wild type fluorescent protein from jellyfish or a fluorescent protein derived from said wild type fluorescent protein, characterized in that the fluorescence properties of said modified fluorescent protein change depending on a change in a pressure that is applied to a liquid where said modified fluorescent protein exists.

(57) 要約: 蛍光蛋白質が存在する液体に加えられる力を検出可能な改変蛍光蛋白質の提供。クラゲ由来の野生型蛍光蛋白質又は前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質のアミノ酸配列の144番目と145番目との間に相同する位置にペプチドリンカーが挿入されている改変蛍光蛋白質であって、前記改変蛍光蛋白質が存在する液体に加えられる圧力の変化に応じて前記改変蛍光蛋白質の蛍光特性が変化することを特徴とする改変蛍光蛋白質。



WO 2012/063897 A1

- 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： 改変蛍光蛋白質

技術分野

[0001] 本発明は、改変蛍光蛋白質に関する。

背景技術

[0002] 蛍光蛋白質、例えばアミノ酸配列が配列表の配列番号6で表わされる緑色蛍光蛋白質は、基礎研究及び応用研究において、通常、蛋白質を蛍光標識する材料として用いられる。蛍光蛋白質による蛍光標識は、光学顕微鏡下において、蛋白質の局在及び運動の観察を可能とする。また、遺伝子工学的に改変を加えることで、細胞質内のpHやカルシウム濃度など、環境を感受する蛍光蛋白質も作られている（特許文献1及び2）。細胞質内の環境変化を感受できる上記蛍光蛋白質は、生命現象を調べるために、非常に有力なツールである。

[0003] 一方で、古くから、細胞質内の圧力が、発生段階における組織形状を決定することなど、生体内の圧力と生命現象に強い相関があることが示唆されている。

先行技術文献

特許文献

[0004] 特許文献1：特開2002-253261号公報

特許文献2：特開2002-369690号公報

発明の概要

発明が解決しようとする課題

[0005] しかしながら、生体内の圧力を計測できる技術はなく、上述の仮説は、未だ証明を待つ状態といえる。生体内の圧力を可視化できる技術は、今後の生物研究を大きく発展させると考えられる。とりわけ、生体内の圧力の可視化を蛍光蛋白質によって行うことができれば、非侵襲的に、すなわち、細胞等の生試料や生体に対して損傷を加えることなく、圧力計測が可能となる。

[0006] そこで、本発明は、液体内の圧力を計測できる改変蛍光蛋白質を提供する。

課題を解決するための手段

[0007] 本発明は、クラゲ由来の野生型蛍光蛋白質又は前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質のアミノ酸配列の144番目と145番目との間に相同する位置にペプチドリンカーが挿入されている改変蛍光蛋白質であって、前記改変蛍光蛋白質が存在する液体に加えられる圧力の変化に応じて前記改変蛍光蛋白質の蛍光特性が変化することを特徴とする改変蛍光蛋白質、好ましくは、前記液体に加えられる圧力の上昇に応じて前記蛍光強度が上昇する改変蛍光蛋白質に関する。

発明の効果

[0008] 本発明の改変蛍光蛋白質は、本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力の変化に応じて蛍光特性が変化し、好ましくは前記圧力の変化と蛍光強度とが正の相関を示すから、本発明の改変蛍光蛋白質によれば、生体内の圧力変化の可視化を行うことができ、非侵襲的に、すなわち、細胞等の生試料や生体に対して損傷を加えることなく、蛍光変化によりその圧力が経時的に計測可能となる。また、本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力変化を容易に検出することができる。

図面の簡単な説明

[0009] [図1]図1は、YFPと前記YFPの144位と145位の間にペプチドリンカーを挿入して作成した挿入変異体の模式図である。

[図2]図2は、YFP及びYFPの挿入変異体の吸光波長スペクトル（黒線）及び波長488ナノメートルのレーザーで励起した時の蛍光波長スペクトル（灰線）を示すグラフである。（a）は野生型YFP、（b）はYFP-1G、（c）はYFP-3G、（d）はYFP-6Gの結果をそれぞれ示す。

[図3]図3は、YFP（a）、YFP-1G（b）、YFP-3G（c）の圧力依存性を示すグラフである。

[図4]図4は、YFP、YFP-1G、及びYFP-3Gにおける圧力と蛍光

ピーク波長との関係（a）、並びに、圧力と蛍光ピーク波長における蛍光強度との関係（b）を示したグラフである。

[図5]図5は、YFP-3G水溶液への加圧を0MPaから所定の圧力まで変化させたときの蛍光強度の変化率をプロットしたグラフである。

[図6]図6は、水溶液中のYFP-3Gについて測定した蛍光強度変化に基づいて図5のグラフから本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力の変化を算出した結果を示すグラフである。各線は、それぞれ別々に試行して得られたグラフである。

[図7]図7は、YFP、YFP-1G、及びYFP-3Gにおける圧力と蛍光ピーク波長における蛍光強度との関係を示したグラフである。

[図8]図8は、GFP、GFP-1G、及びGFP-3Gにおける圧力と蛍光ピーク波長における蛍光強度との関係を示したグラフである。

[図9]図9は、CFP、CFP-1G、及びCFP-3Gにおける圧力と蛍光ピーク波長における蛍光強度との関係を示したグラフである。

[図10]図10A~Cは、それぞれ、上記YFP、YFP-1G、及びYFP-3Gの発色団（chromophore）周辺の蛋白質立体構造を示す図である。

発明を実施するための形態

[0010] 蛍光蛋白質は、ベータカン構造と呼ばれる円柱構造を持つ蛋白質である。ベータカン構造の内部に、3つのアミノ酸残基から構成される発光団があり、該発光団は、周囲のベータカン構造によるプロトン配置に対して、敏感に反応する。本発明は、蛍光蛋白質の一部、より具体的には発光団に最も近いループにペプチドリンカーを挿入することにより、前記蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力の変化に応じて蛍光特性が変化し、好ましくは前記蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力と蛍光強度とが正の相関を示す改変蛍光蛋白質を得ることができる、という知見に基づく。

[0011] すなわち、本発明は、一態様において、クラゲ由来の野生型蛍光蛋白質又は前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質のアミノ酸配列の144番目と145番目との間に相同する位置にペプチドリンカーが挿入されている改

変蛍光蛋白質であって、前記改変蛍光蛋白質が存在する液体に加えられる圧力の変化に応じて前記改変蛍光蛋白質の蛍光特性が変化することを特徴とする改変蛍光蛋白質（以下、「本発明の改変蛍光蛋白質」ともいう）に関する。

[0012] 本発明の改変蛍光蛋白質の蛍光特性が本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力の変化に応じて変化するメカニズムの詳細は明らかではないが、以下のように考えられる。すなわち、蛍光蛋白質の一部、より具体的には発光団に最も近いループにペプチドリンカーを挿入することで、蛍光蛋白質内における発光団近くのベータカン構造に歪みが発生し、これにより溶媒中の水が前記発光団へ介入するようになる。そして、前記発光団は、水との相互作用によって蛍光特性が変化する。すなわち、本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力が増加して前記発光団内の水の挙動が変化するにより、当該発光団から発せられる蛍光波長が変化し、及び／又は、蛍光強度が増加すると考えられる。但し、本発明はこれらのメカニズムに限定して解釈されなくてもよい。

[0013] 溶媒中の圧力を計測できる蛍光蛋白質は、これまでに報告されていない。また、再生医学などでは、組織の形状を決定付けるのに、圧力が重要であることが、少しずつ明らかになってきているが、細胞内の圧力を計測できる技術がないために、それ以上の知見を得ることができていない。本発明の改変蛍光蛋白質は、遺伝子導入などの簡素な方法で、細胞内に当該蛍光蛋白質を発現させることができるので、多くの生物研究者にも有用で応用が可能なツールとなりうる。例えば、深海生物の研究などは、圧力と生命現象との関わりを調べることは必須であり、本発明の改変蛍光蛋白質は、深海生物の研究においても非常に重要なツールとなりうる。

[0014] [蛍光蛋白質]

本発明において「蛍光蛋白質」とは、励起光を当てると発光する蛋白質をいう。蛍光蛋白質としては、特に限定されないが、一例としてサンゴ由来：例えば、アザミサンゴ (*Galaxea fascicularis*)、クサビライシ (*Fungia* sp

.)、コモンサンゴ (*Montipora*, sp) 等、イソギンチャク由来：例えば、オオカワリイソギンチャク (*Halcurias* sp.L) 等、クラゲ由来：エクオレア・ビクトリア (*Aequorea victoria*) 等が改変蛍光蛋白質の原料として挙げられる。好ましくはクラゲ由来の野生型蛍光蛋白質又は前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質を原料としたものが挙げられる。本発明において「クラゲ由来の野生型蛍光蛋白質」とは、全長238アミノ酸残基のクラゲ由来蛍光蛋白質をいい、好ましくはクラゲ (*Aequorea Victoria*) 由来の緑色蛍光蛋白質 (GFP; 全長238アミノ酸残基、GenBank Accession No. AAA27722、配列表の配列番号6) をいう。また、本発明において「前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質」とは、前記GFPに由来する変異蛍光蛋白質を含み、好ましくはYFP、CFP、EGFP、EYFP、及びECFP等の蛍光蛋白質を含む。以下、本発明において「クラゲ由来の野生型蛍光蛋白質又は前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質」を単に「蛍光蛋白質」と呼ぶことがある。なお、YFPの配列として238アミノ酸残基の配列番号1のアミノ酸配列が挙げられ、CFPの配列として238アミノ酸残基の配列番号7のアミノ酸配列が挙げられるが、本発明においてYFP及びCFPは前記配列限定のものに限定されない。例えば、クローニングやタグ標識のため、蛍光蛋白質としての機能に影響を与えない範囲で、N末端付近やC末端付近に1又は複数のアミノ酸残基の置換・付加・欠失・挿入がされたもの、及び、それに起因してアミノ酸配列の長さが238アミノ酸残基ではないものも含みうる。その場合のリンカーの挿入部位は、前記野生型蛍光蛋白質のアミノ酸配列の144番目と145番目との間に相同する位置（すなわち、発光団に最も近いループ）とすればよい。本発明における蛍光蛋白質は、蛋白質の形態に加え、該蛍光蛋白質をコードするポリヌクレオチドや、該蛍光蛋白質を発現可能なベクターの形態で、例えば市販の製品として、容易に入手できる。本発明における蛍光蛋白質としては、前記緑色蛍光蛋白質の203残基目のスレオニンをチロシンに換えた蛍光蛋白質であるYFP及びEYFP（とりわけ、配列番号1のアミノ酸配列で表わされるもの）が好ましい

。なぜなら、YFP及びEYFPにおいては、発光団(65-67残基)と203残基のチロシンのフェノール環が電子的に相互作用しているため、YFP及びEYFPは、GFPと比べ、敏感にその発光特性が変化することが期待されるからである。

[0015] [ペプチドリンカー]

本発明において「ペプチドリンカー」とは、蛍光蛋白質に挿入されるアミノ酸配列をいう。ペプチドリンカーのアミノ酸の数は、圧力の感受性及び蛍光強度の維持の観点から、1以上が好ましい。また、同様の観点から、前記ペプチドリンカーのアミノ酸の数は4以下が好ましく、より好ましくは3以下である。したがって、前記ペプチドリンカーのアミノ酸の数は、1~4が好ましく、1~3がより好ましい。また、ペプチドリンカーのアミノ酸残基は、圧力の感受性及び蛍光強度の維持の観点から、グリシンを含むことが好ましく、すべてグリシンであることがより好ましい。

[0016] ペプチドリンカーの挿入位置は、圧力の感受性及び蛍光強度の維持の観点から、蛍光蛋白質の発光団に最も近いループであり、好ましくは蛍光蛋白質のアミノ酸配列の144位と145位との間であり、より好ましくは野生型蛍光蛋白質、すなわち、全長238アミノ酸残基の緑色蛍光蛋白質(GFP; GenBank Accession No. AAA27722、配列番号6)の144位と145位との間に相同する部位である。挿入対象がアミノ酸配列の長さが238アミノ酸残基でない蛍光蛋白質の場合であっても、当業者であれば、通常のアライメントや目視による配列の比較等を行うことにより容易に挿入部位を特定できる。

[0017] [圧力の変化に応じて変化する蛍光特性]

本発明において「蛍光特性」とは、励起波長、蛍光波長、これらのスペクトル、及び蛍光強度を含む。ペプチドリンカーが挿入された本発明の改変蛍光蛋白質は、これらの蛍光特性の少なくとも1つが本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力の変化に応じて変化する、好ましくは少なくとも蛍光強度が、本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力の変化に

応じて正の相関で変化する。なお、本発明において「蛍光強度が、本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力の変化に応じて正の相関で変化する」とは、本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力が増加すれば、蛍光強度が増加し、本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力が減少すれば、蛍光強度が減少することをいう。本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力としては、圧力の感受性及び蛍光強度の維持の観点から、0MPaを超え1000MPa以下が好ましく、より好ましくは0MPaを超え500MPa以下、さらに好ましくは0MPaを超え300MPa以下である。

[0018] [本発明の改変蛍光蛋白質の製造方法]

本発明の改変蛍光蛋白質は、公知の方法で容易に製造することができ、例えば、クラゲ由来の野生型蛍光蛋白質又は前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質をコードするDNAにおける、クラゲ由来の野生型蛍光蛋白質又は前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質のアミノ酸配列の144位と145位との間に相同する部位にペプチドリinkerをコードする塩基配列のDNAを挿入した改変DNAをクローニングし、適宜発現させることで製造することができる。本発明の改変蛍光蛋白質の精製方法を含む取り扱い、改変に供した蛍光蛋白質と同様とすることができる。また、本発明の改変蛍光蛋白質を生体内で発現させる場合には、本発明の改変蛍光蛋白質をコードするDNAを適切な発現ベクターにクローニングし、該ベクターを目的の細胞又は生体に導入する方法が挙げられる。但し、本発明の改変蛍光蛋白質は、その製造方法、クローニング方法、発現方法、及び遺伝子導入方法に制限されない。

[0019] したがって、本発明はその他の態様において、本発明の改変蛍光蛋白質をコードするベクター（以下、「本発明のベクター」ともいう。）に関する。本発明のベクターは、本発明の改変蛍光蛋白質を発現するための発現ベクターであっても良い。該発現ベクターにおいて、発現系は特に制限されず、原核生物、真核生物を問わない。したがって、本発明はさらにその他の態様に

において、本発明の改変蛍光蛋白質が遺伝子導入された細胞又はヒトを除く生物に関する。さらにまた本発明は、本発明のベクターを含むキットであって、任意に、遺伝子導入に必要な試薬、細胞、取扱説明書等を含むキットに関する。

[0020] [内部標準蛍光蛋白質との融合形態]

本発明の改変蛍光蛋白質と従来の蛍光蛋白質とを組み合わせ、従来の蛍光蛋白質を圧力に対して蛍光特性が変化しない内部標準として使用し、両者の蛍光特性を比較することで本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力を計測することもできる。内部標準として蛍光蛋白質を利用する場合、本発明の改変蛍光蛋白質と前記内部標準蛋白質と蛍光特性が異なることが好ましく、それぞれの励起波長及びそのスペクトルが互いに異なることが好ましい。また、互いの発現量を調節して感度を高める観点からは、本発明の改変蛍光蛋白質と前記内部標準蛋白質とが融合した融合蛋白質の形態が好ましい。したがって、本発明はその他の態様において、本発明の改変蛍光蛋白質と、前記改変蛍光蛋白質の励起スペクトルとは異なる励起スペクトルの蛍光蛋白質とが融合した融合蛍光蛋白質（以下、「本発明の融合蛍光蛋白質」ともいう）に関する。

[0021] 本発明の融合蛍光蛋白質において、本発明の改変蛍光蛋白質と前記内部標準蛋白質とは、リンカーを介して融合してもよい。本発明の融合蛍光蛋白質は、例えば、公知の蛍光蛋白質のベクターに本発明の改変蛍光蛋白質をコードするDNA断片をクローニングするなどして、当業者であれば容易に製造できる。したがって、本発明はその他の態様において、本発明の融合蛍光蛋白質をコードするベクターに関する。前記ベクターは、本発明の融合蛍光蛋白質を発現するための発現ベクターであっても良い。該発現ベクターにおいて、発現系は特に制限されず、原核生物、真核生物を問わない。したがって、本発明はさらにその他の態様において、本発明の融合蛍光蛋白質が遺伝子導入された細胞又はヒトを除く生物に関する。さらにまた本発明は、前記ベクターを含むキットであって、任意に、遺伝子導入に必要な試薬、細胞、取

扱説明書等を含むキットに関しうる。

[0022] [圧力測定方法]

本発明はさらなる態様において、本発明の改変蛍光蛋白質／融合蛍光蛋白質が存在する液体にかかる圧力変化又は圧力を検出する方法であって、前記蛍光蛋白質の蛍光強度又は蛍光波長を検出することを含む方法に関する。

[0023] 本発明の改変蛍光蛋白質／融合蛍光蛋白質は、本発明の改変蛍光蛋白質／融合蛍光蛋白質が存在する液体に加わる圧力の変化に応じて蛍光特性が変化するから、例えば、細胞内、血管内、胚内、水溶液中に存在させることで、これらにかかる圧力変化を検出することが可能となる。また、内部標準を併用あるいは本発明の融合蛍光蛋白質を使用することで、リアルタイムで圧力を知ることできる。本発明の改変蛍光蛋白質／融合蛍光蛋白質を用いた圧力の検出感度としては、例えば、 $1.0 \text{ MPa} \sim 0.1 \text{ MPa}$ 、好ましくは $0.8 \text{ MPa} \sim 0.4 \text{ MPa}$ 、より好ましくは $0.7 \text{ MPa} \sim 0.5 \text{ MPa}$ とすることができる。また、検出できる圧力としては、例えば、 0 MPa を超え 1000 MPa 以下である。検出感度の観点から、下限としては、 0.001 MPa 以上が好ましく、より好ましくは 0.01 MPa 以上、さらに好ましくは 0.05 MPa 以上、さらにより好ましくは大気圧以上である。また、上限としては、同様の観点から、 500 MPa 以下が好ましく、より好ましくは 100 MPa 以下、さらに好ましくは 10 MPa 以下、さらにより好ましくは 1 MPa 以下である。

[0024] 本発明の改変蛍光蛋白質は、より具体的には、例えば、細胞内の浸透圧変化の計測、血圧変化の計測、及び深海生物の体内圧の計測等に応用できる。

[0025] 以下、本発明を実施例及び図面を参照しながら説明する。

実施例

[0026] [YFPの挿入変異]

配列表の配列番号1で表わされる全238個のアミノ酸残基からなる黄色蛍光蛋白質(YFP)の144番目のアスパラギン酸と145番目のチロシンとの間にペプチドリンカーを挿入した挿入変異体を作製した(図1)。挿

入したペプチドリンカーは、それぞれ、G（変異体名：YFP-1G）、GGGS（変異体名：YFP-3G：配列番号2）、GGTGGGS（配列番号3）（変異体名：YFP-6G）、GGTGGSGGTGGGS（配列番号4）（変異体名：YFP-12G）とした。

[0027] YFP及びYFPの変異体は、定法によって発現、精製した。すなわち、前記YFP及びYFP変異体をコードするDNAプラスミドを大腸菌にトランスフォームして大腸菌内で上記YFP及びYFP変異体を発現させた。精製は、上記YFP及びYFP変異体のN末端にFLAGタグ(DYKDDDDK：配列番号5)を付加することにより、収集した大腸菌のライゼート(細胞質)から分離精製した。

[0028] [波長特性の比較]

上述のように作製された挿入変異体の吸収波長スペクトル及び発光波長スペクトルを調べた。その結果、YFPの吸収波長及び発光波長は、グリシンの挿入により挿入したアミノ酸残基の数に応じて短波長側に移行していた(図2)。上記の蛍光波長の移行は、グリシンの挿入により、ベータカン構造が変化し、YFPの発光団周辺の環境が変化したことを反映していると考えられる。YFP-6G、YFP-12Gは、YFPと比べ、蛍光強度が低下してしまうため、圧力を検出する蛍光蛋白質としてYFP-1G及びYFP-3Gがより好ましいと考えられる。

[0029] [波長特性の圧力依存性]

YFP、YFP-1G、YFP-3Gの圧力依存性を調べた。具体的には下記条件で測定した。YFPの結果を図3(a)に、YFP-1Gの結果を図3(b)に、YFP-3Gの結果を図3(c)にそれぞれ示す。

[圧力依存性の測定条件]

YFP及びYFP変異体を20 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)の溶液に0.1~0.3 mg/mlの濃度になるように調製した。吸光度は、吸収分光光度計(Shimadzu UV-Vis Spectrophotometer UV-1650PC)により、吸収波長250~600 nmの範囲で計測した。蛍光度は、蛍光分光光度計(Shimadzu UV-Vis Spectrop

hotometer UV-1650PC)により、励起波長を488 nmに固定し、蛍光波長500~650 nmの範囲で計測した。

圧力下における蛍光特性計測には、蛍光分光度計(Shimadzu UV-Vis Spectrophotometer UV-1650PC)と、圧力光学セル(PCI500, Syn Corporation)と、圧力ポンプ(HP-500, Syn Corporation)を用いた。圧力は、急激な圧力変化に伴う温度変化を回避するために、毎秒5 MPa程度の速度で変化させた。目的の圧力に達してから1分後に、励起波長を480 nmに固定し、蛍光波長500~650 nmの範囲で計測した。実験は全て室温(25℃)で行った。

[0030] 図3(a)に示すとおり、YFPは、圧力を加えるにつれ、ピーク波長が長波長側に移行し、かつ、蛍光強度が低下した。図3(b)に示すとおり、YFP-1Gは、圧力を加えるにつれ、ピーク波長が長波長側に移行し、かつ、蛍光強度は、200 MPaまでは上昇し、その後、低下した。図3(c)に示すとおり、YFP-3Gは、圧力を加えるにつれ、ピーク波長が長波長側に移行し、かつ、蛍光強度が上昇した。図4に、上記をまとめたグラフを示す。

[0031] 図4(a)に示すとおり、ピーク波長の移行の圧力依存性に関しては、YFP、YFP-1G、YFP-3Gの間に大きな差は見られなかった。また、図4(b)に示すとおり、ピーク波長における蛍光強度変化の圧力依存性に関しては、YFPは、300 MPa加圧時の変化率が0.75に対し、YFP-3Gでは、300 MPa加圧時の変化率が2.4であり、YFP-3Gが、YFPに比べ、圧力に対しての影響を大きく受けることが示された。

[0032] [蛍光強度変化からの圧力変化の計測]

YFP-3Gの蛍光強度(515~535 nm)とYFP-3Gが存在する液体にかかる圧力(0~50 MPa)の詳細な相関グラフを作成した(図5)。図5のグラフは、YFP-3G水溶液への加圧を0 MPaから所定の圧力まで変化させたときの蛍光強度の変化率をプロットしたグラフである。図5に示すとおり、圧力変化と蛍光強度変化とが相関するから、図5をキャリブレーション表として用いることで、YFP-3Gの蛍光強度からYFP

−3 Gが存在する液体にかかる圧力の変化を見積もることが可能となる。その一例を図6に示す。

[0033] 図6は、YFP−3 Gの水溶液に対し、5秒間隔で5 MP aずつ加圧したときのYFP−3 Gの蛍光強度を検出し、その蛍光強度変化と図5のグラフとから、圧力の時間変化を計測したグラフである。図6に示すとおり、YFP−3 Gの蛍光強度変化から圧力変化を計測でき、その計測精度は、0.6 MP aであった。

[0034] したがって、本発明の改変蛍光蛋白質は、YFP−3 Gが存在する液体にかかる圧力の変化に応じて蛍光特性が変化するから、本発明の改変蛍光蛋白質によれば、本発明の改変蛍光蛋白質が存在する液体にかかる圧力の計測が可能であることが示された。

[0035] [GFP及びCFPの変異体の作製]

配列表の配列番号6及び7のアミノ酸配列でそれぞれ表わされる緑色蛍光蛋白質(GFP)及びシアン色蛍光蛋白質(CFP)の144番目のアスパラギン酸と145番目のチロシンとの間にペプチドリンカーを挿入した挿入変異体を作製した。挿入したペプチドリンカーは、それぞれ、G(変異体名: GFP−1 G/CFP−1 G又は1 G挿入変異体)及び、GGS(変異体名: GFP−3 G/CFP−3 G又は3 G挿入変異体)とした。これらのGFP及びGFP変異体並びにCFP及びCFP変異体を、上述したYFP及びYFP変異体と同様に発現、精製した。

[0036] YFP、YFP−1 G、YFP−3 G、GFP、GFP−1 G、GFP−3 G、CFP、CFP−1 G、及びCFP−3 Gについて、大気圧に加える圧力を0~50 MP aとした場合のピーク波長の蛍光強度を測定した。圧力下における蛍光特性計測は、上述と同様に行った。YFP、GFP及びCFPに関する結果をそれぞれ図7~9に示す。

[0037] 図7~9に示すとおり、1 G挿入変異体及び3 G挿入変異体の蛍光強度はいずれも0~50 MP aの加圧と正の相関を示した。図9に示すとおり、CFPそのものの蛍光強度も加圧と正の相関を示したが、1 G挿入変異体及び

3 G挿入変異体とすることで、より圧力への感受性が向上した。

[0038] 図10A～Cは、それぞれ、上記YFP、YFP-1G、及びYFP-3Gの発色団周辺の立体構造を示す。図10AのYFPの構造はPDBデータバンクID：3DQ7からの引用である。図10BのYFP-1G及び図10CのYFP-3Gの構造データは、それぞれ、PDBデータバンクID：3VGQ及び3VGRとして登録された。図10B及びCにおいて矢印は水分子を示す。図10は、発光団に最も近いループにリンカーが挿入されることにより蛍光蛋白質内のベータカン構造に歪みが発生し、これにより溶媒中の水が前記発光団へ介入していること示す。

産業上の利用可能性

[0039] 本発明によれば生体内の圧力変化の可視化を行うことができ、非侵襲的に、すなわち、細胞等の生試料や生体に対して損傷を加えることなく、蛍光変化により経時的な圧力計測が可能となる。本発明は、例えば、深海調査の分野、細胞生物学の分野、分子イメージングの分野、医療・診断薬分野、及び蛋白質の構造解析分野などにおいて有用である。

配列表フリーテキスト

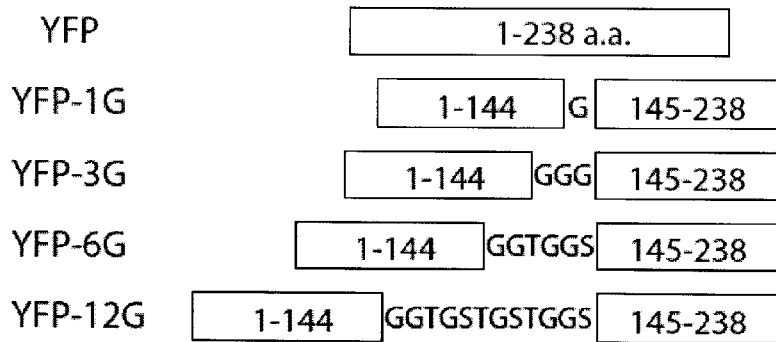
[0040] 配列番号1：YFP（黄色蛍光蛋白質）
配列番号2：本発明の改変蛋白質の一例
配列番号3，4：ペプチドリンカー
配列番号5：FLAGタグ
配列番号6：GFP（緑色蛍光蛋白質）
配列番号7：CFP（シアン色蛍光蛋白質）

請求の範囲

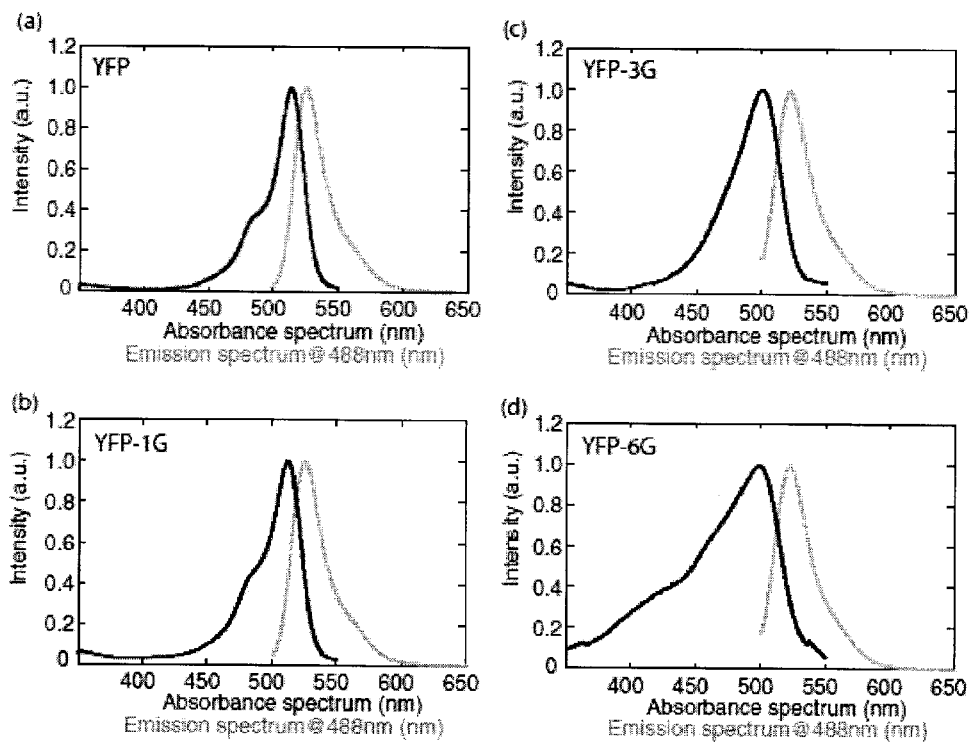
- [請求項1] クラゲ由来の野生型蛍光蛋白質又は前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質のアミノ酸配列の144番目と145番目との間に相同する位置にペプチドリンカーが挿入されている改変蛍光蛋白質であって、前記改変蛍光蛋白質が存在する液体に加えられる圧力の変化に応じて前記改変蛍光蛋白質の蛍光特性が変化することを特徴とする改変蛍光蛋白質。
- [請求項2] 前記ペプチドリンカーが、1～3個のアミノ酸である、請求項1記載の改変蛍光蛋白質。
- [請求項3] 前記ペプチドリンカーのアミノ酸が、グリシンを含む、請求項1又は2記載の改変蛍光蛋白質。
- [請求項4] 前記野生型蛍光蛋白質が、全長238アミノ酸残基の緑色蛍光蛋白質（GFP）である、請求項1から3のいずれかに記載の改変蛍光蛋白質。
- [請求項5] クラゲ由来の蛍光蛋白質を原料とするものである、請求項1から4のいずれかに記載の改変蛍光蛋白質。
- [請求項6] 前記野生型蛍光蛋白質に由来する蛍光蛋白質が、YFP、CFP、EGFP、EYFP、及びECFPからなる群から選択される、請求項1から5のいずれかに記載の改変蛍光蛋白質。
- [請求項7] 請求項1から6のいずれかに記載の改変蛍光蛋白質と、前記改変蛍光蛋白質の励起スペクトルとは異なる励起スペクトルの蛍光蛋白質とが融合した融合蛍光蛋白質。
- [請求項8] 請求項1から6のいずれかに記載の改変蛍光蛋白質又は請求項7記載の融合蛍光蛋白質をコードするベクター。
- [請求項9] 請求項1から6のいずれかに記載の改変蛍光蛋白質又は請求項7記載の融合蛍光蛋白質が遺伝子導入された細胞。
- [請求項10] 請求項1から6のいずれかに記載の改変蛍光蛋白質又は請求項7記載の融合蛍光蛋白質が遺伝子導入されたヒトを除く生物。

[請求項11] 請求項 1 から 6 のいずれかに記載の改変蛍光蛋白質又は請求項 7 記載の融合蛍光蛋白質が存在する液体にかかる圧力又は圧力変化を検出する方法であって、前記改変蛍光蛋白質又は融合蛍光蛋白質の蛍光強度又は蛍光波長を検出することを含む、方法。

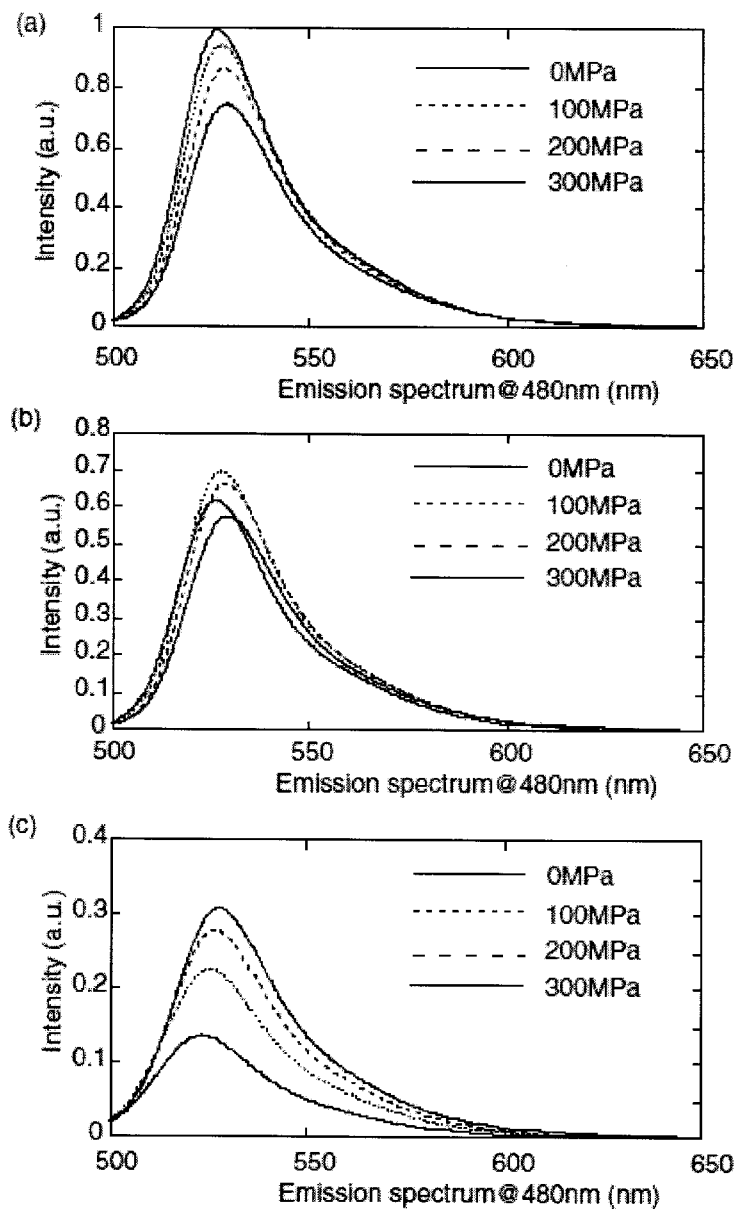
[図1]



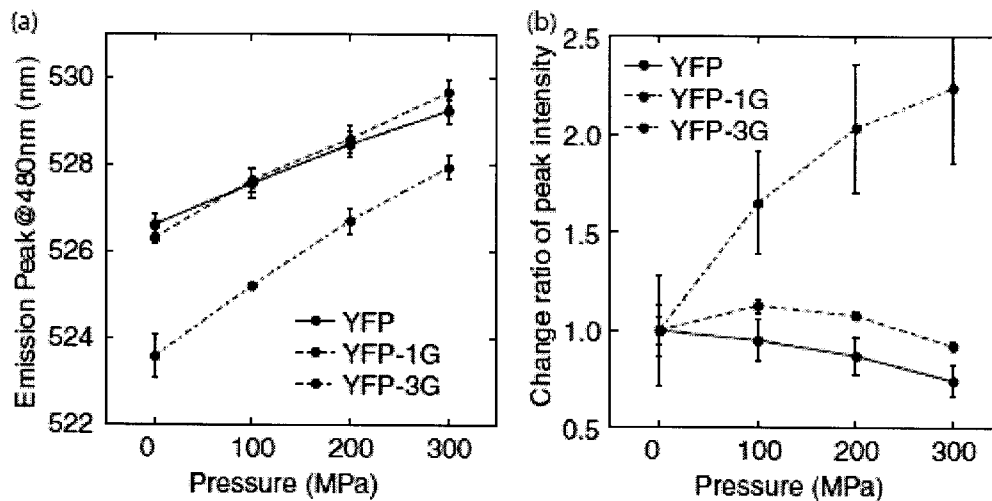
[図2]



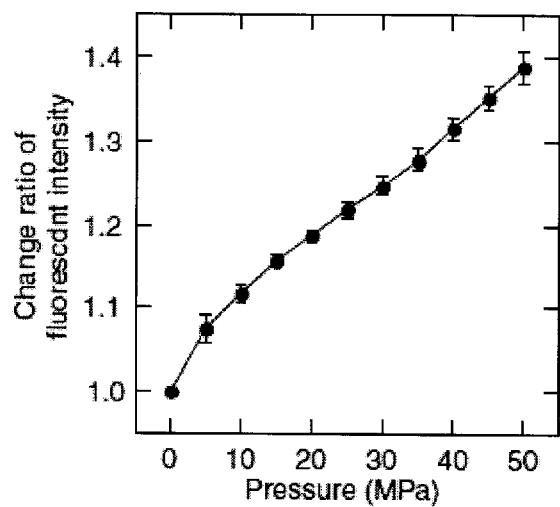
[圖3]



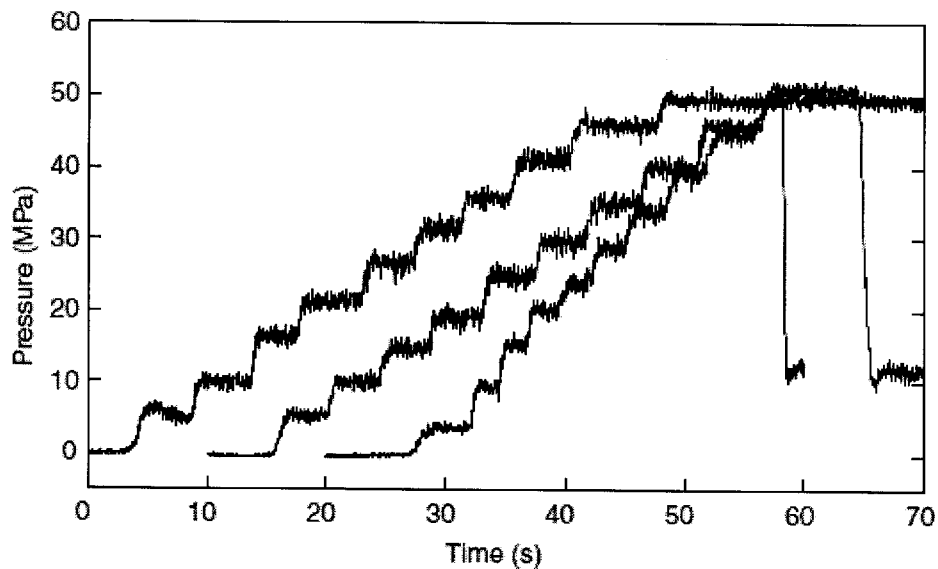
[圖4]



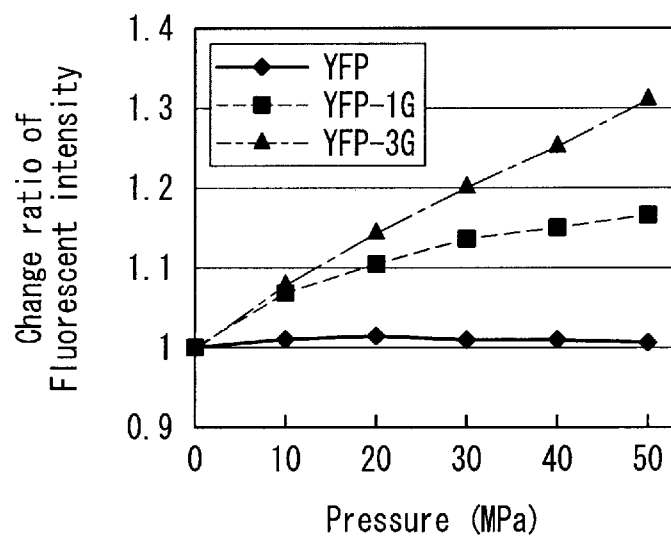
[圖5]



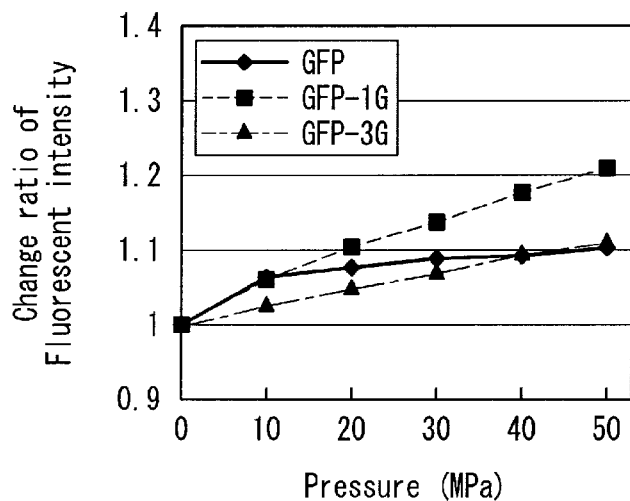
[圖6]



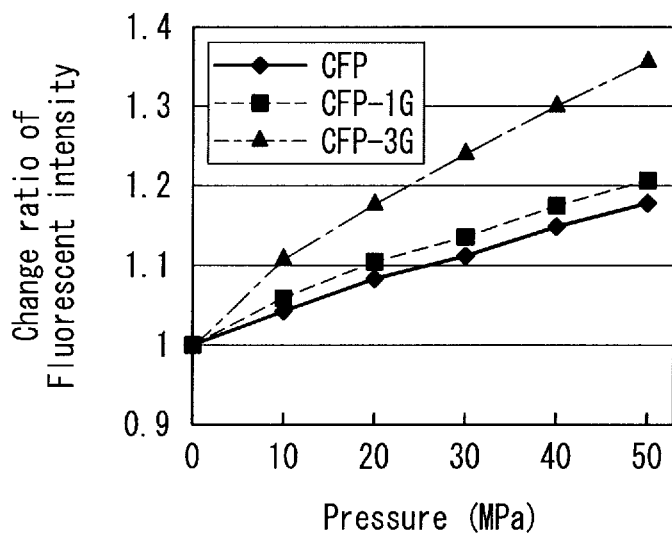
[圖7]



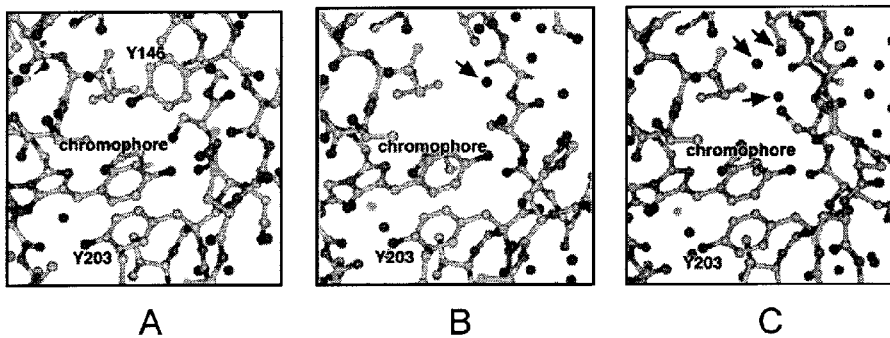
[圖8]



[圖9]



[圖10]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/075932

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER <i>C12N15/09(2006.01) i, A01K67/027(2006.01) i, C07K14/435(2006.01) i, C12N1/15(2006.01) i, C12N1/19(2006.01) i, C12N1/21(2006.01) i, C12N5/10(2006.01) i, G01N21/64(2006.01) i</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) <i>C12N15/09, A01K67/027, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N21/64</i> 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 1996-2011 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2011 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2011 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) JSTPlus/JMEDPlus/JST7580 (JDreamII), PubMed													
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT													
<table border="1"> <thead> <tr> <th>Category*</th> <th>Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages</th> <th>Relevant to claim No.</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>Tomonobu WATANABE, "Sei Saibonai ni Okeru Keiko Tanpakushitsu ni yoru Chikara Hassei no 3 Jigen Kashika", Seimei Gensho Kaimei no Tameno Keisoku Bunseki, Sakigake CREST Kenkyu Hokokukai Koen Yoshishu, 12 January 2010 (12.01.2010), 1 to 4</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WATANABE, T., et al., "Tanpakushitsu o Mochiita Choryoku Kanjusei Probe no Kaihatsu", The Biophysical Society of Japan Dai 47 Kai Koen Yokoshu, 20 September 2009 (20.09.2009), S103, 1P-261</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>BAIRD, G.S., et al., "Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96(20), 11241-6</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>	Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.	X	Tomonobu WATANABE, "Sei Saibonai ni Okeru Keiko Tanpakushitsu ni yoru Chikara Hassei no 3 Jigen Kashika", Seimei Gensho Kaimei no Tameno Keisoku Bunseki, Sakigake CREST Kenkyu Hokokukai Koen Yoshishu, 12 January 2010 (12.01.2010), 1 to 4	1-11	X	WATANABE, T., et al., "Tanpakushitsu o Mochiita Choryoku Kanjusei Probe no Kaihatsu", The Biophysical Society of Japan Dai 47 Kai Koen Yokoshu, 20 September 2009 (20.09.2009), S103, 1P-261	1-11	A	BAIRD, G.S., et al., "Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96(20), 11241-6	1-11	
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.											
X	Tomonobu WATANABE, "Sei Saibonai ni Okeru Keiko Tanpakushitsu ni yoru Chikara Hassei no 3 Jigen Kashika", Seimei Gensho Kaimei no Tameno Keisoku Bunseki, Sakigake CREST Kenkyu Hokokukai Koen Yoshishu, 12 January 2010 (12.01.2010), 1 to 4	1-11											
X	WATANABE, T., et al., "Tanpakushitsu o Mochiita Choryoku Kanjusei Probe no Kaihatsu", The Biophysical Society of Japan Dai 47 Kai Koen Yokoshu, 20 September 2009 (20.09.2009), S103, 1P-261	1-11											
A	BAIRD, G.S., et al., "Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96(20), 11241-6	1-11											
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.													
<table border="0"> <tr> <td>* Special categories of cited documents:</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</td> <td>"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</td> </tr> <tr> <td>"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)</td> <td>"&" document member of the same patent family</td> </tr> <tr> <td>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</td> <td></td> </tr> <tr> <td>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</td> <td></td> </tr> </table>		* Special categories of cited documents:	"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	"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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	"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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	"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)	"&" document member of the same patent family	"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	
* Special categories of cited documents:	"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												
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"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												
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"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												
"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)	"&" document member of the same patent family												
"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													
Date of the actual completion of the international search 25 November, 2011 (25.11.11)	Date of mailing of the international search report 06 December, 2011 (06.12.11)												
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office	Authorized officer Telephone No.												
Facsimile No.													

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2011/075932

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, A	JP 2011-188821 A (Japan Science and Technology Agency), 29 September 2011 (29.09.2011), claims 1 to 8; paragraphs [0017], [0018], [0032] (Family: none)	1-11

<p>A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09(2006.01)i, A01K67/027(2006.01)i, C07K14/435(2006.01)i, C12N1/15(2006.01)i, C12N1/19(2006.01)i, C12N1/21(2006.01)i, C12N5/10(2006.01)i, G01N21/64(2006.01)i</p>											
<p>B. 調査を行った分野</p> <p>調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))</p> <p>Int.Cl. C12N15/09, A01K67/027, C07K14/435, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, C12N5/10, G01N21/64</p>											
<p>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</p> <p>日本国実用新案公報 1922-1996年 日本国公開実用新案公報 1971-2011年 日本国実用新案登録公報 1996-2011年 日本国登録実用新案公報 1994-2011年</p>											
<p>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)</p> <p>JSTPlus/JMEDPlus/JST7580(JDreamII), PubMed</p>											
<p>C. 関連すると認められる文献</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>引用文献の カテゴリー*</th> <th>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</th> <th>関連する 請求項の番号</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>渡邊朋信, "生細胞内における蛍光蛋白質による力発生 of 3次元可視化", 生命現象解明のための計測分析 さきがけ・CREST 研究報告会講演要旨集, 2010.01.12, 1-4</td> <td>1-11</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WATANABE, T., et al., "蛋白質を用いた張力感受性プローブの開発", 日本生物物理学会第47回講演予稿集, 2009.09.20, S103, 1P-261</td> <td>1-11</td> </tr> </tbody> </table>			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	渡邊朋信, "生細胞内における蛍光蛋白質による力発生 of 3次元可視化", 生命現象解明のための計測分析 さきがけ・CREST 研究報告会講演要旨集, 2010.01.12, 1-4	1-11	X	WATANABE, T., et al., "蛋白質を用いた張力感受性プローブの開発", 日本生物物理学会第47回講演予稿集, 2009.09.20, S103, 1P-261	1-11
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	渡邊朋信, "生細胞内における蛍光蛋白質による力発生 of 3次元可視化", 生命現象解明のための計測分析 さきがけ・CREST 研究報告会講演要旨集, 2010.01.12, 1-4	1-11									
X	WATANABE, T., et al., "蛋白質を用いた張力感受性プローブの開発", 日本生物物理学会第47回講演予稿集, 2009.09.20, S103, 1P-261	1-11									
<p><input checked="" type="checkbox"/> C欄の続きにも文献が列挙されている。 <input type="checkbox"/> パテントファミリーに関する別紙を参照。</p>											
<p>* 引用文献のカテゴリー</p> <p>「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</p>											
<p>国際調査を完了した日</p> <p>25.11.2011</p>	<p>国際調査報告の発送日</p> <p>06.12.2011</p>										
<p>国際調査機関の名称及びあて先</p> <p>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</p>	<p>特許庁審査官 (権限のある職員)</p> <p>神谷 昌男</p> <p>電話番号 03-3581-1101 内線 3448</p>	<p>4B 4503</p>									

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
A	BAIRD, G.S., et al., "Circular permutation and receptor insertion within green fluorescent proteins", Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999, 96(20), 11241-6	1-11
PA	JP 2011-188821 A (独立行政法人科学技術振興機構) 2011.09.29, 【請求項1】 - 【請求項8】、【0017】、【0018】、【0032】 (ファミリーなし)	1-11