

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03221

研究課題名(和文) 試験管内分子進化と立体構造解析に基づいた赤色蛍光タンパク質の系譜拡張

研究課題名(英文) Extension of lineages of red fluorescent proteins based on in vitro molecular evolution and structural analysis

研究代表者

今村 博臣 (Imamura, Hiromi)

京都大学・生命科学研究科・准教授

研究者番号：20422545

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：タンパク質工学によって、天然の緑色蛍光タンパク質(GFP)を赤色蛍光タンパク質(RFP)へと人工的に変換することに初めて成功した。GFPとRFPは異なる構造の発色団を自己触媒的に作り出す。変換前と変換後の立体構造を詳細に比較することで、RFP発色団が形成されるために重要だと考えられる構造上の要素が明らかとなった。今回GFPから開発したRFPは既存のRFPの中でも最高クラスの量子収率を持っており、GFPからの人工的な変換が新たな高輝度RFPを開発する有力な手法となりうることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、不可能とされていた緑色の蛍光タンパク質を赤色に変えることが可能であることを実証した。今回開発したRFPは、明るい蛍光を発するGFP並みの量子効率をもつものの励起光の吸収効率が悪い。また明るさが十分とはいえない。一方で、今回の研究により赤色発色団を形成するために重要な発色団周囲の環境が明らかになった。本研究は、天然に広範に存在するGFPからのRFPの創成に道を開くもので、明るく高性能なRFPの開発を一気に加速させる成果である。このようなRFPを用いれば、現在は難しい組織や臓器内といった生体深部のイメージングが可能になり、医学・生物学研究の進展に大きく寄与すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have successfully convert a naturally occurring green fluorescent protein (GFP) into a red fluorescent protein (RFP) by protein engineering. A detailed comparison of the conformations before and after conversion revealed the structural elements considered to be important for the formation of the RFP chromophore. The RFP developed from GFP in this study has one of the highest quantum yields among existing RFPs, indicating that artificial conversion from GFP may be a promising method for developing new bright RFPs.

研究分野：生物物理学

キーワード：蛍光タンパク質 イメージング X線結晶構造解析 タンパク質工学

1. 研究開始当初の背景

下村脩博士が発見したオワンクラゲ緑色蛍光タンパク質 (avGFP) とそのファミリータンパク質 (本申請書中では簡単のため“FP”とする) は、それ自身を構成するアミノ酸配列の一部が自己触媒的に蛍光団を形成し、他の因子なしに蛍光性を持つという特徴をもつ。そのため、タンパク質やオルガネラのタグ、あるいは遺伝子コード型蛍光バイオセンサーの構成要素等として、現代の生物学研究に欠かすことのできない極めて有用なツールとなっている。

従来報告されている天然型 FP の多くは緑色蛍光を有するが、一部の花虫綱動物 (サンゴやイソギンチャク等) からは赤色蛍光を発する FP が単離されている。FP の蛍光団は β バレル構造の内部に存在し、3つの連続するアミノ酸残基から自己触媒的に形成される。蛍光団形成の最初のステップは 65~67 番目 (番号は avGFP に準じる) のアミノ酸主鎖の環状化による N-[5-hydroxy-1H-imidazole-2yl)methylidene]acetamide の形成である。緑色 FP (GFP) では、これに続いて 66 番目の Tyr 残基の C α -C β 間に二重結合が形成されて蛍光団が完成する。一方、赤色 FP (RFP) では、まず 65 番目のアミノ酸主鎖において C α -N 間の二重結合が形成された後に、66 番目 Tyr 残基の C α -C β 間二重結合が形成されることにより蛍光団が完成すると考えられている。すなわち、赤色蛍光団の形成は、緑色蛍光団とは異なる自己触媒反応によって進む。

生体深部のイメージングには、生体内で散乱や吸収が生じにくい長波長 (赤色~近赤外色) の光が適しているが、既存の長波長 FP、特に蛍光波長が 600 nm を超えるものは蛍光量子収率が極めて低く、暗いという欠点があった。そのため、生体イメージング用タグとして、長波長の蛍光を発する明るい高性能 FP の開発が強く求められていた。現在研究に用いられているほぼ全ての長波長 FP は、*Discosoma sp.* と *Entacmaea quadricolor* から単離されたアミノ酸配列の相同性が高い 3 種類の RFP (DsRed, eqFP578, eqFP611) を元に開発されたものであるために、アミノ酸配列が互いに類似している。このような配列多様性の低さが、高性能な新しい長波長 FP を開発するための自由度を制限していた。一方、GFP の配列は多様性が高く、上記の RFP と進化的に比較的近いものから離れたものまで存在する。そのため、こうした GFP の改変によって RFP の系譜を人工的に拡張することができれば、RFP の配列多様性が増大し、高性能な長波長 FP を開発するための新たな基盤になると考えられた。しかし、本研究の開始時点では、試験管内分子進化によって GFP を RFP へと変換することに成功したという報告はなかった。また、RFP は緑色蛍光を有する祖先型 FP から進化したことが分子進化的な解析から示唆されていたが、どのような立体構造の変化が、蛍光団形成の自己触媒反応を緑色型から赤色型へと変化させたかについてはよくわかっていなかった。

2. 研究の目的

本研究は、次の 2 つの目標を掲げた。

- ①天然型 GFP に変異を導入することにより、既存の RFP とは系譜の異なる新しい RFP を創出する。
- ②上記①で創出する RFP の立体構造を、元の GFP の立体構造および両者の中間に位置する FP の立体構造と比較することにより、赤色蛍光団の形成にはどのような立体構造の違いが本質的に重要であるかを明らかにする。

3. 研究の方法

3-1. プラスミドの構築と変異誘導

分光解析のための FP 過剰発現プラスミドは、FP 遺伝子を pRSETB ベクターの XhoI および HindIII サイトの間にサブクローニングすることで得た。部位特異的変異誘導は、変異を含み、15 塩基のオーバーラップを持つ 2 つの変異プライマーを用いて KOD One DNA ポリメラーゼで PCR を行った。ランダム変異誘導は、GeneMorph II ランダム変異誘導キットを使用し、FP cDNA を増幅することで行った。結晶化のための AzamiGreen および AzamiRed1.0 の過剰発現プラスミドは、pET15b ベクターの NdeI-BamHI サイトに各遺伝子をサブクローニングすることによって構築した。哺乳類細胞の細胞質で AR1.0 および mARs1 を発現させるためのプラスミドは、それぞれの遺伝子を pcDNA3.1(-)ベクターの XhoI-HindIII サイト間にサブクローニングすることによって構築した。mARs1 の核、ミトコンドリアマトリックス、細胞膜、小胞体、およびゴルジ体への局在化プラスミドは、3xNLS-mScarlet-I、4xMTS-mScarlet-I、Lck-mScarlet-I、ER-mScarlet-I、および mScarlet-I-Giantin を、後期エンドソームおよびフォーカルアドヒージョンへの局在化プラスミドは、mScarlet-I-Rab7、および mScarlet-I-PXN を、リソソームおよび微小管先端への局在化プラスミドは、EB3-mScarlet-I および Lamp1-mScarlet-I を、アクチンフィラメントへの局在化プラスミド LifeAct-mTurquoise2 の FP 部分を置き換えることで構築した。

3-2. スペクトル特性のための FP のタンパク質発現および精製

FP プラスミドで形質転換した大腸菌 JM109(DE3)株のコロニーを 50 mL の 2 \times YT 培地に移し、24 $^{\circ}$ C で 2 日間、振盪培養した。発現した FP は、Talon Sepharose カラムと Superdex 200 Increase

10/300 GL ゲル濾過カラムで精製し、4°C で保存した。

3-3. 吸収および蛍光スペクトル

精製 FP の吸収および蛍光スペクトルを、それぞれ V-730bio UV-可視分光光度計および FP-8300 蛍光分光光度計を使用して測定した。

3-4. X線結晶構造解析のための FP のタンパク質発現および精製

FP プラスミドで形質転換した大腸菌 BL21(DE3)株を、光学密度 600 nm が 0.4-0.7 になるまで、アンピシリン (50 μ g/mL) を含む 2 L の LB 培地で 37 °C で培養した。その後、イソプロピル- β -D-チオガラクトピラノシド (0.5 mM) を添加してタンパク質発現を誘導し、培養を 18 °C で一晩続けた。発現した FP は、Ni-NTA アガロースカラムと Superdex 200 Increase 10/300 GL ゲル濾過カラムで精製し、4°C で保存した。

3-5. X線結晶構造解析

結晶化は、20 °C でタンパク質溶液とリザーバー溶液を 0.5 μ L ずつ混合することで、シッティングドロップ蒸気拡散法を使用しておこなった。X線回折データは、SPring-8 のシンクロトロンビームライン BL41XU において、100 K の窒素ストリーム中で収集した。回折データは MOSFLM を使用して処理され、AIMLESS でスケールされた。初期フェーズは、Phenix プログラムの Phaser-MR を使用して、既報の AzamiGreen の構造 (PDB ID: 6CIU) を検索モデルとして分子置換法によって計算された。原子モデルの構築および精密化はそれぞれ Coot および Phenix を使用して行った。原子座標および構造因子 (コード 814J および 814K) は、タンパク質データバンクに登録した。

3-6. 哺乳類細胞培養および顕微鏡観察

HeLa 細胞株は、10 %牛胎子血清 (FBS) を補充した DMEM (1 g/L グルコース) で培養した。PEI-Max を使用し、FP 発現用プラスミドで HeLa 細胞をトランスフェクションした。イメージングには、Ti-E 倒立顕微鏡と Zyla4.2sCMOS カメラを使用した。対物レンズは、Plan Apo 60 \times 、開口数 1.40、油浸対物レンズ、もしくは Plan Apo 20 \times 、開口数 0.75、ドライ対物レンズを使用した。OSER アッセイでは、HeLa 細胞を、CytERM-mARs1、CytERM-mCherry、または CytERM-dTomato プラスミドでトランスフェクションし、トランスフェクションの 16-24 時間後に SP8 共焦点顕微鏡で画像を収集した。OSER 構造および核膜の蛍光強度の定量は FIJI でおこなった。

4. 研究成果

4-1. サンゴ由来 GFP の RFP への変換

我々は、本研究の出発材料として、アザミサンゴ (*Galaxea fascicularis*) 由来の明るい 4 量体 GFP である AzamiGreen (AG) を出発材料として選択した。AG は、492 nm に最大励起波長、503 nm に最大蛍光波長をもち、代表的な RFP である DsRed、eqFP578、および eqFP611 とは、アミノ酸配列上でそれぞれ 54%、51%、49%の同一性を有する。我々は、これら 3 つの RFP に高度に保存されているアミノ酸残基が、拡張された π 共役系を有する発色団の形成において重要な役割を果たしていると仮定した。これら 3 つの RFP で保存性が高いアミノ酸残基を導入した AG 変異体を作製した。いくつかの変異体の中で、35 アミノ酸を置換した AG 変異体において弱い赤色蛍光が観察され、この変異体を AzamiRed0.1 (AR0.1) と命名した。AR0.1 は、501 nm の強い吸収と AG に似た緑色蛍光成分に加えて、577 nm での吸収と 600 nm を最大とする赤色蛍光成分を有していた。AR0.1 に 8 箇所の復帰変異を導入し、更に 157-159 残基で飽和変異誘導を行うことで、赤色蛍光が増加し緑色蛍光が減少した AzamiRed0.6 (AR0.6) を得た。AR0.6 をさらに改変し、195 番目の残基での復帰変異および 40 と 118 残基での飽和変異を導入して、AzamiRed1.0 (AR1.0) を得た。AR1.0 は、最大励起波長が 571 nm、最大発光波長が 606 nm であり、AG と比較して 500 nm での吸収が著しく減少しており、緑色蛍光はほとんど無視できる程度であった。AR1.0 は AG から 29 のアミノ酸置換を含み、両 FP のアミノ酸同一性は 87%であった。AR1.0 のモル吸光係数 (34,100) は、AzamiGreen の約半分であり、DsRed、eqFP578、および eqFP611 よりもはるかに低かったが、この低いモル吸光係数の理由は不明である。一方で、AR1.0 の蛍光量子収率 (QY) は 0.65 であり、600 nm を超える最大発光波長を持つ FP の中で最高クラスであった。この結果は、高い QY を持つ RFP が天然の GFP を改変することで開発できることを示している。

次に、AR1.0 の 29 アミノ酸置換セットが AG 以外の GFP を RFP に変換できるかどうかを検証した。これらの 29 置換を、AG と 82%の配列同一性を有し、DsRed、eqFP578、および eqFP611 と約 50%の同一性を有する *Montastraea cavernosa* 由来の GFP (mcavGFP) に導入した。mcavRed0.1 と命名したこの変異体は、575 nm に吸収ピークを持ち、暗いが明確な赤色蛍光を示した。これは、29 のアミノ酸置換セットが少なくともいくつかのサンゴ由来 GFP に DsRed 型の発色団を形成する能力を付与することを示している。我々はさらにランダム変異誘導を行い、mcavRed0.1 の赤色発色団の形成を改善した。6 回のランダム変異誘導の後、580 nm 付近での吸収が大幅に改善された mcavRed1.0 を得た。mcavRed1.0 は、最大発光が AR1.0 より 10 nm 長い 616 nm であり、蛍光 QY は 0.38 であった。

4-2. GFP から RFP への変換に重要なアミノ酸残基

AG に導入された 29 のアミノ酸変異のうち、どの変異が緑から赤への変換に不可欠であるかを調査するために、それぞれのアミノ酸残基を一つずつ AG のアミノ酸残基に置換した復帰変異体を作製した。多くの復帰変異が赤色発色団の形成にほとんど影響を与えなかったが、60、62、65、66、69、105、107、158、または 159 番目のアミノ酸残基の置換は赤色発色団の吸収を大幅に減少させた。これは、これらの残基が赤色発色団の形成に重要な役割を果たしていることを示唆している。さらに、65、66、105、158、または 159 番目の位置での単一アミノ酸置換は、緑色蛍光の出現を伴った。しかし、29 の復帰変異体のいずれも赤色蛍光を完全に失うことはなかったことは注目すべき点である。

次に、AR1.0 における変異を AG の配列に順次戻していった。AR1.0 から、4、7、および 9 箇所のアミノ酸残基が順次戻された AR1.1、AR1.2、および AR1.3 の吸収および蛍光スペクトルは、AR1.0 と非常に類似していた。ただし、培養哺乳類細胞における発色団の形成速度は、AR1.0、AR1.1、および AR1.2 に比べて AR1.3 では明らかに遅くなっていた。AR1.3 から AR1.2 を作成するために置換された Thr39 と Ser82 は、それぞれタンパク質の表面および発色団から離れた位置にある。したがって、Thr39 と Ser82 はタンパク質の折りたたみに寄与している可能性がある。我々はさらに、AR1.3 から、3、5、および 6 箇所のアミノ酸残基を戻した AR1.4、AR1.5、および AR1.6 を生成した。これらの変異体の吸収スペクトルは AR1.0 と比較して著しく変化していたが、依然として顕著な赤色蛍光を保持していた。AR1.6 には、AG とは異なる 14 箇所のアミノ酸残基 (Pro59、Gln60、Met62、Ser65、Lys66、Ile69、Pro76、Phe87、Gln105、Thr107、Val118、Gly138、Ile158、Lys159) が存在する。これらの残基は、AzamiRed タンパク質における赤色発色団の形成反応に重要な役割を果たしていると考えられた。

4-3. GFP から RFP への変換に関連する構造変化

我々は、AR1.0 および AG の結晶構造をそれぞれ 1.84 Å および 1.62 Å の解像度で決定した。AR1.0 結晶の非対称単位には 6 分子 (1 つ半の 4 量体) が含まれており、AG 結晶の非対称単位には 4 分子 (1 つの 4 量体) が含まれていた。各非対称単位の分子はほぼ同一の構造であった。非対称単位内の任意の 2 つの分子間の C_α 原子の平均 RMSD 値は、AR1.0 で 0.335 Å 以下、AG で 0.191 Å 以下であった。AG および AR1.0 の 4 量体は、サブユニットの向きにおいて DsRed 4 量体と類似していた。AR1.0 および AG の全体的な構造は非常に類似しており、非対称単位内の任意のサブユニットの組み合わせ間で C_α 原子の RMSD が 0.478 Å 以下であった。ほとんどの構造差異は発色団周辺に限局しており、発色団周辺の親水性相互作用ネットワークに有意な差異が見られた。

AG の Asn62、Tyr63、Gly64 によって形成された発色団は GFP タイプの構造を持つ一方、AR1.0 の Met62、Tyr63、Gly64 によって形成された発色団は典型的な DsRed タイプの構造を持っていた。AR1.0 の電子密度マップは、Phe61 の主鎖 C および Met62 の主鎖 N、C_α、および C_β がイミダゾリノン環と同一平面にあることを明示しており、Met62 の C_α が sp² ハイブリッドであり、Met62 の N-C_α 結合が二重結合であることを示している。したがって、共役 π 電子系が拡張されて、アシルイミンが形成されていることが明らかとなった。発色団に先行するペプチド結合 (Phe61 と Met62 の間) は、他の赤色蛍光タンパク質で見られるように、cis 配置を示している。AR1.0 の発色団のフェノール環はイミダゾリノン環と同一平面にあることから、Tyr63 の C_α-C_β 結合は脱水素されて二重結合を形成している。フェノール環は、DsRed 発色団のように cis 配置を取る。AR1.0 発色団のフェノール酸素は、Ser142 の O_γ、Lys159 の N_ε、および β ストランド 7 と 10 の間の裂け目にある水分子と相互作用する。これらの原子は、Glu140 の主鎖カルボニル酸素、Ile195 および Ala160 の窒素原子、ならびに β7 と β8 の間の裂け目にある水分子と親水性相互作用ネットワークを形成する。類似の相互作用ネットワークは DsRed (PDB ID: 1zgo) にも形成されている。平面フェノレート環は His193 との π-π スタッキングによって安定化されている。親水性相互作用ネットワークと π-π スタッキング相互作用は AG にも保存されているが、AG の対応する残基がメチオンである点が異なる。

フェノール酸素周辺の構造とは対照的に、AR1.0 のイミダゾリノン環周辺の親水性相互作用ネットワークは、AG や DsRed のそれとは異なるが、d1eqFP611 (PDB ID: 3E5T) のそれに類似している。ただし、d1eqFP611 のフェノール環は trans コンフォメーションを取る。Lys66、Glu144、His193、および Glu211 は、イミダゾリノン環の下にある 4 つの水分子から成る水クラスターと水素結合ネットワークを形成していた。Glu144 と Glu211 は、それぞれ His193 の N_ε および N_δ と水素結合していた。Lys66 は Glu144 および水クラスターと相互作用するが、DsRed とは異なり、Glu211 と直接相互作用していない。したがって、Glu211 の負電荷は Glu211-His193-Glu144-Lys66 ネットワークによって安定化される可能性がある。Glu144 は Tyr177 とも相互作用し、側鎖カルボキシ基のコンフォメーションを安定させていた。Arg91 のグアニジノ基は、直接イミダゾリノン環のカルボニル酸素と相互作用していた。Arg91 のグアニジノ基のコンフォメーションは、Thr175 の O_γ、Tyr177 の O_η、Gln60 の O_ε、および Pro59 のカルボニル酸素との水素結合によってガイドされる。

Glu211、His193、Glu144、および Tyr177 によって形成された水素結合ネットワークは AG にも存在するが、イミダゾリノン環の近くに水クラスターは見られなかった。AG の Glu211 は、独自の折りたたまれたコンフォメーションを取る Arg66 と相互作用し、Thr69 の O_γ および Phe68

のカルボニル酸素によって安定化されるが、イミダゾリノン窒素とは相互作用しない。AG の Glu211 は、Gln38 の N_ε および水分子と相互作用する。したがって、AG の Glu211 の負電荷は、これらの多重相互作用によって中和される可能性がある。AG の Arg91 の方向は、Thr59 の O_γ およびカルボニル酸素、および Thr175 の O_γ と水素結合することで整列し、イミダゾリノン環のカルボニル酸素と相互作用する。

発色団に続く 65 番目から 67 番目のセグメントに、AR1.0 と AG の間で最も顕著な主鎖構造の違いが見られた。この主鎖構造の違いは、異なる水素結合ネットワークによって維持されていた。AR1.0 のセグメント (Ser65-Lys66-Ala67) の主鎖コンフォメーションは、Trp89、Gln105、および Thr107 の側鎖原子、Lys66 および Ala67 の主鎖窒素原子、Gln60 および発色団 (Gly 64) のカルボニル酸素原子、および 3 つの水分子によって形成された水素結合ネットワークによって安定化されていた。Ser65 の O_γ は Tyr116 および Gln38 の側鎖と水素結合していた。AR1.0 の Gln38 は、Ser65 の主鎖カルボニル酸素および水クラスター内の水分子とも相互作用していた。一方、AG のセグメント (Asn65-Arg66-Ala67) の主鎖コンフォメーションは、周囲の残基 (Phe68、Thr69、Glu211 を含む) と Arg66 のグアニジノ基との相互作用によって歪んでいた。セグメントのコンフォメーションは、Trp89 および Ser105 の側鎖原子、Arg66 および Ala67 の主鎖窒素原子、Val60 および発色団 (Gly 64) のカルボニル酸素原子、および 3 つの水分子によって形成された水素結合ネットワークによってさらに安定化されていた。AG の Asn65 の側鎖は、AR1.0 の Ser65 とは異なる方向を向いており、Asn65 の N_δ は Tyr116 と水素結合し、Phe114 とカチオン-π 相互作用を形成し、Asn65 の O_δ は Tyr87 および Ala67 と水素結合していた。これらの相互作用もセグメントコンフォメーションの安定化に寄与している。これらの広範な構造再配置の結果として、AR1.0 のイミダゾリノン環の下には 4 つの水分子を含む大きな空洞が作られる。この空洞は他の多くの RFP にも見られ、赤色発色団の形成に必要な不可欠な酸素分子が結合するポケットである可能性が考えられた。

61 番目と 62 番目のペプチド結合の trans-cis 異性化は、赤色発色団の形成に必要なステップである。AG の Phe61 の主鎖カルボニル酸素は、水分子を介して Gln38 および Tyr116 と相互作用する。この相互作用は、Phe61-Asn62 ペプチド結合の trans コンフォメーションを強化し、アシルイミン形成に必要な cis 形への異性化を妨げる可能性がある。一方、AR1.0 の Phe61 には水素結合パートナーが存在せず、Ser65 の側鎖が水分子を排除して Gln38 および Tyr116 と新しい水素結合を形成し、AR1.0 の trans-cis 異性化を可能にする。この trans-cis 異性化には、58 番目と 62 番目の残基間の主鎖水素結合の破壊が伴う。水素結合の喪失は、Ser58 のカルボニル酸素と Gln209 の N_ε との新しい水素結合によって補償され、AR1.0 のシスペプチドを安定化する。この新しい水素結合が赤色発色団の形成に寄与していることは、Q209L 変異が 580 nm の吸収を減少させた事実によっても裏付けられる。

4-4. 蛍光イメージングのためのモノマー化 AzamiRed

多量体蛍光タンパク質は、融合パートナータンパク質の細胞内局在や機能に影響を与えるため、蛍光タグには適していない。AR1.0 は 4 量体であるため、蛍光タグとしての使用のために AR1.0 をモノマー化した。初めに、AG をモノマー化するために使用された V123T/Y188A/F190K 変異を AR1.0 に導入したが、蛍光はほぼ完全に失われた。蛍光を回復させるために、モノマー化した AR1.0 に対してランダム変異誘導および部位特異的飽和変異誘導を行った。この過程で、C 末端の 7 残基も除去した。最終的に、AR1.0 から C 末端の 7 残基を除去し、さらに 16 残基が置換された赤色蛍光を有するモノマー変異体である mARs1 を得た。置換された残基のほとんどはタンパク質の表面または発色団から離れた位置に存在する。精製された mARs1 タンパク質は、非常に高濃度でもサイズ排除クロマトグラフィーによってモノマーに対応する位置に単一ピークを示した。mARs1 が細胞内でモノマーとして振る舞うかどうかを確認するために、OSER アッセイを実施した。mARs1 の OSER スコアは mCherry と同様に低く、モノマー閾値を下回っていた。したがって、mARs1 は細胞内でも非常に低いオリゴマー化傾向を持つと結論付けた。mARs1 は、AR1.0 と比較して吸収および発光最大がそれぞれ約 10 nm 青方偏移しており、AR1.0 と同じ最大励起波長 (571 nm) を保持していた。mARs1 のモル吸光係数および蛍光量子収率は、それぞれ 27,100 M⁻¹ cm⁻¹ および 0.26 であった。培養哺乳類細胞で発現した AR1.0 の明るさは mCherry を上回り、mScarlet-I の約 66% に達した。一方、mARs1 の明るさは、低いモル吸光係数および量子収率を反映して、mCherry および mScarlet-I のそれぞれ約 18% および 9% であった。培養哺乳類細胞での強い励起光に対する AR1.0 および mARs1 の光退色特性を調査した結果、両方の RFP が複雑な光退色動態を示すことが明らかになった。AR1.0 は光退色において 2 つの時間成分を示した。mARs1 は短い遅延後に光退色を開始し、mOrange2 および mCardinal に類似して光活性化が起こったことを示唆している。最終的に、mARs1 を融合タンパク質またはオルガネラ局在化配列を融合して培養哺乳類細胞で発現させ、細胞内局在を調査した。mARs1 融合タンパク質は、ミトコンドリア、核、小胞体、ゴルジ体、リソソーム、エンドソーム、細胞膜、アクチン繊維、および伸長する微小管末端などの細胞内構造を可視化した。したがって、mARs1 は細胞内で標準的な赤色蛍光タグとして機能する。この結果は、GFP のタンパク質工学を通じてタンパク質およびオルガネラタグに適したモノマー-RFP を開発できることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 5件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Imamura Hiromi, Sakamoto Shuichiro, Yoshida Tomoki, Matsui Yusuke, Penuela Silvia, Laird Dale W, Mizukami Shin, Kikuchi Kazuya, Kakizuka Akira	4. 巻 9
2. 論文標題 Single-cell dynamics of pannexin-1-facilitated programmed ATP loss during apoptosis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 e61960
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.61960	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Imamura Hiromi, Otsubo Shiho, Nishida Mizuho, Takekawa Norihiro, Imada Katsumi	4. 巻 120
2. 論文標題 Red fluorescent proteins engineered from green fluorescent proteins	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2307687120
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2307687120	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計19件（うち招待講演 4件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 今村博臣、大坪史歩、竹川宣宏、今田勝巳
2. 発表標題 緑色蛍光タンパク質由来赤色蛍光タンパク質の創出
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坪史歩、竹川宣宏、今村博臣、今田勝巳
2. 発表標題 緑色蛍光蛋白質AzamiGreen変異体における赤色蛍光発生の構造基盤
3. 学会等名 第21回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大坪史歩、今村博臣、竹川宣宏、今田勝巳
2. 発表標題 緑色蛍光蛋白質AzamiGreen由来赤色蛍光蛋白質の結晶構造解析に基づく赤色蛍光団形成の構造基盤
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村博臣、大坪史歩、西田水穂、竹川宣宏、今田勝巳
2. 発表標題 緑色蛍光蛋白質由来赤色蛍光蛋白質の開発
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村博臣、大坪史歩、西田水穂、竹川宣宏、今田勝巳
2. 発表標題 緑色蛍光タンパク質から赤色蛍光タンパク質を創り出す
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第47回討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 今村博臣、大坪史歩、西田水穂、竹川宣宏、今田勝巳
2. 発表標題 GFPからRFPへの人工的な変換によって明らかになったRFP蛍光団形成メカニズム
3. 学会等名 日本生体エネルギー研究会第49回討論会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 米満茜、西田水穂、今村博臣
2. 発表標題 ダイナミックレンジを増大させたFRET型ATPバイオセンサーによる単一細胞ATP計測
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大坪史歩、今村博臣、永富勇、竹川宜宏、今田勝巳
2. 発表標題 単量体化した人工赤色蛍光蛋白質AzamiRedの構造
3. 学会等名 第61回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiromi Imamura
2. 発表標題 Visualization and detection of the cellular energy currency with genetically encoded fluorescent biosensors
3. 学会等名 FAOPS2023 (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 大坪史歩、今村博臣、竹川宜宏、今田勝巳
2. 発表標題 AzamiGreenより作成した新規赤色蛍光蛋白質AzamiRed1.0の赤色発色団形成機構
3. 学会等名 第23回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 今村博臣
2. 発表標題 光熱変換を利用した細胞操作に向けた試み
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大坪史歩、今村博臣、竹川宜宏、今田勝巳
2. 発表標題 赤色蛍光タンパク質の単一復帰変異による赤色蛍光消失の構造基盤
3. 学会等名 第60回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	今田 勝巳 (Imada Katsumi) (40346143)	大阪大学・理学研究科・教授 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------