

# 様式 C-19

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21370071

研究課題名（和文） 多彩な発光微生物蛍光タンパク質による酸化ストレスの光シグナリング及びイメージング

研究課題名（英文） Fluorescence-signaling and imaging of oxidative stress on the basis of diverse fluorescent proteins originating from luminous bacteria

研究代表者

柄谷 肇 (KARATANI HAJIME)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：10169659

研究成果の概要（和文）：

発光細菌由来黄色蛍光タンパク質（Y1-yellow）及び青色蛍光タンパク質（Y1-blue）をコードする遺伝子の真核細胞発現系を構築すると共に、発現蛍光タンパクによる酸化ストレスの生細胞イメージング法を確立した。真核細胞モデルとして出芽酵母を用いた。ミトコンドリアシグナル配列を融合した Y1-yellow 遺伝子により、同サイト局在的発現系の構築を実現すると共に、Y1-yellow 蛍光に基づいてミトコンドリアの動態や活性酸素種を可視化できることを実証した。他方、細胞空間の広域で放射される Y1-blue 蛍光により、内在的なアポトーシスシグナルとなるミトコンドリアサイトクロム *c* の可視化を達成した。

成果の概要（英文）：

Live-cell fluorescence imaging method of mitochondrion in a budding yeast (*Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*)) as a model of eukaryotic cell has been established by use of recombinant redox yellow fluorescent proteins (Y1-yellow) and blue fluorescent protein (Y1-blue), originating from luminous bacterium *Aliivibrio sifiae* Y1, both of which exhibits the strong fluorescence only in their oxidative states. To endow such unique fluorescence properties to *Sc*, the genes encoding Y1-yellow, fused with a sequence targeting at mitochondrion, and Y1-blue were newly constructed. From a series of fluorescence imaging of *Sc* transformed with Y1-yellow gene, of which expression was designed to be localized at mitochondrial sites, it was demonstrated that Y1-yellow is profitable to visualize the mitochondrial dynamics as well as the reactive oxygen species (ROS) in living cells. Fluorescence imaging of *Sc* transformed with Y1-blue gene was also useful for the visualization of the respiratory activity as well as formation and extinction of ROS. Furthermore, it was demonstrated that Y1-blue is promising for the visualization of cytochrome *c*, which is a key factor in an intrinsic apoptosis cascade arising from the excess ROS formation in the respiratory electron transport.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費       | 間接経費      | 合計         |
|--------|------------|-----------|------------|
| 2009年度 | 6,900,000  | 2,070,000 | 8,970,000  |
| 2010年度 | 2,500,000  | 750,000   | 3,250,000  |
| 2011年度 | 2,200,000  | 660,000   | 2,860,000  |
| 年度     |            |           |            |
| 年度     |            |           |            |
| 総計     | 11,600,000 | 3,480,000 | 15,080,000 |

研究分野：生物物理化学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：生体生命情報学、生物物理、酸化ストレス、蛍光タンパク質、発光バクテリア

## 1. 研究開始当初の背景

オワンクラゲ由来緑色蛍光タンパク質 (GFP) に代表される蛍光タンパク質及びそれをコードする遺伝子は、Chalfie R. や Tsien R. らの研究を端緒として、バイオプローブあるいはリポータータンパク質として、標的遺伝子の発現サイト、タンパク質産物の挙動など、細胞内情報の獲得や生体関連物質のセンシングに広範囲に応用されており、蛍光タンパク質はライフサイエンス研究のキーワードとなった。本研究はそのような研究背景を踏まえて計画された。

## 2. 研究の目的

細胞内外の環境変化或いは刺激や攪乱に応答して光の色と強度を変化させる発光微生物由来の多彩な蛍光タンパク質或いはそれらをコードする遺伝子を活用して、i) 多様な酸化ストレスの蛍光イメージング法を構築すると共にその分子機構を解き明かす；ii) 蛍光イメージングに基づいて、大腸菌から真核細胞まで、生細胞の酸化ストレスの可視化法を構築する。真核細胞では特に酸化ストレスと密接に関わるミトコンドリアの動態の可視化及びアポトーシスシグナルの可視化を目指した。真核細胞モデルとして、高度な真核生物の生命現象の基本的な分子機構がよく保存されていること、また取扱が容易なことから出芽酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*; 以下 *Sc*) を用いた。

## 3. 研究の方法

研究の流れを i) ~ iv) に示す：i) 種々の蛍光タンパク質コード遺伝子のクローニング；ii) クローニングした遺伝子の発現系の構築；iii) 組換え体蛍光タンパク質の特性評価；及びiv) 酸化ストレス、活性酸素種などの蛍光イメージングへの応用。

### I. 大腸菌発現系の構築とイメージング

#### I-1. 遺伝子のクローニング：

発光バクテリア *Aliivibrio sifiae* Y1 より抽出したゲノム DNA を鋳型として、発光バクテリア黄色蛍光タンパク質 (Y1-yellow) 及び青色蛍光タンパク質 (Y1-blue) をコードする遺伝子 (Y1-yellow 及び Y1-blue と記す) を PCR で増幅後、それぞれ制限酵素 *PciI* 及び *XhoI* で処理した。次に同様に処理した線状化 pETBlue2 プラスミドにクローニングした。Y1-yellow 及び Y1-blue は 3' 末端に 6His 配列を有する。プラスミドベクターを精製後、*Escherichia coli* K12 の形質転換 (ヒートショック法) に供し、目的プラスミドを大量調製した。調製したプラスミドをそれぞれ pETBlue2-Y1-yellow、pETBlue2-Y1-blue と記す。引き続き両ベクターを発現用大腸

菌 *E. coli* BL21 株の形質転換に供した。

#### I-2. 発現条件の検討：

条件を詳しく調べた結果、カルベニシリン含有 2×YT 培地中、17 ° C で 24 時間培養することとした。組換え体蛍光タンパク質の大量調製の場合も同様に培養した。菌体を集菌後さらにソニケーションで破菌し、組換え体 Y1-yellow 及び Y1-blue 粗抽出液を得た。粗抽出液をそれぞれ His-Trap カラム及び DEAE カラムを用いて精製した。精製純度を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動分析により評価した。

#### I-3. 蛍光キャラクタリゼーション：

単離精製した Y1-yellow 及び Y1-blue の蛍光及び光吸収特性をスペクトロスコピーに基づいて行なった。

#### I-4. 蛍光イメージング：

蛍光顕微鏡による観測では対物レンズとして PlanFluor100×/1.3 oil を用い、位相差イメージと共にリアルカラー蛍光イメージを得た。蛍光イメージングには、Nikon Eclipse E600W 及び Ti4 を、Keyence CCD カメラシステム VB-6000 及び Nikon CCD カメラ DS-Ri1 と組み合わせたシステムを用いた。また使用したフィルターブロックを以下に示す：UV-1A (Exciter, 365/10 nm; DM, 400 nm; BA, 400 nm), V-2A (Ex, 380-420 nm; DM, 430 nm; BA, 450 nm); B-2A (Ex, 450-490 nm; DM, 505 nm; BA, 520 nm), G-2A (Ex, 510-560 nm; DM, 575 nm; BA, 590 nm), 及び FITC (Ex, 465-495 nm; DM, 505 nm; BA, 515-555 nm)。プレパラートを作製後、カバーガラスの 4 辺は高真空シリコンで封入した。観測時の温度は通常、約 23 ° C とした。

## II. 酵母発現系の構築とイメージング

### II-1. Y1-yellow コード遺伝子クローニング：

Y1-yellow と共にミトコンドリアシグナル配列 (MCT) を Y1-yellow N 末端に有する MCT-Y1-yellow コード遺伝子発現系を構築した。さらに *Sc* コドン使用頻度に基づいて両遺伝子の塩基配列の最適化を行い、コドン最適化遺伝子を合成し、クローニングに供した。PCR 等実験に用いたプライマーを以下に示す。

表 1 PCR 用プライマー及びミトコンドリアシグナル配列 (制限酵素サイトを含む)。

Y1-yellow 増幅用プライマー：  
BamHI-YFP Kob, AGGATCAAAAATGTTAAAGGTATAGTAG  
YFP-XbaI kob, ATCTAGACCAACACTGGTTAGCATT  
HindIII-MCT, AGGGAATATTAAGCTTAAAATGTTGTGCCAACAGATG  
YFP-XbaI, CGAAGGGCCCTCTAGACCAACACTGGTTAGCATT  
K-MCT-YFP-F, AGGGAATATTAAGCTTAAAATGTTGTGCCAACAAATG  
K-MCT-YFP-R, CGAAGGGCCCTCTAGACCAGCATTGGTTGGCATT  
ミトコンドリアシグナル配列 (HindIII-MCT)  
TACTGACCTTTCATGATAATAGGTCTGGTCATGATATTGCTACTTCTC  
TTAGCTGTCGTTCTAATCATCTGTTGGCACAACATTTAAAGCTT  
ミトコンドリアシグナル配列増幅用プライマー：

MCT-C : TACTGACCTCTTCATGATAATAGGCTCTGG  
MCT-YFP : ATGAAGAGGTCAGTAATGTTTAAAGGTATAGTA

II-2. Y1-yellow プラスミドベクターの構築:  
クローニングに供した遺伝子は次の4種類  
である: *Y1-yellow*, *opt-Y1-yellow*, *MCT-  
Y1-yellow* 及び *optMCT-Y1-yellow*. 添字 *opt*  
はコドン最適化遺伝子を指す。クローニング  
は pYES2/CT に対して行ない、これをシャトル  
ベクターとして形質転換に用いた。MCT 配  
列を欠く *Y1-yellow* コード遺伝子 (*Y1-yellow*)  
の場合、*Bam*HI 及び *Xba*I で処理後、pYES2/CT  
にクローニングした。Y1-YFP の N 末端への  
MCT 配列の連結は、In-fusion 反応により達  
成した。構築したベクターをそれぞれ  
pYES2/CT-Y1-yellow、-optY1-yellow、  
-MCT-Y1-yellow、-optMCT-Y1-yellow とよぶ。  
また、プラスミド PCR を行いインサート DNA  
の有無を確認した。次に各プラスミドベク  
ターを PEG、酢酸リチウム、サケ由来一本鎖 DNA  
及び *Sc* と混合し、ヒートショックを与えて  
*Sc* を形質転換した。

形質転換 *Sc* は、SC-U 寒天培地上で選択後、  
2 % glucose 含有 SC-U 液体培地中での培養、  
さらに 2 % Galactose 及び 2 % Raffinose を  
含む SC 誘導液体培地中で培養した。培養中  
は半日毎に 5 mol/L NaOH で培地の pH を 6.7  
に調整した。発現条件を詳しく調べ 30 °C、  
48 時間振盪条件が好適であることを見いだ  
した。

発現の成否は His-tag 抗体 Anti-His(C-  
term)-FITC 用いるウエスタンブロット法で  
評価した。

### II-3. Y1-blue 遺伝子のクローニングと発現:

*Y1-yellow* に準じる手法に基づいて実施し  
た。しかしながら *Y1-blue* の場合、*Y1-yellow*  
とは異なり、細胞空間全体に及ぶ *Y1-blue* 蛍  
光発現系の構築を目指した。遺伝子の増幅に  
用いたプライマー示す: BFP-Hind3-Fkob,  
AGGGAATATTAAGCTTATGTTTAAAGGTAATGTTCAA;  
BFP-XbaI-R2, CGAAGGGCCCTCTAGACCAATTACCTGCAATATC。野  
性型 *Y1-blue* コード遺伝子と同じ塩基配列を  
有するプラスミドを *pYES2/CT-Y1-blue*、また  
最適化した塩基配列を有するプラスミドを  
*pYES2/CT-optY1-blue* とよぶ。*optY1-blue* の  
場合、BFP-XbaI-R2 に変えて CU-BFP-RK  
(CGAAGGGCCCTCTAGACCAATTACCG) を用いた。次  
に HindIII 及び Xba I で線状化した pYES/2CT  
に対して In-fusion 反応を行いクローニング  
した。形質転換法は *Y1-yellow* の系と同様で  
ある。*Y1-blue* の場合、発現温度と培養時間  
はそれぞれ 25 °C 及び 24 時間とした。

### II-4. 蛍光イメージング:

観測法は上述の I-4 に準じる。カルチャー  
細胞を遠心操作と PBS 中への再分散を、観測  
法に応じて 1~3 回繰返した。またクローニ

ング未処理の pYES2/CT で形質転換した *Sc* を  
コントロール細胞とした。

共染色試薬として MitoTracker Orange (ジ  
メチルスルホキシド (DMSO) 中に調製、染色  
時濃度 150 nmol/L)、DAPI (PBS 中に調製、  
染色時濃度 0.1 µg/mL)、キナクリン (PBS 中  
に調製、染色時濃度 0.5 mmol/L) などを使用  
した。染色後は必要に応じて 2、3 回洗浄し、  
PBS 中に分散後、顕微鏡観測に供した。

## 4. 研究成果

### III. 大腸菌の系における成果

#### III-1. 組換え体 *E. coli* の蛍光イメージ:

*Y1-blue* 及び *Y1-yellow* による *E. coli* の  
蛍光イメージ及び単離精製した組換え体の  
蛍光スペクトルを図 1 に示す。

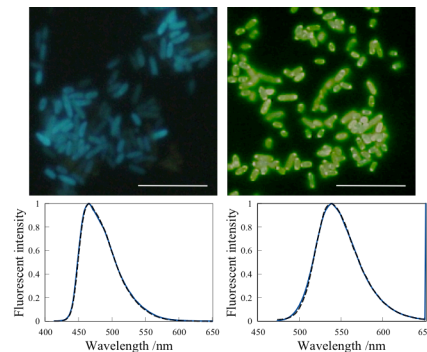


図 1 形質転換大腸菌生細胞蛍光イメージ  
(上段). 上左 *E. coli-Y1-blue* (V-2A); 上  
右 *E. coli-Y1-yellow* (B-2A). スケールバ  
ー, 10 µm. 下段, 単離精製した組換え体  
*Y1-blue* (左, ex 400 nm) 及び *Y1-yellow* (右,  
ex 460 nm) の蛍光スペクトル (実線). 破  
線, 野性型 *Y1-blue* 及び *Y1-yellow*.

種々の条件の生細胞イメージングより、高  
酸素濃度するとき *Y1-blue* 及び *Y1-yellow* は顕  
著な蛍光を示すことが判った。また、  
*Y1-yellow* の場合、細胞膜呼吸鎖近傍の蛍光  
が強いこと、他方 *Y1-blue* の蛍光は細胞空間  
全体で放射されることが明らかとなった。

また *Y1-blue* 及び *Y1-yellow* の蛍光・吸収  
スペクトロスコーピーから組換え体の蛍光挙  
動は野性型と一致することが認められた。

#### III-2. 刺激条件下の蛍光イメージ:

酸化還元環境あるいは呼吸鎖電子フロー  
の攪乱を目的として、Fe(III)、過酸化水素  
(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)、シアン化カリウム及び亜ジチオン酸  
ナトリウムの効果について検討した。

亜ジチオン酸イオンで処理した細胞は直  
ちに蛍光を失うが、他方過酸化水素処理によ  
り蛍光が増大した。これらの結果は *Y1-blue*  
及び *Y1-yellow* が細胞内の酸化還元環境の可  
視化に有用であることを示す。また、Fe<sup>3+</sup>を  
摂取した系において大きな蛍光強度の変化  
が観測された (Fig. 2)。

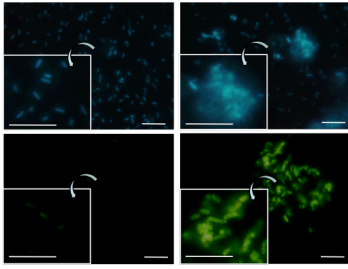
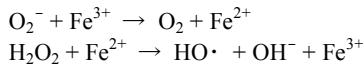


図2 Fe(III)処理前(左)後(右)における *E. coli*-YI-blue (上段, V-2A) 及び *E. coli*-YI-yellow (下段, B-2A) の蛍光イメージ.  $\text{Fe}^{3+}$  (カルチャー濃度 0.45 mmol/L). スケールバー, 10  $\mu\text{m}$ .

$\text{Fe}^{3+}$  摂取後、生体内のレドックス環境に応じて、 $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$  比が変動する。また呼吸鎖で恒常的に生産されるスーパーオキシドアニオン ( $\text{O}_2^-$ ) や  $\text{H}_2\text{O}_2$  との間でつぎの反応が起こるものと予想される。



上段の反応で生成する酸素は一重項であることが知られている。また後段で反応性が強いヒドロキシルラジカル ( $\text{OH}\cdot$ ) が産生する。観測された強い蛍光は、このような活性酸素種が一時的に多量に生じた結果、酸化型蛍光タンパク質濃度が増大したことに依ると考えられる。一連の実験から、YI-blue 及び YI-yellow 共に酸化ストレスと密接に関連する活性酸素種の可視化に有効なことが実証された。

#### IV. 出芽酵母の系における成果

##### IV-1. YI-YFP の蛍光免疫イメージング :

*Sc-MCT-YI-yellow* をパラホルムアルデヒド固定処理・洗浄後、Anti-His(C-term)-FITC との免疫反応に供した。

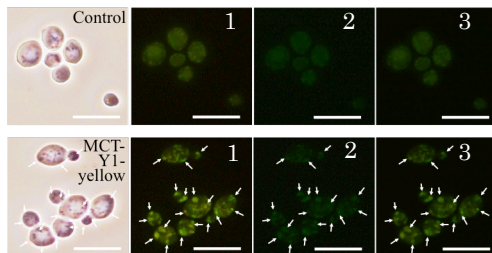


図3 免疫蛍光イメージング. 上段, コントロール; 下段, *Sc-MCT-YI-yellow*. 左, 位相差; 1, 2 及び 3, 蛍光(フィルター: 1, B-2A; 2, FITC; 3, V-2A). スケールバー, 10  $\mu\text{m}$ .

免疫蛍光染色から MCT-YI-yellow が細胞中において局所的に多数発現することを確認した(図3中, 矢印が指すサイト)。optMCT-YI-yellow も同様に発現した。

##### IV-2. YI-Yellow 発現サイト :

ミトコンドリアにおいて選択的に染色する MitoTracker Orange さらに DAPI を用いて共染色した後の蛍光イメージ(図4)から、YI-yellow 黄色蛍光サイトがミトコンドリアに局在することを明らかにした。他方、コントロールの場合(図4上段 A 1, B-2A フィルター)、ミトコンドリアサイトにおいて黄色蛍光は全く見られないことを検証した。

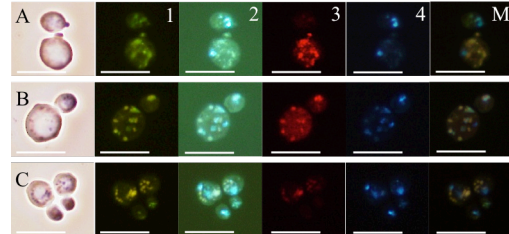


図4 多重染色後の蛍光イメージ. A, コントロール; B, *Sc-MCT-YI-yellow*, C, *Sc-optMCT-YI-yellow*. フィルター: 1, 2, 3 及び 4; B-2A, V-2A, G-2A 及び UV-1A. M; 重ね合わせ(B, G 及び UV). スケールバー, 10  $\mu\text{m}$ .

##### IV-3. 刺激条件下の蛍光イメージング :

酸化剤、呼吸阻害剤及び呼吸鎖脱共役剤の摂取によって誘発される攪乱と蛍光イメージとの関係について調べた。

IV-3-a. 酸化剤の効果: 酸化剤として  $\text{H}_2\text{O}_2$  を用いた。数  $\mu\text{mol/L}$  から数十  $\text{mmol/L}$  の範囲で濃度を変えて所定時間 *Sc* 細胞を処理後、PBS を用いて洗浄した。洗浄後直ちにイメージングに供した。代表的な例を図5に示す。図5から明らかであるように、YI-yellow が酸化的刺激によって顕著に蛍光強度を高めることが酵母発現系においても実証された。

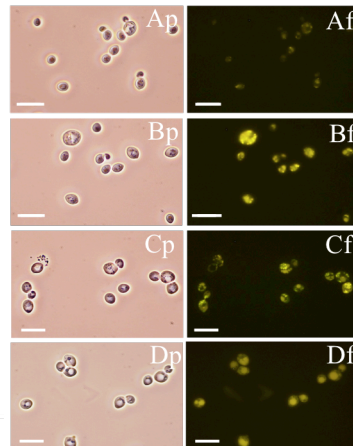


図5 *Sc-optMCT-YI-yellow* (A~C) 及びコントロール(D)の蛍光イメージに及ぼす  $\text{H}_2\text{O}_2$  処理効果. 左, 位相差; 右, 蛍光(B-2A). 処理に用いた  $\text{H}_2\text{O}_2$  濃度 (mmol/L): A, 0; B, 20; C; D, 60. 処理時間, 30 分. スケールバー, 10  $\mu\text{m}$ .



IV-3-b. シアン化物イオン (CN<sup>-</sup>) の効果: CN<sup>-</sup> はミトコンドリア呼吸鎖複合体 IV の阻害剤であることから、呼吸活性と密接に関わる Y1-yellow 黄色蛍光に影響が及ぶものと予想し、CN<sup>-</sup>による攪乱が及ぼす効果を調べた。

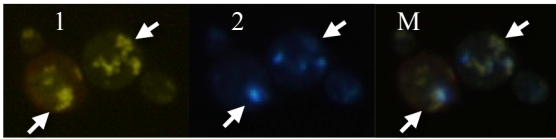


図6 *Sc-optMCT-Y1-yellow* の蛍光イメージに及ぼす CN<sup>-</sup> 摂取の効果. 処理に用いた CN<sup>-</sup> 濃度, 50 mmol/L. フィルター: 1, B-2A; 2, V-2A; M, 重ね合わせ (1 及び 2). 矢印, ミトコンドリアクラスター.

CN<sup>-</sup>を取込むことにより、ミトコンドリアが集合した様子が Y1-yellow の蛍光イメージから明らかとなった (図6 矢印)。また、DAPI 蛍光と Y1-yellow との蛍光消光相互作用を調べた結果、ミトコンドリアが集合するサイトは染色体 DNA サイトと重なることが示唆された。

これらの結果から、CN<sup>-</sup>による呼吸阻害で惹起された酸化ストレスが Y1-yellow の蛍光を通して可視化され得ることを実証するだけでなく、ミトコンドリアの動態を捉えることにも有用であることが明らかとなった。

IV-3-c. 呼吸鎖脱共役剤の効果: 膜電位の解消から酸化ストレスを誘発する脱共役剤として、カルボニルシアニド-m-クロロフェニルヒドラゾン及びカルボニルシアニド-p-メトキシフェニルヒドラゾンを用いた。細胞分散液中の濃度を  $\mu\text{mol/L}$  オーダーとして処理した形質転換 *Sc* の蛍光イメージングにおいて著しい蛍光挙動の変化は観測されなかったが、脱共役剤の効果について今後詳しい検証が求められる。

#### IV-1. Y1-blue の蛍光イメージング:

蛍光免疫染色等の蛍光イメージングから、Y1-blue の発現が細胞壁と液胞部位を除いて細胞空間全体に及ぶことが判った (図7)。

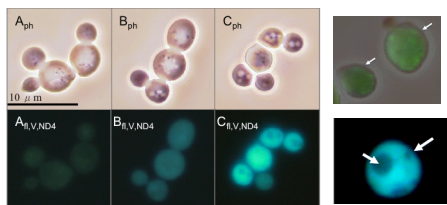


図7 コントロール (A), *Sc-Y1-blue* (B) 及び *Sc-optY1-blue* (C) の位相差イメージ (上段) 及び蛍光イメージ (フィルター, V-2A) (下段). 免疫蛍光イメージ (フィルター, FITC). 下段右, 拡大イメージ.

#### IV-2. 酸化ストレスの可視化:

上述のとおり、好氣的呼吸の際、一部の O<sub>2</sub> は O<sub>2</sub><sup>-</sup>に一電子還元される。引き続いて多様な活性酸素種が産生されると共に、酸化ストレスさらにはアポトーシスが誘発される。本研究では、活性酸素種の産生を促進する、Fe<sup>3+</sup> 及び CN<sup>-</sup>が Y1-blue 青色蛍光に及ぼす効果を詳しく調べた。

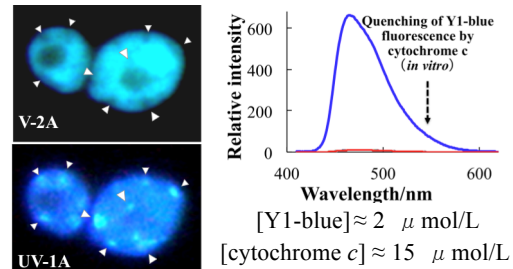


図8 Y1-blue 蛍光消光に基づく *Sc-opt-Y1-blue* シトクロム *c* の可視化. 処理に用いた Fe<sup>3+</sup> の初期濃度, 0.44 mmol/L. 矢印, ミトコンドリア近傍で消光された Y1-blue 青色蛍光サイト. スケールバー, 10  $\mu\text{m}$ . 右; シトクロム *c* の存在下で消光された Y1-blue 蛍光スペクトル (赤): 青, サイトクロム *c* を含まない系.

過剰に取込まれた Fe<sup>3+</sup>の作用によって一時的に多量に産生される活性酸素種はミトコンドリアの内膜のアポトーシスシグナルとなることが知られている。Fig. 8 に示したように、ほぼ細胞空間全域に及ぶ Y1-blue 青色蛍光がネガ画像のように欠落している個所が見られる。逆に UV-1A 励起ではスポットライトのように出現する。これは自己蛍光に起因する。

MitoTracker Orange による共染色から V-2A 励起で Y1-blue 青色蛍光が消失したサイトはミトコンドリアであることが判明した。現時点で定量的な説明は困難であるが、過剰な活性酸素種の産生、ミトコンドリア膜電位の解消と膜損傷、サイトクロム *c* の放出が逐次的に起こり、結果的にミトコンドリア周辺の Y1-blue 青色蛍光が消光されたものと考えられる。これまでに我々は Y1-blue 青色蛍光がサイトクロム *c* によって消光されることを見いだしている。今回もまた同様な蛍光消光の再現性を確認した (図8)。

上に述べた一連の結果から、Y1-blue 蛍光はアポトーシスシグナルの可視化に応用し得ることが強く示唆される。

#### V. まとめ

研究成果は以下のように総括される。

i. 原核単細胞発光微生物のレドックス蛍光タンパク質 (Y1-yellow, Y1-blue) の真核細胞発現系を構築した。これらは発現と同時に

自発的に蛍光能を獲得することが明らかになった。特に Y1-yellow の場合、ミトコンドリアサイト選択的発現系を確立した。

ii. Y1-yellow 及び Y1-blue は細胞内のレドックス環境を反映した蛍光を発することが明らかとなった。

iii. ミトコンドリアにおいて酸化ストレスの誘発シグナルとなる活性酸素種の生成消滅の蛍光可視化法確立のための基礎的知見を獲得した。

iv. 酸化ストレスと関連して内在性アポトーシスシグナルと密接に関連するシトクロム c の可視化を達成した。

v. これらの成果は当初の研究計画の目標をほぼ達成したものと捉えられる。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 4 件)

本報告書記載の成果を特許出願の予定である。また論文投稿が遅れている。報告書記載のデータを記述するものではないが、以下に研究と関連する雑誌論文を記載する。

主要な論文

① Yoshizawa S, Karatani H; Wada M, Kogure K. *Vibrio azureus* emit blue-shifted light caused by an accessory blue fluorescent protein, *FEMS Microbiology Letters*, 査読有, 329, 2012, 61 - 68.

(DOI:10.1111/j.1574-6968.2012.02507.x)

その他の論文

② 柄谷肇, 生物発光の分子メカニズムと光の色の多様性, *ぶんせき*, 査読無, 5, 2011, 255 - 262.

③ Yoshizawa S, Karatani H, Wada M, Yokota A, Kogure K. *Aliivibrio sifiae* sp. nov., luminous marine bacteria isolated from seawater, *The Journal of General and Applied Microbiology*, 査読有, 56, 2010, 509 - 518. (DOI:10.2323/jgam.56.509)

④ 柄谷肇, 生物発光の多様性及び光るタンパク質の機能と応用, *海洋化学研究*, 査読無, 23, 2010, 44-54.

[学会発表] (計 6 件)

本研究成果と直接関係する学会発表を以下に記す。

① Karatani H, Namikawa Y, Mori M, Ihara Y, Kitadokoro K, Visualization of mitochondria in living cells using a redox yellow fluorescent protein with a mitochondrial targeting signal, 36th Meeting of the American Society for Photobiology (ASP2012), Delta Center-Ville, Montreal, Canada, 2012-6-25 (口頭発表採択済)。

② 森奈穂美, 並川由紀, 柄谷肇, 発光微生物由来蛍光タンパク質酵母発現系の構築とその応用, 酵素工学会第64回講演会, 2010年11月19日, 東京大学, 東京都。

③ 柄谷肇, 伊原裕, 並川由紀, 森奈穂美, 杉本未来, 北所健悟, 金折賢二, 田嶋邦彦, 発光バクテリア由来黄色蛍光タンパク質の *in vivo* 酸素応答, 第16回日本光生物学協会年会, 2010年8月10日, 大阪大学, 大阪府。

④ Karatani H, Shishimoto S, Kawakami H, Frequency analysis of bioluminescence emission from bacterial colony under the stimulus of oxygen, 35th Meeting of the American Society for Photobiology (ASP2010) (ポスター発表), Brown University, Providence, USA. 2010-6-13.

⑤ 柄谷肇, 発光生物の発光機構と蛍光タンパク質 ( $O_2$ 種をKeywordとして), 応用物理学会関西支部平成21年度第2回支部講演会 (招待講演), 2010年1月22日, 大阪大学, 大阪府。

⑥ 柄谷肇, 伊原裕, 北所健悟, 田嶋邦彦, 金折賢二, 微生物蛍光タンパク質による細胞内酸素化学種の可視化, 第82回日本生化学会大会, 2009年10月24日, 神戸国際展示場, 兵庫県。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

柄谷 肇 (KARATANI HAJIME)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授  
研究者番号：1 0 1 6 9 6 5 9

### (2) 研究分担者

北所 健悟 (KITADOKORO KENGO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・  
准教授  
研究者番号：6 0 2 8 3 5 8 7

### (3) 連携研究者

田嶋 邦彦 (TAJIMA KUNIHIKO)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授  
研究者番号：5 0 1 6 3 4 5 7

金折 賢二 (KANAORI KENJI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・  
准教授  
研究者番号：3 0 2 7 3 5 4 3

山田 悦 (YAMADA ETSU)

京都工芸繊維大学・環境科学センター・  
教授  
研究者番号：3 0 1 5 9 2 1 4

和田 実 (WADA MINORU)

長崎大学・大学院水産・環境科学総合研究  
科・准教授  
研究者番号：7 0 2 9 2 8 6 0