

平成 26 年 5 月 16 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010～2013

課題番号：22685016

研究課題名(和文)新規蛍光強度増大型プローブによる細胞内蛋白質標識法の開発

研究課題名(英文)Development of Novel Fluorogenic Probes for Labeling Intracellular Proteins

研究代表者

堀 雄一郎 (HORI, Yuichiro)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00444563

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円、(間接経費) 5,670,000円

研究成果の概要(和文)： タグ蛋白質とその特異的蛍光プローブを利用した蛋白質標識法は、化学に基づく新しい蛋白質のイメージング技術として近年注目を集めている。本研究では、遊離の状態では非蛍光性で、新規タグ蛋白質であるPYPタグとの標識反応に伴い蛍光強度を増大させる「発蛍光プローブ」を開発した。この発蛍光プローブとPYPタグにより、細胞内蛋白質を迅速、特異的、高S/N比でイメージングすることに成功し、本技術をDNAメチル化イメージングに応用した。

研究成果の概要(英文)： Fluorescence protein labeling by a specific pair of a protein tag and synthetic probe is a powerful chemistry-based approach to investigate protein function and localization inside living cells. In this research, we developed a protein labeling system based on fluorogenic probes and photoactive yellow protein (PYP) tag. By utilizing this technique, we were succeeded in specific imaging of proteins inside living cells with high S/N ratio and excellent labeling kinetics. Furthermore, the labeling technique was applied to the imaging of DNA methylation.

研究分野：ケミカルバイオロジー、蛋白質・ペプチド化学

科研費の分科・細目：複合化学、生体関連化学

キーワード：蛋白質標識 生細胞蛍光イメージング 発蛍光プローブ PYPタグ

1. 研究開始当初の背景

蛋白質の蛍光標識は、生細胞における蛋白質の局在や動態を解析するための有用な手法であり、生命科学の研究者にとって必須のものとなっている。生細胞における蛋白質の局在情報を可視化するための研究ツールのうち最も汎用されているものは、蛍光蛋白質である。その応用範囲は、局在解析だけでなく、金属イオンや酵素活性の検出など多岐に渡っている。一方、蛍光蛋白質にも、いくつかの問題が指摘されている。例えば、蛍光蛋白質は 27kDa と比較的大きく、標的蛋白質に与える立体的影響が懸念されている。また、長波長領域において、十分な明るさの蛍光を発する蛋白質がほとんどないために、厚みのある組織や小動物におけるイメージング実験では、感度の低下が問題となることがある。

近年、これらの問題を解決することを目的として、合成蛍光プローブを利用した化学アプローチに基づく新しい蛋白質標識技術が開発された。この技術では、生細胞中の標的蛋白質を標識するうえで、特定のリガンドと特異的に結合する蛋白質を標的蛋白質の融合タグ(タグ蛋白質)として利用する。このタグ蛋白質を介して、リガンドと蛍光色素を連結した蛍光プローブにより、標的蛋白質を標識・イメージングすることができる。これまでに報告されている代表的なタグ蛋白質として、HaloTag、SNAP-tag、tetracysteine tag があげられる。

この標識技術には、次に挙げられる 3 つの利点がある。1 つ目は、特定のタイミングで標的蛋白質を容易に標識できるため、ある特定の時間に発現している蛋白質のみを標識し、その局在や動態を高い時間精度で可視化できることである。2 つ目は、様々な優れた蛍光特性を有する色素化合物をプローブに導入できることである。このことは、近赤外蛍光を発するプローブや蛍光蛋白質より明るく光退色に強い色素を組み込んだプローブの開発が可能であることを意味している。3 つ目は、比較的小さなサイズのタグ蛋白質も利用できることである。

一方、この標識技術の問題は、遊離プローブが蛍光を放つことである。プローブを細胞に添加しただけでは、多くの場合、タグ蛋白質を標識したプローブと遊離プローブの蛍光を区別することができない。このことは、細胞を洗浄し遊離プローブを除去することで解決されると考えられる。しかしながら、プローブの構造によっては、洗浄除去に時間がかかる場合や、完全に除去することができないことがあり、迅速なイメージングに支障をきたし S/N 比の低下につながる問題がある。このため、この問題を解決する大きな技術革新が待ち望まれていた。

2. 研究の目的

本研究では、前述の問題を解決するために、遊離状態では非蛍光性で、タグ蛋白質と結合

すると蛍光強度が上昇する「発蛍光プローブ」を開発する。発蛍光プローブの先駆けとしては、前述の Tetracysteine tag の蛍光標識プローブを挙げることができる。しかしながら、この手法では、遊離プローブは非蛍光性であるものの、プローブの細胞内成分への非特異結合に伴いバックグラウンド蛍光が上昇するため、やはり洗浄作業が必要となる。したがって、洗浄操作を行うことなく迅速かつ高い S/N 比で蛋白質をイメージングすることのできる新しい発蛍光プローブの開発が期待されていた。

そこで、本研究では、細胞内でタグ蛋白質と特異的に結合する発蛍光プローブの設計・開発を行うことで、洗浄操作無しで、蛋白質の高 S/N 比・迅速イメージングを行った。

3. 研究の方法

(1) プローブの合成

FCTP に関しては、2,4-ジヒドロキシ-6-メチルベンズアルデヒドを出発物質として、クマリン環を合成し、PEG リンカーを導入し、チオエステルを形成後、フルオレセインをクリックケミストリーにより結合させ、合成した。

FCANB に関しては、4-ブロモ-3-メチルフェノールを出発物質として、PEG リンカーを導入後、桂皮酸骨格を Heck 反応により合成し、チオフェノール脱離基を縮合後、フルオレセインを縮合することで合成した。

TMBDMA 及び CMBDMA に関しては、3-(ジメチルアミノ)フェノールを出発物質として、7-ジメチルアミノクマリン-3-カルボン酸を合成し、チオフェノール誘導体を縮合することで合成した。

(2) 蛋白質の発現・精製

pET-His-PYP を大腸菌(BL21(DE3))に形質転換後、LB 培地にて OD600 が 0.6~0.8 になるまで 37 °C で培養した。次に、IPTG を最終濃度 100 μM になるように加え、20 °C で一晚培養した。培養した大腸菌を集菌し、超音波破碎した後に可溶性画分を抽出した。可溶性画分の PYP タグは、Ni-NTA カラムにより精製した。その後、トリス緩衝液または HEPES 緩衝液を移動相として、ゲル濾過クロマトグラフィーにより最終精製した。

(3) 蛋白質標識実験

トリスまたは HEPES 緩衝液中、PYP タグと各種プローブを 37°C で反応させた。反応終了後 SDS-PAGE により解析した。また、細胞溶解液中での反応は、HEK293T 細胞を破碎し抽出した溶液に精製した PYP タグと各種プローブを添加し行った。

トリスまたは HEPES 緩衝液中、PYP に結合した各種プローブの蛍光特性について検討するため、吸収、蛍光、励起スペクトルを 37°C で測定した。標識反応の速度論解析では、蛋白質大過剰条件下において、種々の蛋白質濃

度を変化させ決定した擬一次反応速度定数をフィッティングすることで、二次速度定数を決定した。

(4) 生細胞蛍光イメージング

HEK293T 細胞及び NIH3T3 細胞に Lipofectamine2000 を用いて遺伝子 (pcDNA3.1-PYP-EGFR、pcDNA3.1-MBP-PYP、pcDNA3.1-HA-PYP-NLS) 導入を行い、24 時間 37°C にて培養後、標識実験を行った。各種プローブを添加後、蛍光顕微鏡もしくは共焦点レーザー蛍光顕微鏡を用いて細胞を観察した。

4. 研究成果

(1) 新規タグ蛋白質 PYP と発蛍光プローブ

我々は、既存技術の問題点を解決するために、新しいタグ蛋白質と発蛍光プローブを利用した蛋白質標識技術の開発に取り組んできた。以前の研究で、次の3つの基準で、タグ蛋白質を決定している。①動物以外の生物由来の蛋白質の中から探索する。これは、動物細胞で発現する蛋白質を選ぶと、標識反応を行うとき、標的蛋白質以外にその内在性蛋白質が標識されてしまうためである。②動物細胞中の小分子と結合することがないことに加え、酵素反応を引き起こすことのないものとする。これは、タグ蛋白質の標識反応において細胞内小分子とプローブが競合しないようにするとともに、細胞内代謝に与える影響を最小限にするためである。③蛋白質のサイズができる限り小さいものとする。以上の条件のもと、探し出した蛋白質は紅色硫黄細菌 *Halorhodospira halophila* 由来 PYP であった。

PYP タグは 125 アミノ酸 (14kDa) からなる蛋白質であり、その大きさは、蛍光蛋白質 (238 アミノ酸 : 27kDa) の約半分であり、タグ蛋白質として魅力的である。PYP タグのリガンドは、天然補因子である 4-ヒドロキシ桂皮酸チオエステル誘導体であり、PYP タグの Cys69 と共有結合することが知られている。また、PYP タグは 7-ヒドロキシクマリン-3-カルボン酸チオエステル誘導体とも結合することが報告されている。これまでに、PYP リガンドであるクマリンと蛍光色素であるフルオレセインの誘導体を柔軟なリンカーで連結したプローブ FCTP を開発している。FCTP は、遊離状態では、クマリン部位とフルオレセイン部位が会合し蛍光消光することが分かっている。このプローブは、PYP タグとの結合により、会合が解消され、蛍光強度が上昇することが示されている。一方、PYP タグに対する結合速度が極めて遅く (50% 結合時間 : 470 分以上)、実用的な時間でイメージング実験を行うには、更なる結合速度の向上が必要であった。そこで、結合速度を改良すべく新たな発蛍光プローブの開発に取り組出した。

(2) 発蛍光プローブの再設計と細胞表層蛋白質の無洗浄生細胞蛍光イメージング

FCTP と PYP タグの結合速度が遅い理由として、リガンド部位と蛍光色素部位の会合構造が、PYP タグとの結合において立体障害を引き起こしていることが考えられた。このため、反応速度を向上させるには、リガンド部位と蛍光色素部位が会合しない分子構造を有する発蛍光プローブの設計が必要であると考えた。まず着目したのは、PYP タグとプローブが結合する際に起こる脱離反応である。結合時、チオエステル交換反応によりプローブからチオール化合物が脱離する。このとき、チオール化合物に色素会合のための消光基を組み込んでおけば、発蛍光標識と反応速度の向上が同時に達成されると考えた (図 1)。分子設計上、大きな特徴は、消光基としてニトロベンゼンを選択したことである。ニトロベンゼンは、蛍光色素との吸収・蛍光スペクトルの重なりによらず、種々の蛍光色素に対して動的・静的消光を引き起こすことが分かっており、消光基として有用である。また、分子設計のもう一つのポイントは、リガンド部位をクマリンから桂皮酸に変更することで、蛍光色素とリガンドの会合を抑制し、反応速度を向上させようとしたことである。このようにして、蛍光色素は、遊離状態ではリガンド部位ではなくニトロベンゼンと会合・消光し、結合反応に伴いニトロベンゼンが脱離し、蛍光色素の蛍光強度が上昇することを期待した。これらの消光基及びリガンドと蛍光色素であるフルオレセインを組み込んだプローブ FCANB を合成した。

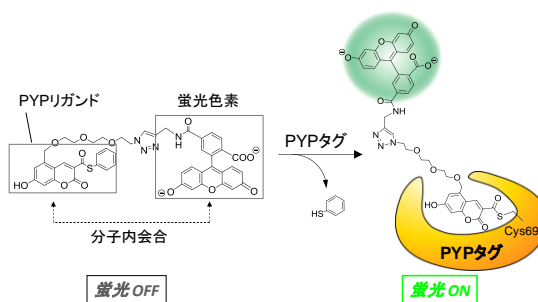


図 1. FCANB による PYP タグの発蛍光標識原理。

標識反応を行い SDS-PAGE で解析したところ、FCANB と PYP タグが共有結合していることが示され、細胞溶解液中においても、FCANB と PYP は特異的に結合することが明らかとなった。さらに、蛍光スペクトルを測定したところ、FCANB は遊離状態では消光し、PYP タグとの結合により蛍光強度を 15 倍上昇させた。これらの結果から、FCANB は PYP タグの特異的な発蛍光プローブであることが示された (図 2 a)。

プローブ改変によって、反応速度が向上しているかを検討したところ、FCANB の二次反応速度定数 k_2 は $125 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ であり、FCTP ($k_2=1.11 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$) に比べ 110 倍反応速度が

向上したことが示された。

次に、PYP タグ融合蛋白質を生細胞に発現させ洗浄操作なしで観測できるかを検討した。PYP タグを膜蛋白質 EGFR（上皮成長因子受容体）に融合させ細胞膜上に発現させ、プローブを添加し、細胞の洗浄なしで共焦点レーザー蛍光顕微鏡により観察した。その結果、細胞内や培地からはほとんど蛍光が観測されなかったのに対し、細胞膜上から強い蛍光シグナルが観測された。このことから、生細胞膜表面において特異的に標識反応が起こることが示された。以上より、プローブの反応速度を大きく向上させた発蛍光プローブを用いることで、生細胞膜表面の蛋白質を洗浄することなく観測することに成功した（図 2 b）。

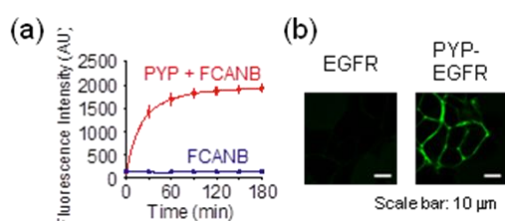


図 2. (a) 標識反応に伴う FCANB の蛍光強度の時間変化。(b) FCANB による細胞表面蛋白質の無洗浄生細胞蛍光イメージング

(3) 環境応答性発蛍光プローブによる生細胞内蛋白質イメージングへの応用

FCANB は細胞膜非透過性であり、細胞内蛋白質を標識することはできなかった。そこで、細胞膜透過性であり細胞内蛋白質を無洗浄で迅速にイメージングすることができるプローブの開発が新たな課題となった。

開発にあたり、PYP タグのリガンド分子の構造に注目した。現在までに報告されているリガンド分子は、4-ヒドロキシ桂皮酸、4-ジメチルアミノ桂皮酸及び7-ヒドロキシクマリンの誘導体などである。これらの分子構造の類似性から、7-ジメチルアミノクマリン (DMAC) 誘導体も PYP タグに結合すると予想した。この分子が開発上重要である理由は、DMAC は環境応答性蛍光色素であり、極性の高い溶媒中では蛍光強度を低下させ、極性の低い溶媒中では蛍光強度を上昇させる性質を持っているためである。この性質を

利用することで、DMAC 誘導体を PYP タグの発蛍光プローブとして利用できるのではないかと考えた。すなわち、プローブは、遊離状態では極性の高い水中にあるため蛍光強度が低下し、標識反応により PYP タグの疎水性内部に取り込まれるため蛍光強度が上昇すると予想した (図 3)。

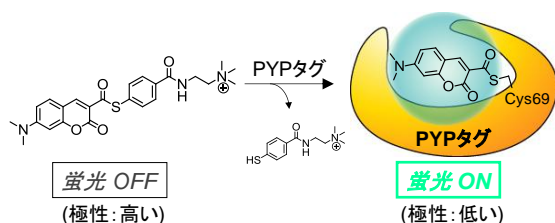


図 3. 環境応答性蛍光プローブによる PYP タグの発蛍光標識原理。

まず、SDS-PAGE 解析により、TMBDMA、CMBDMA ともに PYP タグと共有結合し、細胞溶解液中では、プローブは PYP タグと特異的に結合することが示された。蛍光スペクトル測定の結果、プローブの蛍光強度は、遊離状態では低く、PYP タグとの反応により大きく上昇した (TMBDMA : 22 倍、CMBDMA : 16 倍) (図 4 a)。

このことから、両プローブは PYP タグをラベル化する発蛍光プローブであることが示された。更に、速度論解析の結果、TMBDMA は $k_2 = 3,950 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ 、CMBDMA は $k_2 = 126 \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$ であった。興味深いことに、TMBDMA に関しては、FCANB に比べ反応速度の大幅な向上 (約 32 倍) がみられた。

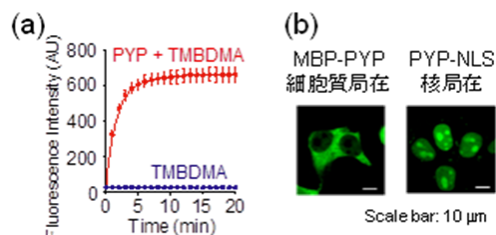


図 4. (a) 標識反応に伴う TMBDMA の蛍光強度の時間変化。(b) TMBDMA による細胞表面蛋白質の無洗浄生細胞蛍光イメージング

次に、これらのプローブを用いて、生細胞内蛋白質のイメージング実験に関して検討した。まず、マルトース結合蛋白質 MBP と PYP タグの融合遺伝子 MBP-PYP と、PYP タグと核局在化シグナルの融合遺伝子 PYP-NLS を細胞に導入し発現させ、TMBDMA を添加し共焦点蛍光顕微鏡で無洗浄イメージングを行った。その結果、非発現細胞からは蛍光は観測されなかったのに対し、MBP-PYP 発現細胞では主に細胞質から、PYP-NLS 発現細胞では核から蛍光が観測された (図 4 b)。

CMBDMA についても同様の結果であった。以上より、TMBDMA 及び CMBDMA は細胞膜を透過し、細胞内蛋白質を標識することができることが示され、洗浄操作無しで生細胞内蛋白質のイメージングが可能であることが証明された。さらに、TMBDMA を用いて、PYP-NLS 発現細胞から得られる蛍光を経時的に観察し定量解析を行ったところ、約 6 分で核内の蛍光が飽和することが分かった。このことから、TMBDMA により、細胞内蛋白質のイメージングが極めて短い時間で達成できることが示された。

最後に、この標識技術を DNA メチル化のイ

イメージングに応用した。DNA メチル化は、エピジェネティックに遺伝子発現を制御する重要な化学修飾である。その修飾反応は DNA メチル転移酵素により触媒され、CpG 配列のうちシトシンの5位がメチル化される。まず、メチル CpG 結合ドメインである MBD1 (MethylCpG-binding domain 1) と PYP タグの融合遺伝子 PYP-MBD を細胞に導入し発現させた。TMBDMA または CMBDMA を添加し洗浄操作を行わずにイメージングを行ったところ、核内からドット状の蛍光が複数観測された (図5)。また、その蛍光は、Hoechst の蛍光と局在が重なった。一般に、Hoechst は、核内のヘテロクロマチンと呼ばれる DNA メチル化の亢進した領域を染色することが知られていることから、PYP-MBD は、ヘテロクロマチン領域に局在化していることが示唆された。更に、DNA メチル化酵素の阻害剤である 5-AzadC を添加し、イメージング実験を行ったところ、PYP-MBD に結合したプローブの蛍光は、Hoechst 染色部位とは異なる位置から観測された。このことは、DNA メチル化阻害剤非存在下では、PYP-MBD が DNA メチル化領域に結合しており、DNA メチル化の阻害に伴う DNA のメチル化レベルの低下により、DNA から解離し局在を変化させたと考えられた。このように、本技術は、DNA メチル化解析に応用することができ、DNA メチル化阻害剤の生細胞評価ツールとしても利用できると期待される。

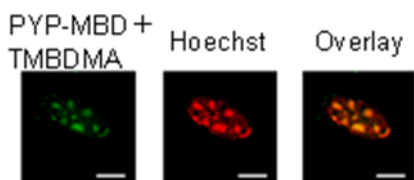


図5. TMBDMA と PYP-MBD を用いた DNA メチル化イメージング。

(4) 結論

本研究では、PYP がタグ蛋白質として良好に機能することを示し、PYP タグを特異的に標識することのできる発蛍光プローブを化学原理に基づいた合理的設計戦略により開発した。蛍光色素の分子内会合消光や環境応答性を利用した発蛍光スイッチ機構を適用することで、細胞表層や細胞内に発現させた蛋白質を迅速かつ高 S/N 比でイメージングすることが可能となった。合成蛍光プローブを用いた既存の蛋白質標識技術は、多くの場合、生細胞内の蛋白質を洗浄操作無しで特異的に検出するのに数十分から数時間を必要とする。これに対し、本研究で開発したプローブの中でも TMBDMA は、数分以内という極めて短い時間でのイメージングを可能にした。このように、発蛍光プローブを用いたイメージングは、本技術の大きなアドバンテージである。また、PYP タグのサイズの小ささは、蛋白質の生細胞イメージングにとって理想

的な特長といえる。今後、本技術の応用展開によって、生命科学現象の解明に貢献することが期待される。

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 15 件)

① Hori, Y., Norinobu, T., Sato, M., Arita, K., Shirakawa, M., Kikuchi, K. “Development of Fluorogenic Probes for Quick No-Wash Live-Cell Imaging of Intracellular Proteins” *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 12360-12365 (2013) (査読有)
DOI: 10.1021/ja405745v.

② Hori, Y., Kikuchi, K. “Protein Labeling with Fluorogenic Probes for No-Wash Live-Cell Imaging of Proteins” *Curr. Opin. Chem. Biol.* **17**, 644-650 (2013) (査読有)
DOI: 10.1016/j.cbpa.2013.05.015.

③ 堀 雄一郎、菊地 和也「発蛍光型スイッチ機能を有した蛋白質ラベル化技術の開発による細胞内標的分子イメージング」*CSJ Current Review*, **12**, 162-168 (2013) (査読有)

④ 堀 雄一郎、菊地 和也「発蛍光型スイッチ機能を有した蛋白質ラベル化技術の開発による細胞内標的分子イメージング」*化学と生物*, **51**, 189-192 (2013) (査読有)

⑤ Hori, Y., Nakaki, K., Sato, M., Mizukami, S., Kikuchi, K. “Development of Protein-Labeling Probes with Redesigned Fluorogenic Switch Based on Intramolecular Association for No-wash Live-cell Imaging” *Angew. Chem. Int. Ed.* **51**, 5611-5614 (2012) (査読有)
DOI: 10.1002/anie.201200867.

⑥ Baba, R., Hori, Y., Mizukami, S., Kikuchi, K. “Development of Fluorogenic Probe with Transesterification switch for Detection of Histone Deacetylase Activity” *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 14310-14313 (2012) (査読有)
DOI: 10.1021/ja306045j.

⑦ Dhara, K., Hori, Y., Baba, R., Kikuchi, K. “Fluorescent Probe for Detection of Histone Deacetylase Activity Based on Aggregation-Induced Emission” *Chem. Commun.* **48**, 11534-11536 (2012) (査読有)
DOI: 10.1039/c2cc36591j.

⑧ 堀 雄一郎、菊地 和也「発蛍光プロ

ブによる次世代型タンパク質標識技術－化学アプローチに基づくタンパク質蛍光イメージングの新展開」*化学*, **67**, 68-69 (2012) (査読有)

⑨ 堀 雄一郎、菊地 和也「合成蛍光プローブと発現タンパク質を用いた新規タンパク質ラベル化システム」*生化学*, **83**, 135-139 (2011) (査読有)

[学会発表] (計 68 件)

① Hori, Y., “Development of Small Molecules with Fluorogenic Switches for Visualizing Protein Function and Localization”, iCeMS-RIKEN Joint Symposium on Mesoscopic Chemical Biology Integrated Chemical-Physical Systems Towards Cell Control, Kyoto, Japan, 2014 年 2 月 7 日 (招待講演)

② Hori, Y., Sato, M., Kikuchi, K., “Development of PYP-tag mutants and fluorogenic probes for rapid imaging of intracellular proteins”, Seeing is Believing, EMBO/EMBL Symposium, Heidelberg, Germany, 2013 年 10 月 3 日～6 日

③ 堀雄一郎、佐藤基、菊地和也「環境応答性発蛍光プローブと PYP タグを利用した細胞内蛋白質高速イメージング技術の開発と生物応用」、第 7 回バイオ関連化学シンポジウム、名古屋、2013 年 9 月 27 日～29 日

④ Hori, Y., Sato, M., Kamikawa, Y., Kikuchi, K., “Development of Protein-labeling Probes with Environment-sensitive Fluorogenic Switch for No-wash Labeling of Intracellular Proteins Tagged with Photoactive Yellow Protein (PYP) Mutant”, EMBL Conference Series, Chemical Biology 2012, Heidelberg, Germany, 2012 年 9 月 27 日

⑤ Hori, Y. “Development of Fluorogenic Probes with Chemical Triggers for Imaging Protein Function and Localization”, The 5th “MEXT Project of Integrated Research on Chemical Synthesis” Forum, Unique peptide assemblies with biological functions, Uji, Japan, 2012 年 9 月 15 日 (招待講演)

⑥ 堀 雄一郎、佐藤 基、菊地 和也「PYP タグと発蛍光プローブを利用した生細胞蛋白質イメージング」、第 3 回 Vivid Workshop、加賀、2012 年 2 月 21 日

⑦ Hori, Y., Kikuchi, K., “Design of Fluorogenic Probes for Protein Labeling

Method Based on Photoactive yellow Protein (PYP) Tag and Live Cell Imaging” Nature Chemical Biology Symposium, Boston, USA, 2011 年 10 月 20 日～22 日

⑧ 堀雄一郎、中木恭兵、則信智哉、菊地和也「Photoactive Yellow Protein (PYP) タグと蛍光強度増大型プローブを利用した蛋白質標識法の開発と生細胞イメージング」、バイオ関連化学シンポジウム、筑波、2011 年 9 月 12-14 日

⑨ Hori, Y., Nakaki, K., Norinobu, T., Kikuchi, K., “Development of Photoactive Yellow Protein-based Protein Labeling System with Designed Fluorescence Probes”, Seeing is Believing, EMBO/EMBL Symposium, 2011 年 3 月 18 日

⑩ Hori, Y., Nakaki, K., Kikuchi, K., “Development of a Protein Labeling System Based on Photoactive Yellow Protein and a Designed Fluorogenic Probe”, Pacificchem 2010, Honolulu, USA, 2010 年 12 月 19 日

⑪ 堀 雄一郎、則信 智也、中木 恭兵、菊地 和也「Design of Fluorogenic Probe for Novel Labeling System Based on Protein Tag, Photoactive Yellow Protein」、BMB2010、神戸、2010 年 12 月 9 日

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：タンパク質を蛍光標識する方法
発明者：菊地 和也、堀 雄一郎、上野 秀樹
権利者：国立大学法人大阪大学
種類：特許登録
番号：5299932
取得年月日：2013 年 6 月 28 日
国内外の別：国内

[その他]

ホームページ等

<http://www-molpro.mls.eng.osaka-u.ac.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

堀 雄一郎 (HORI YUICHIRO)

大阪大学・工学研究科・助教

研究者番号：00444563