

生物発光の多様性及び光るタンパク質の機能と応用

柄谷 肇*

はじめに

生物発光は古代よりヒトの目に映り、同時に神秘さを醸し出していたものと想像される。Aristotle も死魚や朽木からの発光に関する記録を残したとされている (BC300年代)。大航海時代、Columbus が海洋表層で発生した大規模発光をログブックに記している (1490年頃)。海洋表層の大規模発光は Milky sea と呼ばれ、発光細菌の大発生に起因する。アメリカの地質調査衛星によって Milky sea がたまたま撮影されていたこともある (文献 1)。時を経てフランスの Dubois が発光二枚貝の研究より、生物発光が発光基質 (Luciferin) と発光触媒酵素 (Luciferase) との生体内化学反応に起因することを解き明かした (1885年)。生物発光はまた、生体よりルシフェリンとルシフェラーゼを別々に単離し、それらを再び混ぜ合わせるによって再現することができる。Fig. 1 に生物発光の再現の概念を示す。生物発光反応は、Luciferin と Luciferase の頭文字をとって、しばしば LL 反応と呼称される (本稿ではルシフェラーゼ反応と記す)。

Dubois の研究以後、多くの種類のルシフェリンとルシフェラーゼが単離されている。さらに発光関連タンパク質をコードする遺伝子も多く解析されている。その一つが2008年度のノーベル賞の対象となったオワンクラゲ由来 GFP をコードする遺伝子である。

陸棲や海棲など棲息環境の違いからも予想さ

れるように、発光生物は進化の過程で独立的に発生してきた。種同士間における遺伝学的な関連性の希薄さが、結果的にルシフェラーゼ反応に多様性をもたらしたともいえる。現在およそ30種類の発光生物が確認されている。予想されるようにルシフェラーゼの立体構造も大きく異なる (Fig. 2)。ホタルルシフェラーゼについては Nakatsu らもルシフェラーゼの構造を詳細に解析し、反応メカニズムとの関連性を議論している (文献 6)。

発光生物の遺伝学的な関連性は希薄ではあるものの、ルシフェラーゼ反応において酸素分子

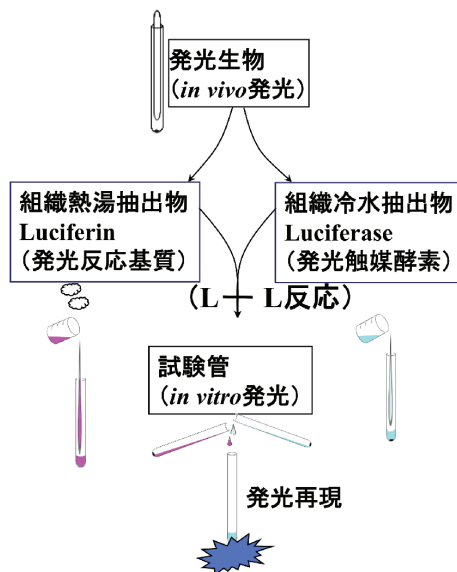


Fig. 1 試験管内における生物発光再現の概念 (文献 2)。

*京都工芸繊維大学大学院工芸科学研究科生体分子工学部門教授

が消費される点を共通項として捉えることができる(文献7)。また海洋発光生物の一部のルシフェリンには共通項もみうけられることがある。共通項は食物連鎖によるルシフェリンの摂取に基づくものであり、オワンクラゲに例を見ることができる。オワンクラゲはルシフェリンを餌として取り入れることが飼育実験において検証されている。たとえばセレンテラジンを与

えた非発光性ミズクラゲを餌として与えるとオワンクラゲは発光する(文献8)。

多くの生物発光の極大波長は荒い近似ではあるが、太陽光の極大波長周辺に存在する(Fig. 3)。もちろん、赤と緑のランタンをもつ *Phrixotrix hirtus* (鉄道虫) のように太陽光の極大波長から離れたものも存在する(文献9)。また深海魚の *Malacosteus niger* (ドラゴンフィッ

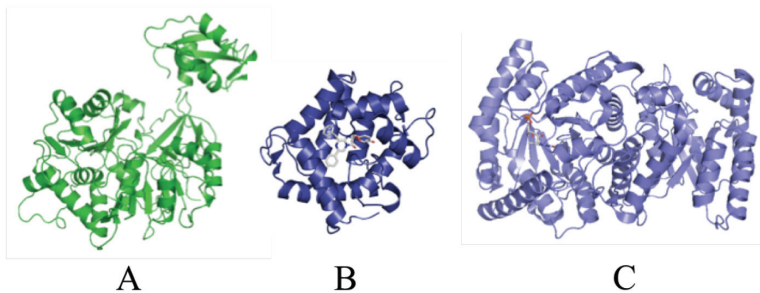


Fig. 2 代表的なルシフェラーゼの結晶構造。A, ホタルルシフェラーゼ(文献3); B, オワンクラゲルシフェラーゼ(イクオリン)(文献4); バクテリアルシフェラーゼ(FMNH₂結合状態)(文献5)。

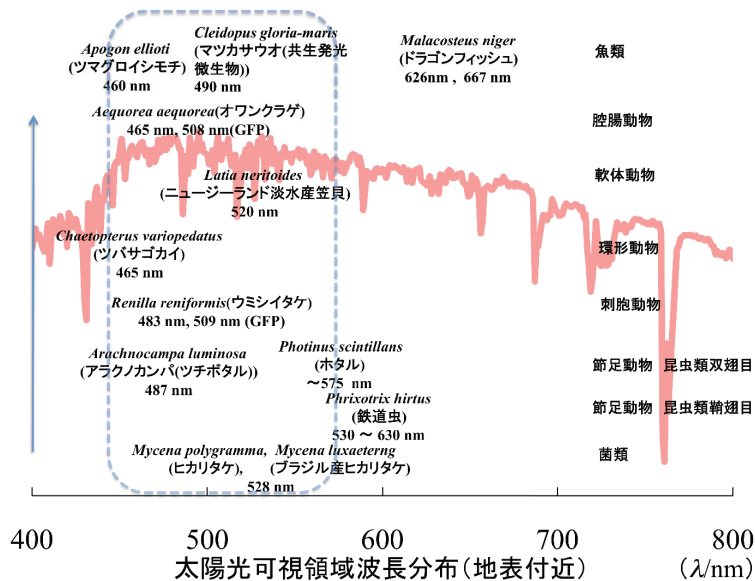


Fig. 3 生物発光の極大波長と太陽光の波長分布の関係。垂直方向の矢印；放射光エネルギーの相対強度。

シユ)は青色発光だけでなく目の付近に発光器があり赤色発光(極大発光波長, 705 nm)を放射する(文献10). ドラゴンフィッシュは光受容体としてクロロフィル誘導体(吸収極大波長, 667 nm)を持っており, 赤色発光機能を交信に利用していることが示唆されている.

ルシフェラーゼ反応の多様性

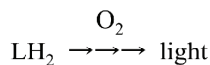
本稿では Fig. 4 に示すようにルシフェラーゼ反応を4タイプに分類して考える. 反応は5タイプに分類することも可能である.

タイプIは, ルシフェリンと酸素分子との反応をルシフェラーゼが触媒する反応であり, 甲殻綱介形類亜綱に分類されるウミボタルにあてはまる. ウミボタルは日本沿岸で多く採れることから, 第二次世界大戦前から Kanda らをはじめ日本人研究者がその研究において重要な役割を演じている. 発光性の介形類(*Ostracoda*) (貝形虫, カイムシともよばれる) ウミボタル科 (*Cypridininae*) には *Cypridina*, *Vargula* などが含まれる. Shimomura 等によ

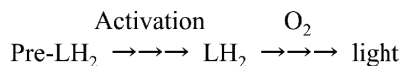
て結晶化されたウミボタルルシフェリンは imidazolopyrazine であり, ひずみの大きい構造を有する高エネルギージオキセタノン中間体を経て発光種と二酸化炭素が生成する (Fig. 5) (文献11-13). ウミボタルルシフェラーゼもまた Shimomura らによって単離精製された(分子量, 約53,000または約68,000) (文献14).

ホタルの生物発光に代表されるタイプIIのルシフェラーゼ反応では, 高エネルギー分子アデノシントリリン酸 (ATP) の脱リン酸化反応が前段に含まれる. ホタルルシフェラーゼはいわゆる ATP-activating enzyme である. ホタルルシフェリンは benzothiazoyl-thiazole であり, ウミボタルルシフェリンとの違いを容易に理解できる. ルシフェラーゼは Mg^{2+} の存在下, アデニル酸とルシフェリンとの縮合を触媒する. 次に酸素分子とアデニレート部位との反応で過酸化物構造が形成され, アデニレートの脱離, 環化を経て高エネルギージオキセタノン中間体が生じる. 最終的にジオキセタノン中間体の分解によって励起状態のオキシルシフェリンが生

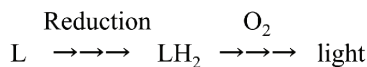
Type I Directoxidation: basic enzyme-substrate systems



Type II Substrate activation followed by oxidation : Adenine nucleotide linked activation



Type III Substrate reduction followed by oxidation : pyridine nucleotide linked reduction



Type IV Ion-activated: O_2 related “pre-charged” systems

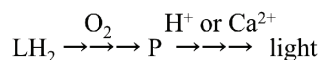


Fig. 4 ルシフェラーゼ反応の分類.

じる (Fig. 6).

Fig. 6と同様なメカニズムは、コメツキムシ科 *Elateridae* のファミリーに含まれる *Coleoptera* (甲虫類) の生物発光においてもあてはまる (文献15). ホタルルシフェラーゼは分子量約62,000の単一ポリペプチドであり、柔軟な四残基ループによって結ばれた大きなN-ターミナルドメインと小さなC-ターミナルドメインより構成されている (文献3). 全体的な効率はルシフェリン1分子に対しておよそ0.9光量子であることが報告されている (文献16).

光の色はホタルルシフェリンより生成する励

起状態のオキシルシフェリンイオンの蛍光特性に帰着する. 生理的なpHでは黄緑色発光が放射され、また酸性条件では励起モノアニオンからの赤色発光が観測される. 赤色発光については、オキシルシフェリンがよじれた状態に励起され、よじれた状態のまま基底状態に緩和されることが原因であるとも考えられる (文献17). 最近、ルシフェラーゼの構造解析から、励起状態のオキシルシフェリンが、反応にともなうルシフェラーゼの構造変化によって、高度な疎水環境に存在することが提案されている (文献6).

酸素酸化反応を受ける還元剤としての発光基質が生理的条件下で不安定な場合、前駆反応とし

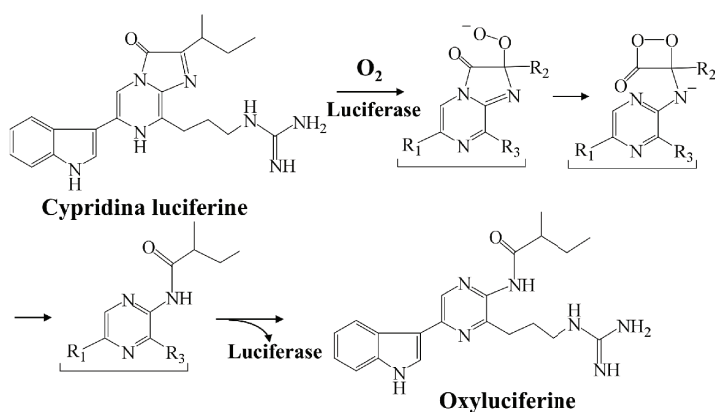


Fig. 5 ウミボタルルシフェラーゼ反応スキーム.

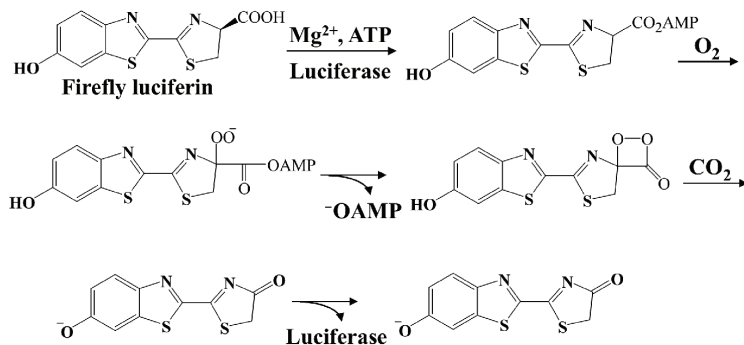


Fig. 6 ホタルルシフェラーゼ反応スキーム.

て還元型基質の生成が必要となる。これはタイプⅢに分類されるルシフェラーゼ反応であり、発光バクテリアがこの範疇に含まれる (Fig. 5) (文献18)。

バクテリアルシフェラーゼ反応の基質となるリボフラビン 5'-リン酸 (FMN) の還元型は自動酸化 ($\text{FMNH}_2 + \text{O}_2 \rightarrow \text{FMN} + \text{H}_2\text{O}_2$) を受けやすく不安定であるが、一旦 FMNH_2 がルシフェラーゼに結合すると自動酸化を受けにくく、酸素分子と反応して過酸化物中間体を与える。続いて長鎖脂肪族アルデヒドが加わりペルオキシヘミアセタール中間体が生じる。発光種はルシフェラーゼと結合した状態で形成され、FMN の 4a 位がヒドロキシ化された構造を有する (文献19)。量子収率はおよそ0.3であり、残りの0.7は暗反応過程となる。この0.7に相当する暗反応過程は不明なまま残されている。反応から類推できるように、バクテリアルシフェラーゼはモノオキシゲナーゼ活性を有する。発光が呼吸と直接関連していることから、ルシフェラーゼは酸素ターミネータとしての機能を有しており、バクテリアの発光が発光呼吸といわれる所以でもある (文献20)。

発光バクテリアは主に海棲であり、陸棲の1属を含めて、5属24種が同定されている。これ

までに研究されてきたすべての発光バクテリアにおいて、ルシフェラーゼは α - β サブユニット構造よりなるヘテロダイマーである。 α 及び β サブユニットの分子量はそれぞれ約40,000及び35,000である。*Vibrio harveyi*由来のルシフェラーゼの結晶構造も決定され、構造生物学的な観点からのメカニズムも研究されている (文献21)。最近、基質が結合した状態のルシフェラーゼの結晶構造も報告されている (Fig. 2 参照)。

タイプⅣの生物発光の場合、イオンが発光種の生成において鍵となる。代表的な例が、生物発光性渦鞭毛藻類である。特に *Gonyaulax polyedra* が詳しく研究されている (文献22)。*Gonyaulax* ルシフェリンはクロロフィルから誘導される線形のテトラピロールであり、自動酸化を受けやすい (文献23)。*Gonyaulax* の生物発光には二つのタンパク質が関与する。一つは luciferin-binding protein (LBP) で生理的な pH 条件では、ルシフェリンはタンパク質分子中にとじこめられ自動酸化から保護されている。pH が6付近に低下すると、ルシフェリンが放出される (文献24, 25)。他の一つは、ルシフェラーゼ (137 kDa) である。pH8では不活性であるが、LBP がルシフェリンを放出する pH において活性である。即ち、水素イオン

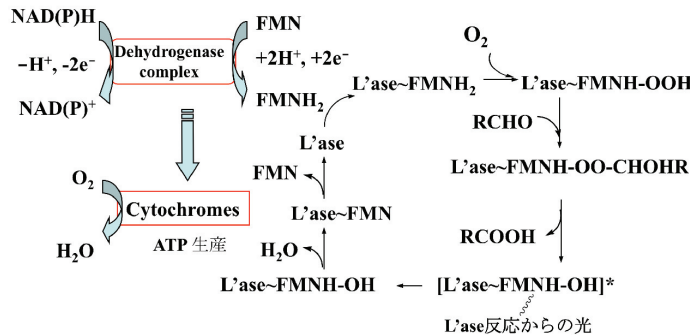


Fig. 7 バクテリアルシフェラーゼ触媒回路。L'ase, ルシフェラーゼ。

濃度の増大がフラッシュ的な発光を惹起する仕組みの要となる。

Coelenterates (刺胞動物) や *Ctenophores* (有節動物) の多くは発光性であり、カルシウムイオンが発光の鍵となる。この生物発光もまたタイプIVに含まれる。GFPは刺胞動物オワンクラゲ(傘の直径、5~10 cm)の一種 *Aequorea aequorea* などの生物発光に参与する。オワンクラゲの生物発光スキームを Fig. 8 に示す。

ルシフェリンはイミダゾピラジンを骨格とするセレンテラジンである。セレンテラジンと結合したオワンクラゲルシフェラーゼ(イクオリン)は、酸素分子との反応で過酸化物を形成した後、カルシウムイオンによってセレンテラジン部位の酸化が促進され、二酸化炭素と励起状態の酸化ルシフェリン(セレンテラミド)を与える。発光の極大波長は470 nmである。生体内では、GFPがルシフェラーゼ反応に参与することによって緑色光(極大波長508 nm)が発光の主成分となる(文献26-28)。

イクオリンの結晶構造の解析から、イクオリンには4つのヘリックスループ-ヘリックス

モチーフからなる“EF-hand”ドメインが存在し、EF-handは三つのCa²⁺結合サイトをもつことが明らかにされている(文献4)。

光の色の多様性；蛍光タンパク質の関与

反応の多様性に加えて、光の色にも多様性が見られる。このことはルシフェリンの構造の多様性とも関連する。励起状態の反応産物は通常、ルシフェラーゼと複合体を形成しており、ホタル生物発光で顕著に見られるように、ルシフェラーゼのマイクロ環境もまた光の色に変化をもたらす。さらに、オワンクラゲの項で述べたように、ルシフェラーゼ反応に内在性蛍光タンパク質(FP)が関与すると、ルシフェラーゼ反応のエネルギーによってFPが励起され、電子励起状態に遷移したFPからの光が観測されることになる。このような系では蛍光タンパク質がアクセサリタンパクとして機能していると考えられることができる。Fig. 8のスキームにあるように、GFPの結合により緑色蛍光が放射されるが、ルシフェラーゼ抽出物、即ちGFPが関与しない系の発光は青色である。オワンクラゲだけでなく *Renilla* (ウミパンジー) もまたカ

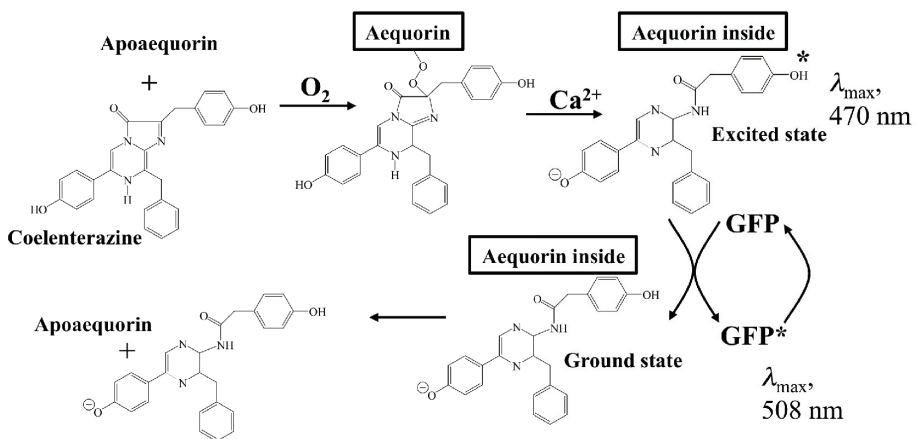


Fig. 8 オワンクラゲ生物発光. GFP, 緑色蛍光タンパク質.

ルシウムイオンによって発光が惹起され、さらに GFP が関与して第二発光種となる。この場合、単離ルシフェラーゼ反応からの発光の極大波長は486 nm である。

GFP が励起されるメカニズムとして、GFP 研究の初期のころから共鳴エネルギー移動 (FRET) が提案されている (文献29)。FRET に基づくメカニズムの場合、GFP とルシフェラーゼ中間体との1対1の結合が不可欠な素過程となる (文献30)。FRET 効率 η はドナー・アクセプター間距離 r の6乗 (r^6) の距離の逆数に比例するだけでなく、タンパク質同士の相互の配向にも依存する。もちろん GFP の吸収スペクトルとルシフェラーゼ反応からの発光のスペクトルが互いに好適に重なる条件を要する。

アクセサリ蛍光タンパク質は、第二発光種としての機能だけでなく、触媒的に反応に関与してルシフェラーゼ反応のキネティクスに影響を及ぼすことがある。このような触媒的な機能と対になった発光変調機能を一部の発光バクテリアでみることができる。バクテリア蛍光タンパク質は、ペルオキシヘミアセタール中間体 (Fig. 5) との分子内エネルギー移動過程を経て、その分解を促進しながら光の色を変化させる。このように、触媒的機能を有する点が GFP とは大きく異なる。蛍光性ルマジンタンパク質 (LumP) を産生する *Photobacterium* 属がその代表例である (文献31)。*Allivibrio fischeri* strain Y1 もまた顕著な発光変調を起こす (文献32)。*A. fischeri* Y1 の発光変調の原因蛍光タンパク質は酸化型フラビンを補欠分子族とし、黄色蛍光を発することから黄色蛍光タンパク質 (Y1-YFP) とよんでいる (文献33, 34)。このような色を冠した蛍光タンパク質の命名法は Hastings によって考案されたものである。

遊離 FMN の蛍光極大波長は525 nm であるがアポ Y1-YFP に取込まれると540 nm にレッドシフトする。このシフトは、タンパク質分子内において FMN のイソアロキサジン部位のコンフォメーション変化が原因であると予想されている (文献35)。興味深いことには Y1-YFP は二つの活性フォームで存在し、両フォーム共に発光変調活性を有している (文献35)。Y1-YFP はまたレドックスタンパク質であり、蛍光特性は酸化還元状態によって支配される (文献36)。Y1-YFP の場合、酸化型は蛍光性であるが、還元されるとほぼ無蛍光性となる。またこのように Y1-YFP のレドックス性が、カルチャーの酸素分圧に依存した生物発光色の可逆的变化 (青色発光 (低酸素状態) \leftrightarrow 黄色発光 (酸素供給時)) の原因となることがある (文献37, 38)。分子論的には、還元型 Y1-YFP は上述の触媒的機能を失った状態であるといえ、再酸化されると変調活性を取り戻すことになる。このような *A. fischeri* Y1 の光の色の変化は細胞の生理的な条件と密接に関連している。

応用の視点からの考察

生物発光に基づいて発光関連分子の高感度分析がこれまでに多く報告されている。具体例として、ホタルルシフェラーゼ反応を利用した ATP あるいはバイオマスの高感度アッセイをあげることができる。オワンクラゲのイクオリンもまた有用な光るタンパク質である。たとえばイクオリンのカルシウムイオン感受性に基づいて、細胞内の遊離カルシウムイオンレベルが計測されている (文献39)。特筆すべきは GFP である。これもオワンクラゲ由来であることから、Shimomura らの基礎研究が如何に重要なものであったかを改めて認識することができる。ここで GFP が実用化されるまでの背景を簡潔

に述べる。

GFP の cDNA は Prasher らによってクローニングされ、238個のアミノ酸より構成されることが明らかとなった (文献40)。さらに、GFP 単結晶の X 線回折データに基づいて、GFP は一つの α ヘリックスを内部に配置し、その外側に11個の β シートより成るシリンダー状の構造を有することが明らかにされた (文献41, 42)。蛍光団は、238アミノ酸残基の -Ser⁶⁵-Tyr⁶⁶-Gly⁶⁷- 配列部分において細胞内で自発的に形成される。具体的には、環化、脱水、そして酸素酸化反応による π 電子共鳴構造の形成が触媒フリーで達成される (文献43, 44)。点変異に基づいて Ser⁶⁵ を Thr と取り替えることにより GFP のフォールディングが迅速化されること、Thr²⁰³ を His とすることにより蛍光発光スペクトルがレッドシフトすることなどが Ormö, Tsein らによって明らかにされた (文献42, 45)。さらに、Chalfie らの先駆的な成果は、GFPcDNA のレポーター遺伝子としての道を大きく切り拓いたといえる (文献46)。

GFP は、蛍光団が自発的に構築される点の他、小型の単一ペプチドよりなる点、比較的安定である点、退色しにくい点など、実用的に有用な特徴を多く有している。GFP を特定のタンパク質に目印として付けることができれば、目印の蛍光から細胞内における特定タンパク質の量、動態、発現サイト、時空分布などの多様な情報を得ることも可能となる。このような場合、特定のタンパク質を GFP との融合タンパク質として発現させて、蛍光顕微鏡観測に供する。目印となる GFP は目的タンパク質に対するタグ (tag) とよばれることがある。最近の応用例については文献47を参照されたい。

マウス心筋細胞内の O₂ 分圧の GFP 蛍光イメージング (文献48) や、ブドウ球菌によるバ

イオフィルム形成過程の GFP 蛍光イメージング (文献49) など、GFP の単独発現系の応用も興味深い。発光性の刺胞動物や有節動物だけでなく、非発光性のサンゴでも GFP が発見され、生命科学分野への応用を目指した研究が展開されている (文献50, 51)。

最後に、*A. fischeri* Y1 由来の蛍光タンパク質を応用観点から述べてみたい。*A. fischeri* Y1 は、Y1-YFP の他、青色蛍光タンパク質 (Y1-BFP) を産する (文献52)。Y1-BFP の補欠分子族は LumP と同様にリボフラビンの前駆体 6, 7-dimethyl-8-(1'-D-ribityl)lumazine である。Y1-YFP 及び Y1-BFP はそれぞれ582塩基長及び600塩基長の遺伝子でコードされており、単一ポリペプチドよりなる小型のタンパク質である (文献53)。GFP とは異なりペプチドだけで蛍光能を発現することはないが、いずれの補欠分子族も細胞内において恒常的に存在するものであり、遺伝子の発現後はそれぞれの補欠分子を自動的に取り込み蛍光タンパク質となる。Y1-YFP だけでなく Y1-BFP も酸化還元タンパク質であり、細胞内の酸化還元状態に依存して蛍光特性が変化する。細胞内では例えば呼吸と関連してスーパーオキシドアニオン、過酸化水素などの活性酸素種 (ROS) が生成・消滅していることから、Y1-YFP 及び Y1-BFP は ROS を検知するセンサータンパク質となり得ることが期待される。さらにバクテリアルシフェラーゼと Y1-YFP あるいは Y1-BFP との融合タンパク質をコードする DNA を構築することによって、光の強度だけでなく光の色をもパラメタとする細胞内 ROS の励起光フリー生物発光イメージングが実現できるものと期待している。この発想はそもそも *A. fischeri* Y1 の生物発光の色と強度が呼吸と連動して変化することから得たものである (文献37)。

おわりに

生物個体レベルからの発光は仲間との交信、餌の誘引、威嚇防御、酸素毒性に対する防御など様々な利用形態が考えられる。分子レベルにおいて生物発光の意義を解き明かす事は難題ではあるが、発光挙動と細胞分裂周期や呼吸との分子リンク、生命活動のリズムやホメオスタシスと生物発光との関連性など興味深い課題が多い。さらに、発光生物はなぜ光るのか、なぜ光らねばならないのか、いかに光る機能を獲得したのか、など素朴で且つ重要な命題が残る。

他方、GFPをコードする遺伝子やそのタンパク質産物が生命科学の研究に広範に用いられていることから予想されるように、他の生物発光関連タンパク質の活用も今後益々興味もたれる。

文 献

- 1) Miller, S.D., Haddock, S.H., Elvidge, A.D., Lee, T.F., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 14181-14184 (2005).
- 2) 柄谷肇, 平成21年度中学校・高等学校実践力向上講座理科(化学)(2009).
- 3) Conti, E., Franks, N.P., Brick, P., *Structure*, 4, 287-298 (1996).
- 4) Head, J.F., Inouye, S., Teranishi, K., Shimomura, O., *Nature*, 405, 372-373 (2000).
- 5) Campbell, Z.T., Weichsel, A., Montfort, W.R., Thomas O. Baldwin, T.O., *Biochem.*, 48, 6085-6094 (2009).
- 6) Nakatsu, T., Ichiyama, S., Hiratake, J., Saldanha, A., Kobayashi, N., Sakata, K., Kato, H., *Nature*, 440, 372-376 (2006).
- 7) Wilson, T., Hastings, J.W., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 14, 197-230 (1998).
- 8) Haddock, S.H.D., Rivers, T.J., Robinson, B.H., *Marine Biology*, 133, 571-582 (2001).
- 9) Viviani, V.R., Bechara, E.J.H., *Ann. Entomol. Soc. Am.*, 90, 389-398 (1997).
- 10) Douglas, R.H., Partridge, J.C., Dulai, K., Hunt, D., Mullineaux, C.W., Tauber, A.T., Hynninen, P.H., *Nature*, 393, 423-424 (1998).
- 11) Shimomura, O., *et al.*, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 30, 929-933 (1957).
- 12) Shimomura, O., Johnson, F.H., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 44, 340-347 (1971).
- 13) Shimomura, O., *In* "Chemical and Biological Generation of Excited States" ed., Adam, W., Cilento, G., pp. 249-276, Academic Press, New York (1982).
- 14) Shimomura, O., *et al.*, *J. Cell. Comp. Physiol.*, 58, 113-124 (1961).
- 15) Wood, K.V., Lam, Y.A., Seliger, H.H., McElroy, W.D., *Science*, 244, 700-702 (1989).
- 16) McElroy, W.D., DeLuca, M., *In* "Chemical and Bioluminescence" ed., Burr, J.G., pp. 387-399, Dekker, New York (1985).
- 17) McCapra, F., *In* "Bioluminescence and Chemiluminescence" ed. Hastings, J.W., Kricka, L.J., Stanley, P.E., pp. 7-15, Wiley & Sons, Chichester (1997).
- 18) Hastings, J.W., Potrikus, C.J., Gupta, S.C., Kurfürst, M., Makemson J.C., *Adv. Microbiol. Physiol.* 26, 235 (1985).
- 19) Kurfuerst, M., Macheroux, P., Ghisla, S., Hastings, J.W., *Biochim. Biophys. Acta*, 924, 104-110 (1987).

- 20) Grogan, G.W., *Arch. Microbiol.* 137, 159 (1984).
- 21) Fisher, A.J., Thompson, T.B., Thoden, J.B., Baldwin, T.O., Rayment, I., *J. Biol. Chem.*, 271, 21956-21968 (1996).
- 22) Hastings, J.W., In "Light emission by plants and bacteria" ed., Gouindjee, J.A., Fork, D.C., Academic Press, New York, 363-398 (1986).
- 23) Nakamura, H., Kishi, Y., Shimomura, O., Morse, D., Hastings, J.W., *J. Am. Chem. Soc.*, 111, 7607-7611 (1989).
- 24) Morse, D., Pappenheimer, A.M., Hastings, J.W., *J. Biol. Chem.*, 264, 11822-11826 (1989).
- 25) Minttag, M., Eckerskorn, C., Strupat, K., Hastings, J.W., *FEBS Lett.*, 411, 245-250 (1997).
- 26) Shimomura, O., Johnson, F.H., Saiga, Y., *J. Cell. Comp. Physiol.*, 59, 223-239 (1962).
- 27) Shimomura, O., *FEBS Lett.*, 104, 220-222 (1979).
- 28) Hart, R.C., Stempel, K.E., Boyer, P.D., Cormier, M.J., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 81, 980-986 (1978).
- 29) Morin, J.M., Hastings, J.W., *J. Cell. Physiol.*, 77, 313-318 (1970).
- 30) Ward, W.W., Cormier, M.J., *Photochem. Photobiol.*, 27, 389-396 (1978).
- 31) Lee, J., Matheson, I.B.C., Müller, F., O'Kane, D.J., Vervoort J., Visser, A.J.W.G., In "Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes" Vol. II., ed., Müller, F., pp. 109-151, CRC Press, Boca Raton (1990).
- 32) Ruby, E.G., Neelson, K.H., *Science*, 196, 432-434 (1977).
- 33) Macheroux, P., Schmidt, K.U., Steinerstauch, P., Ghisla, S., Colepicolo, P., Buntic, R., Hastings, J.W., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 146, 101-106 (1987).
- 34) Daubner, S.C., Astorga, A.M., Leisman, G.B., Baldwin, T.O., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 8912-8916 (1987).
- 35) Karatani, H., Hastings, J.W., *J. Photochem. Photobiol., B: Biol.*, 18, 227-232 (1993).
- 36) Karatani, H., Izuta, T., Hirayama, S., *Photochem. Photobiol. Sci.*, 6, 566-570 (2007).
- 37) Karatani, H., Yoshizawa, S., Hirayama, S., *Photochem. Photobiol.*, 79, 120-125 (2004).
- 38) Karatani, H., Matsumoto, S., Miyata, K., Yoshizawa, S., Suhama, Y., Hirayama, S., *Photochem. Photobiol.*, 82, 587-592 (2006).
- 39) Shimomura, O., Musicki, B., Kishi, Y., *Biochem. J.*, 251, 405-410 (1988).
- 40) Prasher, D.C., Eckenrode, V.K., Ward, W.W., Prendergast, F.G., Cormier, M.J., *Gene*, 111, 229-233 (1992).
- 41) Yang, F., Moss, L.G., Phillips Jr., G.N., *Nature Biotech.*, 14, 1246-1251 (1996).
- 42) Ormö, M., Cubitt, A.B., Kallio, K., Gross, L.A., Tsien, R.Y., Remington, S., *Science*, 273, 1392-1395 (1996).
- 43) Cody, C.W., Prasher, D.C., Westler, W.M., Prendergast, F.G., Ward, W.W., *Biochemistry*, 32, 1212-1218 (1993).

- 44) Heim, R., Prasher, D.C., Tsien, R.Y., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 12501-12504 (1994).
- 45) Tsien, R.Y., *Annu. Rev. Biochem.*, 67, 509-544 (1998).
- 46) Chalfie, M., Tu, Y., Euskirchen, G. Ward, W.W., Prasher, D., *Science*, 263, 802-805 (1994).
- 47) 実験医学増刊 “生命現象の動的理解を目指すライブイメージング”, 宮脇敦史編, 羊土社, vol. 26-No. 17 (2008).
- 48) Takahashi, E., Takano, T., Nomura, Y., Okano, S., Nakajima, O., Sato, M., *Am. J. Physiol. Cell Physiol.*, 291, C781-C787 (2006).
- 49) Rani, S.A., Pitts, B., Beyenal, H., Velunchamy, R.A., Lewandowski, Z., Davison, W.M., Buckingham-Meyer, K., Stewart, P.S., *J. Bacteriology*, 189, 4223-4233 (2007).
- 50) Matz, M.V., Fradkov, A.F., Labas, Y.A., Savitsky, A.P., Zaraisky, A.G., Markelov, M.L., Lukyanov, S.A., *Nature Biotech.*, 17, 969-973 (1999).
- 51) Bulina, M.E., Chudakov, D.M., Britanova, O.V., Yanushevich, Y.G., Staroverov, D.B., Chepurnykh, T.V., Merzlyak, E.M., Shkrob, M.A., Lukyanov, S., Lukyanov, K.A., *Nature Biotech.*, 24, 95-99 (2006).
- 52) Karatani, H., Wilson, T., Hastings, J.W. *Photochem. Photobiol.*, 55, 293 - 299 (1991).
- 53) Karatani, H., In “Luciferase and Fluorescent Proteins: Principles and Advances in Biotechnology and Bioimaging” ed., Viviani, V.R., Ohmiya, Y., pp. 137-150, Transworld Research Network, Kerala (2007).