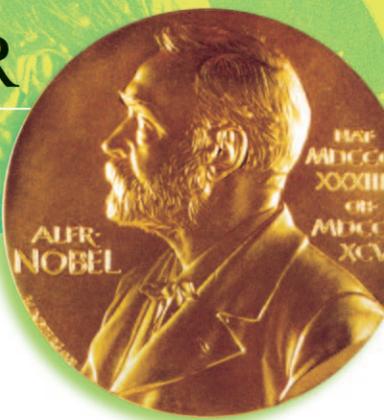


DER NOBELPREIS FÜR
CHEMIE 2008



Angewandte
Chemie

Grün fluoreszierendes Protein

DOI: 10.1002/ange.200902240

Die Entdeckung des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) (Nobel-Vortrag)**

Osamu Shimomura*

Aequorin · Biolumineszenz · Fluoreszierende Proteine · Nobel-Vortrag

1. Biographie

Eine Kindheit im Krieg

Ich wurde am 27. August 1928 in der Stadt Fukuchiyama in der Präfektur Kyoto-Fu (Japan) geboren. Mein Vater Chikara war Hauptmann im Regiment von Fukuchiyama. Er wurde im Frühjahr 1933 in die Mandschurei versetzt, die damals unter japanischer Besatzung stand. Da es im Gebiet der Mandschurei eine starke Rebellenbewegung gab, blieben meine Mutter Yukie, mein jüngerer Bruder Sadamu und ich in Japan. Wir zogen zu meiner Großmutter Tsuki Shimomura nach Sasebo in der Präfektur Nagasaki. Erst im März 1935, nachdem die Rebellen niedergeschlagen waren, folgten wir meinem Vater in die Mandschurei in die Stadt Renzankan. Eine Schwester, Toshiko, wurde dort geboren, sie starb aber an einer Lungenentzündung ein Jahr nach der Geburt. Ich erinnere mich an die tiefe Trauer meiner Mutter nach Toshikos Tod.

Anfang 1938 wurde mein Vater an die sowjetische Grenze verlegt. Der Rest meiner Familie kehrte zurück nach Sasebo. Meine Mutter folgte bald wieder meinem Vater, und Sadamu und ich blieben fast ein Jahr in der Obhut meiner Großmutter Tsuki. Als der älteste Sohn war ich der Stammhalter der Familie, und Tsuki erzog mich nach strenger Tradition. Da ich körperlich nicht sehr stark war, versuchte sie, mich mit nahrhaftem Essen aufzupäppeln, zum Beispiel mit Omeletts, Rinderhack und Sojamilch. Großmutter achtete peinlich auf Manieren und Etikette. So musste in ihrer Gegenwart stets eine gute Haltung annehmen. Oft sagte sie: „Der Samurai zeigt keine Schwäche, auch wenn es ihn hungert.“ Wenn ich gebadet hatte, inspizierte sie Hals und Ohren nach Schmutz – es sei nämlich schändlich, schmutzig enthauptet zu werden (es ist manchmal ehrenvoll für einen Samurai, Harakiri zu begehen und dann enthauptet zu werden).

Ich wusste, dass sie von der Bedeutung des Vorbereitungsseins sprach, aber es war auch ein wenig beängstigend. Im Jahr darauf brachte Vater meine Mutter nach Hause zurück, blieb aber selbst nur kurz (Abbildung 1). Im April 1941 kam ich in die siebte Klasse an der Mittelschule in Sasebo. Die Militarisierung hatte in Japan ihren Höhepunkt erreicht. Unter der Führung von Schuloffizieren mussten wir ein- oder zweimal die Woche an militärischen Übungen teilnehmen. Später in diesem Jahr wurde mein Vater nach Osaka versetzt, und nach Beginn des Pazifikkriegs am 8. Dezember zogen wir



Abbildung 1. Meine Familie im Jahr 1939. Vordere Reihe von links nach rechts: Meine Mutter Yukie, Großmutter Tsuki, Großvater Kosaburo, mein Vater Chikara, mein jüngerer Bruder Sadamu und, hinter Sadamu sitzend, ich selbst. Die hintere Reihe ist die Familie meines Onkels Eijiro Sata.

zu ihm. Einer meiner Lehrer an der Schule in Osaka war Shizuo Ito, ein bekannter Dichter aus Isahaya. Ich steckte mich mit Tuberkulose an und war oft müde; obwohl ich hart arbeitete, war mein Rang in der Klasse schlecht. Ich interessierte mich zu der Zeit für Modellflugzeuge. Einmal baute ich ein Flugzeug nach einem Artikel in einem wissenschaftlichen Magazin nach, das ich in einem großen Warenhaus ausstellen durfte. Meine Schwester Setsuko wurde geboren, und ich musste gelegentlich auf sie aufpassen.

Als ich in der neunten Klasse war, zeichnete sich für Japan ein widriger Kriegsverlauf ab, und mein Vater wurde nach Thailand geschickt. In der Schule fiel oft der Unterricht aus, stattdessen häuften sich die militärischen Übungen. Einmal sah ich bei einem Nachtmarsch zum Mt. Ikoma viele kleine unregelmäßige Lichtpunkte auf der Straße. Heute glaube ich, dass es selbstleuchtende Regenwürmer waren, die von den

[*] Prof. O. Shimomura

Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA 02543 (USA)
E-Mail: oshimomura@mbl.edu

[**] Copyright © The Nobel Foundation 2008. Wir danken der Nobel-Stiftung, Stockholm, für die Genehmigung zum Abdruck einer deutschen Fassung des Vortrags.

Stiefeln zertreten wurden. Im Sommer 1944 schrieb mein Vater, dass wir aufs Land ziehen sollten, um den Bombardements der Amerikaner zu entgehen. Meine Mutter beschloss, dass wir zu ihren Eltern nach Isayaha in der Nähe von Nagasaki ziehen würden. An meinem ersten Tag in der neuen Schule, es war im September, teilte der Lehrer uns mit: „Diese Klasse wird sofort an das Waffendepot der Marineflieger in Omura einberufen. Andere Klassen werden an die Mitsubishi-Schiffswerft und -Waffenfabrik in Nagasaki einberufen.“ Das allgemeine Mobilmachungsgesetz war schon vor Jahren in Kraft getreten, und ich rechnete durchaus damit, früher oder später einberufen zu werden, ich dachte aber nicht, dass dies gleich am ersten Schultag geschehen würde. Von diesem Tag an lernten wir nicht mehr: Wir arbeiteten.

Zwei Monate nach meinem Arbeitsantritt in Omura wurde das Waffendepot durch Bombardements zerstört. Als an diesem Tag die Luftsirenen heulten, suchten einige Studenten Schutz in einem unterirdischen Bunker, die anderen von uns rannten an den Rand der Landebahn und harrten dort in einem Graben aus. Bald sah ich eine Formation von über zwanzig B29-Bombern von Westen heranfliegen, und die Bombardements begannen. Eine Streubombe detonierte in unmittelbarer Nähe und bewarf uns mit Sand und Schotter. Die Bomben zerstörten fast die gesamte Anlage, ich sah aber, dass ein einzelner Hangar noch stand und dass einige Leute versuchten, ein Kampfflugzeug herauszuziehen. Wir eilten hinzu, um zu helfen. Im rauchverhangenen Himmel über uns war jedoch ein feindliches Flugzeug verborgen, und in dem Moment, als wir den Hangar erreichten, wurden wir mit Brandbomben eingedeckt. Ich hörte jemanden den Befehl zur Flucht brüllen. Wir rannten zwischen Bomben, die mit weißer Flamme brannten, davon; ich sah einen Menschen, der an der Schulter getroffen war und dessen Arm nur noch herunterbaumelte.

Nach dem Luftangriff erfuhren wir, dass einige der Schüler in dem unterirdischen Bunker umgekommen waren und dass unser Schülerheim abgebrannt war. Innerhalb eines Monats wurden mehrere hölzerne Fabrikgebäude zwischen den Bergen nahe Isayaha errichtet, und wir bekamen die Order, dort zu arbeiten. Ich besuchte jeden Tag die Fabrik, selbst als sie noch nicht fertig gebaut war; wenn ich nichts zu tun fand, legte ich mich oft in ein nahe Kartoffelfeld und betrachtete die Formationen von B29-Bombern, die hoch über dem Mt. Tara-dake nach Osten flogen. Es war schön, die silber glänzenden B29 vor dem Hintergrund des blauen Himmels zu sehen. Dann, nach zehn Minuten, würde ich schwarzen Rauch aus dem Industriegebiet von Ohmuta am gegenüberliegenden Ufer des Ariake-Sees aufsteigen sehen, und ich konnte mir nur ausmalen, welch schreckliches Blutbad sich dort drüben abspielte.

Die neue Fabrik war eine Reparaturhalle für Flugzeugmotoren. Meine Arbeit bestand darin, die Stirnfläche, die das Kurbelgehäuse mit dem Zylinder verbindet, glattzuschleifen. Unsere Abschlüsse erhielten wir im März 1945 in der Fabrik, ohne Abschlussfeier oder Diplome. Ich war 16 Jahre alt. Der Einberufungsbefehl blieb bestehen.

Die Atombombe auf Nagasaki und das Ende des Krieges

Am 6. August 1945 erfuhren wir aus den Nachrichten, dass die Innenstadt von Hiroshima durch eine neue Art von Bombe vollständig zerstört worden war. Drei Tage später, kurz vor elf Uhr morgens, warnte uns eine Sirene in der Isayaha-Fabrik vor einem bevorstehenden Luftangriff. Wie gewöhnlich ging ich nicht in den Bunker, sondern erklimmte mit ein paar Freunden einen nahen Hügel und schaute in den Himmel. Wir sahen eine einzelne B29, die von Norden kommend Richtung Nagasaki flog, das ungefähr 15 km entfernt lag. Ich wunderte mich über den ungewöhnlichen Kurs. Die B29 warf zwei oder drei Fallschirme ab und ich hörte vereinzelte Gewehrschüsse. Bei genauem Hinsehen waren keine Menschen an den Fallschirmen. Nach ein paar Minuten folgte eine zweite B29 der ersten Maschine, und eine Sirene gab Entwarnung. Wir kehrten in die Fabrik zurück.

In dem Augenblick, als ich mich auf meinen Schemel setzte, kam ein kräftiger Lichtblitz durch die kleinen Fenster, und wir waren eine halbe Minute geblendet. Dann, ungefähr 40 Sekunden nach dem Blitz, folgte ein lautes Geräusch und eine plötzliche Veränderung des Luftdrucks. Irgendwo musste es eine gewaltige Explosion gegeben haben. Der Himmel füllte sich rasch mit dunklen Wolken, und als ich die Fabrik verließ, um nach Hause zu gehen, setzte ein Nieselregen ein. Der Regen war schwarz, und als ich zuhause ankam, war mein weißes Hemd grau geworden. Meine Großmutter bereitete mir schnell ein Bad. Dieses Bad duldete mich vor den schädlichen Wirkungen der starken Strahlung gerettet haben, die wohl in dem schwarzen Regen verborgen war.

Am nächsten Morgen erzählte uns einer der technischen Offiziere, dass die Fallschirme, die wir Tags zuvor gesehen hatten, Messinstrumente und einen Sender trugen. Er erwähnte auch, dass es schwere Schäden in Nagasaki gegeben hatte, Einzelheiten seien aber nicht bekannt. Der Fabrikvorsteher organisierte einen Rettungsstrupp. Wir versuchten, nach Nagasaki zu gelangen, aber die Straßen und Eisenbahnstrecken waren unpassierbar. Später am Nachmittag wurde dann die Eisenbahnlinie nach Michinoo, von wo aus es nicht weit zum Bahnhof von Nagasaki war, wieder freigegeben, und Rettungsmannschaften begannen, Verletzte nach Isayaha und andere Städte zu transportieren.

Am 15. August erklärte Kaiser Hirohito im Radio die bedingungslose Kapitulation. Für die meisten Japaner war es das erste Mal, dass sie die Stimme des Kaisers hörten. Ich glaube, dass es ein weit verbreitetes Gefühl der Verzweiflung gab und die Menschen große Angst vor einer ungewissen Zukunft hatten.

Viele Jahre vergingen, bevor wir genauere Informationen über die Atombomben hatten, die auf Hiroshima und Nagasaki abgeworfen wurden. Die Nagasaki-Bombe war ein anderer Typ und weitaus mächtiger als die Hiroshima-Bombe. Selbst wenn man die Anwendung der Hiroshima-Bombe als Maßnahme zur Beendigung des Krieges entschuldigt, so diente der Abwurf auf Nagasaki, drei Tage später, zweifellos nur dem Test einer neuen Waffe. Dies kann niemals entschuldigt werden.

Die Mobilmachung war beendet, aber ich war nicht sicher, ob meine Schulakte den Besuch eines Colleges erlauben

würde. Um mir Rat einzuholen, besuchte ich meine Schule in Isahaya eine Woche nach Kriegsende. Am Haupttor waren mehrere große Blätter Papier angebracht, auf denen unzählige Namen geschrieben standen. Ungefähr die Hälfte der Namen war durchgestrichen. Offenbar wurde die Schule als Lazarett für die Verletzten aus Nagasaki benutzt, die auf den Papieren aufgelistet waren. Auf dem Schulhof trotteten mehrere Männer unter der heißen Sommersonne, begleitet vom schrillen Lärm der Zikaden. Alle waren halb nackt. Als ich genauer hinsah, war ihre Haut mit schwarzen Flecken bedeckt, in denen sich weiße Sprengel zeigten. Ich hielt es für Medizin, die vielleicht die Haut schwarz färbte, doch später merkte ich, dass es getrocknetes Blut war. Die weißen Flecken waren Maden, die in dem menschlichen Fleisch geschlüpft waren. Aber das war noch nicht der schockierendste Anblick: Vorne am Tor lagen mit Strohmatten bedeckte Leiber auf einen Karren gestapelt, wahrscheinlich um in ein Krematorium gebracht zu werden. Zwei Menschen mit einer Trage, auf der ein Körper lag, kamen aus dem Schulgebäude. Im gleichen Moment sah ich zwei halbnackte Menschen in der Nähe des Zauns. Sie hatten dem Aufladen der Leiber zugesehen, so wie es womöglich mit ihnen in paar Tagen geschehen würde. Ich fühlte mich, als würde ich Geister vor mir sehen. Mein Gehirn erfror, der Lärm der Zikaden verklang, und meine Sinne schwanden. Ich glaube, der mentale Schock, den ich bei diesem Anblick erlitt, hatte eine dauerhafte Wirkung auf mich. Ich habe es lange Zeit bedauert, dass ich nicht mit diesen Menschen sprach; wahrscheinlich fehlte mir damals der Mut.

Das College für Pharmazie in Nagasaki

Zwischen 1946 und 1947 versuchte ich, mich an drei verschiedenen Colleges einzuschreiben, wurde aber überall abgelehnt. Meine Schulakte war nicht überzeugend, da ich an der Isahaya-Schule, die mir den Abschluss ausstellte, keinen einzigen Tag Unterricht hatte. Dann hörte ich, dass das College für Pharmazie in Nagasaki, das dem Medizin-College untergliedert war, ein provisorisches Institut in einer geräumten Militärkaserne nahe meinem Elternhaus errichtete, (Beide Colleges waren von der Atombombe völlig zerstört worden) und tatsächlich wurde ich dort im April 1948 zugelassen. Obwohl ich überhaupt nicht im Sinn hatte, Pharmazeut zu werden, war es unter diesen Umständen meine einzige Wahl. Meine Großmutter schenkte mir zum Eintritt in das College einem Anzug aus seidenem Stoff. Es gab zu der Zeit keine Stoffe zu kaufen, aber sie besaß ein Feld mit Maulbeerbäumen. Dort züchtete sie Seidenraupen, wickelte das Seidengarn von den Kokons, trocknete das Garn, webte es eigenhändig zu Stoff und nähte dann die Kleider.

Die meisten der Pharmaziestudenten wohnten im Studentenheim, und sie waren immer hungrig, denn Nahrungsmittel waren sehr knapp. Ich lebte zu Hause, und wir besaßen Ackerland. Ich hatte also großes Glück, was das Essen betraf. Trotz großer Anstrengungen durch die Professoren verfügte das College über nur armselige Mittel und Ausrüstung. Experimente waren kaum möglich. Der Unterricht in analytischer Chemie und in physikalischer Chemie schien in Ord-

nung, aber ich lernte nur sehr wenig über organische Chemie. Bei organischen Synthesen setzten wir oft Lösungsmittel in Brand, denn technische Ausrüstung und Laborgläser waren schlecht. Zum Glück hatte viele von uns in Kriegszeiten gelernt, wie man Feuer bekämpfte. Ich entwickelte ein zunehmendes Interesse an chemischen Experimenten, aber die einzigen Versuche, die ich mit der vorhandenen Ausrüstung durchführen konnte, waren anorganische ionische Reaktionen. Mit der Erlaubnis von Professor Shungo Yasunaga (Abbildung 2) stellte ich viele Glaskapillaren von 1 mm

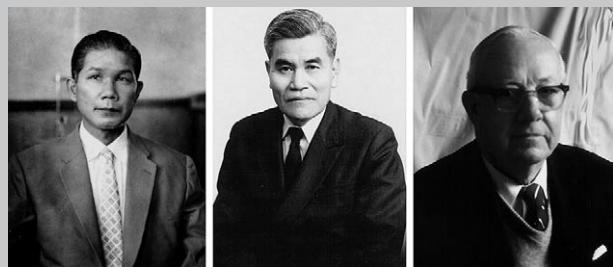


Abbildung 2. Meine drei Mentoren. Von links: Professor Shungo Yasunaga (1911–1959), Nagasaki; Professor Yoshimasa Hirata (1915–2000), Nagoya; Professor Frank H. Johnson (1908–1990), Princeton.

Durchmesser her und packte sie mit Aluminiumpulver. Wenn eine kleine Menge einer gemischten Lösung von Metallionen in die Spitze der Kapillare gebracht wurde und man diese in ein Entwicklungsreagens hielt, so konnte man beobachten, wie das Reagens durch die Kapillarwirkung rasch nach oben gezogen wurde. Die Metallionen wurden in diesem Prozess aufgetrennt, und farbige Bänder erschienen, die zu den jeweiligen Ionen gehörten. Es war eine Form der Chromatographie. Mit Prof. Yasunagas Erlaubnis nahm ich eine kleine Menge verschiedener Chemikalien mit nach Hause und begann, die Bedingungen, denen die Auf trennung unterlag, genauer zu studieren. Die Ergebnisse wurden einige Jahre später, als meine erste Veröffentlichung, im *Journal of the Pharmaceutical Society of Japan* publiziert.^[1]

Im März 1951 erhielt ich meinen Abschluss an der Nagasaki Pharmacy School als Klassenbester. Die Schule wurde neu organisiert und firmierte nun als Department für Pharmazie der Nagasaki University. Professor Yasunaga gab mir eine Assistentenstelle im analytisch-chemischen Laboratorium, und in der übrigen Zeit setzte ich meine chromatographischen Experimente, die ich als Student angefangen hatte, fort. Ich begann außerdem, mich für klassische Musik zu interessieren, nachdem ich irgendwo eine Schallplattenaufnahme gehört hatte. Allerdings kostete eine Schallplatte fast einen Monatslohn. Irgendwie, wahrscheinlich mit finanzieller Hilfe meiner Eltern, gelang es mir, einen Schallplattenspieler zu kaufen, und aus gläsernen Vakuumröhren, Kondensatoren und Widerständen baute ich mir einen Verstärker.

Professor Yasunaga war ein höflicher und sehr netter Mann, der allseitiges Vertrauen genoss. Nachdem ich vier Jahre bei ihm gearbeitet hatte, arrangierte er mir einen bezahlten Urlaub, damit ich für ein Jahr studieren konnte. Darüber hinaus bot er an, mich Professor Fujio Egami an der Nagoya University vorzustellen, der ein berühmter Moleku-

larbiologe war. Wir nahmen den Zug nach Nagoya, erfuhren dann aber leider, dass Professor Egami an diesem Tag nicht in der Universität war. Professor Yasunaga besuchte also stattdessen Professor Yoshimasa Hirata (Abbildung 2, Mitte), einen Organochemiker. Wir plauderten einige Minuten. Als wir gingen, meinte Professor Hirata, ich solle mich doch seiner Gruppe anschließen und könne jederzeit anfangen. Das war eine Überraschung, hatten wir uns doch gerade erst kennengelernt. Ich wusste nicht viel über Molekularbiologie oder organische Chemie, deshalb war es mir gleich, was von beidem ich studieren würde. Ich verstand Professor Hiratas Worte als Wink des Himmels, und so beschloss ich, mich seiner Gruppe anzuschließen. So wie es aussieht, hat diese Entscheidung meine Zukunft festgelegt und mich meinen späteren Studien der Biolumineszenz, des Aequorins und des grün fluoreszierenden Proteins (GFP) zugeführt.

Studien bei Professor Hirata und das *Cypridina-Luciferin*

Ich schrieb mich im April 1955 in Hiratas Arbeitsgruppe am Department of Science der Nagoya University ein. Hiratas Arbeitskreis war ein wunderbarer Ort mit einer großartigen Atmosphäre. Niemand unterrichtete mich, aber ich lernte viel, indem ich anderen einfach zuschaute.

An meinem ersten Tag holte Professor Hirata einen großen Vakuumexsikkator hervor, in dem getrocknete Muschelkrebse (*Cypridina*) aufbewahrt wurden. Er erklärte mir, dass die *Cypridina*, die in flachen Küstengewässern Japans vorkamen, unter der Wirkung einer organischen Verbindung namens Luciferin und eines Enzyms, der Luciferase, Licht aussenden. Er erzählte weiter, dass das Luciferin extrem instabil war und in der Gegenwart von Sauerstoff zerfiel und auch, dass Professor Newton Harvey an der Princeton University seit 20 Jahren erfolglos versuchte, das Luciferin zu isolieren. Professor Hirata fragte, ob ich das *Cypridina-Luciferin* isolieren und kristallisieren könnte, um seine Struktur zu bestimmen, denn zu der Zeit war die Kristallisation der einzige Weg, um die Reinheit einer Substanz zu beweisen. Er erklärte außerdem, dass er das Projekt keinem Studenten geben konnte, der einen Abschluss anstrebt, denn der Ausgang des Unternehmens war allzu unsicher. Ich begriff die Schwierigkeit der Arbeit. Weil ich da war, um zu studieren, und nicht, um einen Abschluss zu machen, entgegnete ich, dass ich mein Bestes tun wolle.

Die Kristallisation stellte sich in der Tat als sehr schwierig heraus. Es kostete mich zehn Monate harter Arbeit, um das Luciferin zu extrahieren, aufzureinigen und zu kristallisieren. Als es am Ende gelungen war, konnte ich vor Glück drei Tage lang nicht schlafen. Seit dem Ende des Krieges war mein Leben dunkel gewesen, nun aber hatte ich etwas, das mir Hoffnung für die Zukunft gab. Meine vielleicht größte Belohnung war das Gefühl von Selbstwert: Ich lernte, dass jedes schwierige Problem durch große Anstrengung gelöst werden kann. Mein Aufenthalt in Nagoya wurde um ein Jahr verlängert, damit ich die Struktur des *Cypridina-Luciferins* studieren konnte (Abbildung 3). Unsere erste Arbeit zum *Cypridina-Luciferin* wurde 1957 publiziert, obwohl die Struktur des Luciferinchromophors noch aufzuklären blieb.



Abbildung 3. Der Autor, zusammen mit einem engen Freund und Mitarbeiter, Toshio Goto (rechts), an einer Gegenstromverteilungsapparatur. Die Aufnahme entstand 1956, kurz nach der erfolgreichen Kristallisation des *Cypridina-Luciferins*.

Nach Amerika

Im Frühjahr 1959 erhielt ich einen Brief von Dr. Frank Johnson (Abbildung 2, rechts) von der Princeton University, der mich in seine Arbeitsgruppe einlud. Als Professor Hirata hörte, dass ich nach Princeton gehen wollte, verlieh er mir den Doktortitel für meine Arbeiten an den *Cypridina*, obgleich ich gar nicht als Doktorand eingeschrieben war. Prof. Hirata wusste, dass ein Doktortitel meine Entlohnung in Princeton verdoppeln würde. Ich war völlig überrascht. Für die Reise nach Amerika bewarb ich mich um ein Fulbright-Stipendium, das mir auch genehmigt wurde.

Am 4. August 1960 fand meine Hochzeit mit Akemi Okubo statt, die Doktorandin am Pharmacy Department in Nagoya war. Die Heirat war auf traditionelle Weise von einem Ehestifter arrangiert worden. Am 27. August verließ ich Yokohama auf einem Schiff nach Seattle, zusammen mit mehr als 200 anderen Fulbright-Stipendiaten, allerdings konnte mich Akemi wegen eines Visaproblems nicht begleiten. An diesem Tag war mein 32. Geburtstag. Die Pier war voll von Menschen, denn es war die letzte Pazifikfahrt der Hikawa-maru (Abbildung 4). Tausende von farbigen Bändern spannten sich vom Schiff zur Pier. Unvergesslich der

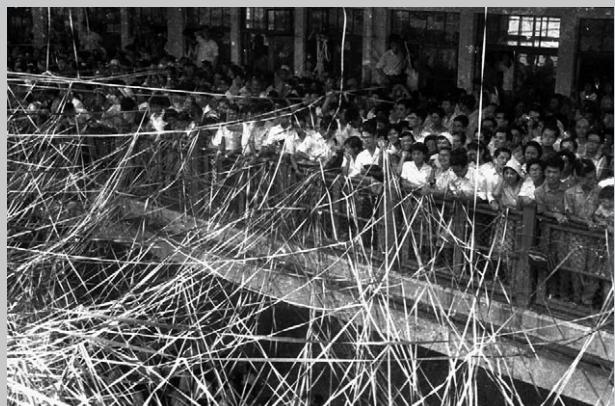


Abbildung 4. Blick von der ablegenden Hikawa-maru im Hafen von Yokohama (27. August 1960).

Moment, als das Schiff sich in Bewegung setzte und die Bänder zerrissen und dann herabfielen. In Amerika setzte ich meine Reise per Eisenbahn fort, und ich kam am 17. September 1960 in Princeton an. Die erste Nacht verbrachte ich in Dr. Johnsons Haus, und am darauf folgenden Morgen bot er an, mir bei der Suche nach einem Apartment zu helfen. In der Zeitung fanden wird eine Annonce für ein Zimmer, und wir fuhren zu dem Haus. Ein Mann öffnete auf unser Klingeln, schlug die Tür aber gleich wieder zu, als er mein Gesicht sah. Es war ein klarer Fall von rassischer Diskriminierung, wie sie mir sonst nur höchst selten widerfahren ist.

Bei unserem ersten Treffen in Dr. Johnsons Büro zog er eine kleine Ampulle hervor, die ein weißes Pulver enthielt. Es waren zermahlene und gefriergetrocknete Leuchttorgane der Leuchtqualle *Aequorea*, und Johnson vermutete, dass sie beim Mischen mit Wasser Licht ausstrahlen würden. Wir gingen in eine Dunkelkammer und probierten es aus, konnten aber kein Licht sehen. Dennoch erzählte er mir mit großer Begeisterung, dass *Aequorea* bei Friday Harbor, Washington State, massenhaft vorkämen und brillant leuchteten. Er fragte dann, ob ich die Biolumineszenz dieser Quelle studieren wolle, und ich antwortete, dass ich das gerne täte. Also beschlossen wir, den nächsten Sommer nach Friday Harbor zu fahren.

In meinen ersten Monaten in Princeton extrahierte und reinigte ich Luciferase aus getrockneten *Cypridina*. Ich war überrascht über die großen Mengen, die in Princeton gelagert wurden, unter anderem in Flaschen mit Datum von 1928 und auch in einer verschlossenen Blechdose, auf der sich ein Etikett mit dem Namen von Sakyō Kanda, einem Pionier der Biolumineszenzforschung, befand. Eine größere Charge war während des Krieges für militärische Zwecke gesammelt und nach Kriegsende in Professor Harveys Obhut gegeben worden. Beim Mischen mit Wasser lumineszieren getrocknete *Cypridina* selbst nach Jahrzehnten noch.

Im Dezember 1960, kam Miss Yo Saiga als Forschungsassistentin in unsere Gruppe, und im Monat darauf, kurz nach dem Amtsantritt von John F. Kennedy, kam endlich auch meine Frau – nach viermonatiger Verzögerung aufgrund der Visaprobleme. Am 23. Juni 1961 reisten Dr. Johnson, meine Frau, Miss Saiga und ich nach Friday Harbor. Dr. Johnson hatte einen neuen Plymouth für die Reise angeschafft. Wir beluden ihn mit einem großen Photometer sowie anderen Instrumenten und Chemikalien, die wir für unsere Forschungen brauchten. Wir fuhren sieben Tagen quer durch Amerika und kamen dann bei unserem Gastgeber, Dr. Robert Fernald, an den Friday Harbor Laboratories der University of Washington an.

Friday Harbor befindet sich auf der San Juan Island, die östlich von Victoria und der Vancouver Island liegt. San Juan Island bot eine beeindruckende Kulisse. Das Meer war sauber und schön. Bei Ebbe sah man bunte Seeigel und Seesterne mannigfacher Größe über die Felsen verstreut. Auch Fische gab es in Massen, und mit den einfachsten Ködern ließen sich 30 cm lange Felsenfische aus dem Wasser ziehen. Wie aßen sie oft als Sashimi zubereitet. Friday Harbor war damals wie ein Paradies für uns.

Für unsere Forschungen wies uns Dr. Fernald einen Teil eines großen Laboratoriums zu. Es gab noch drei andere

Wissenschaftler dort, darunter Dr. Dixy Lee Ray, zu der Zeit Professorin an der University of Washington und spätere Vorsitzende der US-amerikanischen Atomenergiebehörde und Gouverneurin von Washington. Sie hatte immer ihren Hund bei sich, obwohl am Friday Harbor Laboratory Hunde per Gesetz verboten waren. Sie erklärte, das Tier sei ihr Assistent.

Unser Forschungsgegenstand, *Aequorea*, kam wirklich in Massen vor. Ein unaufhörlicher Strom von Quallen zog mit dem Gezeitenstrom jeden Morgen und Abend am Dock ganz in der Nähe des Laboratoriums vorbei. In meinem Nobel-Vortrag beschreibe ich, wie wir das lumineszierende Material sammelten und extrahierten. Im September 1961 kehrten wir mit den Rohextrakten nach Princeton zurück und begannen mit der Isolierung. Im Februar 1962 hatten wir rund 5 mg nahezu reiner lumineszierender Substanz gewonnen. Es war ein Protein, und wir nannten es Aequorin. Das besondere am Aequorin war, dass es, sogar in Abwesenheit von Sauerstoff, Licht in der Gegenwart von Calciumionen emittierte. Es war das erste Photoprotein, das jemals entdeckt wurde. Bei der Säulenchromatographie des Aequorins fanden wir Spuren eines Proteins, das vor dem Aequorin eluierte und eine grüne Fluoreszenz zeigte. Wir isolierten auch dieses Protein, das heute als grün fluoreszierendes Protein bekannt (GFP) ist.

Im August 1962 reiste ich auf die Bermudas, um in der dortigen Bermuda Biological Station den berühmten Feuerwurm *Odontosyllis enopla* zu studieren. Die Feuerwürmer sind sehr klein, zeigen aber eine spektakuläre Biolumineszenz, die mit dem Mondzyklus zusammenhängt. Die Lumineszenz tritt immer nur in den Tagen nach Vollmond auf. Das Schauspiel beginnt ungefähr eine Stunde nach Sonnenuntergang mit dem plötzlichen Erscheinen eines Schwärms brillant lumineszierender Weibchen (etwa 2 cm lang), die sich an der Wasseroberfläche blitzschnell um die eigene Achse drehen. Innerhalb weniger Sekunden tauchen die hell leuchtenden Männchen auf (etwa 1 cm lang), die, angezogen vom Licht, aus allen Richtungen auf die Weibchen zuschießen. Nach 10 Minuten ist alles vorbei. Ich sammelte die Feuerwürmer und untersuchte ihr Luciferin.

Mein Visum lief 1963 aus, sodass ich eigentlich auf meine Stelle am Pharmacy Department der Nagasaki University zurückkehren sollte. Über Professor Hirata erhielt ich jedoch einen Ruf auf eine Stelle als Associate Professor an das Water Science Institute der Nagoya University, mit der Abmachung, dass ich dort meine Biolumineszenzforschungen fortführen könnte. Ich nahm den Ruf an und trat meinen Posten im September 1963 bei Professor Tadashiro Koyama an. Einige Monate später bat mich Professor Hirata, einem seiner Doktoranden, Yoshito Kishi (der später Professor an der Harvard University wurde), bei der Strukturbestimmung des *Cypridina*-Luciferins zu helfen. Im Sommer 1964 reisten Kishi und ich mit gut zehn Studenten nach Setoda an der Inlandsee, um Massen von *Cypridina* zu sammeln. Aus den gefrorenen *Cypridina* extrahierten wir das Luciferin, das wir dann reinigten und kristallisierten. Mit diesem Material gelang es Kishi im Jahr darauf, die Struktur des Luciferins zu bestimmen.

Im Februar 1965 reiste ich nach Neuseeland, wo ich zwei Arten von biolumineszierenden Organismen studierte: den

Höhlenwurm *Arachnocampa* und die Süßwasserschnecke *Latia*. Kurze Zeit später beschloss ich jedoch, wieder an Dr. Johnsons Laboratorium an die Princeton University zurückzukehren, vor allem weil mir auch bewusst wurde, dass ich nicht ausreichend befähigt war, in zwei separaten Gebieten – Geowissenschaften und Biolumineszenz – auf höchstem Niveau zu forschen. Mein Wunsch war es, den chemischen Mechanismus der Aequorin-Biolumineszenz zu studieren und aufzuklären, zumal einige Kollegen an der Existenz eines Photoproteins wie Aequorin zweifelten. Im Dezember 1965 kehrte ich mit meiner Frau und unserem einjährigen Sohn Tsutomu nach Princeton zurück.

Seit den frühen 50er Jahren hatte man angenommen, dass Calciumionen wichtige Funktionen in lebenden Organismen übernehmen. Einen Weg, dies experimentell zu beweisen, gab es aber nicht. Erst 1967 gelang es Ellis Ridgway und Christopher Ashley an der University of Oregon mithilfe von Aequorin als Indikator, experimentelle Beweise für die Beteiligung von Calciumionen an der Muskelkontraktion vorzulegen. Die Verwendung von Aequorin als Calciumindikator erwies sich als zunehmend nützlich in der Biologie und Physiologie, und ich wollte nun umso mehr den Mechanismus der Aequorin-Lumineszenz aufklären.

Ich wusste bereits, dass die Lumineszenz von einer intramolekularen Reaktion verursacht wurde, die im Innern des Proteinmoleküls stattfand und deshalb schwierig zu untersuchen sein würde. Dennoch wollte ich mein Möglichstes versuchen. Das Unterfangen stellte sich als unerwartet umfangreich heraus, und es dauerte gut 12 Jahre, um ein Strukturmodell des Aequorins zu erhalten. Wir benötigten große Mengen von Aequorin, sodass wir zehn Jahre hinweg jeden Sommer nach Friday Harbor reisten und dort jeden Tag 3000 Quallen sammelten und verarbeiteten. Meine Mitarbeiter, meine Frau, meine Kinder und einige ortsansässige Studenten, die wir eigens anheuerten, waren dabei von größter Hilfe. Dr. Johnson entwickelte eine „Quallenschneidemaschine“, um das Abtrennen des Schirmrandes, der die Leuchttorgane enthielt, zu beschleunigen. Im Jahr 1972 gelang uns dann in Princeton die Strukturbestimmung von AF-350, einem Fragment des Aequorin-Chromophors, und 1978 hatten wir die Lumineszenzreaktion weitgehend verstanden.

Außer *Cypridina* erforschte ich zwischen 1965 und 1978 noch zahlreiche andere Leuchtorganismen: die Napfschnecke *Latia*, den Krill *Meganyctiphantes*, den Wurm *Chaetopterus*, den Leuchtkalmar *Watasenia* sowie etliche Hohltiere und Leuchtbakterien. Ich untersuchte auch die Eigenschaften des GFP und konnte eine Kontroverse bezüglich der Rolle einer Dioxetan-Zwischenstufe in der Lumineszenzreaktion des Glühwürmchen-Luciferins auflösen. Die Einzelheiten sind in meinem Buch beschrieben.^[2]

Das Marine Biological Laboratory in Woods Hole

Dr. Johnson setzte sich 1977 zur Ruhe, und ich fasste den Entschluss, mich um eine Stelle an einem meeresskundlichen Laboratorium zu bemühen. Noch in Princeton klärte ich die Struktur des GFP-Chromophors auf^[3] und forschte außerdem noch am Geißeltierchen-Luciferin und an Leuchtringelwür-

mern. Im Jahr 1981 erhielt ich auf Vermittlung von Dr. Woodland Hastings (Harvard University) und Dr. Benjamin Kaminer (Boston University) eine Stelle als Senior Scientist am Marine Biological Laboratory (MBL) in Woods Hole, Massachusetts. Meine Frau Akemi arbeitete am MBL als meine Forschungsassistentin. Ich nahm zusätzlich einen Ruf auf einen Lehrstuhl an der Boston University Medical School an.

Das MBL wurde 1888 gegründet und ist eines der ältesten meeresskundlichen Laboratorien der westlichen Hemisphäre. Über die Jahre forschten viele japanische Wissenschaftler am MBL, darunter geschichtsträchtige Namen wie Shosaburo Watase, Umeko Tsuda, Hideyo Noguchi, Sakyō Kanda, Katsuma Dan, Sachio Hiramoto und Shinya Inoué. Am MBL setzte ich meine Biolumineszenzstudien an Organismen wie dem Tausendfüßler *Luminodesmus*, dem Schlangenstern *Ophiopsila* und mehreren Arten von Leuchtmuscheln fort.

Ab etwa 1975 fand das Aequorin unter Zellbiologen weite Verbreitung als Calciumindikator, und seine Anwendung auf diesem Gebiet erreichte um 1985 ihren Höhepunkt. Ich erhielt in dieser Zeit unzählige Anfragen aus aller Welt und versendete hunderte von Aequorin-Proben. Im Jahr 1985 wurde die cDNA des Aequorins kloniert, und man erzeugte rekombinantes Aequorin. Allerdings waren sich die Patentinhaber des rekombinanten Aequorins, die University of Georgia und die japanische Chisso Corporation, über die weitere Vermarktung des Aequorins uneins, sodass sich seine allgemeine Anwendung verzögerte. 1988 stellten wir in Zusammenarbeit mit Professor Yoshito Kishi in Harvard verschiedene Aequorine mit spezifischen Empfindlichkeiten und Eigenschaften her. Diese enthielten innerhalb ihrer Proteinstruktur spezielle Derivate des Coelenterazins und wurden als semisynthetische Aequorine bezeichnet. 1995 begann ich röntgenkristallographische Studien am Aequorin, und die dreidimensionale Struktur wurde im Jahr 2000 erhalten.^[4]

Im Jahr 1992 wurde die cDNA des GFP von Dr. Douglas Prasher kloniert, der damals am Woods Hole Oceanographic Institute arbeitete. Zur damaligen Zeit glaubte man, dass die Expression der cDNA in lebenden Organismen kein fluoreszierendes GFP erzeugen würde, weil die Bildung des GFP-Chromophors eine Kondensation und eine Dehydrierung erforderte, von denen man nicht erwartete, dass sie spontan ablaufen würden. 1994 versuchten Dr. Martin Chalfie und Mitarbeiter an der Columbia University, die cDNA in *E. coli* sowie einem Fadenwurm zu exprimieren, und beobachteten überraschenderweise die Fluoreszenz des exprimierten GFP. Die Ergebnisse legten nahe, dass man GFP in lebenden Organismen exprimieren konnte, um deren Verhalten zu studieren. Dr. Chalfies Arbeiten zogen ein breites Interesse auf sich und lösten viele weitere Forschungen aus, die rasch zu zahlreichen Anwendungen führten. Dr. Roger Tsien und Mitarbeiter an der University of California in San Diego erzeugten viele GFP-Mutanten, die in unterschiedlichen Farben von Blau bis Rot fluoreszierten, indem sie die Aminosäuren in der Umgebung des Chromophors variierten. Heute ist GFP als Fluoreszenzmarker für Proteinmoleküle und Zellen weit verbreitet und ist ein unverzichtbares Werkzeug in der biologischen, physiologischen und medizinischen Forschung. Es ist auch in anderen Feldern eingesetzt worden, z. B. zum Nachweis von Cadmium, Zink und TNT.^[5]

Im Ruhestand

Am Marine Biological Laboratory trat ich 2001 in Ruhestand. Um noch einige Experimente auszuführen – und weil ich auf Anfrage noch immer Aequorin-Proben versende –, nahm ich die gesamte Laborausrüstung und alle Chemikalien mit nach Hause, wo ich mein Photoprotein Laboratory gründete. Zur Feier meiner Emeritierung organisierte Dr. Shinya Inoué ein Seminar, das am 27. Juli 2002 im Lillie-Hörsaal des MBL unter dem Titel „GFP and Aequorin“ abgehalten wurde. Unter den Teilnehmern waren Martin Chalfie und Roger Tsien. Ich begann ein Buch zu schreiben, das der nächsten Generation von Studenten als Grundpfeiler für die Erforschung der Biolumineszenz dienen sollte. Das Buch, *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, wurde 2006 bei World Scientific Press veröffentlicht und gibt einen umfassenden Überblick über alle bekannten biolumineszierenden Systeme, einschließlich 35 unterschiedlicher Arten von biolumineszierenden Organismen.

Der Sommer 2004 war herrlich. Im Juli erhielt ich den Pearse Prize der Royal Microscopical Society für die Entdeckung des GFP. Anfang August hielt ich einen Vortrag beim International Bioluminescence and Chemiluminescence Symposium. Ende August nahm ich am Symposium „Calcium-Regulated Photoproteins and Green Fluorescent Protein“ teil, das zu meinen Ehren an den Friday Harbor Laboratories im Rahmen des 100-jährigen Jubiläums des Instituts abgehalten wurde. Fast die gesamte Fachwelt im Gebiet der Biolumineszenz war auf diesem Symposium vertreten, und ich war glücklich, viele meiner alten Freunde zu treffen. Allerdings stimmte es mich traurig zu sehen, wie das Meer bei Friday Harbor immer mehr verschmutzt. 2006 erhielt ich den Asahi-Preis, einer der prestigeträchtigsten Preise in Japan.

Ich möchte noch eine Bemerkung zur *Aequorea*-Qualle in Friday Harbor anfügen. Zwischen 1961 und 1988 reisten wir 19-mal von der Ostküste nach Friday Harbor und sammelten insgesamt rund 850 000 Exemplare von *Aequorea* für meine Forschungen. Die Qualle trat in diesem Zeitraum immer massenhaft auf. Nach 1990 ging ihr Auftreten unerklärlicherweise zurück, und es wurde immer schwerer, überhaupt noch einige Exemplare zu sammeln. Die Ursache für den drastischen Rückgang könnte die Verschmutzung des Meeresbodens durch Öl des 1989 vor der kanadischen Pazifikküste havarierten Tankers Exxon Valdez sein. Aber auch eine natürliche Ursache ist möglich. Hätte sich das Verschwinden der Quallen 20 Jahre früher ereignet, würden wir heute den Mechanismus der Biolumineszenzreaktion ebenso wenig kennen wie den Chromophor des GFP.

2. Nobel-Vortrag**Prolog**

Ich entdeckte das grün fluoreszierende Protein (GFP) im Jahr 1961 als ein Nebenprodukt des Ca-sensitiven Photoproteins Aequorin^[6] in der Qualle *Aequorea aequorea* und identifizierte sein Chromophor im Jahr 1979.^[7] Das GFP war

ein schönes Protein, blieb aber nach seiner Entdeckung 30 Jahre lang ohne jeden Nutzen.

Meine Erzählung beginnt 1945, dem Jahr, als Nagasaki durch die Atombombe zerstört wurde und der Zweite Weltkrieg zu Ende ging. Ich war damals 16 Jahre alt und arbeitete in einer Fabrik 15 km nordöstlich von Nagasaki. Ich sah die B-29 mit Kurs Nagasaki, die die Atombombe in ihrem Rumpf trug, und war bald darauf einem blendend hellen Blitz und einer Druckwelle ausgesetzt, verursacht von einer gigantischen Explosion. Den Krieg überlebte ich mit Glück, fand aber in den Nachkriegswirren keine Schule, auf die ich hätte gehen können. Nach zwei Jahren der Tatenlosigkeit erfuhr ich, dass das pharmazeutische Institut des Nagasaki Medical College, das von der Atombombe völlig zerstört worden war, einen Behelfscampus in der Nähe unserer Wohnung errichtete. Ich schrieb mich am pharmazeutischen Institut ein und wurde angenommen. Obwohl ich keinerlei Interesse an Pharmazie hatte, war es der einzige Weg, irgendetwas zu lernen.

Nach meinem Abschluss arbeitete ich als Vorlesungsassistent am nämlichen Institut, das nun der Nagasaki University eingegliedert war. Mein Professor, Shungo Yasunaga, war ein höflicher und sehr netter Mensch. 1955, nachdem ich vier Jahre bei ihm gearbeitet hatte, arrangierte er meinen Wechsel an die Nagoya University, wo ich im Arbeitskreis von Professor Yoshimasa Hirata mein Studium begann.

Das *Cypridina-Luciferin*

Das Forschungsthema, das mir Professor Hirata gab, war die Biolumineszenz des Krebses *Cypridina hilgendorfii*. *Cypridina* emittiert blaues Licht, wenn sein Luciferin in Gegenwart von molekularem Sauerstoff und einem Enzym, der Luciferase, oxidiert wird (Abbildung 5). Das Luciferin war seit Jahren von Newton Harvey an der Princeton University untersucht worden,^[8] ließ sich wegen seiner extremen Instabilität aber nie isolieren. Prof. Hirata wollte, dass ich die Struktur des Luciferins aus *Cypridina* bestimmte, und er trug mir auf, es zu kristallisieren, denn die Kristallisation war damals der einzige Weg, um die Reinheit einer Substanz zu bestätigen.

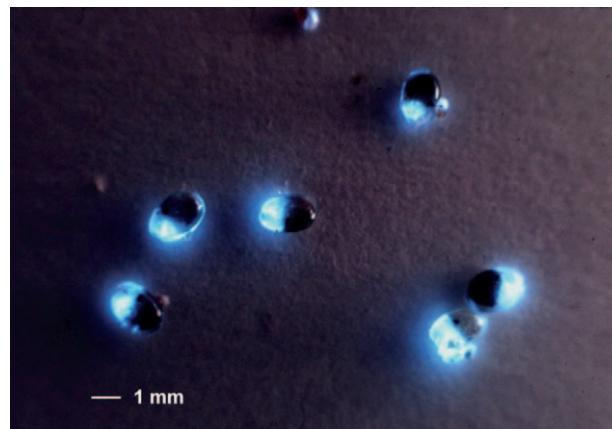


Abbildung 5. Frisch gefangene *Cypridina hilgendorfii*, auf einer dunklen Oberfläche platziert.

Mit 500 g getrockneten *Cypridina* (ungefähr 2.5 kg vor dem Trocknen) begann ich die Extraktion und Isolierung des Luciferins, wobei ich eine spezielle Soxhlet-Apparatur mit einer Wasserstoffatmosphäre einsetzte (Abbildung 6). Nach

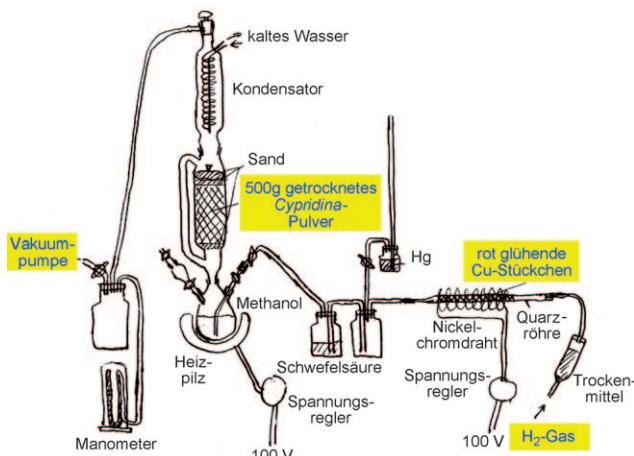


Abbildung 6. Zur Extraktion des *Cypridina*-Luciferins verwendete Apparatur.

fünf Tagen pausenloser Arbeit erhielt ich aus den 500 g getrockneten *Cypridina* nach Aufreinigung etwa 2 mg Luciferin. Ich versuchte, das aufgereinigte Luciferin zu kristallisieren, jedoch endeten all meine Anstrengungen mit amorphen Niederschlägen, und übrig gebliebenes Luciferin war am nächsten Morgen durch Oxidation nutzlos geworden. Also musste ich die Extraktion und Aufreinigung immer wieder aufs Neue beginnen. Ich arbeitete sehr hart und versuchte jede erdenkliche Kristallisationsmethode, aber ohne Erfolg. Dann endlich, nach zehn Monaten, fand ich schließlich, dass das Luciferin aus einem höchst ungewöhnlichen Lösungsmittel kristallisiert werden konnte.^[9] Das Lösungsmittel war hoch konzentrierte Salzsäure. Mit der kristallisierten Probe waren wir nun in der Lage, die chemische Struktur des Luciferins und seiner Oxidationsprodukte zu bestimmen (Abbildung 7).^[10]

Meinen erfolgreichen *Cypridina*-Arbeiten hatte ich zu verdanken, dass ich 1959 eine Einladung von Professor Frank

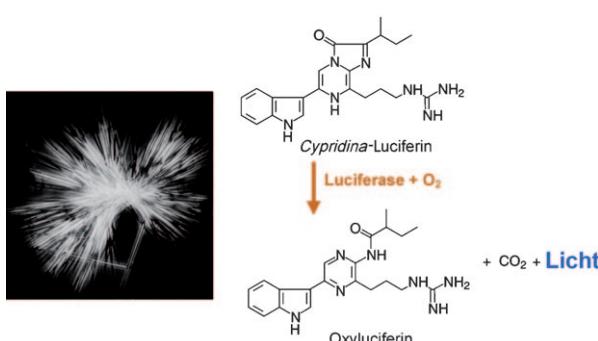


Abbildung 7. Kristalle des *Cypridina*-Luciferins (links) sowie seine chemische Struktur und die des Produkts der Lumineszenzreaktion, Oxyluciferin (rechts).

Johnson nach Princeton erhielt. Kurz nach meiner Ankunft in Princeton, im September 1960, fragte mich Dr. Johnson, ob ich daran interessiert wäre, die Biolumineszenz der Qualle *Aequorea* zu studieren. Ich war stark beeindruckt von seiner Schilderung der brillanten Lumineszenz und des massenhaften Auftretens der Qualle und willigte ein.

Die Qualle *Aequorea* und das Photoprotein Aequorin

Im Frühsommer 1961 fuhren wir von Princeton ins 5000 Kilometer entfernte Friday Harbor. Friday Harbor war damals eine ruhige und friedliche Kleinstadt (Abbildung 8).



Abbildung 8. Friday Harbor, 1961. Das Laboratorium der University of Washington befindet sich auf der anderen Seite der Bucht in der linken Bildmitte. Bis 1980 wurde rund ein Drittel der vorderen Bucht zu einem Yachthafen ausgebaut.

Die Quallen traten massenhaft auf (Abbildung 9), und wir schöpften sie mit einem flachen Netz einzeln aus dem Meer. Die Leuchtdioden von *Aequorea aequorea* (Abbildung 10) sind entlang des Schirmrandes (von uns als Ring bezeichnet) aufgereiht, den wir mit einer Schere abtrennten.

Die damals gängige Vorstellung war, dass das Licht aller biolumineszierender Organismen durch die Reaktion von Luciferin mit Luciferase erzeugt würde. Wir versuchten also,

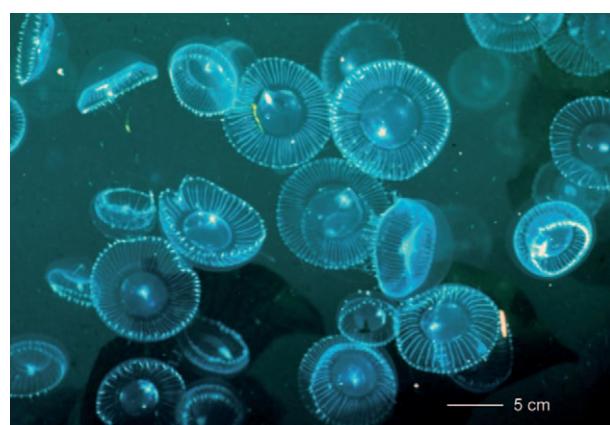


Abbildung 9. Die Qualle *Aequorea aequorea* in natürlicher Umgebung.

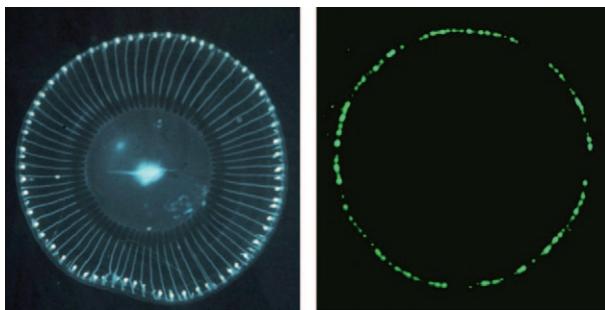


Abbildung 10. Exemplare von *Aequorea aequorea* bei Tageslicht im Meer (links) und bei Anregung in einer Dunkelkammer (rechts).

das Luciferin und die Luciferase aus den Ringen der Qualle zu extrahieren. Wir probierten jede nur erdenkliche Methode aus, aber alles schlug fehl, und schon nach wenigen Tagen gingen uns die Ideen aus.

Ich war überzeugt, dass unsere Versuche deswegen fehlgeschlagen, weil wir zu sehr auf die Luciferin/Luciferase-Hypothese fixiert waren. Ich schlug Dr. Johnson vor, die Extraktion speziell des Luciferins und der Luciferase zu vergessen und unsere Suche auf jede Art von lumineszierender Substanz auszudehnen, worum es sich auch immer handeln möge. Jedoch gelang es mir nicht, ihn zu überzeugen. Ich fing also an, mein eigenes Projekt zu verfolgen, während Dr. Johnson mit seinen Assistenten die Versuche zur Extraktion des Luciferins fortsetzte. Es war eine unangenehme Situation.

Da die Ausstrahlung von Licht bedeutet, dass aktive biolumineszierende Substanz verbraucht wird, muss die Extraktion biolumineszierender Substanzen unter Bedingungen durchgeführt werden, die die Biolumineszenzreaktion reversibel hemmen. Ich probierte diverse Enzym- und Proteininhibitoren aus, aber ohne Erfolg. Tagelang zerbrach ich mir den Kopf, ob ich etwas übersehen haben könnte oder ob mir ein Denkfehler unterlaufen sei. Um ganz ungestört zu sein, fuhr ich in einem Ruderboot oft in die Mitte der Bucht. Eines Nachmittags kam mir plötzlich eine Idee. Es war eine einfache Idee: „Die Lumineszenzreaktion braucht wahrscheinlich ein Protein. Wenn dem so ist, könnte die Lumineszenz bei einem bestimmten pH-Wert reversibel gehemmt werden.“

Ich ging gleich ins Labor und untersuchte die Lumineszenz von Lichtorganen bei verschiedenen pH-Werten. Bei pH 7, 6 und 5 war eine eindeutige Lumineszenz zu sehen, nicht aber bei pH 4. Ich zerrieb die Lichtorgane in einem Puffer von pH 4 und filtrierte dann die Mischung. Das zellfreie Filtrat war fast völlig dunkel, gewann aber seine Lumineszenz zurück, wenn es mit Natriumhydrogencarbonat neutralisiert wurde. Das Experiment zeigte, dass ich im Prinzip die lumineszierende Substanz extrahieren konnte (Abbildung 11).

Im nächsten Moment kam es zu einer großen Überraschung: Als ich den Extrakt in den Ausguss warf, leuchtete ein heller blauer Lichtschein auf. Der Überlauf eines Aquariums lief in den Ausguss, und damit war klar, dass Meerwasser die Lumineszenz verursachte. Da die Zusammensetzung von Meerwasser bekannt ist, fand ich leicht heraus, dass Ca^{2+} die Lumineszenz aktiviert. Die Entdeckung, dass Ca^{2+} das ak-

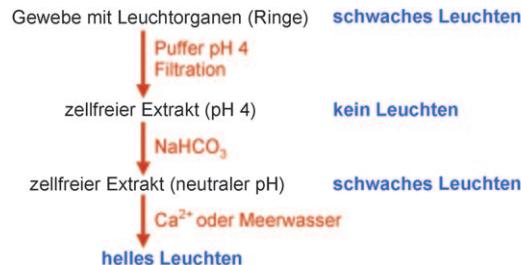


Abbildung 11. Prozedur, mit der nachgewiesen wurde, dass Ca^{2+} das aktivierende Agens der Lumineszenzreaktion ist.

tivierende Agens war, bedeutete, dass das lumineszierende Material mithilfe des Ca-bindenden Chelatliganden EDTA (Ethylenediamintetraacetat) extrahiert werden konnte, und wir entwickelten eine Extraktionsmethode für die lumineszierende Substanz (Abbildung 12).

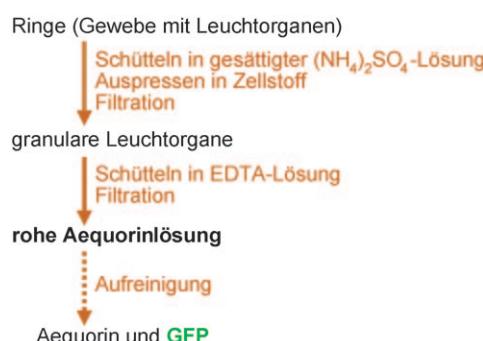


Abbildung 12. Prozedur für die Extraktion von Aequorin und GFP.

Den Rest des Sommers 1961 extrahierten wir die lumineszierende Substanz aus gut 10000 Quallen. Zurück in Princeton reinigten wir die Substanz und erhielten wenige Milligramm des reinen Proteins. In Gegenwart von Ca^{2+} -Spuren emittierte das Protein blaues Licht. Wir nannten das Protein Aequorin.^[6] Aequorin war das erste Beispiel für die Entdeckung eines Photoproteins.^[11] Bei der Aufreinigung des Aequorins fanden wir noch ein weiteres Protein, das eine helle grüne Fluoreszenz zeigte und das wir trotz seiner nur geringen Menge ebenfalls isolierten. Wir nannten es das „grüne Protein“. Es wurde später durch Morin und Hastings in „grün fluoreszierendes Protein“ umbenannt.^[12]

Wir wollten den Mechanismus der Biolumineszenzreaktion verstehen, zumal sich zeigte, dass das Aequorin als Calciumindikator für biologische Studien sehr nützlich war.^[13] Als erstes versuchten wir, den lichtemittierenden Chromophor des Aequorins zu isolieren. Dies erwies sich jedoch als unmöglich,^[14,15] da jeder Versuch mit einer intramolekularen Reaktion des Aequorins endete, die die Emission von Licht auslöste und den ursprünglichen Chromophor zerstörte. Das Geheimnis der Lichtemission in *Aequorea* war gut gehütet.

Schlussendlich fanden wir aber, dass eine fluoreszierende Verbindung gebildet wurde, wenn man Aequorin in Gegenwart von 2-Mercaptoethanol mit Harnstoff denaturierte.^[14] Wir nannten diese fluoreszierende Verbindung AF-350

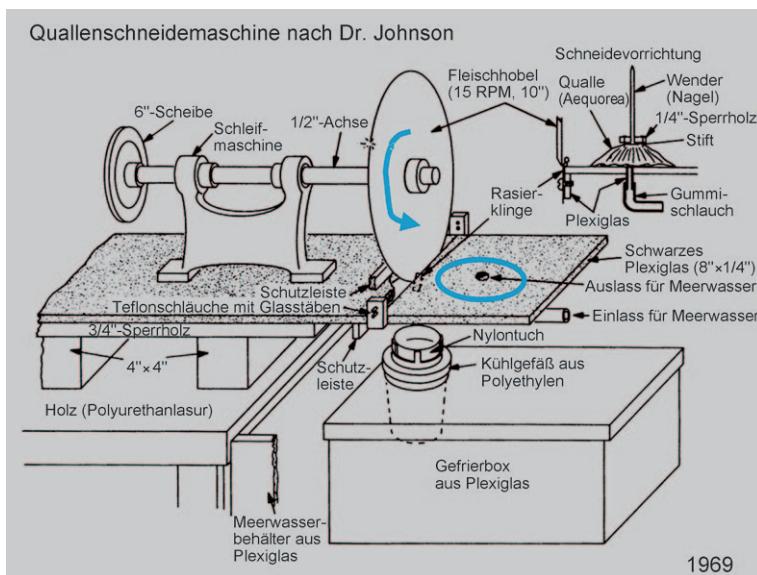


Abbildung 13. Von Frank H. Johnson konstruierte Maschine zum Abschneiden der Quallenringe. Ein Exemplar wird auf eine schwarze Plexiglasscheibe gespannt, die in Rotation versetzt wird, sodass sich der Quallenschirm ausbreitet. Die Scheibe wird unter eine rotierende Klinge (ein Fleischhobel von 10 Inch Durchmesser) geschoben, die einen 2-3 mm breiten Streifen mit den Leuchtorganen abschneidet. Der Streifen fällt in einen unter der Vorrichtung angebrachten Auffangbehälter.

(wegen seines Absorptionsmaximums bei 350 nm) und fass-ten den Plan, eine Strukturbestimmung zu versuchen. Um jedoch die 1 mg an AF-350 zu gewinnen, die für eine einzige Strukturanalyse benötigt wurden, brauchte man 150 mg an aufgereinigtem Aequorin, was bedeutete, dass wir mindestens 50000 Quallen sammeln und extrahieren mussten. Da wir in Wirklichkeit wohl mehrere Milligramm AF-350 benötigen würden, stellte die Strukturbestimmung ein gewaltiges Unterfangen dar.

Es stellte sich rasch heraus, dass das Abschneiden des Rings mit einer Schere zu langsam war. Um den Prozess zu beschleunigen, konstruierte Dr. Johnson eine Quallenschneidemaschine (Abbildung 13), mit deren Hilfe eine einzelne Person mehr als 600 Ringe pro Stunde abschneiden konnte – zehnmal mehr als per Hand.

Wir begannen mit dem Sammeln der Quallen um 6 Uhr morgens, während ein anderer Teil des Teams dann ab 8 Uhr mit der Arbeit an der Abschneidemaschine anfing. Nachmittags extrahierten wir das Aequorin aus den Ringen. Abends zwischen 7 und 9 Uhr fingen wir dann noch mehr Quallen für den nächsten Tag (Abbildung 14). Unser Labor sah wie eine Quallenfabrik aus (Abbildung 15) und war mit dem Geruch von Quallen angefüllt.

Nach fünf Jahren harter Arbeit konnten wir 1972 die chemische Struktur von AF-350 bestimmen.^[16] Das Ergebnis war überraschend. Die Struktur von AF-350 wies als Grundkörper ein 2-



Abbildung 15. Assistenten bei der Arbeit an der Quallenschneidemaschine (links) und beim Extrahieren des Aequorins (rechts).



Abbildung 14. Linkes Foto: Quallensammler im Sommer 1974. Von links nach rechts: meine Frau Akemi, Dr. Chang, ich selbst, Mrs. Chang, Mrs. Johnson, Dr. Johnson, Debby (eine Helferin), meine Kinder Tsutomu und Sachi. Wir sammelten jeden Tag 30 bis 40 Eimer voll Quallen. Rechtes Foto: meine Familie beim Quallensammeln.



Grün fluoreszierendes Protein

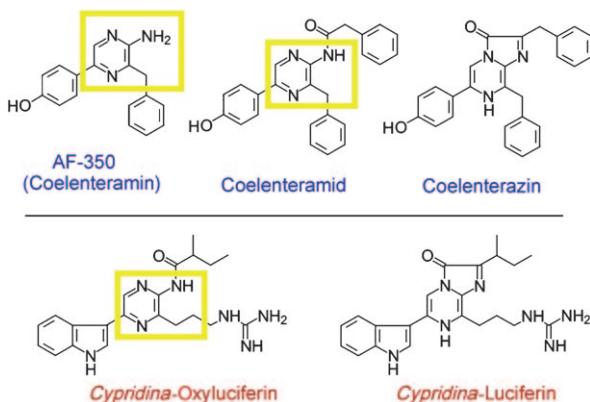


Abbildung 16. Chemische Strukturen von AF-350 (Coelenteramin), Coelenteramid (einem Produkt der Lumineszenzreaktion des Aequorins) und Coelenterazin im Vergleich mit den Strukturen des Oxyluciferins und Luciferins aus *Cypridina*.

Aminopyrazin auf (Abbildung 16), das man zuvor, wenn auch mit anderen Seitenketten, in den Oxidationsprodukten des *Cypridina*-Luciferins gefunden hatte. Dieser Befund legte eine enge Verwandtschaft zwischen den Lumineszenzsystemen von *Aequorea* und *Cypridina* nahe. Mit dieser Information waren wir in der Lage, den Chromophor des Aequorins als Coelenterazin zu identifizieren (Abbildung 16). Damit ließ sich auch die Lumineszenzreaktion des Aequorins aufklären, die wie in Abbildung 17 dargestellt verläuft.

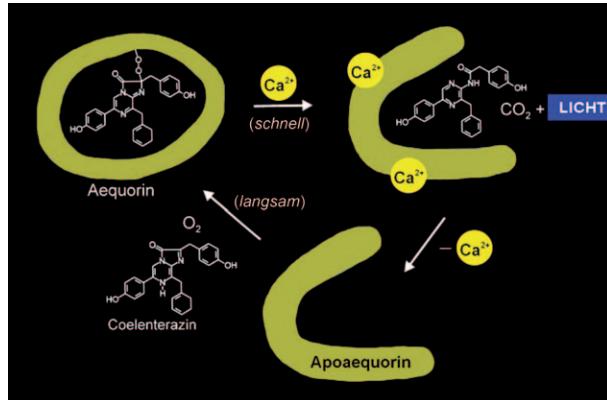


Abbildung 17. Lumineszenz und Regeneration des Aequorins. Das Photoprotein Aequorin bindet zwei Ca^{2+} -Ionen^[17,18] und zerfällt unter Lichtausstrahlung (Emissionsmaximum bei 465 nm) zu Coelenterazin, CO_2 und Apoaequorin. Apoaequorin kann durch Inkubation mit Coelenterazin in Gegenwart von Sauerstoff wieder zu Aequorin umgewandelt werden.

Das grün fluoreszierende Protein

Die Leuchtdome lebender *Aequorea* enthalten neben dem Aequorin auch GFP. Die Energie des vom Aequorinmolekül erzeugten blauen Lichts wird auf das GFP-Molekül übertragen, woraufhin das GFP dann grünes Licht emittiert.^[19]

Obwohl GFP gut erkennbar ist und leicht kristallisiert werden kann (Abbildung 18, links), war die Ausbeute an

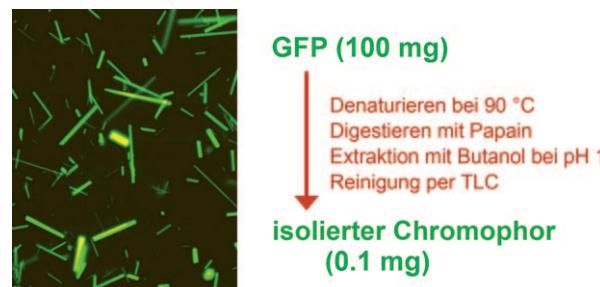


Abbildung 18. Links: GFP-Kristalle (Foto: Dr. Shinya Inoué); rechts: Prozedur zur Isolierung des GFP-Chromophors.

Qualien-GFP extrem niedrig und sehr viel geringer als die des Aequorins. Um Studien am GFP ausführen zu können, mussten wir es über Jahre hinweg anreichern, währenddessen wir die Lumineszenz des Aequorins untersuchten. 1979 hatten wir genügend Material zusammen, um das Protein studieren zu können. Wir nahmen eine Reihe von Experimenten vor, um die Natur des GFP-Chromophors zu ermitteln, wobei wir pro Experiment etwa 100 mg des Proteins einsetzen (Abbildung 18, rechts).

Als erstes spalteten wir das GFP-Molekül durch enzymatische Verdau in kleine Peptidstücke. Wir isolierten und reinigten das den Chromophor enthaltende Peptid und analysierten die Struktur des Chromophors. Als ich das Absorptionsspektrum des Peptids aufnahm, war ich überrascht. Das Spektrum war nahezu identisch mit dem einer Verbindung, die ich 20 Jahre zuvor bei meinen Studien des *Cypridina*-Luciferins synthetisiert hatte. Basierend auf dieser Übereinstimmung und einigen anderen Eigenschaften konnte ich die Struktur des GFP-Chromophors rasch identifizieren.^[7]

Was ich fand, ist in Abbildung 19 dargestellt. Fluoreszierende Proteine liegen gewöhnlich als Komplex aus einem Protein und einer fluoreszierenden Verbindung vor (in Abbildung 19 oben links). Das GFP war jedoch ein besonderer Fall, da der fluoreszierende Chromophor im Proteinmolekül eingebaut war (Abbildung 19 oben rechts). Der untere Teil der Abbildung zeigt weitere Einzelheiten: Das GFP besteht aus einer einzelnen Peptidkette von mehr als 200 Aminosäureresten. Drei Aminosäurereste der Peptidkette bilden

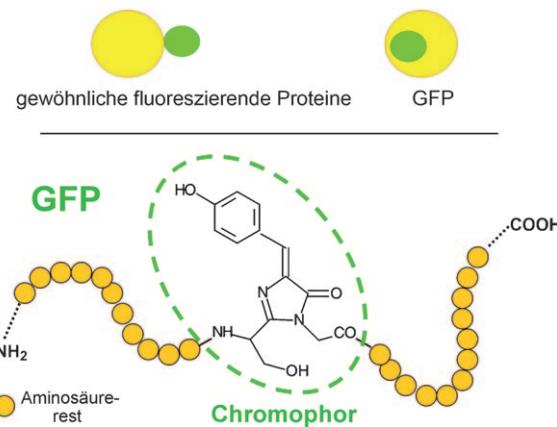


Abbildung 19. Die Struktur des Chromophors im GFP-Molekül.

durch Dehydratisierungs- und Dehydrierungsreaktionen den Chromophor. Dieser Befund war extrem wichtig, weil er zeigte, dass der Chromophor ein Bestandteil der Peptidkette ist, wodurch sich die Möglichkeit zur Klonierung des GFP eröffnete. Die Struktur des Chromophors wurde später durch Cody et al. (1993) bestätigt.^[20]

Nachdem ich den GFP-Chromophor gefunden hatte, war ich der Ansicht, dass auf diesem Gebiet alles getan sei. Ich entschloss mich also, meine Arbeiten am GFP abzubrechen, um mich wieder meinen Biolumineszenzstudien zuzuwenden. Dann geschah etwas Merkwürdiges. Nach 1990 begann die Population an *Aequorea* drastisch zu sinken, sodass es praktisch unmöglich wurde, neue Proben von natürlichem Aequorin oder GFP zu präparieren. Glücklicherweise jedoch wurden das Aequorin und GFP durch Inouye et al.^[21,22] und Prasher et al.^[23,24] kloniert, sodass man nicht länger auf das natürliche Protein angewiesen war. 1994 gelang es Chalfie et al., GFP in lebenden Organismen zu exprimieren,^[25] und Roger Tsien trug entscheidend zu seiner Weiterentwicklung bei.

Heute sind GFP und seine Homologen für die biomedizinische Forschung unverzichtbar, vor allem wegen der Tatsache, dass diese Proteine den fluoreszierenden Chromophor als Bestandteil ihrer Peptidkette enthalten und sie in lebenden Organismen exprimiert werden können. Nicht zu vergessen ist aber, dass die Identifizierung des Chromophors auf dem GFP beruhte, das wir über Jahre hinweg während unserer Studien des Aequorins angesammelt hatten. Ohne die Studien des Aequorins wäre das GFP unbekannt geblieben, und das Gebiet der fluoreszierenden Proteine wäre nie in der Weise aufgeblüht, wie wir es erleben konnten.

Eingegangen am 24. April 2009
Online veröffentlicht am 3. Juli 2009
Übersetzt von Dr. Frank Maaß, Weinheim

- [1] „Chromatography of inorganic ions. I. Capillary microanalysis with alumina for cations“: S. Yasunaga, O. Shimomura, *Yakugaku Zasshi* **1953**, 73, 1346–1350 (in Japanisch).
- [2] O. Shimomura, *Bioluminescence: Chemical Principles and Methods*, World Scientific Publishing, Hackensack, **2006**, S. 498.
- [3] „Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein“: O. Shimomura, *FEBS Lett.* **1979**, *104*, 220–222.
- [4] „The crystal structure of the photoprotein aequorin at 2.3 Å resolution“: J. F. Head, S. Inouye, K. Teranishi, O. Shimomura, *Nature* **2000**, *405*, 372–376.
- [5] M. Zimmer, *Glowing Genes*, Prometheus, Amherst, **2005**, S. 221.
- [6] „Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequo-*
- rea*“: O. Shimomura, F. H. Johnson, Y. Saiga, *J. Cell. Comp. Physiol.* **1962**, *59*, 223–239.
- [7] „Structure of the chromophore of *Aequorea* green fluorescent protein“: O. Shimomura, *FEBS Lett.* **1979**, *104*, 220–222.
- [8] E. N. Harvey, *Bioluminescence*, Academic Press, New York, **1952**.
- [9] „Crystalline Cypridina luciferin“: O. Shimomura, T. Goto, Y. Hirata, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1957**, *30*, 929–933.
- [10] „Cypridina bioluminescence I: structure of *Cypridina luciferin*“: Y. Kishi, T. Goto, Y. Hirata, O. Shimomura, F. H. Johnson, *Tetrahedron Lett.* **1966**, *7*, 3427–3436.
- [11] „Bioluminescence in the sea: photoprotein systems“: O. Shimomura, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **1985**, *39*, 351–372.
- [12] „Energy transfer in a bioluminescent system“: J. G. Morin, J. W. Hastings, *J. Cell. Physiol.* **1971**, *77*, 313–318.
- [13] „Calcium transients in single muscle fibers“: E. B. Ridgway, C. C. Ashley, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1967**, *29*, 229–234.
- [14] „Properties of the bioluminescent protein aequorin“: O. Shimomura, F. H. Johnson, *Biochemistry* **1969**, *8*, 3991–3997.
- [15] „Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin“: O. Shimomura, F. H. Johnson, H. Morise, *Biochemistry* **1974**, *13*, 3278–3286.
- [16] „Structure of the light-emitting moiety of aequorin“: O. Shimomura, F. H. Johnson, *Biochemistry* **1972**, *11*, 1602–1608.
- [17] „Luminescence of aequorin is triggered by the binding of two calcium ions“: O. Shimomura, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1995**, *211*, 359–363.
- [18] „Titration of recombinant aequorin with calcium chloride“: O. Shimomura, S. Inouye, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1996**, *221*, 77–81.
- [19] „Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of *Aequorea*“: H. Morise, O. Shimomura, F. H. Johnson, J. Winant, *Biochemistry* **1974**, *13*, 2656–2662.
- [20] „Chemical structure of the hexapeptide chromophore of the *Aequorea* green-fluorescent protein“: C. W. Cody, D. C. Prasher, W. M. Westler, F. G. Prendergast, W. W. Ward, *Biochemistry* **1993**, *32*, 1212–1218.
- [21] „Cloning and sequence analysis of cDNA for the luminescent protein aequorin“: S. Inouye, M. Noguchi, Y. Sakaki, Y. Takagi, T. Miyata, S. Iwanaga, T. Miyata, F. I. Tsuji, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1985**, *82*, 3154–3158.
- [22] „Expression of apoaequorin complementary DNA in *Escherichia coli*“: S. Inouye, Y. Sakaki, T. Goto, F. I. Tsuji, *Biochemistry* **1986**, *25*, 8425–8429.
- [23] „Cloning and expression of the cDNA coding for aequorin, a bioluminescent calcium-binding protein“: D. Prasher, R. O. McCann, M. J. Cormier, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1985**, *126*, 1259–1268.
- [24] „Primary structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein“: D. C. Prasher, V. K. Eckenrode, W. W. Ward, F. G. Prendergast, M. J. Cormier, *Gene* **1992**, *111*, 229–233.
- [25] „Green fluorescent protein as a marker for gene expression“: M. Chalfie, Y. Tu, G. Euskirchen, W. W. Ward, D. C. Prasher, *Science* **1994**, *263*, 802–805.