

提出日：平成 30 年 5 月 18 日

平成 29 年度 大阪大学蛋白質研究所 拠点事業

(2) 研究成果の概要

課題名	GFP オリゴマーの溶液内ならびに細胞内における蛍光寿命測定		
研究代表者	氏名	金城政孝	
	所属機関名・部局名	北海道大学 大学院先端生命科学研究院	
	職名	教授	
事業名 (該当の事業名の右欄に○)	<input type="radio"/>	共同研究員	
	<input type="radio"/>	超高磁場NMR 共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	クライオ電子顕微鏡共同利用研究課題	
	<input type="radio"/>	客員フェロー	
蛋白研受入担当教員名	原田慶恵		
<p>タンパク質の立体構造変化や周りの微環境の変化に従って、分子の並進拡散係数とさらに回転拡散係数が変化することが予想される。申請者等は回転拡散係数および並進拡散係数を同時に測定することで細胞内の微環境を明らかにすることを目指している。そのためにそのプローブになる分子として、緑色蛍光タンパク質 (EGFP) のオリゴマーを作成して、その構造と拡散係数の関係を明らかにする必要がある。本年は、蛍光タンパク質のダイマーを作成して、その立体構造変化を測定した。二つの蛍光タンパク質遷移モーメントの配向度が異なる 5 種類のホモダイマー変異体 YYm シリーズを作製し、それぞれのカルシウム存在下, 非存在下における蛍光寿命測定に成功した。個々の YYm シリーズにおいてカルシウム存在, 非存在下での固有の蛍光寿命の変化と回転拡散測定の結果を照らし合わせる事でタンパク質の構造変化の推定が可能と考えた。</p> <p>方法並びに結果</p> <p>我々の先行研究では回転拡散振幅が蛍光分子の遷移モーメントの配向度に依存することが示唆されている。そこで振幅の配向依存性を実験的に証明するために Pol-FCS 測定を行うモデルタンパク質としてカルシウムイオンの存在に従って構造変化が期待される蛍光性タンパク質 2 量体の作製を目指した。蛍光発色団の配向度が異なる 5 種類の円順列変異体にて構築した。回転拡散測定は Pol-FCS 装置によって測定を行ったところ, 2 種類の組み合わせでカルシウムイオンの有無による回転拡散の振幅が増加した一方, 振幅は変わらず, または振幅の減少した, タンパク質の組み合わせもあった。これらのことから, 回転拡散振幅の配向依存性を円順列変異体を用いて証明できた。</p> <p>共焦点レーザー顕微鏡蛍光寿命測定システムを用いて, 5 種類に対してカルシウム存在, 非存在下で蛍光寿命を行った。蛍光寿命測定の結果と回転拡散振幅変化率と相関は得られなかった。このことから今回構築したタンパク質においてホモ FRET が起きていないか, もしくはホモ FRET では蛍光寿命の変化がないことが考えられる。</p>			

※本様式は、“拠点事業成果報告”として、拠点ホームページにて公開させていただく予定です。

※必ず A4 用紙 1 枚におさめて下さい。 ※提出期限：平成 30 年 5 月 18 日（金） ※提出の際は PDF 変換して下さい。

※提出先：大阪大学蛋白質研究所拠点プロジェクト班 E-mail: tanpakuken-kyoten@office.osaka-u.ac.jp

