

提出日：2019年 5月16 日

平成30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 オリゴマー並びに新規 YY3.6 センサータンパク質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蛋白質の立体構造、ならびに将来は細胞内の微環境を明らかにすることを目指している。今年度は2量体蛍光タンパク質においてそれぞれの遷移モーメントの配向度が異なる6種類のホモダイマー変異体 V-mV シリーズを作製し、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 V-mV シリーズにおいてカルシウム存在、非存在下での配向度変化に蛍光寿命が依存しないことを明らかにした。</p> <p>方法並びに結果</p> <p>先行研究では偏光蛍光相関分光装置 (Pol-FCS) 測定で得られる回転拡散振幅の配向依存性を実験的に証明するためにモデルタンパク質としてカルシウムイオンの FRET プロブであるイエローカメレオン (YC) を改変したタンパク質 V-mV シリーズを作製した。これらのシリーズでは、円順列変異体が使われることで蛍光タンパク質の配向度のみが変化している。測定を行った結果、カルシウム添加による振幅の変化は円順列変異体ごとに異なる結果が確認された。このことから、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>今年度の実験では、共焦点レーザー顕微鏡蛍光寿命測定システムを用いて、6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。測定を行った結果、配向度の変化にかかわらず蛍光寿命に変化は見られなかった。このことから今回構築したタンパク質においてホモ FRET では蛍光寿命の変化がないことが考えられる。今後はこのことが測定の影響によるものでないと証明するため、蛍光寿命の変化する例として、V-mV series の N 末端の Venus を ShadowY1 と呼ばれるモル吸光係数が高く、量子収率の低いタンパク質に変え、FRET により、蛍光寿命が変化する例を対照として用意し、再測定する予定である。</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：令和元年 5 月 17 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