

(様式 1-2)

提出日：2020 年 5 月 7 日

2019 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 (研究室名：蛋白質ナノ科学研究室)	
<p>研究代表者のグループは回転拡散測定のため偏光蛍光相関分光法システムを構築し、モデルタンパク質として緑色蛍光タンパク質 (EGFP) オリゴマーの溶液内並びに生細胞内での回転拡散計測を行った。昨年度は 2 量体蛍光タンパク質の N 末端の Venus をそれぞれ蛍光発色団の配向度が異なる 5 種類の円順列変異体で構築し、Pol-FCS 装置によって測定を行ったところ、回転拡散振幅の配向依存性を円順列変異体を用いて確認できた。しかし、回転時間領域は 100nsec 領域附近であり、より正確な測定をするには、数 nsec 付近にあると考えられている Homo-FRET の影響を受ける蛍光寿命の影響を正しく評価しなければならない。昨年度は、溶液系での蛍光色素、蛍光タンパク質 2 量体などの蛍光寿命測定を行った。その結果は YYm3.12 以外の全てのタンパク質においてカルシウムの添加による蛍光寿命の変化が無く一定であることが判明した。今回はこの結果を証明するため、蛍光寿命が変化する構造として、V-mV series の N 末端の Venus を ShadowY と呼ばれるモル吸光係数が高く、蛍光量子収率の低いタンパク質 (ShadowY, Y) を用意し、ドナー側のエネルギー移動により消光が起き、確実に蛍光寿命が変化する組み合わせを用意し、蛍光寿命を測定した。</p> <p>結果</p> <p>まず、前年同様、V-mV シリーズでは Ca<sup>2+</sup>を加える事による数値の変化は確認されず、構造が変化したことによる違いは見られなかった。</p> <p>一方で、新たに構築した S-mV<sub>1</sub>, S-mV<sub>173</sub> では、明確に異なる結果が確認された。これらの試料では、Ca<sup>2+</sup>を加える事で、速い成分と遅い成分の両方で蛍光寿命が短くなった。また速い成分の割合が 30%ほどから 40%ほどまで上昇していることが分かった。この結果は mVenus がドナー、ShadowY がアクセプターとして機能した際には、ShadowY は無輻射遷移をおこすため、mVenus の速い減衰のみが観測されると考える。</p> <p>一方で、Homo-FRET を起こすと考えられる V-mV シリーズにおいてこれまで同様、蛍光寿命に変化が見られなかった。これは、Homo-FRET ではアクセプターにエネルギーが遷移したとしてもアクセプターからの蛍光を観測するが、蛍光寿命はモノマーと比べて大きな差がないためだと結論された。</p>			