

FRAPを用いたpH依存的なタンパク質-脂質相互作用の動的解析

横山 輪 (物理学科3回生)、久保田 峻亮 (生物科学科2回生)

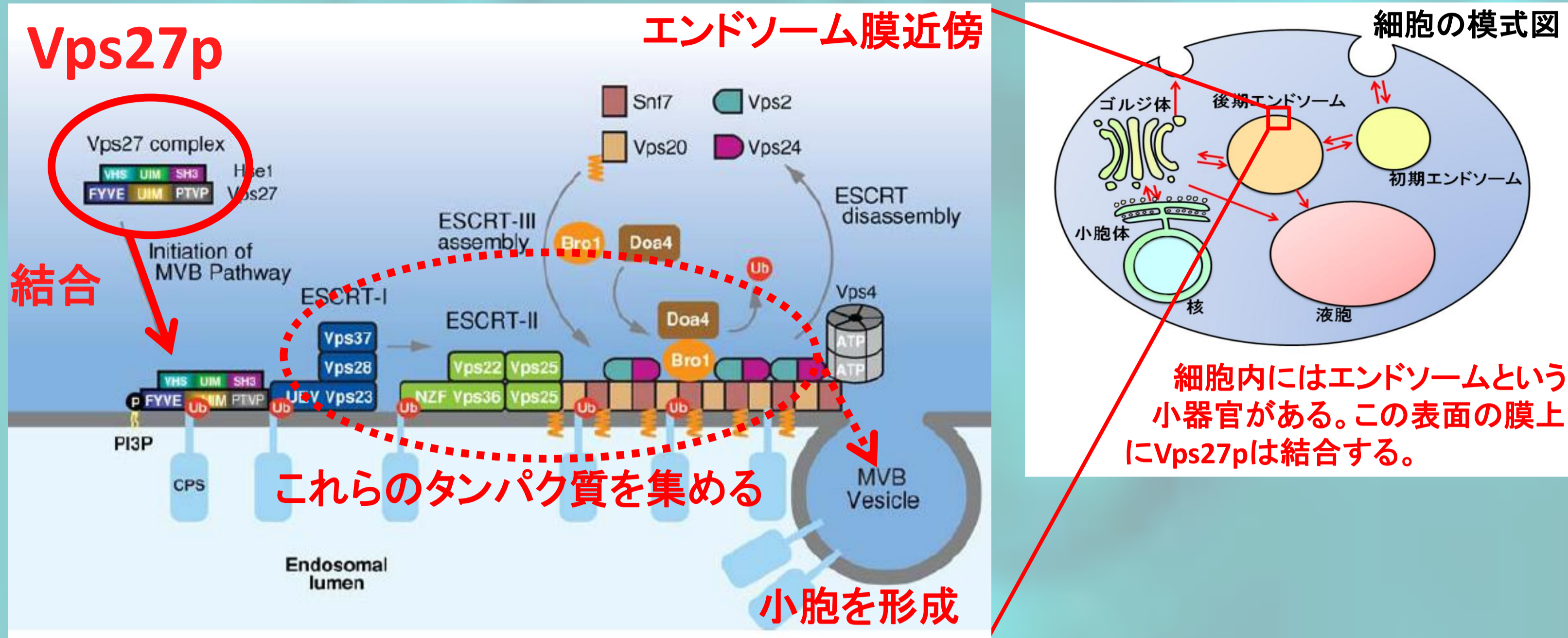
背景

タンパク質Vps27はpHにより細胞内での分布が変化する。

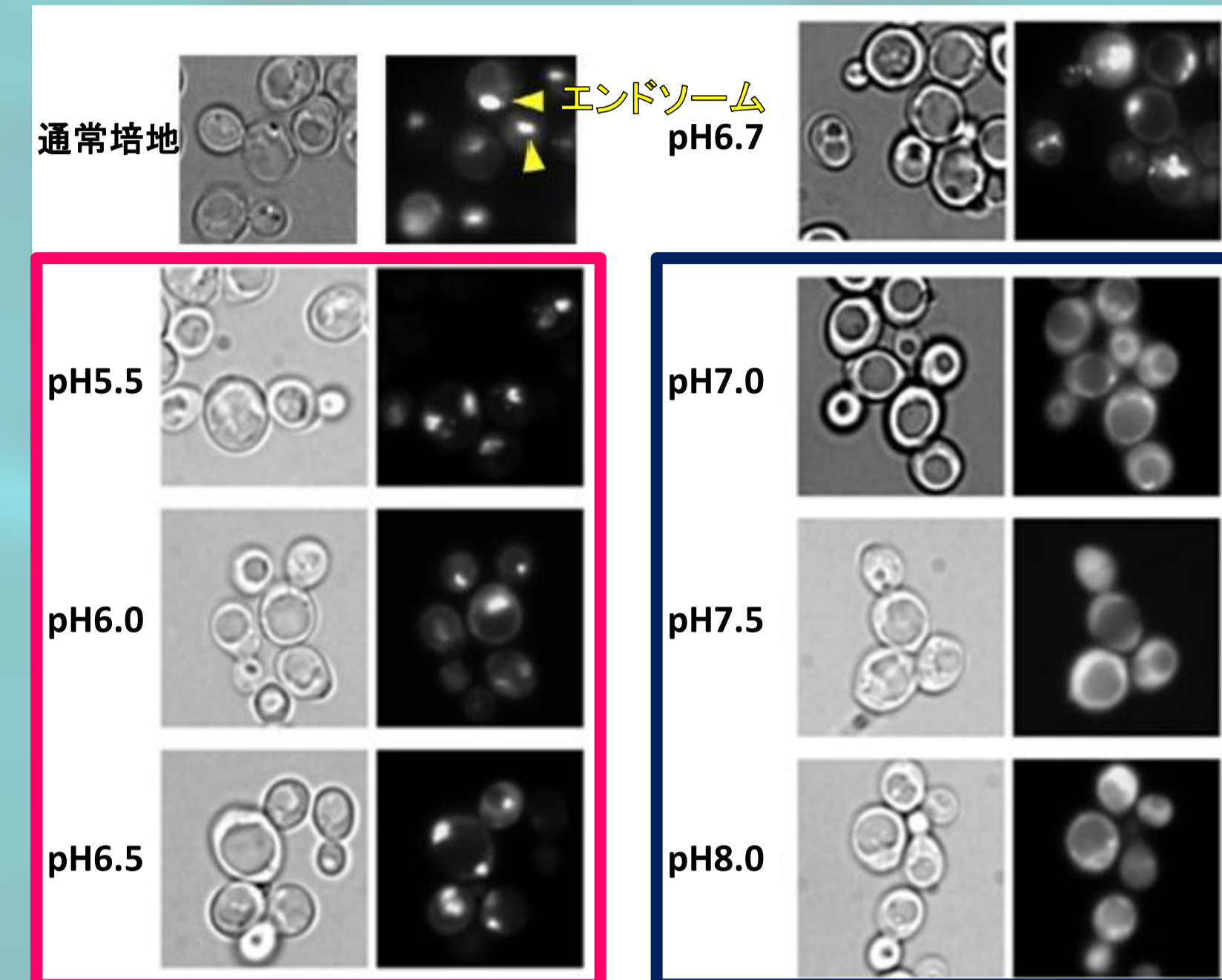
・Vps27pとは?

エンドソーム膜に結合して、エンドソームの内側にさらに小胞を形成させるタンパク質群を集める。

→細胞内輸送に関わる重要なタンパク質!



・蛍光タンパク質でVps27pを光らせて顕微鏡で観察すると・・・



・酸性:
エンドソームに結合(通常)

・中性・塩基性:
細胞質に拡散(異常)

画像で分布を観察しただけではVps27p分子の動的な性質を知ることはできない。

目的

FRAPを用いてVps27pの動的性質のpH依存性を調べる。

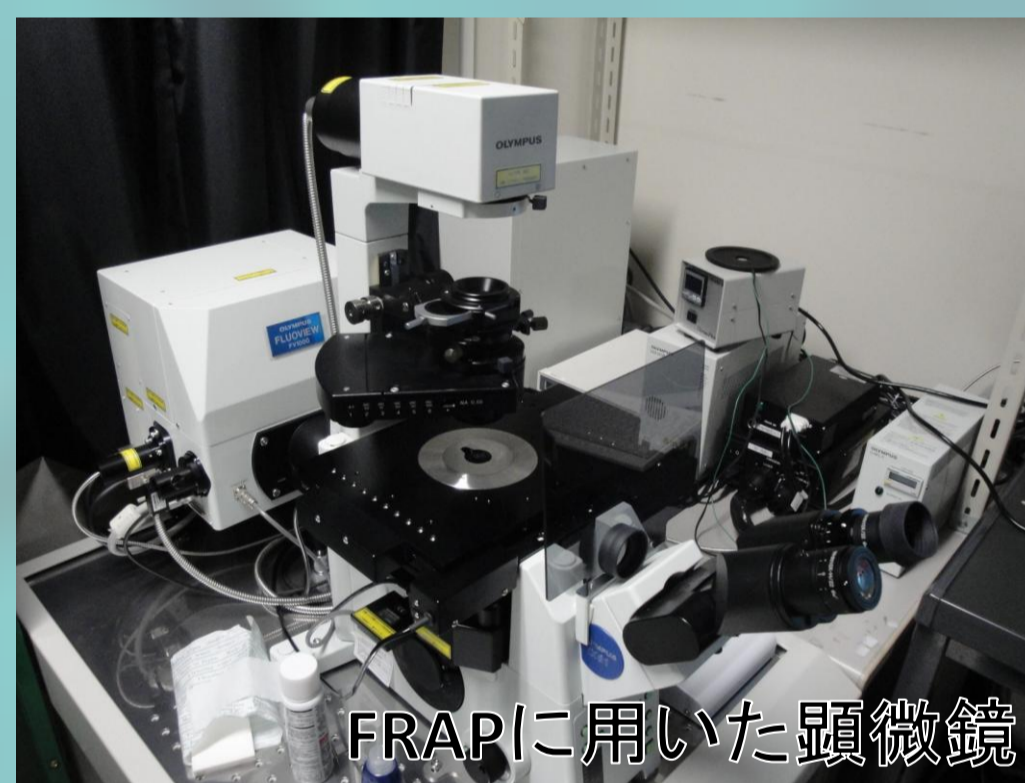
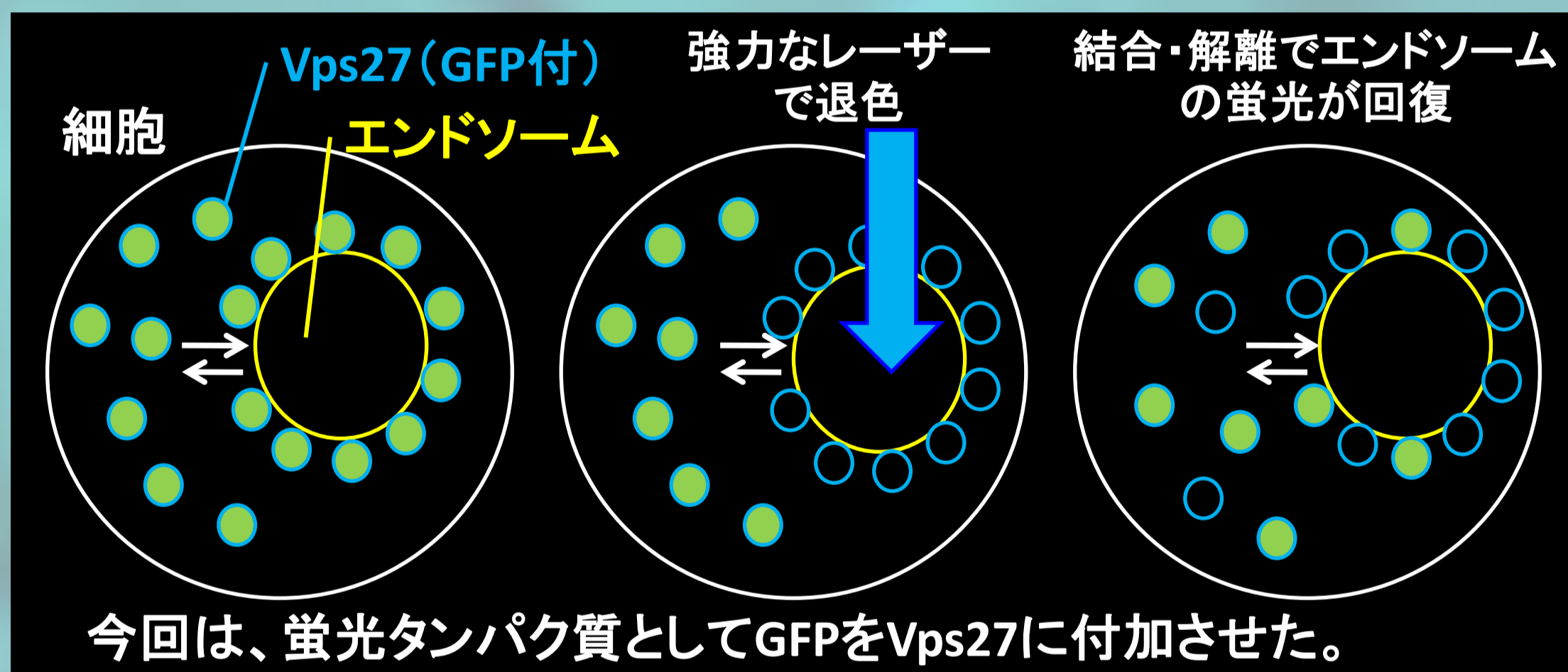
pHによってVps27pの動的な挙動(エンドソームへの結合・解離)がどう変化するかFRAPという手法を用いて調べる。

→画像では分からなかった違いが見られるのではないかな?

方法

サンプル準備とFRAP (Fluorescence Recovery after Photobleaching)について

・FRAPとは? 特定エリアの蛍光を強力なレーザーを用いて退色し、蛍光タンパク質の移動による蛍光回復の様子を解析する方法。



→蛍光回復速度から結合・解離のし易さが分かる。

・サンプルの作成

生体膜と結合してH⁺を透過させるイオノフォアを用いて細胞内外のpHを一定値に均一化した酵母を培養。

pH5.5 pH6.0 pH6.5 pH7.0 通常の5種類のサンプルを作成。

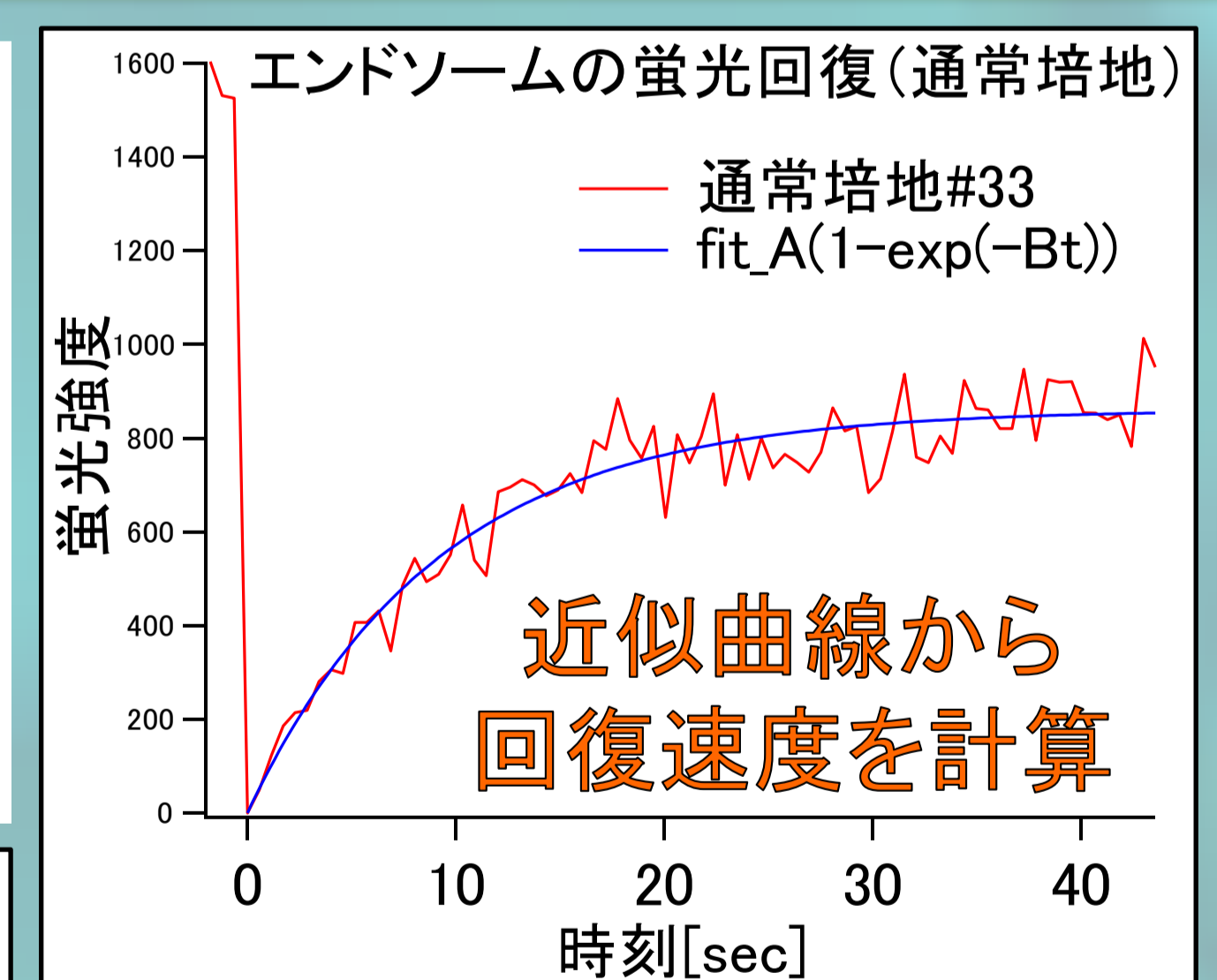
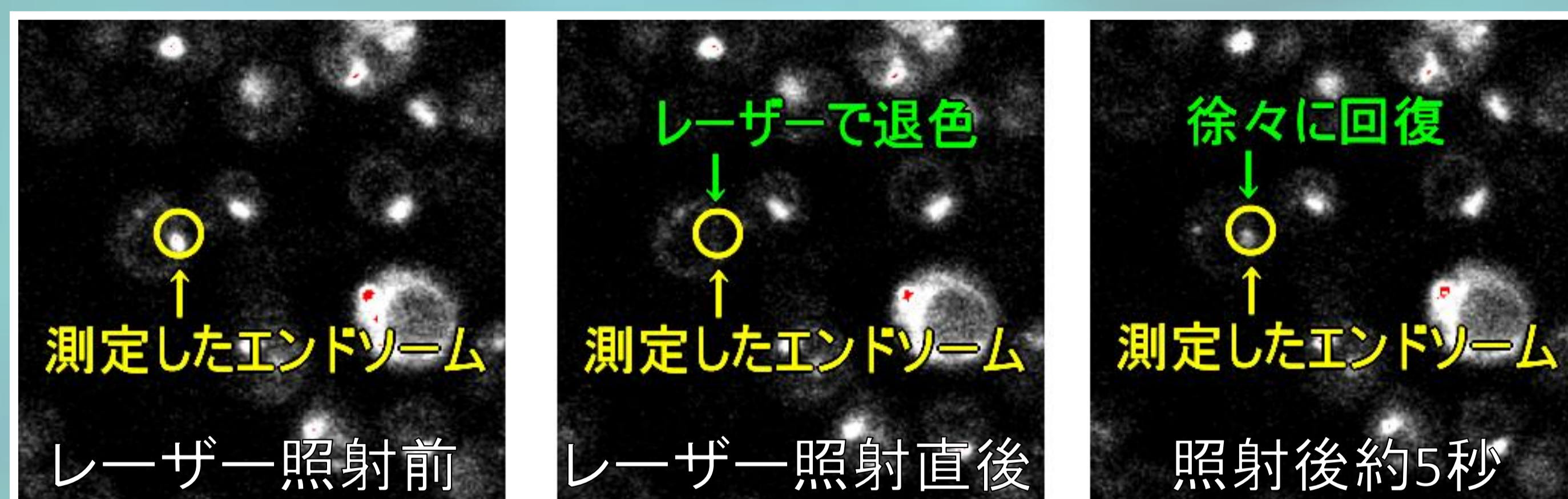
結果

蛍光回復のpH依存性が見られ、pH6.0が最も通常培地のときに近い。

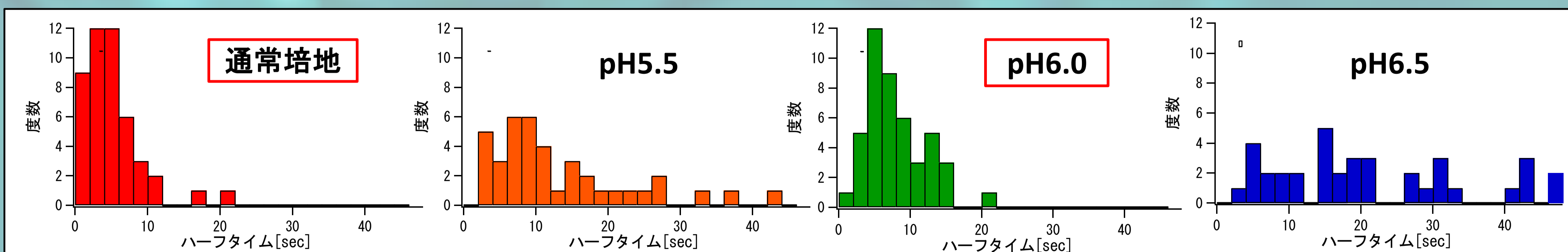
一度退色した部分の蛍光回復が見られた。(pH7.0以外)

→Vps27pはエンドソームと結合・解離の平衡にある。

通常培地の酵母でFRAPを行った際の画像→



↑蛍光回復の様子をグラフにしたもの
←蛍光回復のハーフタイムのヒストグラム
pH6.0のとき通常培地のものと良く一致。



まとめ・考察

エンドソーム近傍はかなり厳密にpH6.0になっていると考えられる。

Vps27pは常に結合・解離を繰り返していることが明らかになった。特に、pH5.5、pH6.0、pH6.5では局在観察では分からない、動的性質の違いがFRAPによって見る事が出来た。また、通常培地のハーフタイムはpH6.0のものと最も一致する。

pHが0.5違うだけでハーフタイムが大きく変化したことから、Vps27pが結合するエンドソーム近傍は、かなり厳密にpH6.0付近に維持されることが考えられる。