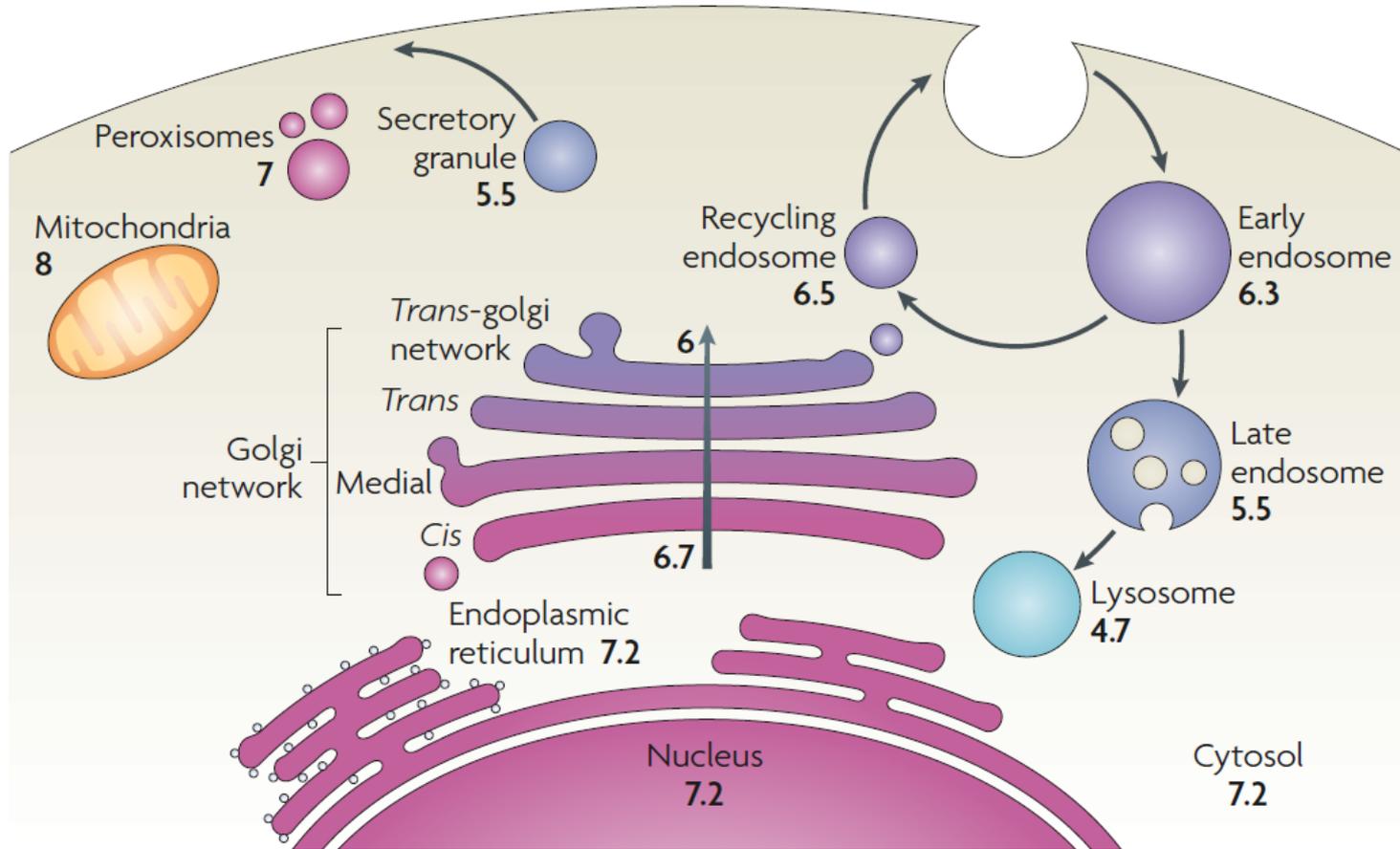


# 細胞内オルガネラpH



*Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 2010, 11, 50-61.

オルガネラのpH異常と疾患との関係が報告されている

Ex. リソソーム内pH異常とリソソーム病

*J. Biol. Chem.*, 2006, 281, 7294-7301.

# レシオ型pH蛍光プローブ

OFF/ON型

pHプローブ : ★



蛍光強度の大きさが  
pH算出に大きく影響する

蛍光強度からpHの定量は困難

レシオ型

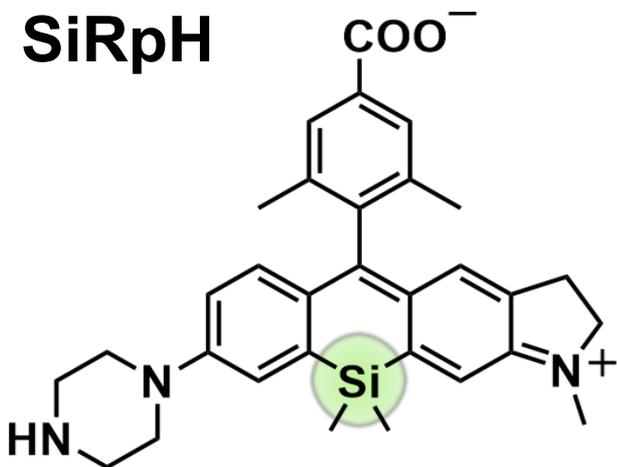
pHプローブ : ★



蛍光強度の大きさが  
pH算出に影響しない

異なる蛍光強度でも  
レシオ値からpH定量が可能

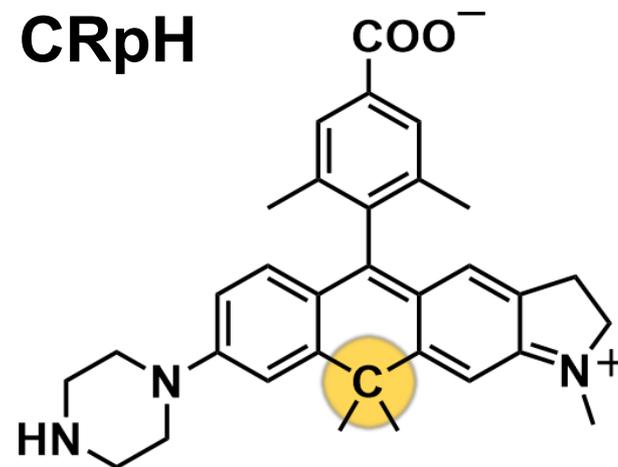
# 新規pHプローブの開発



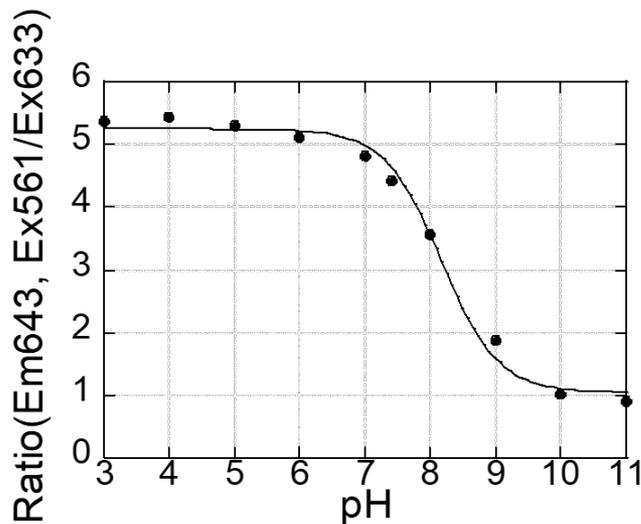
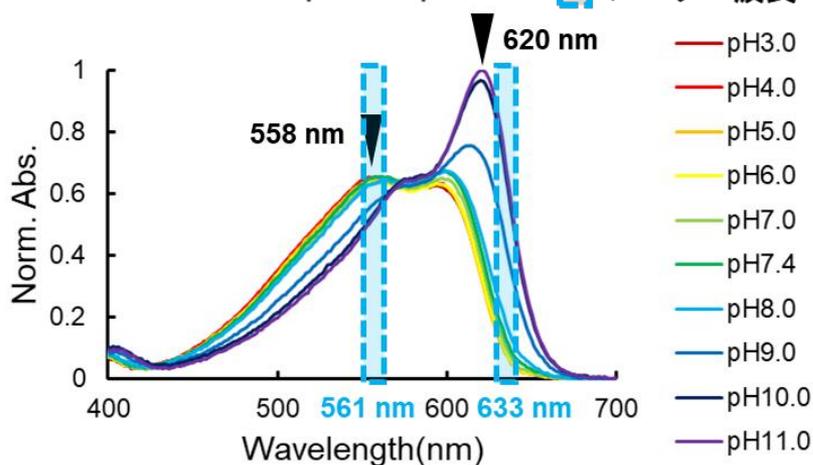
キサンテン10位  
SiからCに



吸収波長の  
短波長化



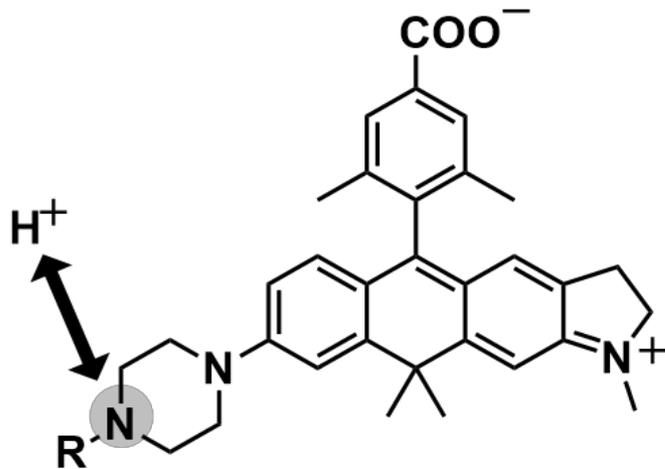
Absorption spectra レーザー波長



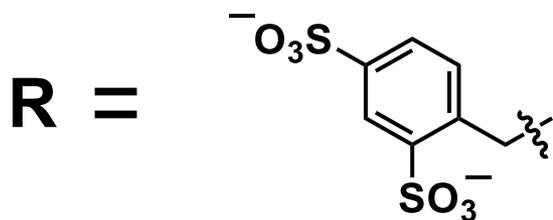
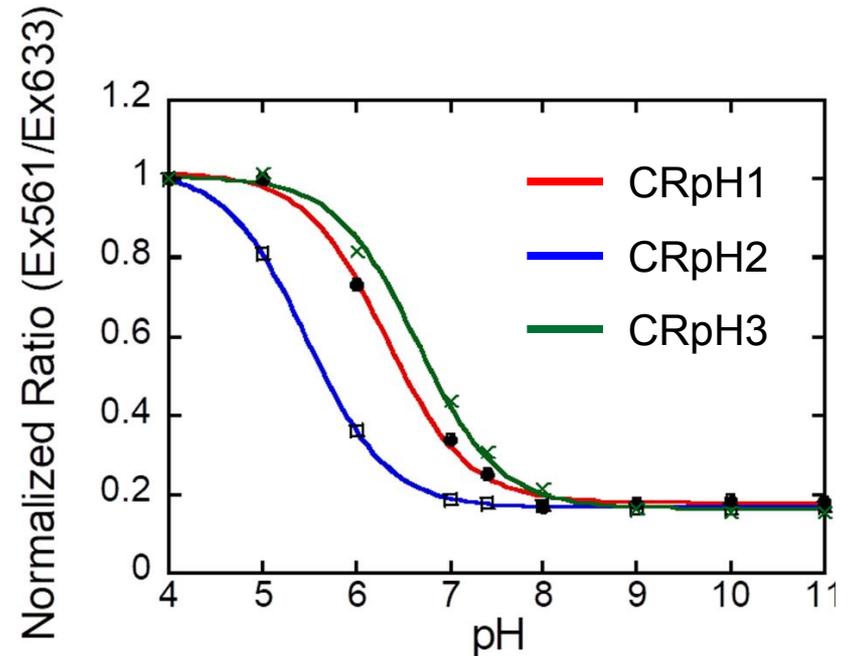
	$\Phi_{fl}$
pH 3.0	0.49
pH 10.0	0.21

吸収波長が短波長化し、蛍光量子収率が上昇した

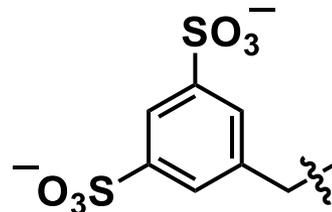
# pK<sub>a</sub>の異なるCRpHプローブの開発



ピペラジンアミノ基の置換基により、  
pK<sub>a</sub>は調整可能



CRpH1 (pK<sub>a</sub> = 6.3)



CRpH2 (pK<sub>a</sub> = 5.5)

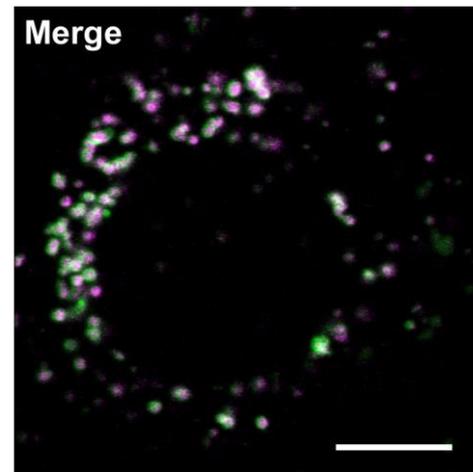
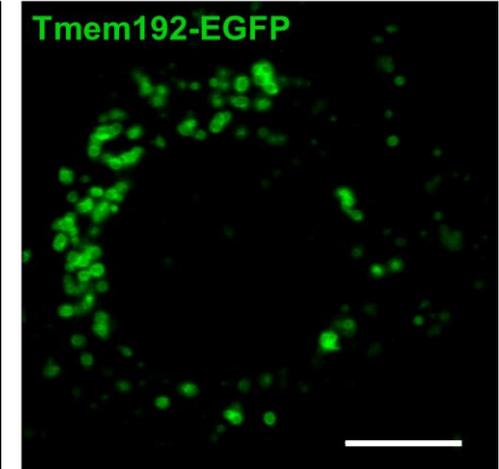
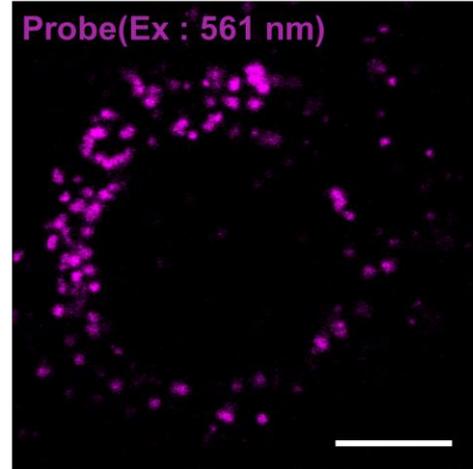
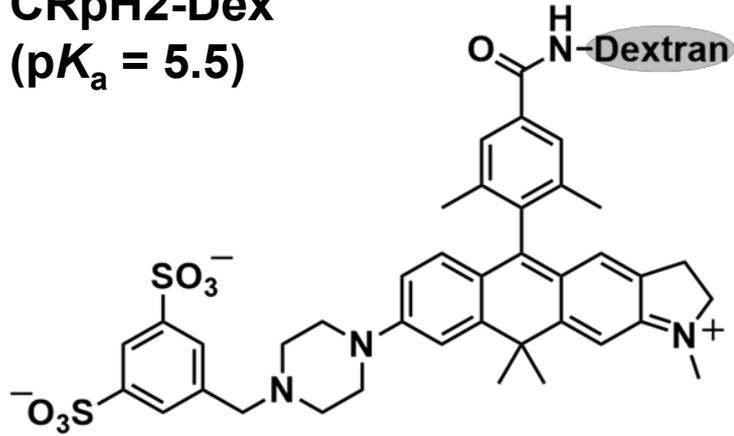
Me基

CRpH3 (pK<sub>a</sub> = 6.7)

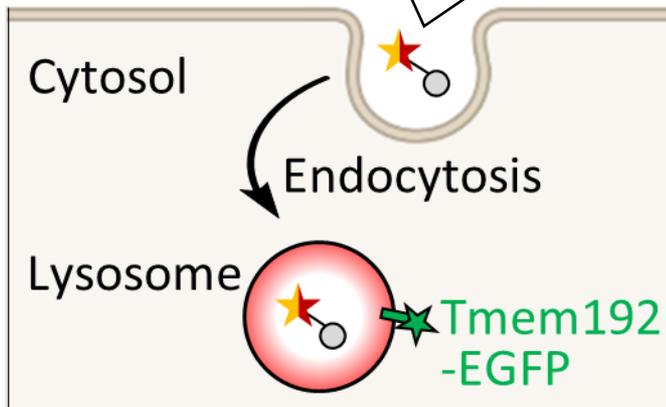
pK<sub>a</sub>=6.3, 5.5, 6.7 の CRpHプローブを開発した

# リソソーム内pHの測定

CRpH2-Dex  
( $pK_a = 5.5$ )



Scale bar: 10  $\mu$ m



リソソームにプローブを到達させることに成功した

# リソソーム内pHの測定

プロトコル

CRpH2-Dex loaded  
MEF-Tmem192 cells



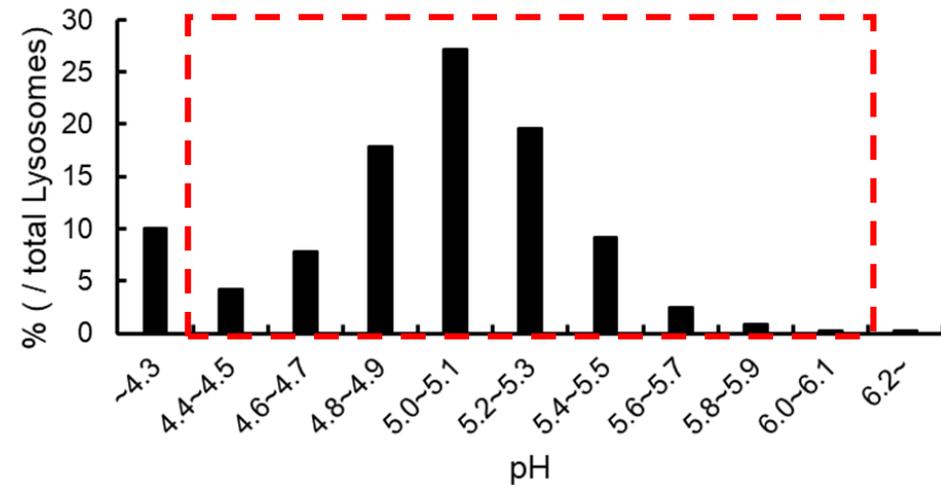
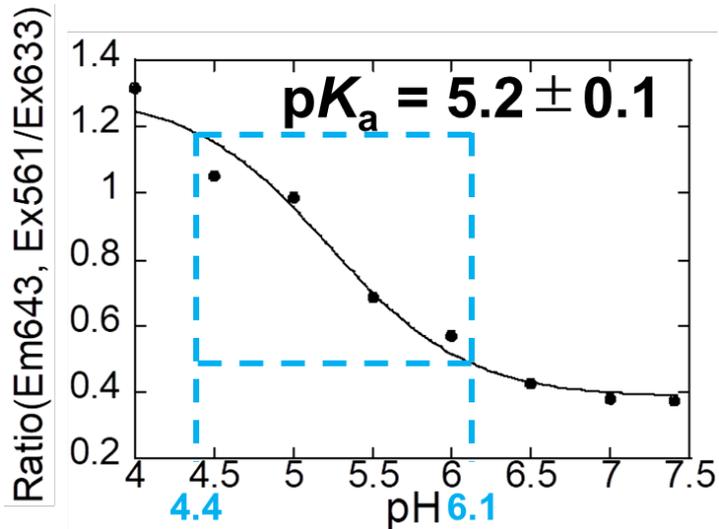
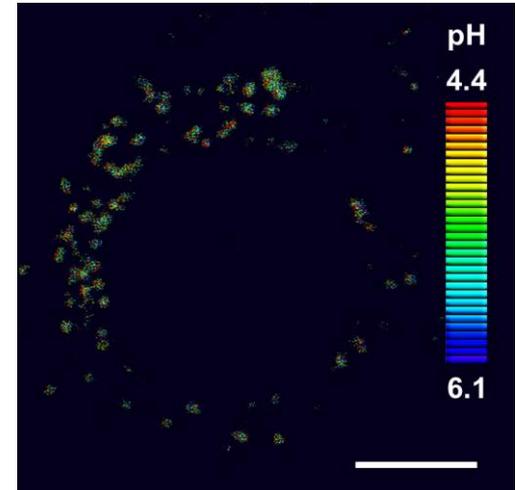
Fix with PFA

Exchange with pH buffer

Fluorescence imaging

生細胞における  
レシオ画像

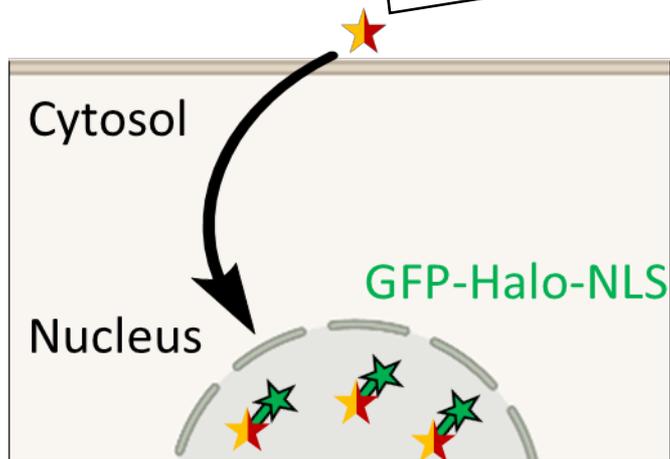
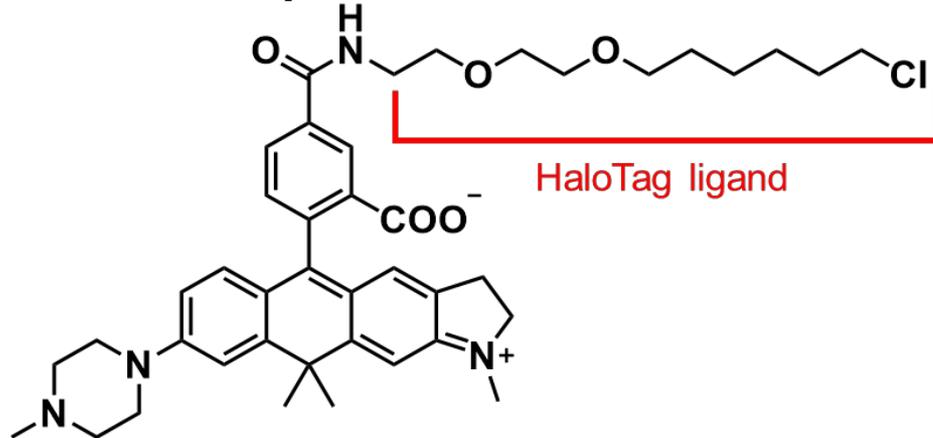
Scale bar: 10  $\mu$ m



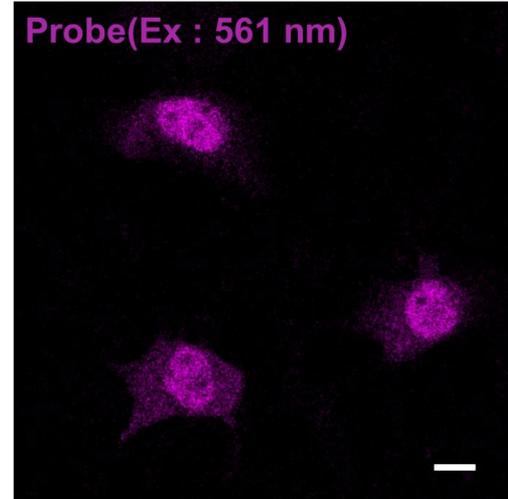
リソソーム内平均pHは $5.1 \pm 0.1$ と算出された

# 生細胞での蛍光イメージング

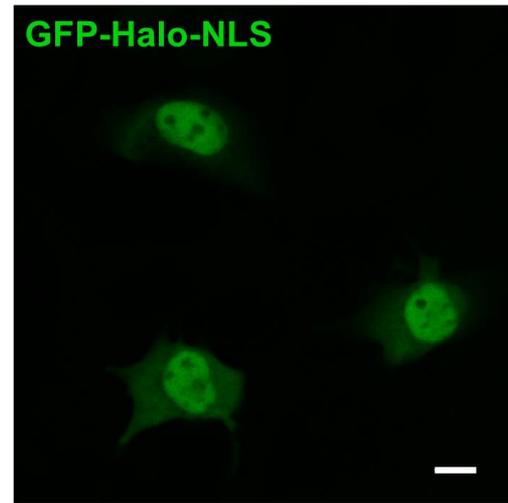
2-COOH CRpH4 Halo



Probe(Ex : 561 nm)



GFP-Halo-NLS

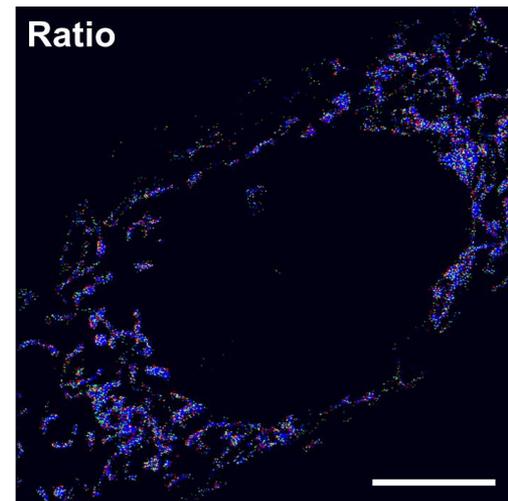
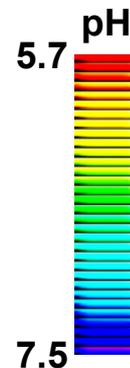
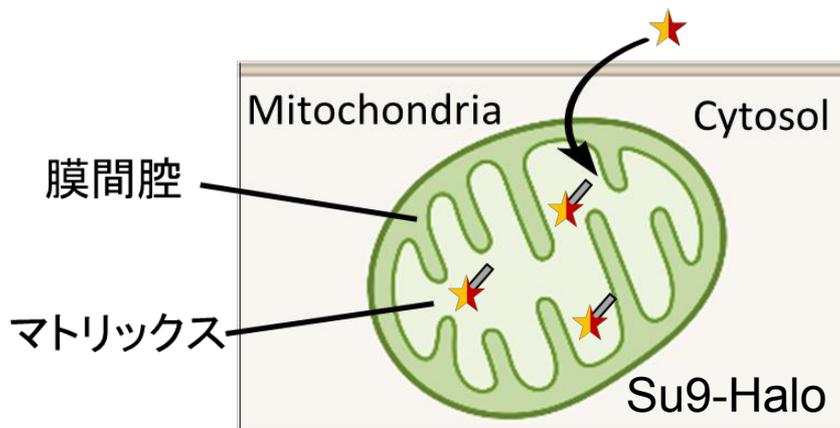
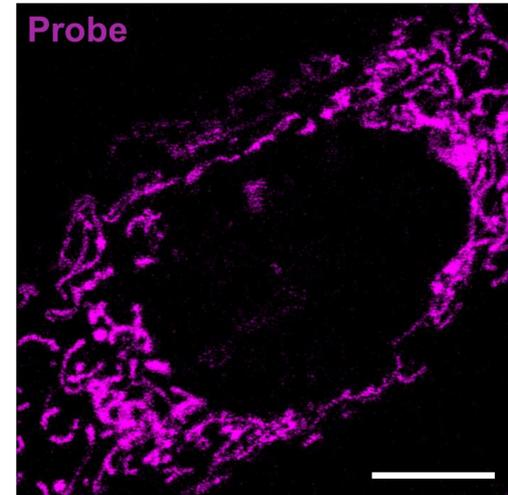
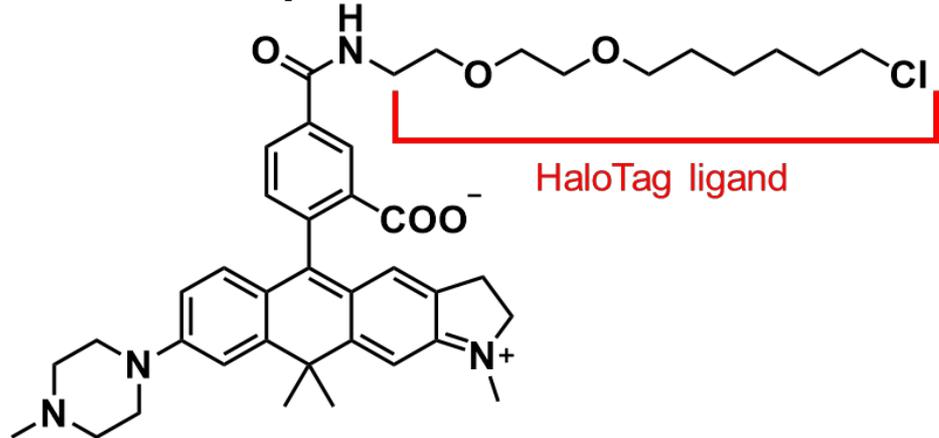


Scale bar: 10  $\mu$ m

HaloTagタンパク質が発現している核への局在に成功した

# ミトコンドリアマトリックスのpH測定

2-COOH CRpH4 Halo

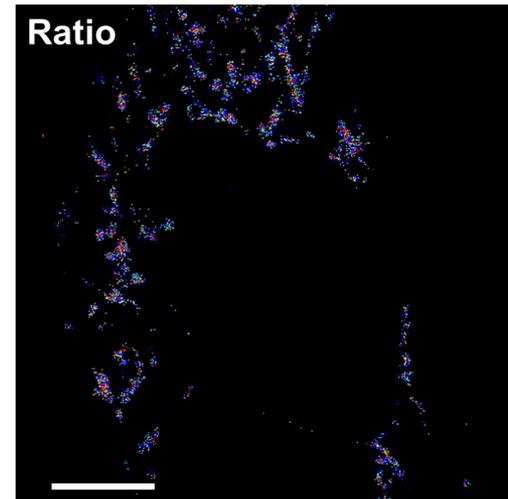
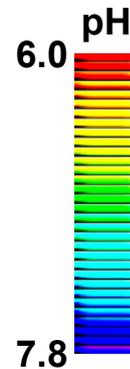
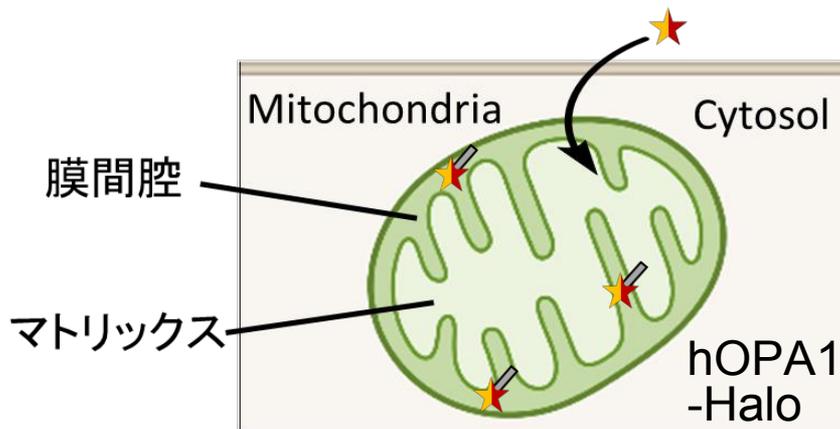
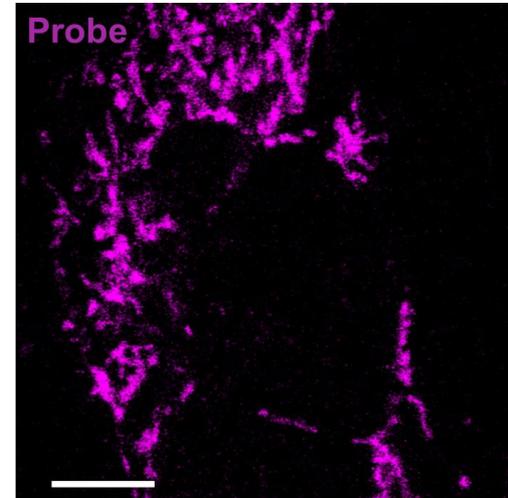
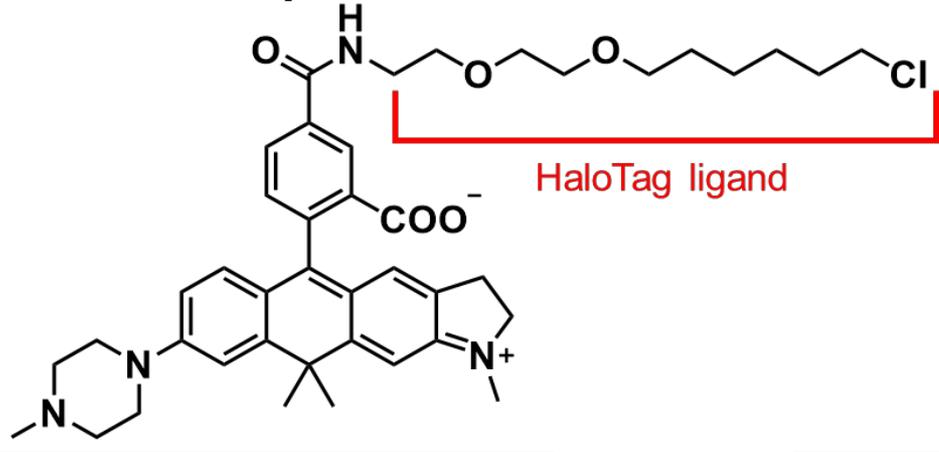


Scale bar: 10  $\mu\text{m}$

マトリックス内平均pHは7.5以上と算出された

# ミトコンドリア膜間腔のpH測定

2-COOH CRpH4 Halo



Scale bar: 10  $\mu$ m

膜間腔平均pHは $7.2 \pm 0.1$ と算出された

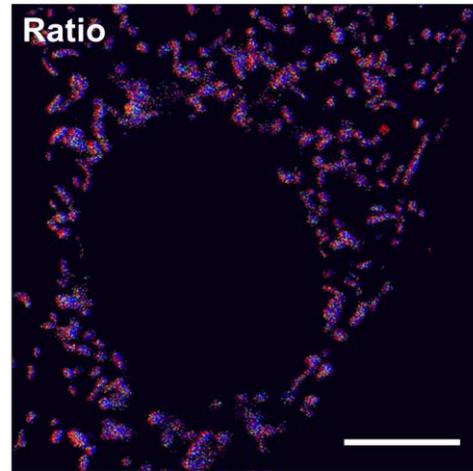
# 脱分極剤によるミトコンドリアpH変化

CCCP : Carbonyl cyanide  
*m*-chlorophenyl hydrazone  
1  $\mu$ M HaloTagプローブ

マトリックス



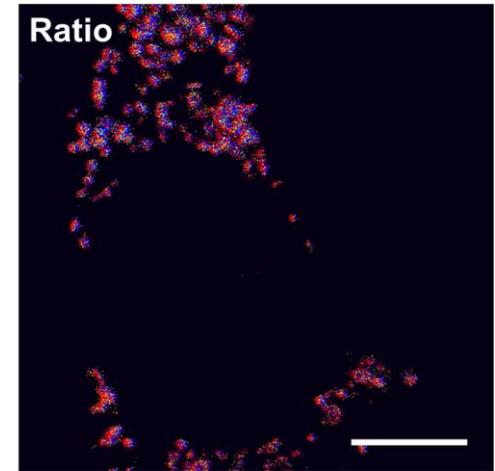
3 min



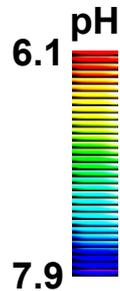
pH低下  
→



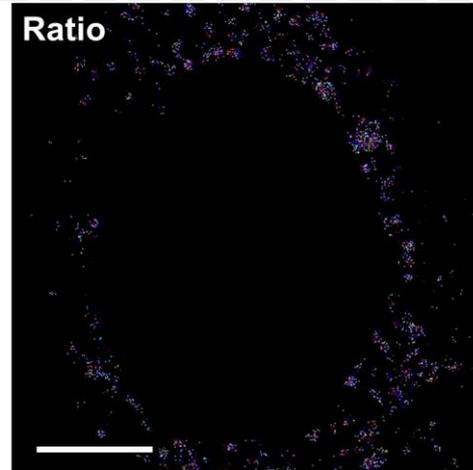
15 min



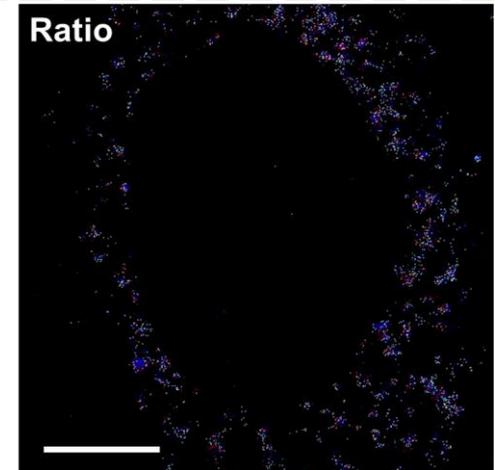
膜間腔



Scale bar: 10  $\mu$ m

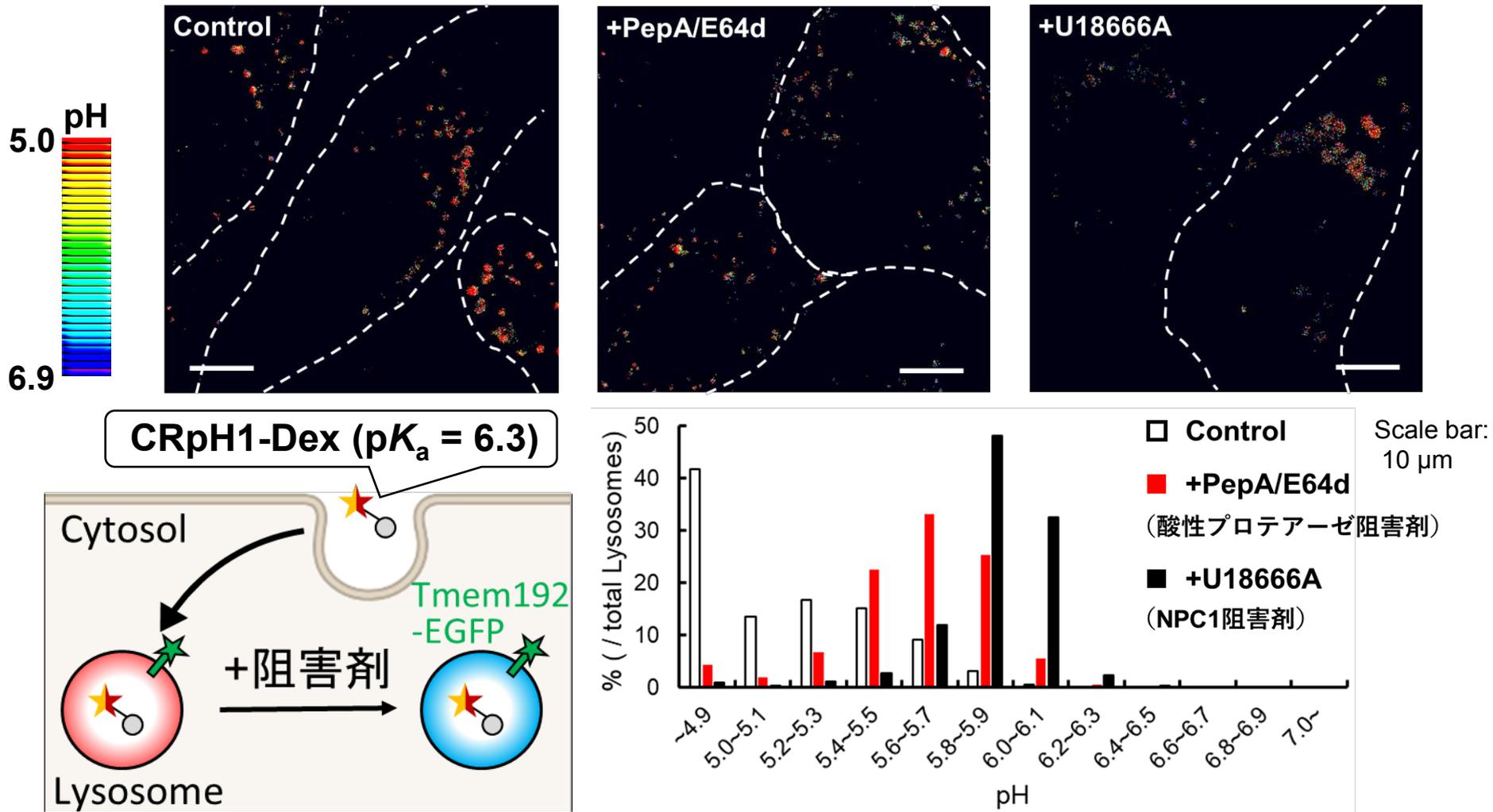


変化なし  
→



プロトン勾配の減少が観察された

# リソソーム病様細胞でのpH測定



リソソーム内pHの中性化が観察された