



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study of Homodimer Glucocorticoid Receptor Interaction Using Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy in the Living Cell [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	Tiwari, Manisha
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第11112号
Issue Date	2013-09-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/53809
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Manisha_Tiwari_review.pdf, 審査の要旨



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 Manisha Tiwari

	主 査	教 授	金 城 政 孝
審査担当者	副 査	教 授	綾 部 時 芳
	副 査	教 授	芳 賀 永
	副 査	准教授	福 井 彰 雅

学 位 論 文 題 名

Study of Homodimer Glucocorticoid Receptor Interaction Using Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy in the Living Cell

(蛍光相互相関分光法を用いた生細胞におけるグルコルチコイド受容体
2 量体化機構の研究)

グルコルチコイドレセプター (GR) はリガンドと結合することで、細胞質から核内へと局在を変化させ転写を調節している核内転写因子のひとつである。本研究では GR が細胞内で 2 量体を形成させていることに注目し、その結合の強さの定量を試みた。

研究では、近年細胞内での分子間相互作用などへの利用が進んでいる蛍光相関分光法 (FCS) および蛍光相互相関分光法 (FCCS) を利用することで、細胞内に導入された GR の拡散、あるいは相互作用を直接観察することを目的として解析を行った。

具体的にはまず第二章で GR の N 末端緑色蛍光タンパク質(GFP)または赤色蛍光単タンパク質(mCherry)を結合させた融合タンパク質を構築した。またその融合タンパク質を構築するにあたり、予備実験として、単量体 mCherry と 2 量体 mCherry 2 を比較し、2 量体 mCherry が光安定性がよく、FCCS 測定に有利であることを確認している。

このように、まず、さらに、細胞内に導入された GR と、発現するタンパク質の量を単一細胞レベルで定量することが可能なシステムを構築した。

第三章においては、FCCS により細胞内タンパク質相互作用の定量的解析が可能かどうかをモデル実験として、相互作用の強いことでよく知られている NF κ B を用いて行った。このタンパク質は P50,P65 のサブユニットを持つタンパク質であり、P50-P50, P65-P65 のホモ 2 量体のほか、より安定に相互作用を行う、P50-P65 ヘテロ 2 量体を形成すること

が知られている。そこで、P50-GFP, P50-mCherry, P65-GFP, P65-mCherry の各種融合体を構築し、また、これらのホモ (P50-GFP, P50-mCherry または, P65-GFP, P65-mCherry) 並びにヘテロ同志 (P50-GFP、P65-mCherry または P65-GFP、P50-mCherry,) の結合における結合定数 (Kd) を導くための計算式を導き出し、FCCS 測定にて Kd を決定した。その結果 P50-P50, P65-P65, P50-P65 の Kd はそれぞれ、 $1.78 \mu\text{M}$, $2.59 \mu\text{M}$ と $0.46 \mu\text{M}$ であることを明らかにした。

第四章においては、GR ならびにその変異体、C421G, A458T, C421G-A458T, ΔNLS , A458T- ΔNLS 等を用いてそれぞれの 2 量体形成の Kd を FCCS を用いて求めた。C421G は DNA 結合能を欠如したものの、A458T は 2 量体化能を欠如したものである。まず、それぞれの融合タンパク質を構築し、内在性の GR の発現していない U2OS 細胞に発現させることにより、内因性タンパク質の影響を受けない実験系の構築を行った。その結果、リガンド処理前後の野生型 GR の Kd がそれぞれ、GR (−Dex) が $15.56 \mu\text{M}$, GR(+Dex) が $4.42 \mu\text{M}$ であることをまず確認して、この手法の有効性を実証した。つぎに、それぞれの変異体の Kd がリガンド存在下で、C421G(+Dex), A458T(+Dex), C421G-A458T(+Dex), ΔNLS (+Dex), A458T- ΔNLS (+Dex) が、それぞれ 4.88、9.91、9.27、3.24、6.84 であることを明らかにした。これらの結果から GR がこれまで考えられていたように、リガンド存在下でも一部は単量体として存在することを明らかにした。これらの定量的な結合状態の解析から申請者は Dynamic Monomer Patyway を提唱するに至った。

本研究において、生細胞内におけるタンパク質相互作用の定量的解析方法を示し、実際にこれまでリガンド結合後は 2 量体として存在すると考えられていた GR が 2 量体または単量体として存在し、ダイナミックに離合集散している可能性をあきらかにした。また生細胞内蛍光相関分光法の有用性を示した点についても意義あるものであると考えられる。よって著者は、北海道大学博士 (生命科学) の学位を授与される資格あるものと認める。