



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on homodimer of glucocorticoid receptor and transcriptional regulation in single-cell level using fluorescence correlation spectroscopy and microwells. [an abstract of dissertation and a summary of dissertation review]
Author(s)	大浅, 翔
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第12262号
Issue Date	2016-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/61730
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/2.1/jp/
Type	doctoral thesis
File Information	Sho_Oasa_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称 博士（生命科学） 氏 名 大 浅 翔

学 位 論 文 題 名

Study on homodimer of glucocorticoid receptor and transcriptional regulation in single-cell level using fluorescence correlation spectroscopy and microwells.

（蛍光相関分光法とマイクロウェルを用いたシングルセルにおける
グルココルチコイド受容体の二量体と転写制御に関する研究）

グルココルチコイド受容体(glucocorticoid receptor; GR)は核内受容体ファミリーに属し、多くの生体組織にて発現し免疫や代謝などに深く関与する。GR はリガンド刺激に応答しその局在を細胞質から核へと変化させ、核内で単量体及びホモ二量体の転写因子として機能する事が知られている。これまでの多くの研究において、ホモ二量体はプロモーター内の回文構造の結合サイトに結合し、標的遺伝子の転写を活性化させる事が知られている。しかしながら、GR のホモ二量体と転写制御の間における関係については、未だに不明な点が多い。その原因として、GR の二量体と転写活性を単一細胞レベルでかつ同時に定量可能な手法がなかったためであると考えられる。そこで、本研究は GR のホモ二量体と転写活性の関係を明らかにする事を目的とし、単一細胞測定が可能なシステムの構築とそのシステムを用いて単一細胞レベルにおける GR のホモ二量体の濃度と転写活性の定量的な関連解析を行った。

第二章では、単一細胞測定が可能なシステムの確立を目指した。緑色蛍光タンパク質 (enhanced green fluorescent protein; EGFP) を GR (EGFP-GR)に融合させた。単一細胞由来の EGFP-GR の濃度を定量するために、蛍光相関分光法 (fluorescence correlation spectroscopy; FCS) と microwell チップを組み合わせた *in vitro* の測定システム(FCS-microwell システム)を構築した。FCS は蛍光標識したタンパク質の分子数(濃度)やダイナミクス(拡散定数)を簡便に得る手法である。また、microwell チップは研究室で独自に開発した 113 pL の微小な穴(microwell)を多数配置した細胞培養チップであり、この microwell に一細胞だけ培養する方法も研究室で確立されてきた。これらの二つの手法を組み合わせる事で、単一細胞由来の EGFP-GR の濃度の定量法を確立した。FCS-microwell システムの有用性を示すために、EGFP の希釈系列を作製し FCS-microwell システムを用いて、EGFP 濃度を定量した。バックグランド補正を組み合わせることで EGFP の濃度を 2.5 nM から 0.17 nM まで定量下限を 10 倍向上させた。さらに細胞から抽出した全 EGFP が microwell 内に完全に保持されている事も示した。従って、単一細胞由来の EGFP で蛍光標識したタンパク質の濃度を 0.17 nM の極低濃度の領域まで定量可能な FCS-microwell システムが確立された。

第三章では、EGFP-GR のホモ二量体形成に注目した。EGFP を融合さ

せた野生型の GR (EGFP-GR_{WT})を HeLa 細胞に一過的に発現させ、FCS-microwell システムにて測定した。FCS 測定より得られる分子数で平均蛍光強度を割り付けた一粒子当たりの蛍光強度を指標に、単一細胞由来の単量体及びホモ二量体の EGFP-GR_{WT}の濃度をそれぞれ定量した。ホモ二量体形成における解離定数を得るために二分子会合モデル式のフィッティング解析を行った。その結果としてリガンドである Dexamethason (Dex)処理した野生型の GR のホモ二量体形成における解離定数は 107 ± 19 nM となった。

第四章では、EGFP-GR_{WT}と二つの変異体(C421G; DNA 結合欠損変異体, A458T; ホモ二量体形成欠損変異体)を内在性の GR が発現していない U2OS 細胞に一過的に発現させ、FCS-microwell システムにて測定した。二分子会合モデル式のフィッティング解析により Dex 処理した野生型 GR のホモ二量体形成における解離定数は 409 nM から 137 nM へと変化し、Dex により GR ホモ二量体形成が誘導されている事を示した。また、DNA 結合能を欠損させた C421G 変異体(EGFP-GR_{C421G})及びホモ二量体形成を欠損させた A458T 変異体(EGFP-GR_{A458T})についてもホモ二量体形成における解離定数を定量し、それぞれ 221 nM と 370 nM が得られた。このことから、GR ホモ二量体は DNA との相互作用を阻害されている状態においても形成され、A458T の変異体においても部分的に二量体形成する事を示した。これらの結果から、FCS-microwell システムにおいて GR の単量体とホモ二量体の濃度をそれぞれ定量し、ホモ二量体形成における解離定数を定量可能である事を示した。また、FCS 測定から得られる拡散定数の値がホモ二量体の分子量(240 kDa)から算出される値よりも小さく遅い拡散を示したことから、EGFP-GR はホモ二量体だけでなく、内在性の相互作用するタンパク質と複合体を形成している事が明らかになった。

第五章では、FCS-microwell システムを用いて定量された GR のホモ二量体形成とその下流にある標的遺伝子の転写制御の關係に着目した。GR 応答性のプロモーター配列の下流に橙色蛍光タンパク質である mKO2 を組み込んだプラスミドを構築し、EGFP-GR_{WT}もしくは EGFP-GR_{A458T}と合わせて細胞に導入した。FCS-microwell システムにより単一細胞由来の EGFP-GR_{WT}もしくは EGFP-GR_{A458T}のホモ二量体の濃度と GR によって発現誘導された蛍光タンパク質の濃度から転写活性を定量した。Dex の未処理の場合、EGFP-GR_{WT}のホモ二量体濃度が増加しても転写活性は低く、一定の値を示した。一方で、EGFP-GR_{WT}及び EGFP-GR_{A458T}において Dex 処理をした細胞においては、ホモ二量体の濃度の増加につれて転写活性も増加した。この結果は、細胞内のホモ二量体の濃度と転写活性の定量的な關係性を示唆し、細胞内のホモ二量体濃度の変化に応答して、ホモ二量体により転写制御される下流遺伝子の転写の制御を行っている事を示唆する。

本研究において、FCS-microwell システムを用いて GR のホモ二量体形成における解離定数及び単一細胞由来の GR ホモ二量体と転写活性の關係について明らかにした。GR の転写制御における二量体形成の意義や分子メカニズムを理解するうえで重要な新しい知見となると同時に単一細胞測定の有用性を示した例として意義あるものであると考えられる。