

学 位 論 文 題 名

Single cell analysis of intranuclear binding process
of glucocorticoid receptor
using fluorescence correlation spectroscopy

（蛍光相関分光法を用いたグルココルチコイドレセプターの
単一細胞における核内動態の解析）

学位論文内容の要旨

蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy: 以下 FCS）は単一分子レベルの蛍光強度のゆらぎから分子の数、分子の運動（拡散定数）を測定する方法である。また、得られた拡散定数から分子の形状や大きさ、さらに分子間相互作用の情報を得ることができる。FCS はその非侵襲性と空間分解能の高さから、生きたままの細胞内での分子間相互作用の解析手法として用いられ、さらにレーザー走査型顕微鏡（Laser Scanning Microscopy: LSM）による画像解析を合わせて用いることで、細胞内小器官などを区別した選択的解析が可能となる。

グルココルチコイドレセプター（Glucocorticoid receptor: 以下 GR）はさまざまな転写活性を担う核内レセプターの一つで、ステロイドホルモンと結合することで細胞質から核内へと移行し、二量体として標的 DNA のエンハンサー（あるいはリプレッサー）部位である Glucocorticoid Response Element (GRE) に結合することで転写を調節している。さらに GR は GRE だけでなく他の転写調節因子との相互作用を通して、糖代謝、ストレス応答、免疫応答などさまざまな生理活性に関与する蛋白質の転写を間接的に制御している。また、そのため、創薬を目的としたターゲットタンパクとして古くから研究が行われてきた。近年では緑色蛍光タンパク質（enhanced green fluorescent protein: 以下 EGFP）を融合させたキメラ GR（EGFP-GR）の生細胞中での局在を解析する手法が盛んに用いられているが、転写活性過程における核内でのダイナミクス、特に二量体のタイミングなど、明らかになっていない点が多い。

本研究では HeLa 細胞に EGFP 融合ヒト GR α （以下 EGFP-hGR α ）を発現させ、作用薬リガンドである Dexamethasone（以下 Dex）の添加前後において FCS 測定する手法を用いて、転写調節過程における GR の細胞内動態を解明することを目的とした。

LSM により EGFP-hGR α が Dex 添加により細胞質から核へと移行すること確認できた。さらに、FCS 測定により、細胞質内での EGFP-hGR α の拡散定数は Dex 添加前後で変化が生じなかったのに対し、核内では Dex 添加によって拡散定数が $1.60 \mu\text{m}^2/\text{s}$ から $0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$ と約 16% が減少果とい

う結果が得られた。これは約 6 倍遅い成分が生じることを意味する。GR は核内で転写共役因子と複合体を形成していることが知られているが、得られた拡散定数から算出した分子量を考えると、共役因子との結合のみで核内での動きが遅くなっているのではないことが明らかとなった。このことは EGFP-hGR α は転写複合体を形成しているだけでなく、むしろ核内でさらに大きな構造体と相互作用していることを示唆している。

さらに、EGFP-hGR α の動きの低下と相互作用のターゲットを明らかにする目的で転写共役因子との結合ドメインが存在する C 末端を欠損させた変異体：EGFP-hGR α /I550 (以下 I566)、GRE との結合能を持たない点変異体：EGFP-hGR α /C421G (以下 C421G)、二量体形成能を持たない点変異体：EGFP-hGR α /A458T (以下 A458T) の発現プラスミドを構築し、発現細胞の核内での FCS 測定を行った。I566 は Dex 非依存的に核内に局在し、得られた拡散定数も Dex 添加前後でほぼ変化せず約 $1 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となった。同様に核内に局在した状態の Dex 添加後における EGFP-hGR α の wild type (以下 wild type) の拡散定数 ($0.25 \mu\text{m}^2/\text{s}$) と比較すると、この I566 の拡散定数は大きく、共役転写因子との結合が GR の遅い動きをもたらす要因の一つであることを示唆している。また、C421G、A458T はいずれも Dex 添加により細胞質から核内に移行し、添加前の拡散定数はいずれも wild type と差異はなかったが、Dex 添加により生じた遅い成分の拡散定数はそれぞれ $0.92 \mu\text{m}^2/\text{s}$ 、 $0.55 \mu\text{m}^2/\text{s}$ となった。この値は Dex 添加後の wild type に比べ大きく、Dex を添加してもあまり遅くならないことを意味する。また、A458T に比べ C421G の拡散定数が大きかったことから、二量体形成というよりむしろ GRE との相互作用が wild type の核内での遅い動きに大きく関与していることを示唆している。拡散定数が小さいほど安定な転写複合体を形成していると考ええると、wild type はまず GRE と結合し、さらに二量化することで安定な転写複合体を形成しているというモデルが妥当と考えられる。

また、我々は GR の転写阻害剤である RU486 の添加前後での FCS 測定を行った。RU486 添加によって wild type は添加前に比べ、53% しか動きが遅くならないことがわかった。さらに、RU486 の効果を拡散定数分布で解析したところ、Dex に比べ広い拡散定数の分布をもっていることがわかった。RU486 は GR の二量化を阻害することで転写を阻害しているとされているが、二量化を形成しない変異体 A458T と拡散定数分布が異なることから、RU486 の二量化阻害以外の阻害機構の存在が示唆された。さらに、GRE と結合しない変異体 C421G は、RU486 を添加しても拡散定数が変化しないという結果が得られた。これは、wild type GR の二量体形成と GRE との相互作用が核内での遅い動きに大きく影響しているという結果を支持している。

このように、FCS を用いた拡散定数の解析から、単一分子内での GR の転写活性過程を追跡できた。このことは、GR に対する薬剤効果の新たな評価法として、FCS が非常に有用であることを示唆している。

学位論文審査の要旨

主査	教授	田村	守
副査	教授	石森	浩一郎
副査	教授	坂口	和靖
副査	教授	矢澤	道生
副査	助教授	金城	政孝 (生命科学院)

学位論文題名

Single cell analysis of intranuclear binding process of glucocorticoid receptor using fluorescence correlation spectroscopy

(蛍光相関分光法を用いたグルココルチコイドレセプターの
単一細胞における核内動態の解析)

本論文は、グルココルチコイドレセプター遺伝子にいくつかの変異を加えたミュータント遺伝子を作製し、更に蛍光ラベルを行った後、細胞内で発現させた系を用いて、このレセプターの転写活性調節部位の同定及び生細胞内での作様機作と機能発現のメカニズムを明らかにしようとしたものである。この目的のため、申請者は蛍光分子のゆらぎを利用する蛍光相関分光法を生細胞に応用し、蛍光ラベルされたミュータント遺伝子から作られる各種蛋白質の動態を追跡した。その結果、本レセプターは核内移行後、二量化され、目的とする遺伝子の結合ドメインと安定な転写複合体を形成することを見出した。本論文は、物理化学的計測法の一つである、蛍光相関分光法の導入と分子生物学的手法により、生細胞内でのグルココルチセレプター機能を解明したものである。さらに、本研究で得られた成果は、他の多くのステロイドレセプターによる遺伝子発現の共通するメカニズムへの手がかりを与えたもので、博士(理学)を受けるに十分値するものと結論した。