

【目的】 グルココルチコイドレセプター (Glucocorticoid Receptor : GR) は、核内受容体のひとつであり、糖代謝や、免疫制御、抗炎症作用などに広く関与していることが知られ、これまでに多くの研究がなされている。しかし一方では、その立体構造や、機能については、まだ不明な点が多い。我々は、これまで生細胞内での GR の定量的な機能解析を目指してきた。本研究ではその解明のため、GR の 2 量体化量と、GR の直接的機能としての転写活性量とを同一単 1 細胞由来溶解液で検出・解析を行い、その関連を明らかにすることを目的とした。

【方法】 我々の開発したマイクロウェル・蛍光相関分光測定システムに、新たに 1 細胞由来の転写活性測定系の拡張を行った。そのため、まず 3 色蛍光相関分光法を用いたダイマー生成量と生細胞内転写活性同時測定システムの開発を行った。次に CMV プロモーター下流に EGFP-GR (緑色) を組み込んだプラスミド、GR 応答性のプロモーター配列の下流に蛍光タンパク質である mKO2 (橙色) を組み込み GR の結合によって mKO2 の発現が誘導されるプラスミドを構築した。EGFP-GR 及び内部コントロールである TagRFP675 (赤色) と一緒に U2OS 細胞に導入し、3 色 FCS 測定条件を確立し、マイクロウェルシステム中にて、1 細胞内に発現した EGFP-GR の濃度と転写活性をそれぞれ定量した。

【結果】 3 色の蛍光分子の FCS 測定により GR の発現量と 2 量体の割合、並びに転写活性量の関係が明らかになった。野生型 EGFP-GR/WT 及び 2 量体欠損変異体 EGFP-GR/A458T においてホモ 2 量体の濃度が増加するにつれて転写活性も増加する事が観察された。また、直線フィッティングから同濃度のホモ 2 量体が存在する場合、EGFP-GR/WT は EGFP-GR/A458T より高い転写活性を示した。EGFP-GR/WT と EGFP-GR/A458T の DNA 結合における解離定数 (K_d) を算出し、EGFP-GR/WT が EGFP-GR/A458T よりも強く DNA と結合する事を明らかにした。これからのことは、DNA と GR の結合の強さが転写活性の制御を行っていることを明らかにした。

単 1 細胞 3 色蛍光相関分光測定方を利用したタンパク質発現量解析

