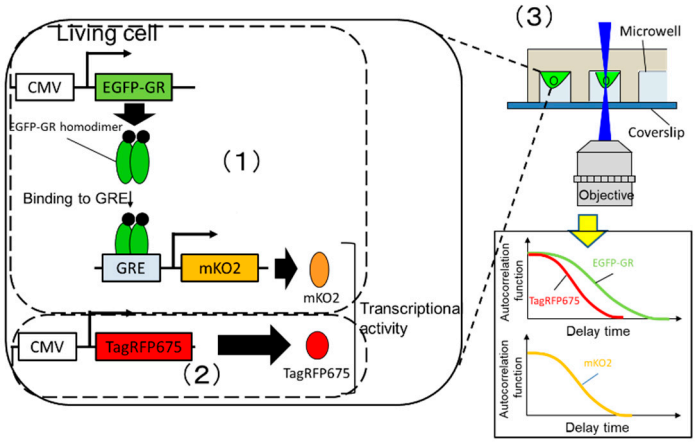
35　単1細胞測定による核内受容体2量体化と転写活性解析	金城　政孝

【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（*Kd*）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



35. 単 1 細胞測定による核内受容体 2 量体化と転写活性解析

金城　政孝

*北海道大学 大学院先端生命科学研究院 先端細胞機能科学分野

Key words：蛍光相関分光法，蛍光相互相関分光法，グルココルチコイド受容体，マイクロウェル，相互作用

緒　言

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、多くの生体組織で発現し糖代謝のみならず、免疫制御や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。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、核内でホモ 2 量体を形成し転写因子として標的遺伝子の転写を活性化させる事が知られている。しかし一方では、その立体構造や、機能や制御については、まだ不明な点が多い。我々はこれまで、GR のホモ 2 量体形成と転写活性の関係性を明らかにする事を目的とし、単 1 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 1 細胞レベルにおける GR のホモ 2 量体形成の濃度の定量的な関連解析を行ってきた。本研究では GR2 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した。

方　法

1.　蛍光相関並びに蛍光相互相関解析

蛍光相関分光法（Fluorescence Correlation Spectroscopy、FCS）並びに蛍光相互相関分光法（Fluorescence Cross Correlation Spectroscopy、FCCS）は ConfoCor2 または ConfoCor3（Carl Zeiss 社、ドイツ）を用いて測定した。対物レンズは C-Apochromat、40×、NA 1.2 水浸レンズを用いた。

FCCS 測定の相関強度（G_G、G_R、G_C）から蛍光分子数（N_G、N_R、N_C）を求め（式（1）、(2)、(3)）、共焦点領域の大きさ（Confocal volume）から、濃度を算出する。次に、GR の 2 量体を考慮した式を導出し、それぞれの濃度から解離定数（Kd（式 4））を求めた［1］。

$$N_G = \frac{1}{G_G(0)-1} \quad (1)$$

$$N_R = \frac{1}{G_R(0)-1} \quad (2)$$

$$N_C = \frac{G_C(0)-1}{(G_R(0)-1)\cdot(G_G(0)-1)} \quad (3)$$

$$K_d = \frac{[M]^2}{[D]} = \frac{([G]+[R])^2}{[\mathrm{GG}]+[\mathrm{RR}]+[\mathrm{RG}]} \quad (4)$$

2.　マイクロウェル（Micorwell）システム

Microwell チップは研究室で独自に開発した 113 pL の微小な穴を多数配置した細胞培養チップであり、この microwell に 1 細胞だけ培養する方法も著者等の研究室で確立した手法を用いた［2］。マイクロウェルシステムを FCS/FCCS 測定を組み合わせる事で、単 1 細胞由来の EGFP-GR の濃度の定量法を確立した。FCS-microwell システムの性能として、バックグランド補正を組み合わせる事で EGFP の濃度を 2.5 nM から 0.17 nM まで測定可能とし、これまでの定量下限を 10 倍向上させた。

*現在の所属：北海道大学 大学院先端生命科学研究院 細胞機能科学分野

3. 単 1 細胞発現解析

1）2 量体化量生成解析

我々の研究室で独自に開発した微小な穴（microwell）を多数配置したシリコンチップと蛍光相関分光法（FCS）を組み合わせ、単 1 細胞測定が可能な FCS-microwell システムを構築した。次に、EGFP を融合した GR（EGFP-GR）を U2OS 細胞に発現させた。構築された FCS-microwell システムを用いて細胞溶解液の FCS 測定から得られる 1 粒子当たりの蛍光強度を指標に、単 1 細胞由来の EGFP-GR 単量体と 2 量体の濃度をそれぞれ定量した。GR2 量体形成の解離定数（Kd）を得るために、二分子会合モデル式を用いてフィッティング解析を行った。

2）発現量解析

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 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 と一緒に U2OS 細胞に導入し、3 色 FCS 測定条件を確立し、1 細胞の EGFP-GR の濃度と転写活性量をそれぞれ得た。

結果および考察

1. GR2 量体形成効率

EGFP と融合させた野生型 GR（EGFP-GR/WT）と二つの変異体（EGFP-GR/C421G：DNA 結合欠損、EGFP-GR/A458T：ホモ 2 量体欠損変異体）をそれぞれ U2OS 細胞に発現させ、FCS-microwell システムで測定した。FCS 測定から得られる 1 粒子あたりの蛍光強度（CPP）を指標として、EGFP-GR の単量体及びホモ 2 量体の濃度をそれぞれ算出した。

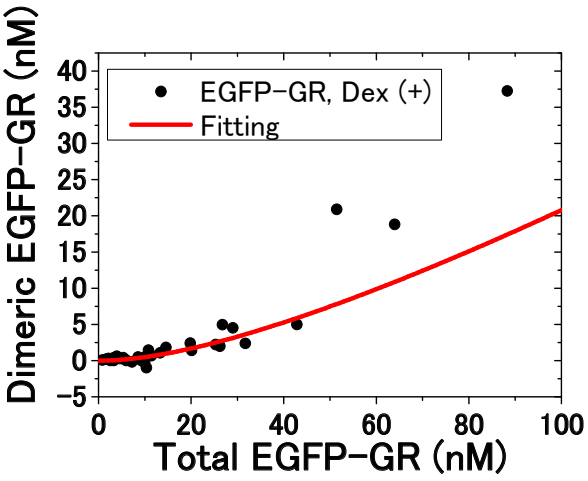


図 1. 野生型 GR の 2 量体化量解析
マイクロウェル中の GR 総量と 2 量体の濃度の関係（黒丸）を、
二分子会合モデル式のフィッティング解析を行った（赤線）。

EGFP-GR のホモ 2 量体形成における解離定数を得るために microwell 内の EGFP-GR 濃度に対して二分子会合モデル式のフィッティングを行った。その結果、野生型、C421G 変異体と A458T 変異体のホモ 2 量体形成における解離定数をそれぞれ 137±37 nM、220±34 nM と 370±118 nM と得られた。また、拡散定数の値が EGFP-GR ホモ 2 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 2 量体だけでなく、転写補因子など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。

マイクロウェルと、FCS/FCCS を用いて、単 1 細胞発現解析を行った図を示す。

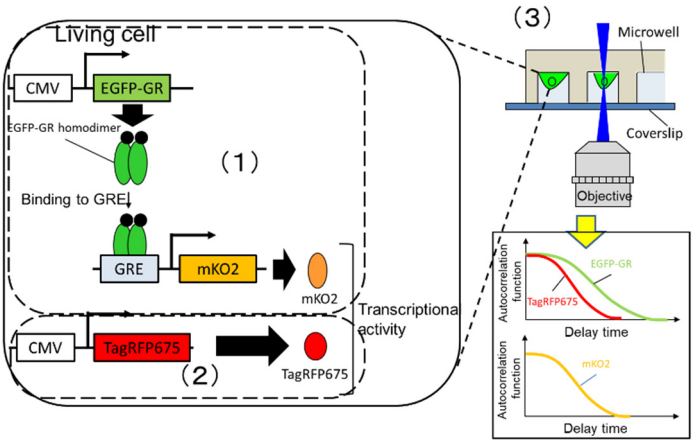


図 2.　3 色蛍光相関分光測定概説

(1) Dex 刺激により発現した GFP-GR（緑色）は GR 認識サイトに結合することで mKO2（橙色）を発現する。

(2) 対象として GFP-GR と同じプロモーターを有する TagRFP（赤色）を利用する。

(3) 細胞はマイクロウェル中で破砕し、GFP、mKO2 並びに TagRFP の相関関数を測定して濃度を算出する。

リガンドである Dex 存在下で EGFP-GR/WT 及び 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を測定し、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、転写活性は DNA との結合の強さに関連する事を明らかにした。

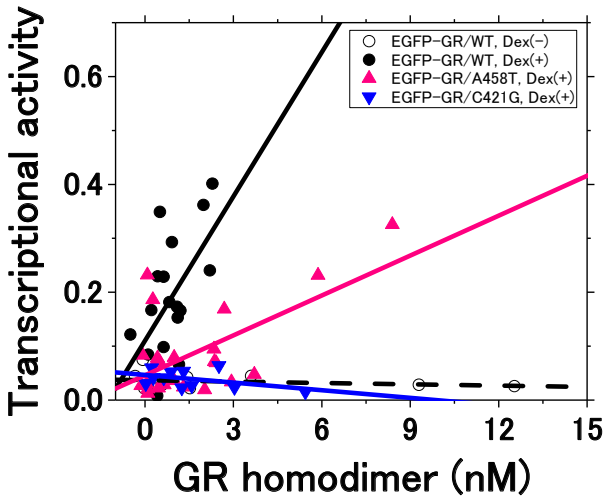


図 3.　GR2 量体化量と転写活性の相関

蛍光相関分光法で得られる 1 粒子（1 分子）あたりの蛍光強度から GR の 2 量体量を求めた。3 色蛍光相関分光測定から転写活性量を求めた。EGFP-GR/WT、EGFP-GR/A458T、EGFP-GR/C421G については図中に示した。

次に、DNA 結合能を欠損させた C421G 変異体（EGFP-GR/C421G）及びホモ 2 量体形成を欠損させた A458T 変異体（EGFP-GRA458T）についてもホモ 2 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。この事から、GR ホモ 2 量体形成は DNA との相互作用を必要とせず、A458T の変異体によって阻害される事を示した。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 2 量体の濃度をそれぞれ定量し、ホモ 2 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解析から、EGFP-GR はホモ 2 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。

FCS-microwell システムを用いて定量された GR のホモ 2 量体形成とその下流にある標的遺伝子の転写制御の関係に着目した。GR 応答性のプロモーター配列の下流に蛍光タンパク質を組み込んだプラスミドを構築し、EGFP-GRWT もしくは EGFP-GRA458T と合わせて細胞に導入した。FCS-microwell システムにより単 1 細胞由来の EGFP-GRWT もしくは EGFP-GRA458T のホモ 2 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。EGFP-GRWT 及び EGFP-GRA458T においてリガンドである Dex 処理をした細胞のみにおいてホモ 2 量体の濃度の増加につれて転写活性の増加がみられた。この結果は、ホモ 2 量体の濃度と転写活性の間の正の関係性を示唆し、細胞内のホモ 2 量体濃度の変化に応答して、ホモ 2 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ことを明らかにした。

我々の結果は GR のホモ 2 量体化量と転写活性の間に比例関係があることを示した。しかし一方では GR2 量体化量と転写活性の間には関連がないとの報告もある［3］。実際に生細胞の細胞質や核内での GR の 2 量体量尾 2 色の蛍光タンパク質を利用して測定した報告［4］では GR2 量体化の Kd は予想よりも高く、従って、生細胞内では 2 量体と単量体が同時に存在し、ダイナミックな活性調整している可能性が高い。今後は、生細胞中で、このようなタンパク質のダイナミックな様子を解き明かすことが必要になる。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、現在カロリンスカ研究所 Department of Clinical Neuroscience、Center for Molecular Medicine に所属する大浅翔博士である。

文　献

1) Oasa S, Mikuni S, Yamamoto J, Kurosaki T, Yamashita D, Kinjo M. Relationship Between Homodimeric Glucocorticoid Receptor and Transcriptional Regulation Assessed via an In Vitro Fluorescence Correlation Spectroscopy-Microwell System. Sci Rep. 2018;8(1). DOI: 10.1038/s41598-018-25393-w

2) Oasa S, Sasaki A, Yamamoto J, Mikuni S, Kinjo M. Homodimerization of glucocorticoid receptor from single cells investigated using fluorescence correlation spectroscopy and microwells. FEBS Lett [Internet]. Federation of European Biochemical Societies; 2015;589(17):2171–8. DOI: 10.1016/j.febslet.2015.07.003

3) Presman, D.M., Ogara, M.F., Stortz, M., Alvarez, L.D., Pooley, J.R., Schiltz, R.L.,Grnøtved, L., Johnson, T.A., Mittelstadt, P.R., Ashwell, J.D., Ganesan, S., Burton,G., Levi, V., Hager, G.L. and Pecci, A. Live cell imaging unveils multiple domain requirements for in vivo dimerization of the glucocorticoid receptor. PLoS Biol. 2014 Mar 18;12(3):e1001813. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001813

4) Tiwari M, Oasa S, Yamamoto J, Mikuni S, Kinjo M. A Quantitative Study of Internal and External Interactions of Homodimeric Glucocorticoid Receptor Using Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy in a Live Cell. Sci Rep. Springer US; 2017;7(1):1–16. DOI: 10.1038/s41598-017-04499-7