



生きた細胞内でグルココルチコイド受容体の分子機構を解明

ーアレルギー性疾患に向けた薬剤探索へ道を拓くー

研究成果のポイント

- ・アレルギー性疾患等に関与するタンパク質（グルココルチコイド受容体）の分子機構を細胞内で解明。
- ・グルココルチコイド受容体が細胞内のどこで・いつ二量体^[1]形成するのか，新しい分子機構を提唱。
- ・タンパク質の二量体形成を細胞内部において簡便に測定できる手法を提案。
- ・細胞内のグルココルチコイド受容体を標的に，アレルギー性疾患の薬剤探索への応用が期待される。

研究成果の概要

北海道大学の金城政孝教授らは，アレルギー性疾患の抑制に重要な役割を持つグルココルチコイド受容体（GR）の細胞内部での二量体形成などの分子動態を明らかにしました。

GRの二量体形成は，GRがゲノムDNAに結合して機能するために必須であると考えられています。従来の研究では，溶液内のGRを用いてGRの分子機構を明らかにしてきましたが，GRがまさに機能する場である細胞内部においては，GRの分子機構は明らかにされてきませんでした。本研究では，一つの細胞内部に焦点を当て，蛍光顕微鏡を用いてタンパク質同士の相互作用を解析し，GRがどこで・いつ二量体を形成するのか分子機構を提唱しました。この成果は，GRを含めた核内受容体^[2]の細胞内部での分子機構を解明するために重要な発見となるだけでなく，細胞を基盤としたGRの分子機構を標的とする薬剤探索を行い，アレルギー性疾患に対する新規薬剤の発見につながることを期待されています。

本研究は，北海道大学大学院先端生命科学研究院の細胞機能科学分野において，Manisha Tiwari 博士，大浅 翔博士研究員，金城政孝教授を中心とした研究チームにより行われたものであり，英国時間2017年6月28日にScientific Reports誌に掲載されました。

論文発表の概要

研究論文名 : A Quantitative Study of Internal and External Interactions of Homodimeric Glucocorticoid Receptor Using Fluorescence Cross-Correlation Spectroscopy. (蛍光相互相関分光法を用いたグルココルチコイド受容体のホモ二量体形成と複合体形成の定量研究)

著者 : Manisha Tiwari^{(1) § *}, 大浅 翔^{(1) §}, 山本条太郎⁽¹⁾, 三國新太郎⁽¹⁾, 金城政孝⁽¹⁾

1) 北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞機能科学分野, §) 共同筆頭著者, *) 北海道大学大学院生命科学院に在学中, 文部科学省の「国費外国人留学生の優先配置を行う特別プログラム」である「International Graduate Program, Training Program for Global Leaders in Life Science (IGP-GLLS)」の支援を受け, 本研究に従事

公表雑誌 : *Scientific Reports* (Nature publishing group)

公表日 : 英国時間 2017年6月28日(水) (オンライン公開)

研究成果の概要

(背景)

グルココルチコイド受容体 (GR) は, アレルギー性疾患の抑制に重要な役割を持つタンパク質です。GR に結合するリガンド^[3]は, 炎症作用を抑えるために臨床治療において幅広く用いられています。GR は, リガンドと結合することで, 細胞内部の局在 (タンパク質が細胞内部の特別な領域に存在すること) を細胞質^[4]からゲノム DNA が存在する核^[5]内へと変えます。核内では, 二量体を形成した GR がゲノム DNA と直接結合することによって, アレルギー性疾患の抑制に関わる遺伝子の発現を制御すると考えられています。しかしながら, これまで GR とリガンドが結合してから遺伝子の発現制御までの間の, 細胞内部における過程は不明でした。特に, ゲノム DNA と結合し, 遺伝子の発現制御に深く関与するとされている GR の二量体の細胞内部での形成についてはあまり研究が行われてきませんでした。

GR の二量体の細胞内部での形成過程を解明することは, 細胞内部での GR の二量体と遺伝子の発現制御との関係性を理解するための重要な知見となると期待されています。さらに, 細胞内部における GR の二量体形成を指標とした, アレルギー性疾患を対象とした新規薬剤の探索への応用も期待されています。

(研究手法)

緑色蛍光タンパク質 (GFP)^[6]と赤色蛍光タンパク質 (RFP)^[7]の二つをそれぞれ融合した GR (GFP-GR, RFP-GR : 図 1 (A)) をヒト骨肉腫細胞 (U2OS) に発現させます。一つの細胞の内部を計測可能な蛍光相互相関分光法^[8]という分子分光手法を用いて, 細胞内部での GR の二量体形成と, GR が相互作用するパートナータンパク質との複合体形成の両方を測定しました。さらに, 研究グループで独自に開発したシリコンチップと組み合わせた *in vitro*^[9]の単一細胞測定システムを新規に構築し (図 1 (C)), 溶液の状態での GR の二量体形成の単一細胞測定を行い, 細胞内部と溶液内での GR の二量体形成を比較しました。

(研究成果)

GFP と RFP がそれぞれ融合したグルココルチコイド受容体 (GR) の細胞内部での蛍光相互相関分光法の測定 (図 1 (B) と (D)) から, 細胞内部での GR の二量体形成を明らかにし, その形成の強弱の指

標となる結合解離定数^[10]を世界で初めて細胞内で決定しました。また、GR の DNA との結合を欠損させた変異体や二量体形成を欠損させた変異体と結合解離定数を比較することにより、GR がゲノム DNA 上でなくても二量体を形成することを明らかにしました (図 2 : (v)⇔(vii))。さらに、細胞内部での細胞質から核への移行を欠損させた変異体の実験から、細胞質内においても GR は二量体を形成することを明らかにしました (図 2 : (ii)⇔(iii))。

さらに、*in vitro* の単一細胞測定システムの実験から、GR の結合解離定数が細胞内部での結合解離定数と比較して、10 分の 1 程度に減少しました。このことは、細胞内部において GR が二量体を形成しにくくなっていることを示唆します。したがって、細胞内部の環境が GR の二量体形成を抑制する方向に働くことも明らかにしました。

(今後への期待)

本研究は、アレルギー性疾患の抑制に関与するグルココルチコイド受容体 (GR) を対象として、細胞内部でのタンパク質同士の結合の強弱の指標となる結合解離定数を世界で初めて決定しました。他の核内受容体に応用し、GR と比較することで、細胞内部での核内受容体の遺伝子の発現制御に関わる分子機構が解明されることが期待されます。さらに、細胞内のほぼすべてのタンパク質は、他のタンパク質同士などと相互作用をすることでその機能を発揮すると考えられていますが、細胞内部での結合解離定数を算出できた例は、ごくわずかです。本研究で使用した測定法は、蛍光分子を融合すれば標的とするタンパク質すべてに応用可能であり、細胞内部で簡便に測定し、細胞内部での結合解離定数を決定することが可能になります。

さらに、この測定法は、基礎研究にとどまらず、アトピー性皮膚炎を含むアレルギー性疾患を抑制する新規の薬剤探索などの研究に応用することで、臨床治療の分野における社会的な貢献が期待されます。

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究所細胞機能科学分野 教授 金城 政孝 (きんじょう まさたか)
TEL : 011-706-9006 FAX : 011-706-9045 Email : kinjo@sci.hokudai.ac.jp
ホームページ : <http://altair.sci.hokudai.ac.jp/infmcd/index.html>

[参考図]

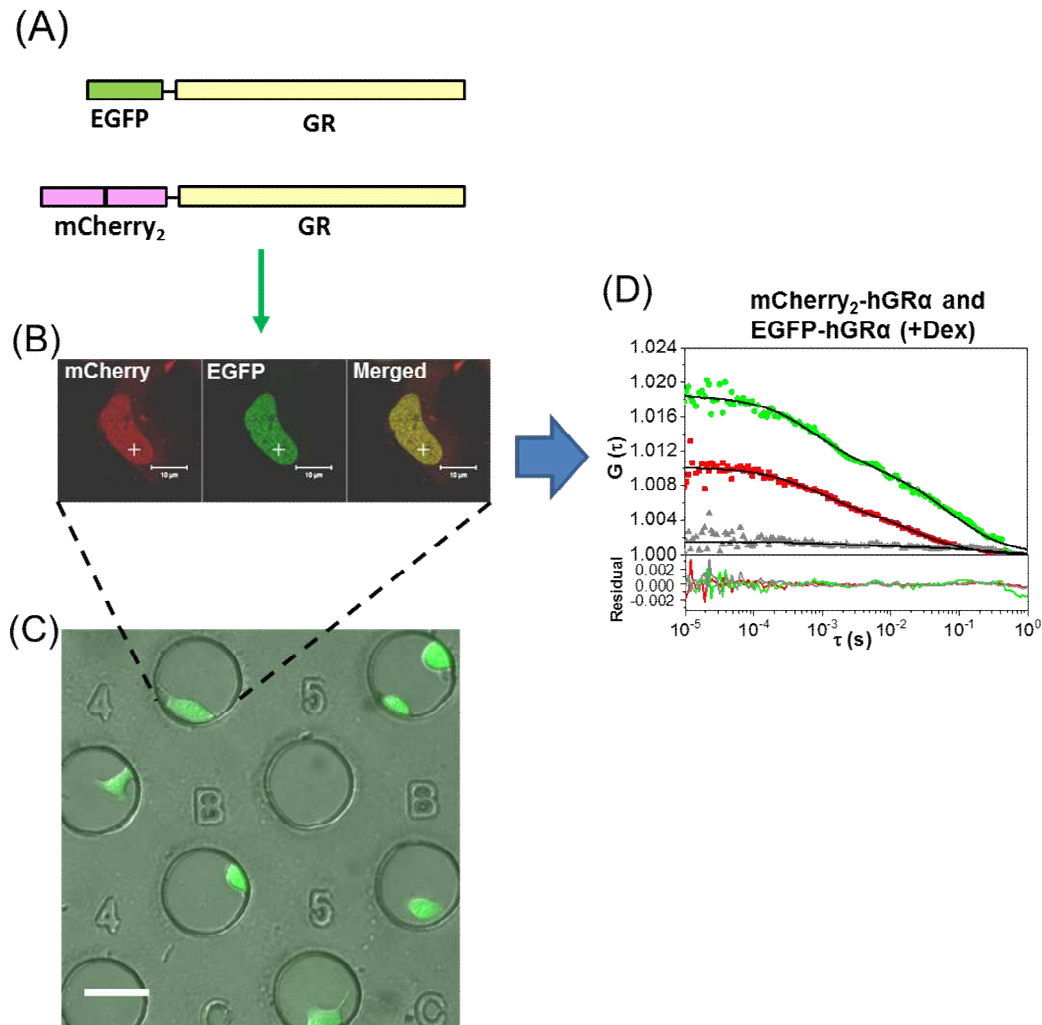


図1 細胞内部でのグルココルチコイド受容体の測定

- (A) RFPであるmCherryとGFPであるEGFPを融合させたグルココルチコイド受容体(GR)の模式図。
- (B) U2OS細胞内での発現の様子。(スケールバー: 10 μm)
- (C) 本研究で使用したシリコンチップ内に封入された単一細胞の様子。(スケールバー: 50 μm)
- (D) 図(B)で示した細胞内部で蛍光相互相関分光法(FCCS)を用いて、GRの二量体を測定した。FCCS測定法では、自己相関カーブ(グラフの上の方にある黄緑色と赤色のプロット点)と一つの相互相関カーブ(グラフの下の方にある深緑色のプロット点)が得られる。これらの三つのカーブからGRの二量体の量を求め、その結合解離定数を決定した。DexはDexamethasone(GRの合成リガンド)を指す。

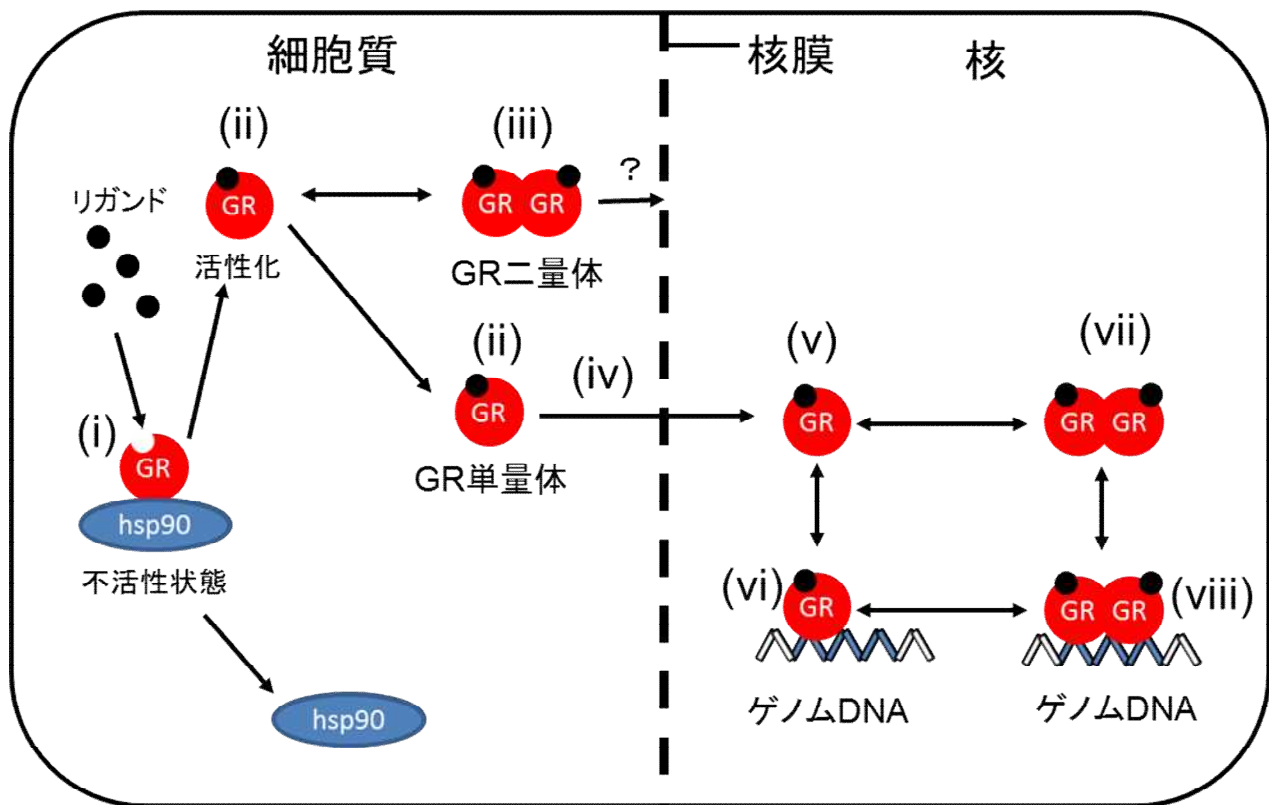


図2 本研究で提唱したグルコルチコイド受容体の分子機構モデルの概略

- (i) グルコルチコイド受容体 (GR) は不活性化状態で hsp90 などのタンパク質と結合して細胞質に局在する。
- (ii) リガンドと結合した活性化 GR。リガンドと結合することにより、hsp90 は GR から解離する。
- (iii) 細胞質にて形成した GR 二量体。GR 二量体が核膜を通過して核へ移行できるかは、研究が進んでいない。
- (iv) GR 単量体において核膜を通過し、核へ移行する。
- (v) 核内において、多くの GR は単量体として存在する。
- (vi) GR 単量体とゲノム DNA の複合体。
- (vii) 核内で形成した GR 二量体。
- (viii) GR 二量体とゲノム DNA の複合体。GR の遺伝子の発現制御に関与する。

[用語説明]

[1] 二量体

2つのユニットから構成されるタンパク質の集合体のこと。

[2] 核内受容体

グルココルチコイド受容体や性ホルモン受容体など生体内のホルモンが結合し、活性化するタンパク質。

[3] リガンド

生体内のホルモンや合成ホルモンなどの総称。

[4, 5] 細胞質と核

どちらも細胞内部の部位。細胞質では主にタンパク質が作られ、核ではゲノム DNA を介してタンパク質の設計図となる情報の保存と伝達を行う。

[6] 緑色蛍光タンパク質 (GFP)

オワンクラゲ由来の緑色の蛍光を発するタンパク質。

[7] 赤色蛍光タンパク質 (RFP)

GFP を改変し、赤色の蛍光を発するタンパク質。

[8] 蛍光相互相関分光法

微小な観察領域内の二色の蛍光分子の揺らぎから、その二色の蛍光分子の相互作用を解析する手法。

[9] *in vitro*

試験管内のもしくは生体外の、という意味。細胞から抽出したタンパク質が溶液の中に存在することを意味する。

[10] 結合解離定数

分子同士の結合の強弱を示す数値。結合解離定数が高いほど、結合が弱いことを示す。