

Gタンパク質シグナルによる
ダイオキシン受容体シグナルの抑制機構の解析

中田 飛鳥

奈良先端科学技術大学院大学
バイオサイエンス研究科 細胞内情報学講座
(伊東 広 教授)

平成 21 年 5 月 18 日 提出

目次

序論	3
三量体Gタンパク質シグナル	3
ダイオキシン受容体シグナル	4
材料と方法	9
結果	15
AIP と $G\alpha_{13}$ の相互作用の確認	15
$G\alpha_{13}$ と AIP の結合部位の探索および AhR-AIP 複合体形成への影響	15
AhR の転写活性化に対する影響	16
AhR の細胞内局在の観察	17
核内における AhR の動態の観察	17
AIP のノックダウンの影響	18
AhR のタンパク質安定性に対する影響	19
AhR の活性化が $G\alpha$ シグナルに及ぼす影響	20
考察	33
$G\alpha_{13}$ と AIP との相互作用の解析	33
Gタンパク質の活性化による AhR の転写活性に対する影響	34
Gタンパク質の活性化による AhR の細胞内局在に対する影響	35
Gタンパク質シグナルによる AhR の活性化状態への影響	35
Gタンパク質シグナルによる AhR のユビキチン化に対する影響	36
謝辞	40
参考文献	41

序論

3 量体Gタンパク質シグナル

3 量体 GTP 結合タンパク質 (G タンパク質) は、ホルモンや神経伝達物質、ケモカインなど様々な細胞外からの刺激を細胞内のシグナル分子に伝達するトランスデューサーとして機能する。G タンパク質は α 、 β 、 γ サブユニットから構成されるヘテロ 3 量体であり、細胞膜に存在する G タンパク質共役型受容体(GPCR)によって活性化される。定常状態では α サブユニット ($G\alpha$) は $\beta\gamma$ サブユニット ($G\beta\gamma$) とともに 3 量体 ($G\alpha\beta\gamma$) を形成し、 $G\alpha$ には GDP が結合している。受容体にリガンドが結合すると $G\alpha$ に結合していた GDP が解離し、細胞内に豊富に存在する GTP が結合し G タンパク質が活性化される。G タンパク質は活性化されると $G\alpha$ から $G\beta\gamma$ が解離し、それぞれ標的となるタンパク質や酵素の活性を調節することで下流にシグナルを伝達する。 $G\alpha$ は GTPase 活性を持ち GTP を GDP に加水分解することで再び不活性化状態に戻り、 $G\alpha\beta\gamma$ の 3 量体を形成する (図 1 A) (AG Gilman, 1987; Y Kaziro *et al.*, 1991)。G タンパク質は $G\alpha$ のアミノ酸配列の違いによって 4 種類のサブファミリー (G_s 、 G_i 、 G_q 、 G_{12}) に分類され (図 1 B)、サブファミリーの違いによって共役する GPCR の種類や標的となる分子が異なる。 $G\alpha_s$ はアデニル酸シクラーゼを活性化し cAMP の産生を引き起こし、反対に $G\alpha_i$ はアデニル酸シクラーゼを抑制する。また $G\alpha_q$ はホスホリパーゼ C β を活性化することでイノシトール 3 リン酸とジアシルグリセロールの産生を促進し細胞内カルシウム濃度の上昇や PKC の活性化を引き起こし、 $G\alpha_{12}$ は細胞骨格の制御に関わる低分子量 GTP 結合タンパク質 Rho の活性化を制御する。

$G\alpha_{12}$ ファミリーは最後に発見されたサブファミリーであり、哺乳類では $G\alpha_{12}$ と $G\alpha_{13}$ が存在する。どちらも広範な組織に発現し、リゾホスファチジン酸 (LPA) やスフィンゴシン 1 リン酸 (S1P)、トロンビンなどのリガンドによって活性化される。 $G\alpha_{12}$ ファミリーの下流の分子として 3 種類の Rho を活性化するグアニンヌクレオチド交換因子 (RhoGEF : p115 Rho GEF、PDZ-RhoGEF、Leukemia-associated RhoGEF) がよく知られている (H Chikumi *et al.*, 2002; T Kozasa *et al.*, 1998; N Suzuki *et al.*, 2003)。RhoA の活性化はアクチン骨格制御だけでなく、細胞極性形成や細胞遊走、細胞増殖に関与することが報告されて

いる。また $G\alpha_{12}$ ファミリーは cadherin (TE Meigs *et al.*, 2001)や protein phosphatase 5 (PP5) (Y Yamaguchi *et al.*, 2002)など RhoGEF 以外の分子とも直接相互作用することが報告されている。 $G\alpha_{12}$ と $G\alpha_{13}$ はアミノ酸レベルで 67%の相同性があり、共役する受容体も共通するものが多い。しかしながら、 $G\alpha_{12}$ と $G\alpha_{13}$ では結合する分子に特異性のある分子も報告されている(H Kurose, 2003)。例えば、Hsp90 や RasGAP1 などは $G\alpha_{12}$ に特異的に結合し、PYK2 や AKAP110 は $G\alpha_{13}$ と特異的に結合する。また、 $G\alpha_{13}$ のノックアウトマウスは胎生致死であるのに対し、 $G\alpha_{12}$ のノックアウトマウスは生まれてくることから $G\alpha_{12}$ と $G\alpha_{13}$ の生理的に異なる役割を担っていると考えられるが、未だ不明な点が残されている。

ダイオキシン受容体シグナル

代表的な内分泌攪乱物質であるダイオキシンは、肝臓毒性や生殖障害、神経毒性、免疫障害、発ガンプロモーション、催奇性など様々な生体毒性を引き起こすことが報告されており、これらの毒性には生体内の広範な組織において発現するダイオキシン受容体 (AhR: aryl hydrocarbon receptor) が関与している(J Mimura & Y Fujii-Kuriyama, 2003; J V Schmidt & C A Bradfield, 1996)。AhR は N 末側に basic-Helix-Loop-Helix (bHLH)モチーフと PAS (Per-Arnt-Sim)ドメインを持つ bHLH-PAS スーパーファミリーに属する転写因子である (図 3A)。定常状態では AhR は Hsp90 や p23、AIP (AhR interacting protein) と複合体を形成している。リガンドであるダイオキシン類と結合することで AhR は活性化し、核内へと移行する。核内において構造的に類似した Arnt (AhR nuclear translocator) とヘテロ 2 量体を形成する。AhR は P450 など脂質薬物代謝に関わる酵素遺伝子のプロモーター領域に存在する XRE (Xenobiotic response element) 配列に結合し転写を活性化する (図 2)。Arnt との二量体化および DNA 配列への結合には bHLH モチーフと PAS ドメインが関与する。またリガンドとの結合には PAS ドメインが関与し、細胞質における Hsp90 や AIP との結合部位も PAS ドメインに存在することが明らかになっている (K Kawajiri & Y Fujii-Kuriyama, 2007)。

AhR は TCDD (2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin)などのダイオキシン類やポリ塩化ビニル (PCB)、タバコの煙などに含まれる B[α]P (benzo α pyrene)や発ガン物質である 3-MC (3-methylcholanthrene)など様々な物質によって転写活性化が引き起こされる。最も毒性の高い TCDD は生体内では代謝されにくく、そのため体内に蓄積し AhR の標的遺伝子である P450 などの薬物代謝酵素遺伝子の転写を過剰に活性化することで内分泌攪乱作用が起こると考えられている。

AhR 遺伝子は脊椎動物だけでなくショウジョウバエや線虫など無脊椎動物にも存在する(図 3 B)。脊椎動物の AhR とは異なり、ショウジョウバエや線虫の AhR はダイオキシンとの結合能を持たないことから、ダイオキシンに対する応答以外の生理的な役割が示唆される(ME Hahn, 2002)。また AhR 遺伝子を欠損するとショウジョウバエにおいては神経細胞の樹状突起の形成異常が、マウスでは肝臓や免疫系器官の形成異常や卵巣における女性ホルモンの合成阻害による産仔数の減少などが見られることから、発生段階において重要な役割を担っていることが示唆されている。(T Baba *et al.*, 2005; P Fernandez-Salguero *et al.*, 1995; R Robles *et al.*, 2000; JV Schmidt *et al.*, 1996; TS Thurmond *et al.*, 2000)。しかしながら内在性リガンドが同定されておらず、生理的な役割は未だよく分かっていない。

細胞質において AhR と複合体を形成する分子として同定された AIP は 3つの研究グループによって同定され、それぞれ AIP (Q Ma & JP Whitlock, Jr., 1997)、XAP2 (hepatitis B virus X-associated protein 2) (BK Meyer *et al.*, 1998)、ARA9 (Ah Receptor-associated protein 9) (LA Carver & CA Bradfield, 1997)と呼ばれている。AIP は N 末側に FKBP (FK506 binding protein)ドメインと C 末端側にタンパク質相互作用に関わる TPR (tetratricopeptide repeat) モチーフが存在する (図 4 A)。FKBP ドメインは FK506 と結合しペプチジルプロリルイソメラーゼ (PPIase)活性をもつ FKBP タンパク質ファミリーと相同性の高いドメインであるが、AIP の N 末側は PPIase の活性中心にあたる配列が欠失しており PPIase 活性がない(A Laenger *et al.*, 2009)。C 末端側の TPR モチーフは AhR と Hsp90 との相互作用に関わる部位である(BK Meyer *et al.*, 2000; JR Petrulis & GH Perdew, 2002)。

AIP の過剰発現は AhR のユビキチン化および AhR タンパク質の

分解を抑制すること(A Kazlauskas *et al.*, 2000)、反対に AIP に対するアンチセンスオリゴヌクレオチドの導入によって AIP の発現量を抑制すると AhR タンパク質の分解が促進されること(MJ Lees *et al.*, 2003)から AIP は AhR の安定性に関与することが示唆されている。さらに、AIP の C 末側の TPR モチーフに点変異を導入した変異体の過剰発現では AhR の分解を阻害できなかったこと(BK Meyer *et al.*, 2000)、PP5 (protein phosphatase 5)の TPR のドメインを過剰発現させると AhR の分解が促進されたことから(BK Meyer *et al.*, 2000)、AIP の TPR モチーフが AhR のタンパク質安定性に関与することが示唆されている。また、AIP は AhR の NLS (nuclear location signal) と importin β の相互作用を阻害することで AhR を細胞質に局在させることが報告されている(JR Petrusis *et al.*, 2003)。

AIP の発現を抑制したマウスは AhR ノックアウトマウスで起こる肝臓の血管形成不全が見られるが(BC Lin *et al.*, 2008)、AIP ノックアウトマウスは心臓の血管形成不全による胎生致死である(BC Lin *et al.*, 2007)。AIP ノックアウトマウスは AhR ノックアウトマウスとは異なる表現型を示すことから、AIP には生体内において AhR の制御以外の役割があることが示唆されている。実際に AIP は AhR だけでなく、グルココルチコイド受容体や PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptor- α)や甲状腺ホルモン受容体 (thyroid hormone receptor β 1: TR β 1) など他の核内受容体と結合し、その活性に影響を及ぼすことが報告されており(MS Froidevaux *et al.*, 2006; A Laenger *et al.*, 2009; WK Sumanasekera *et al.*, 2003)、さまざまな核内受容体シグナルを制御する重要な分子であることが考えられる。また AIP は核内受容体だけでなく、ホスホジエステラーゼと結合し、この結合により AhR の核移行や標的遺伝子の転写活性化が抑制されることが報告されている(SK de Oliveira *et al.*, 2007; SK de Oliveira & A Smolenski, 2009)。また、ヒトの下垂体腺腫において AIP の変異が報告されており(L Cazabat *et al.*, 2009; O Vierimaa *et al.*, 2006)、ヒトにおいても AhR 結合分子以外の機能が存在することが示唆されている。

私は、酵母ツーハイブリッド法を用いた G α ₁₃ 結合分子の探索を行い、AIP が G α ₁₃ と結合することを発見した。さらに AhR の DNA 結合配列 (XRE 配列) を用いたレポーターアッセイにより、G タンパク質の活性化が AhR を介した転写活性化を抑制する可能性を見出した。本研究では、

AIP と $G\alpha_{13}$ の結合様式の解析を行い、また AhR の細胞内局在やタンパク質安定性に着目し、G タンパク質の活性化による AhR を介した転写活性化の抑制のメカニズムの解析を行った。

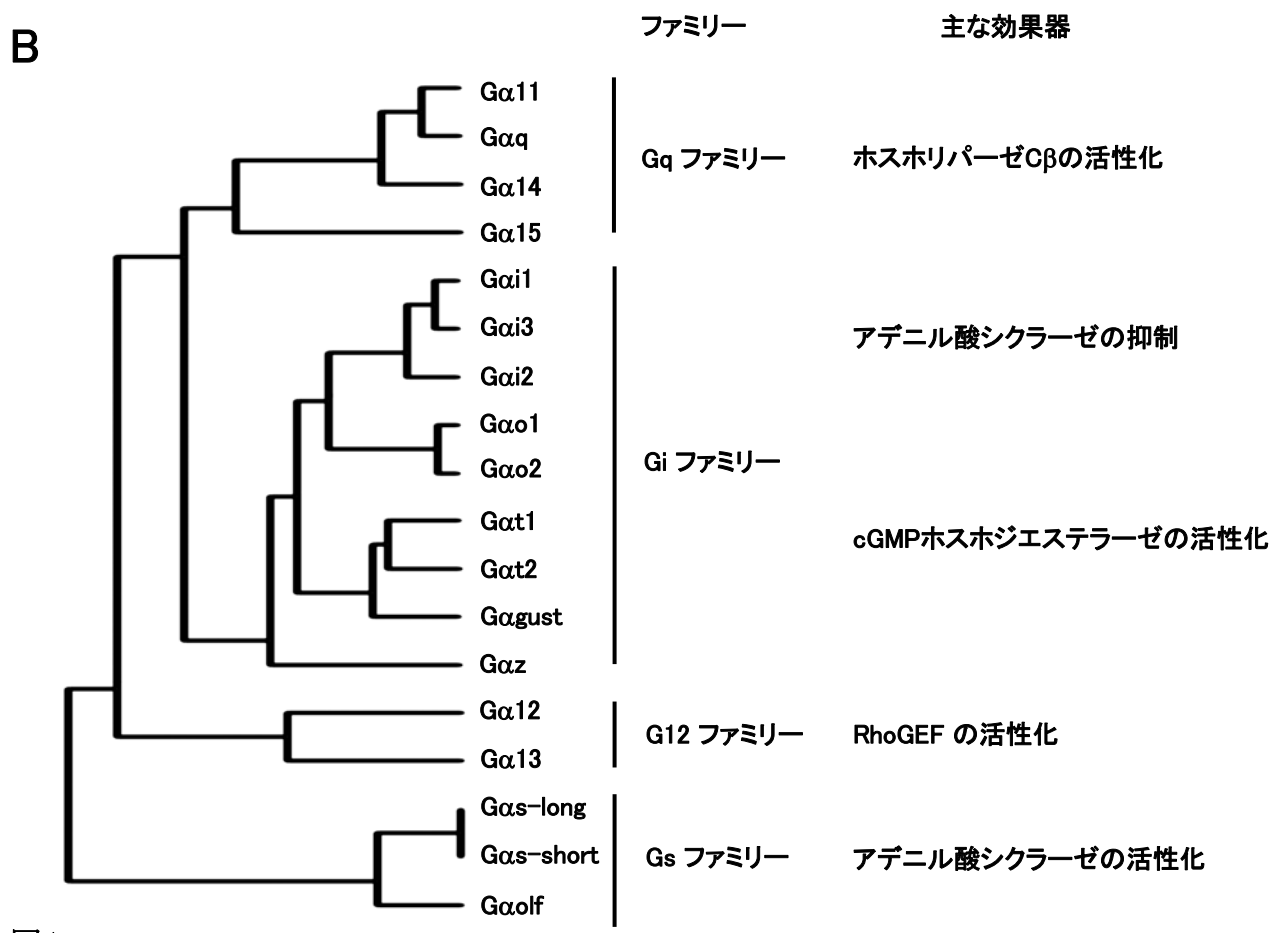
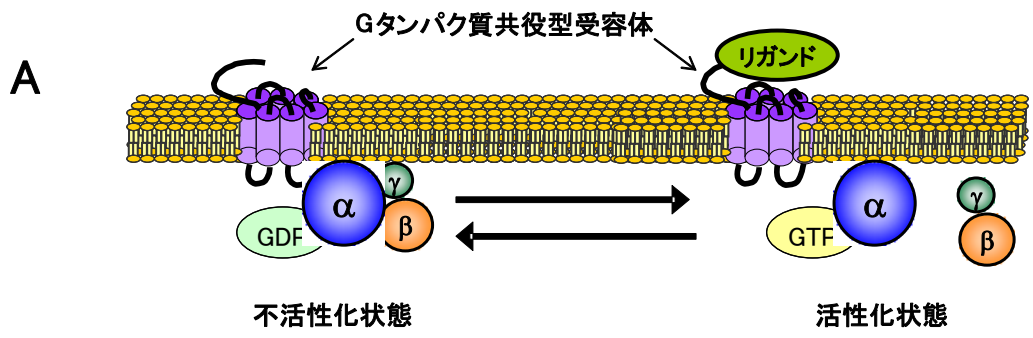


図1

- A) 3量体Gタンパク質の活性化サイクル
 定常状態では、GDP型のGαサブユニットはGβγサブユニットとともにヘテロ3量体を形成する(不活性化状態)。受容体にリガンドが結合すると、GαサブユニットGDP/GTP交換反応がおこり、Gβγから解離する(活性化状態)。GTP型Gαサブユニットは自身のGTPase活性によってGTPをGDPに加水分解し再びGDP型になる。
- B) ヒトGタンパク質αサブユニット(Gα)の分子系統樹の分類
 ヒトGαのアミノ酸配列を基に分子系統樹を作成した。それぞれのGαをファミリーに分類し、代表的な効果器を表記した。

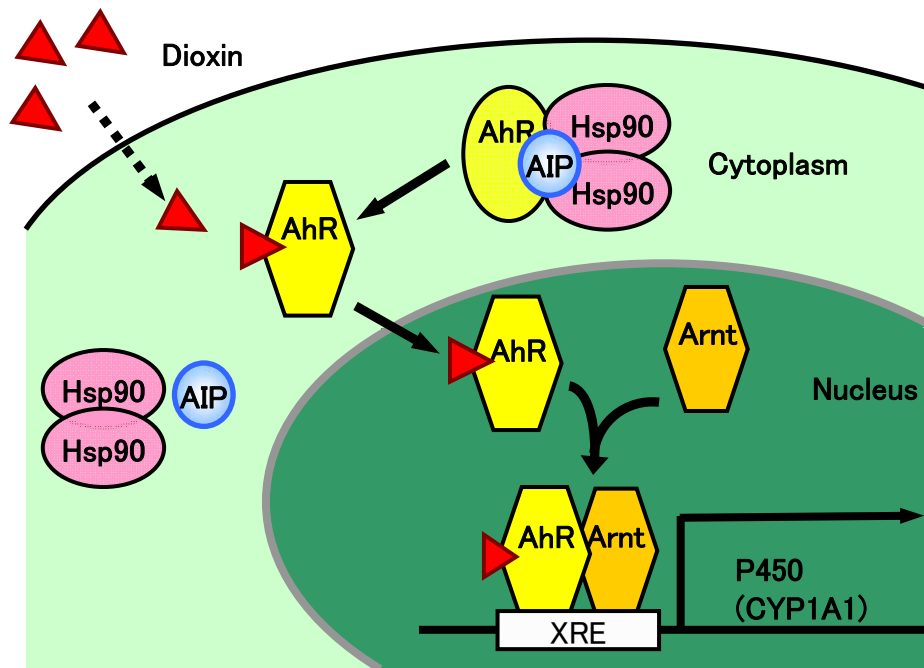


図2

ダイオキシン受容体 (AhR) シグナル

細胞質ではAhRはAIPと2分子のHsp90とともに複合体を形成する。ダイオキシン類が結合すると、AhRは複合体から解離し、核内へ移行する。核内においてArntとヘテロ2量体を形成し、標的遺伝子のプロモーター配列に結合し転写因子として機能する。

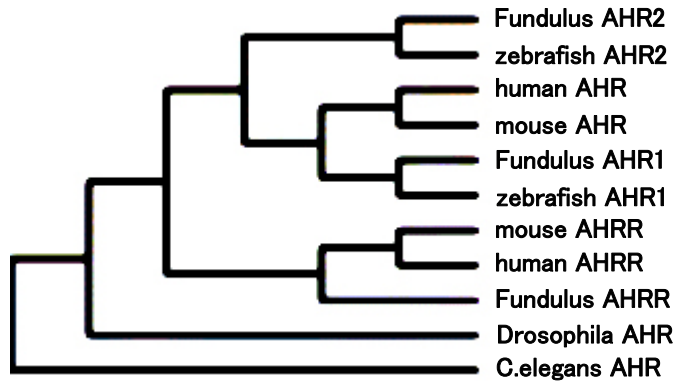
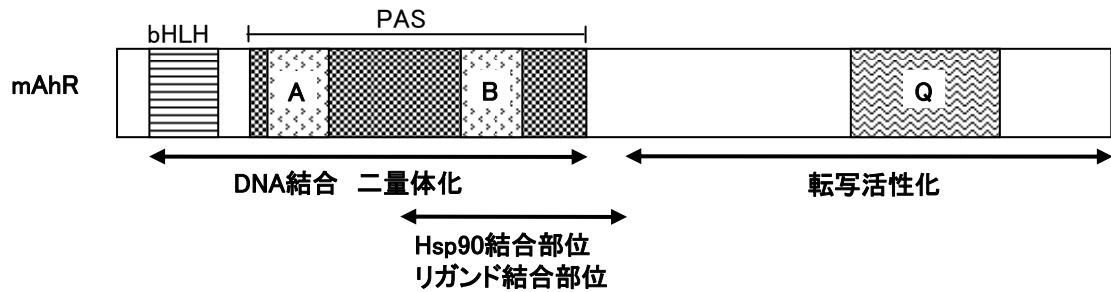


図3

- A) AhRのドメイン構造
 N末端側にbHLH(basic Helix-Loop-Helix)モチーフとPAS (Per-Arnt-Sim)ドメインが存在する。
 C末側の転写活性化部位にはグルタミンに富んだ領域(Q)が存在する。
- B) AhRの進化系統樹
 AhRはAhR1、AhR2の他にAhRに対して抑制的に機能するAhRR(AhR repressor)
 などのホモログが存在し、無脊椎動物からヒトにいたるまで広く保存されている。

材料と方法

細胞培養と遺伝子導入

実験にはヒト胎児腎由来 HEK293T 細胞とアフリカミドリザル腎由来 COS-7 細胞、マウス肝ガン由来 Hepa 1c1c7 細胞を用い、10% ウシ胎仔血清 (FBS) と 100 units/ml ペニシリン、100 μ g /ml ストレプトマイシンを含むダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM) を使用し、37°C 5% CO₂ 条件下で培養した。

HEK293T 細胞と COS-7 細胞はリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションを行った。Hepa 1c1c7 細胞のトランスフェクションには Lipofectamine 2000 (Invitrogen)を用いた。

組換えタンパク質の作製

G α_{13} は Sf9 細胞にバキュロウイルスを感染させる系で発現させた。発現ウイルス、発現条件及び精製条件は既報に従った(WD Singer *et al.*, 1994)。GST-AIP の調製方法は以下のとおりである。pET-42a ベクター (Novagen) に組み込んだ AIP-F(全長)と AIP-N (N 末側)、AIP-C (C 末側)を大腸菌株 BL21(DE3)pLysS に導入した後、1 mM IPTG を加えた培地を用いて 30°C で 3 時間培養し発現を誘導した。大腸菌を凍結融解した後、extraction buffer (50 mM Tris-HCl (pH 7.5)、5 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 mM PMSF、1 μ g/ml leupeptin、1 mM EDTA) で懸濁し、1 mg/ml のリゾチームを加え氷上で 10 分間静置した。その後、ソニケーションで菌体を破碎し、100,000 x g で 40 分間遠心し、上清を回収した。glutathione Sepharose 4B (GE Healthcare)を上清に加え、4°C で 4 時間攪拌した。レジン extraction buffer で 5 回洗浄した後、elution buffer (50 mM Tris-HCl (pH 8.0)、2 mM MgCl₂、1 mM DTT、1 mM PMSF、1 μ g/ml leupeptin、20 mM glutathione)を用いて溶出した。

In vitro binding assay

10 pmol の GST-AIP または AIP-N、AIP-C を 10 μ l の glutathione Sepharose 4B とともに 200 μ l の Buffer Av (10 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、1 mM DTT、150 mM NaCl、1 mM PMSF、1 μ g/ml leupeptin) に加え、4°C でインキュベートし、GST 融合タンパク質を glutathione Sepharose 4B に結合させた。Buffer Av で 3 回洗浄の

後、*In vitro* binding assay に用いた。100 pmol の $G\alpha_{13}$ と $G\beta\gamma$ を 10 μ M GDP または 100 μ M GTP- γ S を含む 200 μ l の Buffer Gv (50 mM HEPES-NaOH (pH 8.0)、1 mM EDTA、3 mM DTT、0.05% ルブロール PX、10 mM $MgSO_4$ 、1 mM PMSF、1 μ g/ml leupeptin) で 30 °C 2 時間のインキュベーションを行った。その前処理を行った $G\alpha_{13}$ と前述の GST-AIP と結合した glutathione Sepharose 4B とを混ぜ合わせた後、4°C で 3 時間インキュベートした。Buffer Gv で 3 回洗浄した後、glutathione Sepharose 4B と共沈したタンパク質を SDS-PAGE で分離し、抗 $G\alpha_{13}$ 抗体と抗 GST 抗体でウエスタンブロッティングを行った。

免疫沈降法

HEK293T 細胞に pCMV5-Myc-AIP と pCMV5-2HA-AhR、pCMV5- $G\alpha_{13}Q226L$ (pCMV5- $G\alpha_{13}QL$) をトランスフェクションした。トランスフェクション後 48 時間で細胞を回収し、細胞を lysis buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)、3 mM $MgCl_2$ 、100 mM NaCl、1 mM DTT、1 mM Na_3VO_4 、10 mM NaF、20 mM β -glycerophosphate、1 mM PMSF、1 μ g/ml leupeptin、1 mM EGTA、0.5% ルブロール PX) で溶解した。細胞抽出液から 1 μ g の抗 HA 抗体 (12CA5, Roche Diagnostics) と 10 μ l の protein G Sepharose (GE Healthcare) を用いて免疫沈降を行い、共沈したタンパク質を抗 Myc 抗体 (9E10, Babco) と抗 AhR 抗体 (SA-210, BIOMOL) を用いてウエスタンブロッティングを行いそれぞれのタンパク質を検出した。

レポーターアッセイ

COS-7 細胞および Hepa 1c1c7 細胞に pCMV5-2HA-AhR と pBOS-GST-Arnt、pCMV5- $G\alpha_{13}QL$ 、pBOS-XRE-luc、pEF-RL をトランスフェクションし、1 μ M 3-MC と 10 μ M LPA (Sigma-Aldrich) で 24 時間刺激した。レポーターアッセイは Dual Luciferase Reporter assay system (Promega) を用い、Firefly luciferase と Renilla luciferase による発光を 1420 ARVO マルチラベルカウンター (PerkinElmer Japan) を使用して測定した。Firefly luciferase による発光量を Renilla luciferase による発光量で割ってルシフェラーゼ活性とした。レポーター遺伝子と空ベクターのみを導入し、刺激なしの細胞溶解液のルシフェラーゼ活性を 1 として各条件の活性を相対値で示した。

Real-Time PCR

Hepa 1c1c7 細胞に pCMV5-2HA-AhR と pBOS-GST-Arnt、pCMV5-G α ₁₃QL をトランスフェクションし、1 μ M 3-MC で 12 時間刺激した。細胞からの RNA の抽出は TRIzol (Invitrogen) を用い、説明書の指示に従って行った。cDNA の合成は Superscript III First strand synthesis system (Invitrogen) を用いて行った。RNA (3 μ g) と Oligo dT primer (TOYOBO)、0.5 mM dNTP に DEPC 処理水を加えて 13 μ l に調整し、65°C で 5 分間加熱した後、氷上で 1 分以上冷却した。反応液に 5 x 1st-strand buffer を 4 μ l、0.1 M DTT と RNase OUT ribonuclease inhibitor (Invitrogen)、Superscript III RT をそれぞれ 1 μ l ずつ加えて 20 μ l とした。溶液を 50°C で 1 時間加熱の後、70°C で 15 分加熱した。合成された cDNA (1 μ l) を使用し、LightCycler480 Probes Master (Roche Diagnostics) を用いて Real time PCR を行った。Real time PCR に使用したプライマーと TaqMan プローブは以下のとおりである。

CYP1A1 :

Forward primer 5'-TCA AAG AGC ACT ACA GGA CAT TTG-3'

Reverse primer 5'-GGG TTG GTT ACC AGG TAC ATG AG-3'

TaqMan probe 5'-AAGGGCCACATCCGGGACATCA-3' (FAM)

β -actin:

Forward primer 5'-GACAGGATGCAGAAGGAGATTACTG-3'

Reverse primer 5'-GCTGATCCACATCTGCTGGAA-3'

TaqMan probe 5'-ATCAAGATCATTGCTCCTCCTGAG-5' (VIC)

反応条件は 95°C で 3 分間加熱した後、95°C で 15 秒間と 55°C で 1 分間の two-step PCR を 50 サイクル行った。PCR 産物の解析は Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) にて行った。

siRNA によるノックダウン

マウス AIP に対する 3 種類の small interfering RNA (siRNA) とコントロールとして firefly luciferase に対する siRNA は Thermo Scientific 社 (Dharmacon) より購入した。それぞれの配列は以下のとおりである。

Control siRNA (luciferase)

CGUACGCGGAUACUUCGA

Mouse AIP

CAAUGAAGGCUCCGUUAUA
GAGAGUUGCCGGACUUUCA
CCUCCAUCCUCAACAAGUA

Hepa1c1c7 細胞 (1×10^5 個) を ϕ 35 mm ディッシュに播き siRNA (最終濃度 50 nM) を lipofectamine2000 を用いてトランスフェクションを行った。トランスフェクションから 48 時間後に $1 \mu\text{M}$ 3-MC で刺激し実験に用いた。

細胞免疫染色

COS-7 細胞に pBOS-HA-AhR と pBOS-GST-Arnt、pCMV5-FLAG-G α_{13} QL をリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション後 24 時間経ったところで、 $1 \mu\text{M}$ 3-MC と $10 \mu\text{M}$ LPA を含む DMEM 培地に交換し、さらに 24 時間刺激した後に細胞を 4% PFA で固定した。0.1% Triton X-100 で細胞膜を透過処理した後、抗 HA 抗体と Alexa 488 標識された抗マウス IgG 抗体 (Molecular Probes) を用いて染色した。

核抽出液の調製

COS-7 細胞に pCMV5-2HA-AhR と pBOS-GST-Arnt、pCMV5-G α_{13} QL をトランスフェクションした。トランスフェクション後 24 時間で無血清培地に交換し、12 時間インキュベーションした後、 $1 \mu\text{M}$ 3-MC と 100 nM LPA を含む培地で 3 時間刺激した。細胞を Buffer A (10 mM HEPES-KOH (pH 7.8)、10 mM KCl、0.1 mM EDTA、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin、0.1%NP-40) で溶解した。細胞抽出液を $2,000 \times g$ で 2 分間遠心し、核を分離した。核画分を Buffer C (50 mM HEPES-KOH (pH 7.8)、420 mM KCl、0.1 mM EDTA、5 mM MgCl₂、2% グリセロール、1 mM DTT、0.5 mM PMSF、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinin、2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatin、0.1%NP-40) で再懸濁した後、4°C で 30 分間攪拌した。懸濁液を $15,000 \times g$ で 15 分間遠心し核抽出液を調製した。

GST pull-down assay

前述のとおり、COS-7 細胞から調製した核抽出液を用いて GST

pull down assay を行った。核抽出液を lysis buffer で 10 倍に希釈した後、glutathione Sepharose (GE Healthcare) 10 μ l を加え、4°C で 1 時間攪拌した。遠心により沈降したレジンを lysis buffer で洗浄したのち、40 mM glutathione を含む lysis buffer を加えた。溶出したサンプルは抗 AhR 抗体と抗 GST 抗体(B-14, Santa Cruz Biotechnology)を用いたウエスタンブロットティングに供した。

ゲルシフトアッセイ

2 本のオリゴヌクレオチドプローブ (5'-GAT CCG GCT CTT GTC ACG CAA CTC CGA GCT CA-3' と 5'-GAT CTG AGC TCG GAG TTG CGT GAG AAG AGC CG-3') をアニーリングし、T4 ポリヌクレオチドキナーゼ (TOYOBO) と [γ - 32 P]ATP を用いて標識した。前述のとおり、COS-7 細胞から調製した核抽出液と 3 μ g の poly (dI-dC) (GE Healthcare)、 [32 P] 標識したプローブ (2 x 10⁴ cpm) を 25 μ l の binding buffer (10 mM HEPES-KOH (pH 7.8)、1 mM EDTA、5 mM MgCl₂、10% グリセロール、50 mM KCl)に加えて 25°C で 20 分インキュベートした。4.5%ポリアクリルアミドゲルと 0.5 x TGE (12.5 mM Tris、95 mM glycine、0.5 mM EDTA)を泳動バッファーに用いて電気泳動を行い、タンパク質 - DNA 複合体を分離し、オートラジオグラフィーで検出した。タンパク質-DNA 複合体に含まれる AhR と Arnt を調べる際には、抗 AhR 抗体と抗 Arnt 抗体を反応液に加え、抗体を含まないサンプルの結果との比較を行った。

ユビキチンアッセイ

ユビキチンアッセイに関しては Treier らの方法に従った (M Treier et al., 1994)。pCMV5-Myc-AIP と pCMV5-2HA-AhR、pCMV5-G α ₁₃QL、His6-ubiquitin をトランスフェクションした HEK293T 細胞を 1 ml の Urea lysis buffer (8 M urea、0.1 M NaH₂PO₄、10 mM Tris-HCl (pH 8.0)、10 mM imidazole、10%グリセロール、0.1% Triton X-100、0.5 M NaCl、10 mM β -mercaptoethanol) に溶解した。細胞抽出液を室温で 15,000 rpm、10 分間遠心し、得られた上清に Ni-NTA agarose (QIAGEN)を加えて 4 時間攪拌した。20 mM imidazole を含む Urea wash buffer でレジンを洗浄した後、elution buffer (200 mM imidazole、5%SDS、0.15 M Tris-HCl(pH 6.7)、30% グリセロール、0.72

M β -mercaptoethanol) で溶出した。溶出したタンパク質は抗 AhR 抗体を用いてウエスタンブロッティングで解析した。

パルスチェイス法

HEK293T 細胞に pCMV5-2HA-AhR、pCMV5-G α_{13} QL をトランスフェクションした。トランスフェクション後 36 時間経ったところで、メチオニンとシステインを含まない培地に交換し、37°C 5% CO₂ 条件下で 30 分間培養した。 [³⁵S] 標識されたメチオニンとシステインを含む培地に交換し、37°C 5%CO₂ 条件下で 1 時間培養した後、非放射性のメチオニンとシステインを含む培地に交換した。培地交換から 1、2、3、4 時間後にそれぞれ細胞を 500 μ l の RIPA(-SDS) buffer(10 mM Tris-HCl (pH7.5)、150 mM NaCl、5 mM EDTA、1% Triton X-100、1% deoxycholate)で回収した。抗 HA 抗体を用いて [³⁵S] 標識された AhR を免疫沈降し、SDS-PAGE によって分離し、オートラジオグラフィーで検出した。

細胞内カルシウム濃度の測定

細胞内カルシウム濃度は Fura 2 acetoxymethyl ester (Fura 2-AM) (DOJINDO)を用いて測定した。Hepa 1c1c7 細胞を ϕ 10 mm ディッシュで培養し、suspension buffer (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 140 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 1.8 mM CaCl₂, 0.8 mM MgCl₂, 5.6 mM glucose)で回収した。細胞数が 2 x 10⁶/ml になるように suspension buffer で希釈した後、Fura 2-AM を最終濃度が 2 μ M になるように細胞懸濁液に加えた。この際に 3-MC 処理を行う細胞には最終濃度が 1 μ M になるように 3-MC を加えた。チューブを遮光し 30°C で 30 分間インキュベートした。細胞を suspension buffer で 3 回洗浄した後、細胞数が 2 x 10⁶/ml になるように suspension buffer で懸濁し、そのうち 400 μ l を測定に用いた。

蛍光測定は分光蛍光光度計 F-2000 (Hitachi)を用いて行った。測定は 37°C で行い、100 μ M LPA で細胞を刺激した。

結果

AIP と $G\alpha_{13}$ の相互作用の確認

新規 $G\alpha_{13}$ 結合タンパク質を探索するために、 $G\alpha_{13}$ 活性型変異体 ($G\alpha_{13}Q226L$) をベイトとし、マウス脳 cDNA ライブラリー (8.8×10^6 個のクローン) に対して酵母ツーハイブリッドスクリーニングを行い、AIP を単離した。 $G\alpha_{13}$ と AIP の直接の相互作用を確認するために、それぞれの組換えタンパク質を作製し、*In vitro pull-down assay* を行った (図 4 B)。その結果、AIP は GTP 型 $G\alpha_{13}$ および GDP 型 $G\alpha_{13}$ のいずれにも同様に結合した。この結果から AIP との結合に $G\alpha_{13}$ の GTP/GDP 依存性はないことが分かった。さらに GDP 型 $G\alpha_{13}$ に $G\beta\gamma$ を加えると AIP と $G\alpha_{13}$ の結合が阻害された。このことから 3 量体 $G\alpha\beta\gamma$ には AIP は結合できず、 $G\beta\gamma$ から解離した $G\alpha_{13}$ に結合することが明らかになった。また $G\alpha_{13}$ 以外の $G\alpha$ との結合を調べた (図 4 C)。その結果、 $G\alpha_{13}$ と $G\alpha_q$ と結合し、 $G\alpha_s$ と $G\alpha_{i1}$ とは結合しないことが分かり、AIP と $G\alpha$ の結合に特異性があることが明らかとなった。

$G\alpha_{13}$ と AIP の結合部位の探索および AhR-AIP 複合体形成への影響

次に AIP の $G\alpha_{13}$ 結合部位を同定するために、AIP の N 末端側の FKBP ドメインと C 末端側の TPR ドメインを保持する AIP の欠失変異体を作製し (図 3 A)、これらの AIP 変異体の組み換えタンパク質を用いて *In vitro pull-down assay* を行った (図 5 A)。その結果、AIP の N 末端側欠失変異体、C 末端側欠失変異体の両方が $G\alpha_{13}$ と結合することが分かった。AIP の TPR ドメインは AhR との相互作用に関わることが知られている (GL Blatch & M Lassle, 1999)。 $G\alpha_{13}$ も AIP の TPR ドメインと結合することから、 $G\alpha_{13}$ が AIP と AhR の相互作用に影響を与える可能性が考えられた。そこで細胞内における AhR と AIP の相互作用に対する $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現の影響を調べた。(図 5 B)。まず HEK293T 細胞に Myc タグをつけた AIP (Myc-AIP) と HA-タグをつけた AhR (HA-AhR) を過剰発現させ、抗 HA 抗体で免疫沈降を行った。その結果、HA-AhR とともに Myc-AIP が共沈することを確認した (図 5 B, lane 7)。さらに $G\alpha_{13}QL$ を過剰発現させると、共沈する Myc-AIP の量が減少した (図 5 B, lane 8)。HEK293T 細胞内において、AhR は AIP と相互作用し、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によってその相互作用が阻害されることが示された。

AhR の転写活性化に対する影響

AhR は細胞質において AIP や Hsp90 と複合体を形成し、この複合体の形成がリガンドに応答した転写活性化に重要であることが報告されている(BK Meyer *et al.*, 1998)。G α_{13} QL の過剰発現が AhR と AIP の相互作用を阻害することから、G α_{13} の活性化が AhR の転写活性化に影響を及ぼす可能性が考えられた。そこで AhR の DNA 結合配列 (XRE 配列) を含むレポーター遺伝子を用いたレポーターアッセイを行い、AhR の転写活性化について実験を行った。まず HA-AhR と GST-Arnt を過剰発現させた COS-7 細胞において、AhR のリガンドである 3-MC が XRE ルシフェラーゼ活性を促進することを確認した(図 6A)。その条件で G α_{13} QL の共発現を行うと、ルシフェラーゼ活性が顕著に低下した (図 6A)。G α_{13} の活性化は p115 RhoGEF を介して低分子量 GTP 結合タンパク質である Rho A の活性化を引き起こす。G α_{13} QL の過剰発現による 3-MC 刺激依存的なルシフェラーゼ活性の抑制に RhoA の活性化が関与するかどうか調べるために、RhoA の活性型変異体 Rho A G14V (Rho V)の共発現を行ったが、Rho V の共発現では G α_{13} QL の共発現でみられるようなルシフェラーゼ活性の抑制は見られなかった (図 6B)。これらの結果から G α_{13} QL の過剰発現によって引き起こされるルシフェラーゼ活性の抑制は RhoA 非依存的であることが示唆された。

次に内在性の AhR の転写活性化に対する G タンパク質シグナルの影響を調べるために、内在的に AhR を高発現する細胞株であるマウス肝ガン由来 Hepa 1c1c7 細胞を用いてレポーターアッセイを行った。図 7A に示すとおり、内在性の AhR によるルシフェラーゼ活性に対しても G α_{13} QL の過剰発現が抑制的に働くことが確認された。さらに他の G α の活性型変異体の過剰発現の影響も同様に調べた結果、G α_{13} QL だけでなく、G α_q QL も抑制的に働くことが明らかになった。一方、G α_s QL と G α_i QL の過剰発現はルシフェラーゼ活性に対して影響を与えなかった。ルシフェラーゼ活性の抑制に関わる G α の特異性は AIP と結合する G α の特異性と相関していることから (図 4 C、図 7A)、G α と AIP の結合が AhR を介したルシフェラーゼ活性の抑制に関与している可能性が考えられた。さらに受容体を介して G タンパク質を活性化させるリガンドである LPA を用いて、内在性の G α の活性化が AhR を介した転写活性化に及ぼす影響について検討を行った。レポーター遺伝子のみをトランスフェクションした Hepa 1c1c7 細胞に、3-MC と LPA で刺激を行いルシフェラーゼ

活性の測定を行った。その結果、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現のときと同様にルシフェラーゼ活性が抑制された。

次に AhR の代表的な標的遺伝子である P4501A1 (CYP1A1) の転写量に対する G タンパク質の影響を調べた。 $G\alpha_{13}QL$ を過剰発現させた Hepa 1c1c7 細胞から RNA を調製し、リアルタイム PCR によって CYP1A1 の mRNA 量の定量を行った。その結果、レポーターアッセイの結果と同様に、3-MC 刺激依存的な CYP1A1 の誘導が $G\alpha_{13}QL$ を過剰発現によって顕著に抑制された (図 7C)。これらの結果から、G タンパク質の活性化は AhR を介した転写活性化を抑制することが示唆された。

AhR の細胞内局在の観察

AhR はリガンドとの結合とは非依存的に細胞質から核へ、または核から細胞質へと移行することが知られており、AIP の過剰発現は AhR を安定的に細胞質にとどめることが報告されている (JR Petrusis *et al.*, 2003)。 $G\alpha_{13}$ が AhR の転写活性化を抑制するメカニズムを解明するために、G タンパク質が AhR の細胞内局在に及ぼす影響を調べた。COS-7 細胞に HA-AhR を過剰発現させ、抗 HA 抗体を用いて免疫染色を行った。コントロールでは 3-MC 非存在下では、AhR は主に細胞質全体に存在し、3-MC 刺激依存的に核へ移行した (図 8)。一方、 $G\alpha_{13}QL$ を過剰発現させた COS-7 細胞では 3-MC 非存在下において、核に蓄積が見られ、3-MC 刺激後もその局在に変化はなかった。LPA 刺激時も同様に、3-MC の有無に関わらず AhR が核に局在した。これらの結果から、G タンパク質の活性化は AhR の核への局在を促進することが示唆された。

核内における AhR の動態の観察

AhR は 3-MC 刺激によって核への移行がおこり、転写が活性化される。しかしながら、図 6 と図 8 示すとおり、G タンパク質によって AhR の核移行は促進されるが転写活性はむしろ抑制された。これらの結果から G タンパク質の活性化によって核へ移行した AhR は転写活性化能を持たない可能性が示唆された。この可能性を検証するために、①AhR と Arnt のヘテロ 2 量体の形成と、②DNA(XRE 配列)への結合、に対する G タンパク質の効果を検討した。

HA-AhR と GST-Arnt を過剰発現させた COS-7 細胞を細胞質画分と核画分に分画し、核抽出液から glutathione Sepharose 4B を用いて GST-Arnt を回収した後、GST-Arnt と HA-AhR の複合体の形成をウエスタンブロッティングで検出した。その結果、3-MC 刺激により核内での AhR/Arnt 複合体が増加するのが確認できた (図 9A, lane 3,4)。一方、G α_{13} QL を共発現させた COS-7 細胞では 3-MC 刺激依存的な AhR と Arnt の結合がみられなかった (図 9 A, lane 5,6)。この結果から G タンパク質の活性化によって核へ移行した AhR は Arnt とは複合体を形成しないことが示唆された。

さらに AhR の DNA 結合能を検討するために、[³²P]標識した XRE 配列を含むオリゴヌクレオチドをプローブとしてゲルシフトアッセイを行った。HA-AhR と GST-Arnt を過剰発現させた COS-7 細胞由来の核抽出液をプローブとインキュベートした後、電気泳動を行った結果、3-MC 刺激依存的な DNA-タンパク質複合体のバンドが見られた (図 9B, lane 3,4)。さらにタンパク質複合体に AhR と Arnt が含まれることを確かめるために、抗 AhR 抗体と抗 Arnt 抗体を反応系に加えた結果、抗 AhR 抗体を加えたサンプルではバンドの消失が見られ (図 9B, lane 5)、抗 Arnt 抗体を加えたサンプルではバンドのスーパーシフトが見られた (図 9B, lane 6)。抗 AhR 抗体は複合体に含まれる AhR を認識し、DNA 結合を阻害したと考えられる。この条件で、G α_{13} QL の過剰発現の影響を検討した結果、3-MC 刺激依存的な AhR の DNA への結合が見られなくなった (図 9C, lane 3,4)。さらに LPA 刺激も同様に AhR の DNA 結合能を抑制した (図 9C, lane 5,6)。これらの結果から、G タンパク質の活性化によって核へ移行した AhR は、3-MC 刺激によって核へ移行した活性型の AhR とは異なり、Arnt との 2 量体化が起こらず、そして AhR の DNA 結合能が低下した不活性型あることが示唆された。

AIP のノックダウンの効果

これまでの結果から G タンパク質の活性化によって引き起こされる AhR の転写活性の抑制や細胞内局在の変化には、G α が AhR と AIP の相互作用を阻害することが重要である可能性が示唆された。この可能性を検証するために、AIP のノックダウンの影響を調べた。はじめに Hepa 1c1c7 細胞に AIP に対する siRNA をトランスフェクションし、AIP の

発現が抑制されることをウエスタンブロッティングで確認した (図 10A 右図)。この条件で AhR の転写活性化を調べた結果、AIP をある程度ノックダウンした細胞においても 3-MC による CYP1A1 の誘導が見られたが、CYP1A1 の mRNA 量はコントロールに比べておよそ 80% まで抑制された。さらに AIP をノックダウンした細胞を細胞質と核に分画し、ウエスタンブロッティングによって AhR の局在の変化を調べたが、3-MC 刺激なしでの AIP ノックダウンに伴う AhR の核への移行はごくわずかであった (図 10B)。この結果はノックダウンが十分でなかったためとも考えられるが、G α_{13} QL の過剰発現で見られたような CYP1A1 の誘導の顕著な抑制や AhR の細胞内局在の変化が見られなかったことから、G タンパク質の活性化は AhR から AIP を取り除くだけでなく、他のメカニズムで AhR シグナルに対して抑制的にはたらいている可能性も考えられた。

AhR のタンパク質安定性に対する影響

定常状態において、AIP は AhR のユビキチン化を阻害することで AhR のタンパク質安定性に関与していると考えられている (A Kazlauskas *et al.*, 2000; JJ LaPres *et al.*, 2000)。G α_{13} QL の過剰発現が AhR と AIP の相互作用を阻害したことから (図 5)、G α_{13} QL の過剰発現が AhR の安定性に及ぼす影響を調べた。AhR と Arnt を過剰発現させた HEK293T 細胞において AhR の発現量をウエスタンブロッティングで調べた。その結果、G α_{13} QL の過剰発現によって AhR のタンパク質量が減少したが (図 11A, lane 2,3)、プロテアソーム阻害剤である MG-132 を処理した細胞では AhR のタンパク量の減少が抑制された (図 11A, lane 5,6)。この結果から G タンパク質の活性化によってユビキチン・プロテアソーム系を介した AhR の分解が促進される可能性が示唆された。

次に AhR のユビキチン化を調べた。HEK293T 細胞に AhR と His タグのついたユビキチンを過剰発現させ、細胞抽出液から Ni-NTA agarose でユビキチン化されたタンパク質を沈降させた。沈降物に含まれるユビキチン化された AhR を抗 AhR 抗体を用いたウエスタンブロッティングによって検出した。その結果、予想されたとおり、G α_{13} QL の過剰発現させた細胞においてコントロールに比べて AhR のユビキチン化が促進されていることが明らかになった (図 11B, lane 7,8)。一方、AIP を共発現させた細胞では、G α_{13} QL の過剰発現によって引き起こされるユビキ

チン化が抑制されることが分かった (図 11B, lane 9-12)。これらの結果から $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって促進されるユビキチン化には AIP が関与している可能性が示唆された。さらに $G\alpha_{13}$ が AhR のタンパク質の安定性に関与することを確認するために、パルスチェイス実験を行った。AhR を過剰発現させた HEK293T 細胞に [^{35}S] で標識されたメチオニンやシステインを取り込ませた。標識された全タンパク質から AhR を免疫沈降法で回収し SDS-PAGE で分離した後、オートラジオグラフィーで標識された AhR を検出した。標識された AhR の半減期を調べたところ、コントロールでは半減期が 4.3 時間であったのが、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現させた細胞では半減期が 1.5 時間となり AhR の安定性が著しく低下していることが明らかになった (図 12)。他の実験の結果においても $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって AhR の発現量の減少が見られており (図 5B, lane 3-4、図 9A, lane 3-6、図 11A)、さらに図 5B では AIP の共発現によって $G\alpha_{13}QL$ による AhR の発現量の減少が解除されている。これらの結果から G タンパク質の活性化が、ユビキチン・プロテアソーム系を介して AhR の分解を促進していることが強く示唆された。

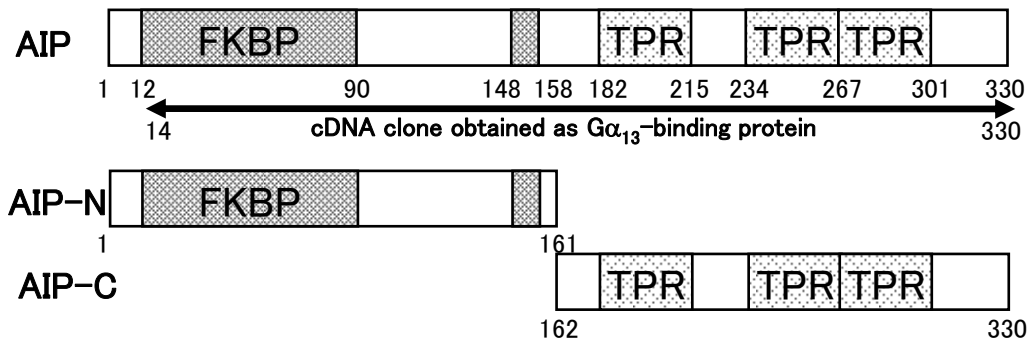
さらに、AhR のユビキチン化の抑制が AhR の転写活性に及ぼす影響について調べた。 $G\alpha_{13}QL$ を過剰発現させた Hepa 1c1c7 細胞に MG-132 を処理することによって、3-MC 刺激依存的な CYP1A1 の誘導が回復した (図 13)。これらの結果から、G タンパク質の活性化が AhR のユビキチン・プロテアソーム系を介したタンパク質分解を促進し、そのことが AhR の転写活性化が抑制されたと考えられる。

AhR の活性化が $G\alpha$ シグナルに及ぼす影響

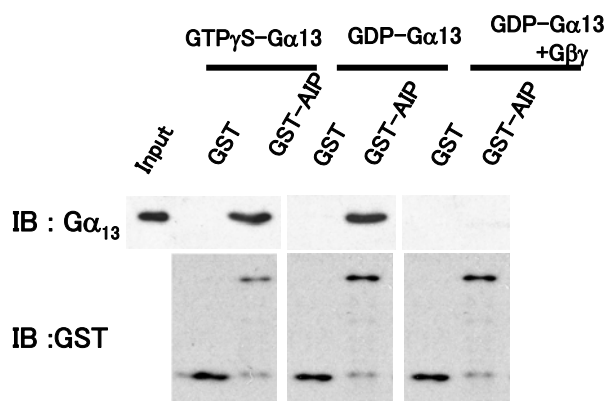
定常状態において AIP は AhR と複合体を形成し、ダイオキシンなどリガンド刺激依存的に AhR から解離する。そこで AhR 複合体から解離した AIP が $G\alpha$ シグナルに影響を与える可能性について検討を行った。AIP は $G\alpha_q$ と結合すること、また $G\alpha_q$ の活性化は細胞内カルシウム濃度の一時的な上昇を引き起こすことから、細胞内カルシウム濃度の上昇に対する AhR の活性化の影響を調べた (図 14)。内在性に AhR と AIP を発現しているマウス肝臓由来 Hepa 1c1c7 細胞において 100 nM LPA 刺激によって細胞内カルシウム濃度の上昇が見られることを確認した (図 14 左図)。さらに測定前に 30 分間 1 μ M 3-MC を処理した細胞においても同様に細胞内カルシウム濃度変化の測定を行ったが、コント

ロールに比べ顕著な差は見られなかった（図14右図）。この結果から、**AhR**の活性化が**Gα_q**の活性化によるカルシウム濃度上昇には影響を及ぼさないと考えられた。

A



B



C

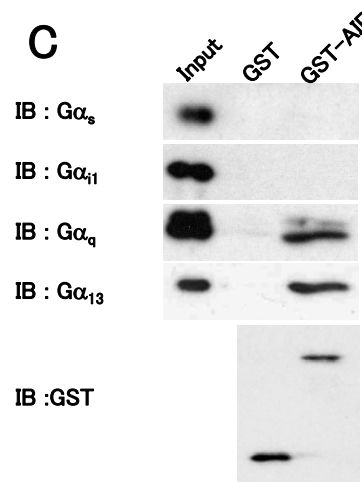
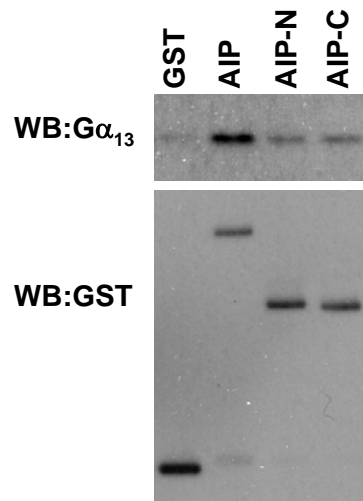


図4

- A) AIPのドメイン構造 AIPはN末端側にFKBPドメイン、C末端側に3つのTPRモチーフが存在する。AIPのGα13結合部位を同定するためにFKBPドメインを含むN末側変異体(AIP-N)、TPRモチーフを含むC末側変異体(AIP-C)を作成した。
- B) Gα13組換えタンパク質と10 μM GTPγS や100 μM GDP、Gβγを図に示す組み合わせで混ぜ合わせた後、インキュベートし、そこにGST またはGST-AIPを加えた。glutathione Sepharose 4BでGタンパク質を沈降させ、共沈したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、抗Gα13抗体と抗GST抗体でウエスタンブロッティングにより検出した。
- C) AIPのGαに対する結合特異性 Gα組換えタンパク質を100 μM GDPとインキュベートした後、GSTまたはGST-AIPと混ぜ合わせ複合体を形成させた。glutathione Sepharose 4BでGα-AIP複合体を共沈させ、複合体に含まれるGαのサブタイプをそれぞれの抗Gα抗体を用いたウエスタンブロッティングによって検出した。

A



B

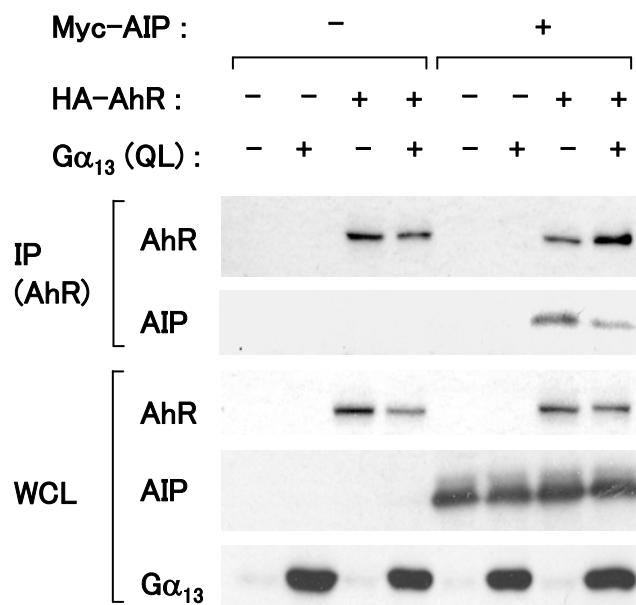


図5

- A) Gα₁₃組換えタンパク質を100 μM GDPでプレインキュベーション後、GST 単独または GST-AIP、GST-AIP-N、GST-AIP-Cと混ぜ合わせた。glutathione Sepharose 4BでGα₁₃-AIP複合体を共沈させ、共沈したタンパク質をSDS-PAGEで分離し、抗Gα₁₃抗体と抗GST抗体を用いたウエスタンブロッティングにより検出した。
- B) Gα₁₃QLの過剰発現のAhR-AIP複合体に対する影響 HEK293T細胞にHA-AhR、Myc-AIP、FLAG-Gα₁₃QLを図に示すとおりに過剰発現させた。トランスフェクションから48時間後に細胞を回収し、抗HA抗体で免疫沈降を行った。共沈したタンパク質を抗Myc抗体、抗AhR抗体、抗FLAG抗体を用いてそれぞれウエスタンブロッティングを行った(上段)。免疫沈降に用いた細胞抽出液(Whole Cell Lysate:WCL)の一部を使って同様にウエスタンブロッティングを行った(下段)。

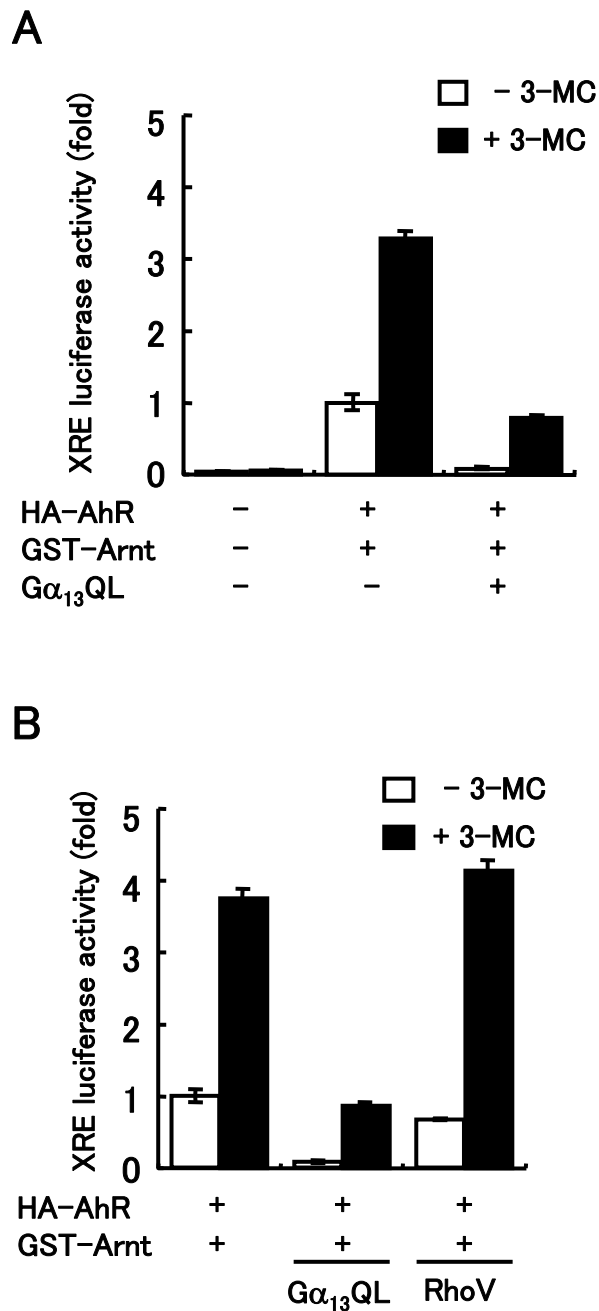


図6

A, B) AhR過剰発現系におけるGα₁₃活性型変異体の影響 COS-7細胞にレポーター遺伝子とHA-AhRとGST-Arnt、FLAG-Gα₁₃QL、FLAG-RhoAG14V (RhoV)を図に示すとおり過剰発現させた。トランスフェクションの24時間後に1 μM 3-MCで刺激した。さらに24時間後、細胞を回収しレポーターアッセイに用いた。それぞれ3回の実験を行い、平均値を示した。図中の縦棒線は標準誤差を示す。

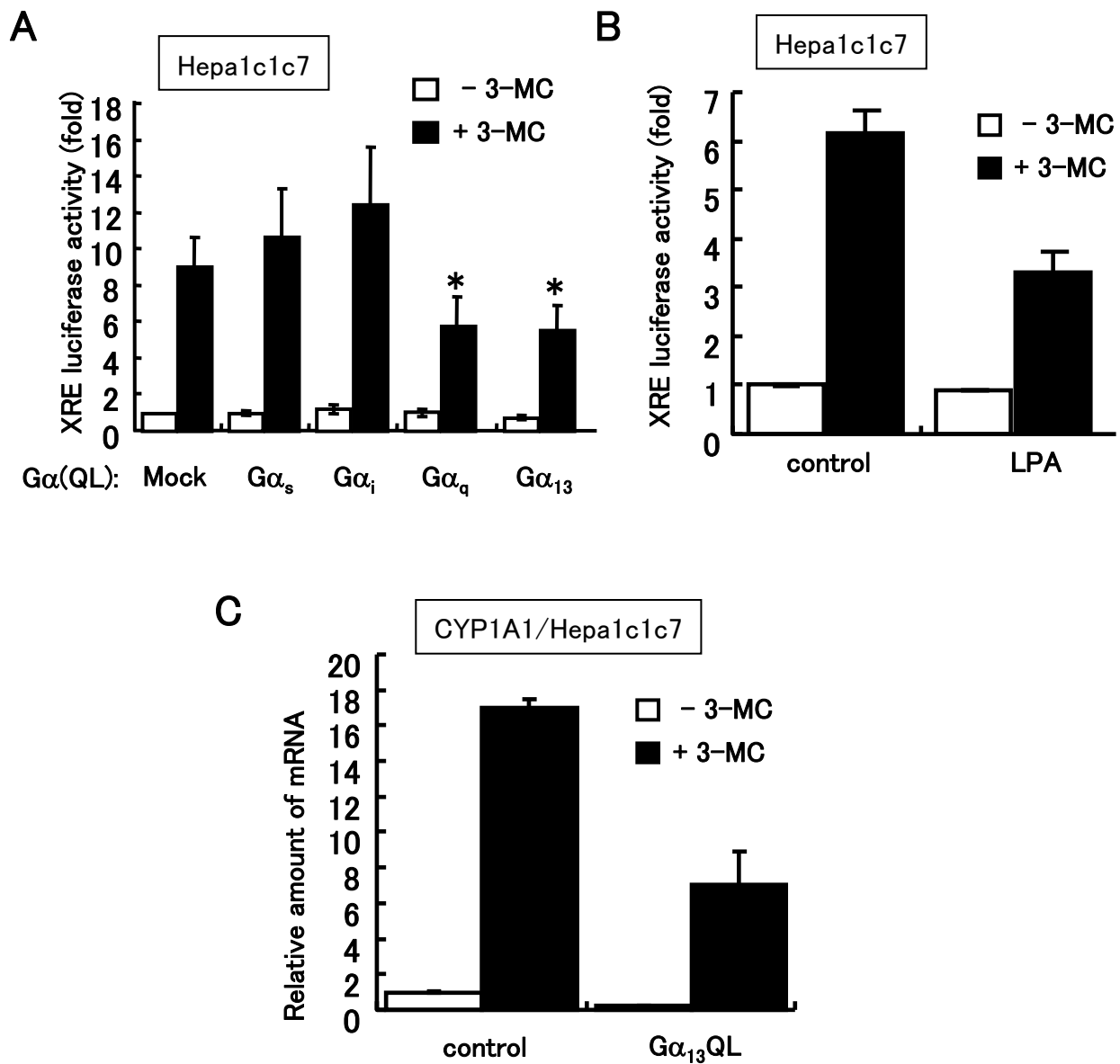


図7

- A, B) 内在性のAhRの活性化に対するGαの活性化の影響 Hepa 1c1c7 細胞にレポーター遺伝子の過剰発現に加えて、A)Gαの活性化型変異体を共発現 または B) LPA刺激を行った。細胞を回収しレポーターアッセイに用いた。
- C) Gα13QLの過剰発現による標的遺伝子の転写量への影響 Hepa 1c1c7 細胞における3-MC刺激依存的な標的遺伝子(CYP1A1)のmRNA量をreal-time RT-PCRで定量した。それぞれ3回の実験を行い、平均値を示した。図中の縦棒線は標準誤差を示す。

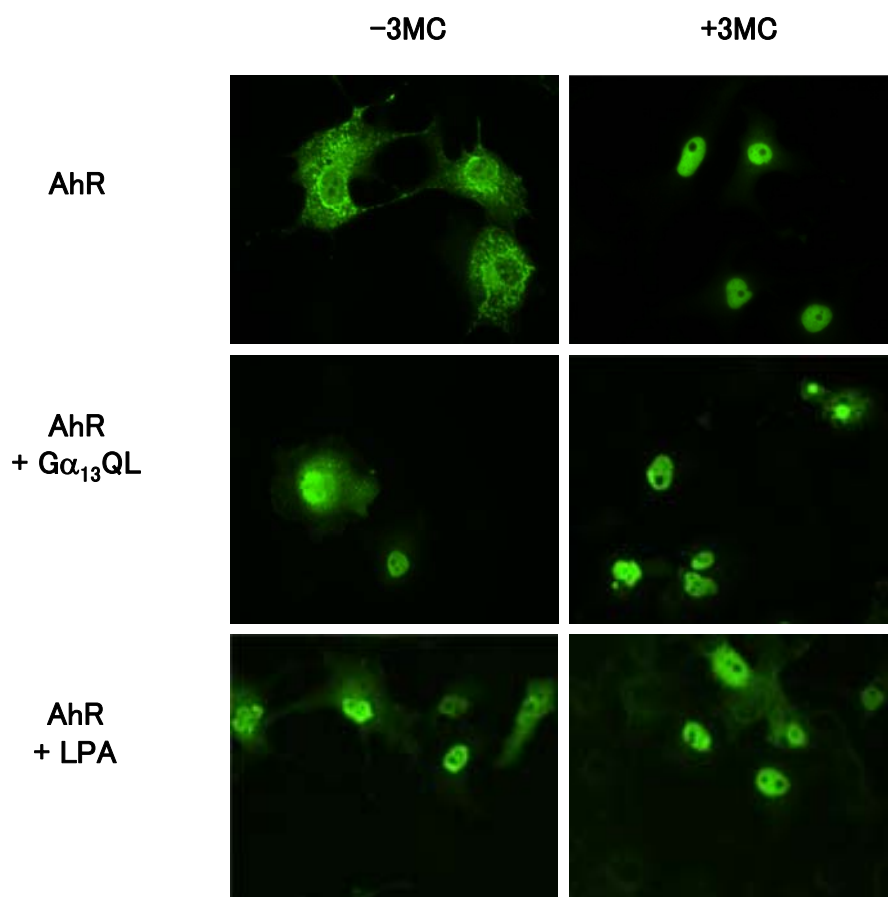


図8

Gα₁₃活性化のAhRの細胞内局在に対する影響 COS-7細胞にHA-AhRとGST-Arntを過剰発現させ、さらにFLAG-Gα₁₃QLを共発現(中段)、またはLPA刺激(下段)を行った。トランスフェクション後、1 μM 3-MCと10 μM LPAで24時間刺激してから、4% PFAを用いて、室温で20分処理し、細胞を固定した。透過処理の後、抗HA抗体とAlexa-488が結合した抗マウス二次抗体で免疫染色を行った。

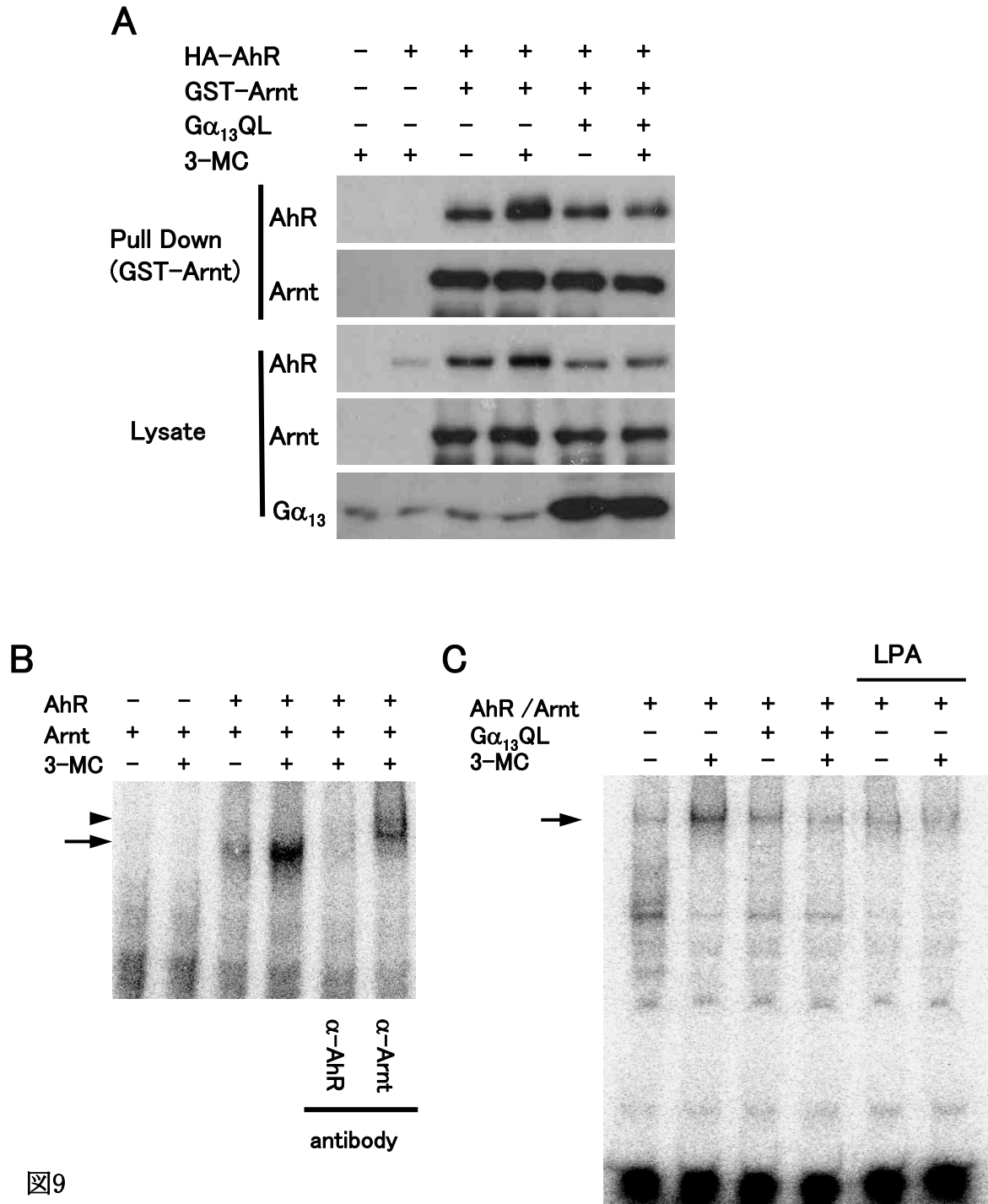


図9

- A) AhRとArntの結合への影響 COS-7細胞に図に示したとおりトランスフェクションを行い、1 μ M 3-MCで6時間刺激した。細胞から核抽出液を調製し、glutathione Sepharose 4Bを用いて核内のGST-Arntを回収した。GST-Arntと結合したAhRを抗AhR抗体を用いたウエスタンブロッティングによって検出した。Pull down assay前の細胞抽出液(Lysate)の一部を用いてウエスタンブロッティングを行った。
- B,C) AhRのDNA結合能への影響 COS-7細胞からA)と同様の条件で核抽出液を調製した後、 $[^{32}\text{P}]$ 標識したDNAプローブを用いてゲルシフトアッセイを行った。B) 矢印はAhRとArntを含むタンパク質DNA複合体を、矢頭は抗Arnt抗体によるスーパーシフトを示す。C) G α_{13} QLの過剰発現またはLPA刺激下において同様の実験を行った。

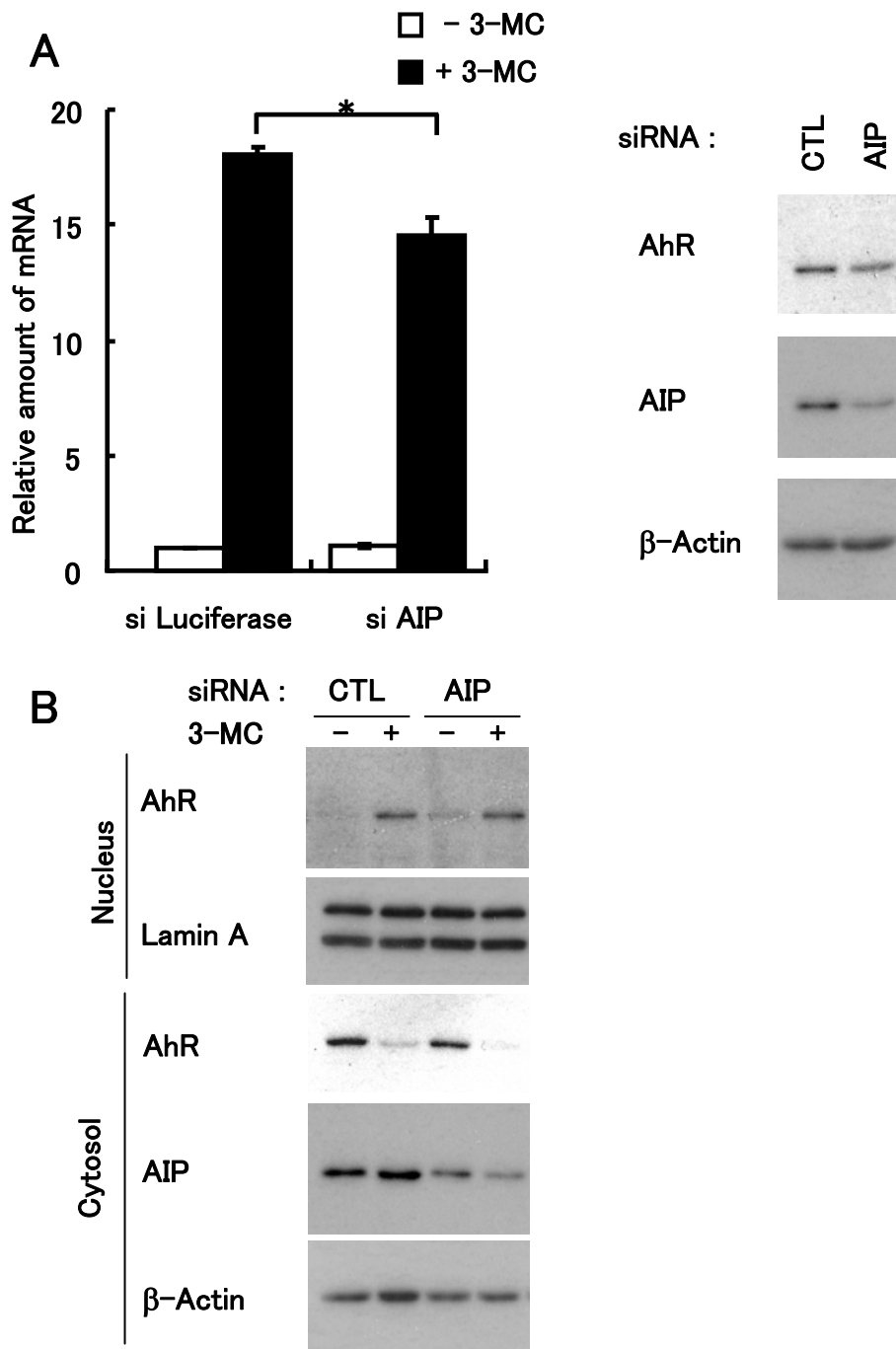


図10

- A) AIPのノックダウンによるCYP1A1の転写量への影響 Hepa 1c1c7 細胞にsiAIPをトランスフェクションし内在性のAIPのノックダウンを行い、1 μ M 3-MCで12時間刺激後、細胞を回収しCYP1A1のmRNA量をreal-time PCRにより定量した(左図)。siAIPの導入後のAIPとAhRのタンパク質量の変化を、それぞれに対する抗体を用いたウエスタンブロッティングによって確認した。それぞれ3回の実験を行い、平均値を示した。図中の縦棒線は標準誤差を示す。
- B) AIPのノックダウンによるAhRの細胞内局在への影響 Hepa 1c1c7 細胞にsiAIPをトランスフェクションし内在性のAIPのノックダウンを行った。トランスフェクションの48時間後、細胞を回収し、遠心分離によって細胞質と核に分画した。それぞれの画分を抗AhR抗体と抗AIP抗体、そして細胞質画分は抗 β -actin 抗体を、核画分には抗laminA抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

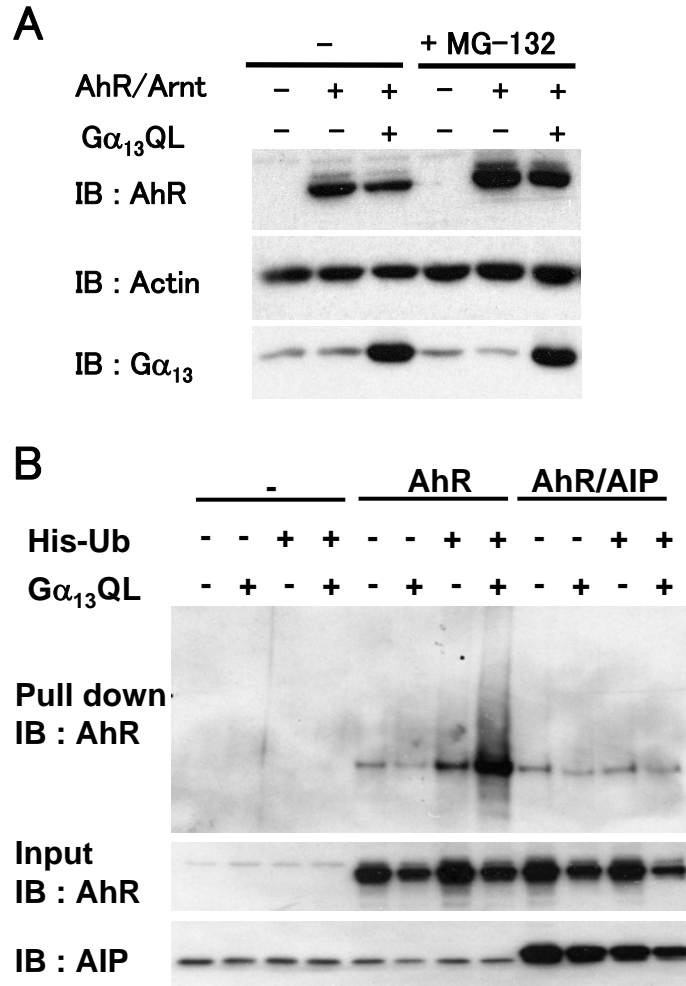


図11

- A) AhRの安定性に対するMG-132の影響 HEK293T細胞に図に示すとおりトランスフェクションを行った後、10 μ M MG-132処理を4時間行い細胞内のAhRのタンパク質量をウエスタンブロッティングによって調べた。
- B) G α_{13} QLの過剰発現がAhRのユビキチン化に及ぼす影響 HEK293T細胞にHA-AhRとGST-Arnt、Hisタグのついたユビキチン(His-Ub)を過剰発現させ、細胞内のユビキチン化したタンパク質をNi-NTAアガロースで回収した。回収したサンプルを抗AhR抗体でウエスタンブロッティングを行い、ユビキチン化したAhRの量を調べた。

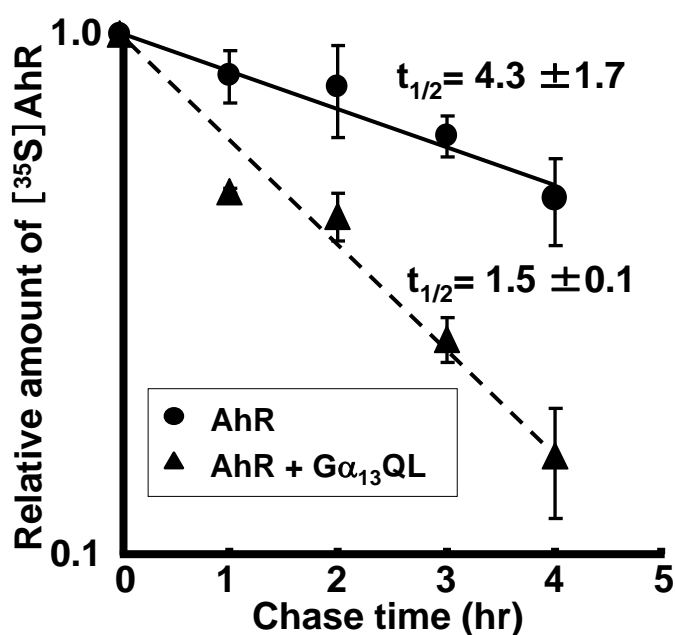
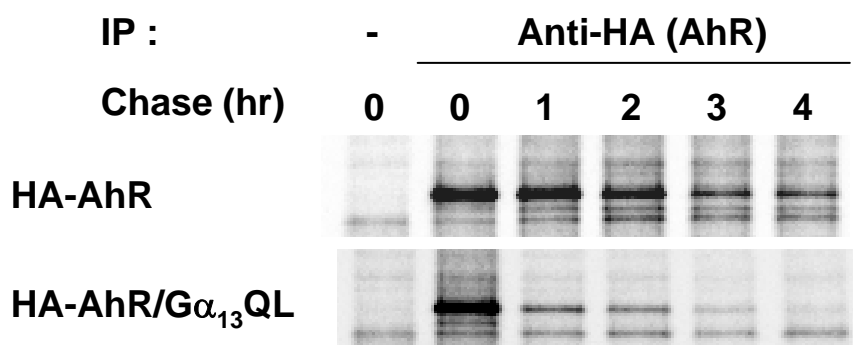


図12

AhRの分解に対するGα₁₃の効果 HEK293T細胞に図に示すとおりトランスフェクションを行い、³⁵S標識されたメチオニンとシステインを1時間取り込ませた後、パルスチェイス実験を行った。細胞抽出液から抗HA抗体を用いてAhRを回収し、SDS-PAGE、オートラジオグラフィーを行った。HA-AhRに取り込まれている³⁵Sの量をBASを使って定量した。下図は3回の実験の平均値±標準誤差をプロットした。

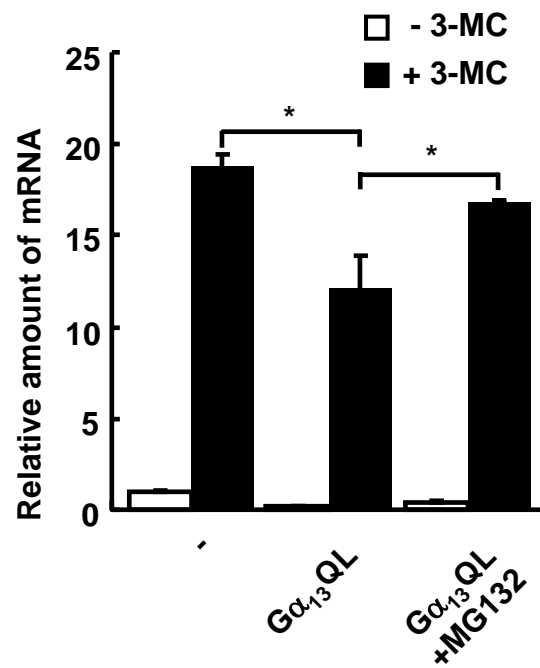


図13

AhRの転写活性化に対するMG-132の影響 Hepa 1c1c7細胞にGα13QLをトランスフェクションし、1 μM 3-MCで8時間処理すると同時に10 μM MG-132処理を行った。MG-132処理の有無によるCYP1A1のmRNA量の変化をreal-time PCRを用いて調べた。それぞれ3回の実験を行い、平均値を示した。図中の縦棒線は標準誤差を示す。

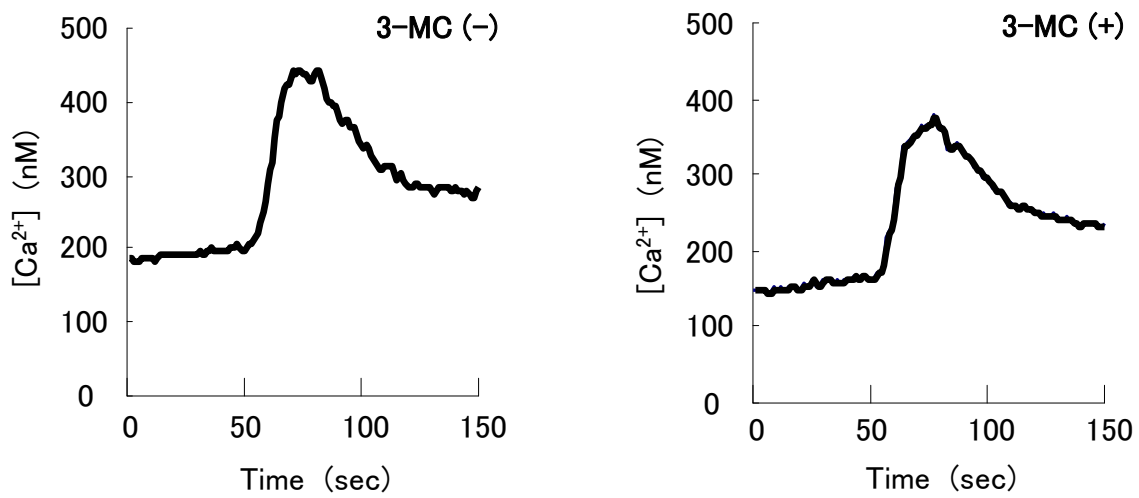


図14

Hepa 1c1c7 細胞にカルシウム蛍光指示薬Fura 2-AMを取り込ませ、測定開始50秒に100 μ M LPAで細胞を刺激し細胞内カルシウム濃度変化をモニタリングした。左図はコントロール、右図はFura 2-AMを取り込ませる際に1 μ M 3-MCを同時に処理した細胞を測定した結果である。3回実験を行い代表的な例を示した。

考察

G α_{13} と AIP との相互作用の解析

本研究では組換えタンパク質を用いた *In vitro* binding assay の結果から、AIP は G α_{13} の GTP/GDP 結合状態に関わらず直接結合するが、G $\beta\gamma$ 存在下では結合できないことが示された (図 3B)。細胞内では、定常状態において G α_{13} は GDP 型であり G $\beta\gamma$ と 3 量体を形成し、GPCR によって活性化されると G α_{13} は G $\beta\gamma$ から解離する。AIP が G α_{13} の GTP/GDP 結合状態による構造変化を認識し、AIP と G α_{13} の結合の親和性が変化することはなかった。しかしながら、G $\alpha\beta\gamma$ の 3 量体とは結合できないが、G $\beta\gamma$ から解離した活性型の G α_{13} と結合すると考えられる。

AIP の C 末端側にタンパク質相互作用に関わる TPR モチーフが存在する。これまでに TPR モチーフを持つタンパク質が G タンパク質と相互作用することが報告されている。protein phosphatase 5 (PP5) は活性型 G $\alpha_{12/13}$ に TPR モチーフを介して結合し、その活性が G タンパク質によって制御される (Y Yamaguchi *et al.*, 2002)。一方、TPR1 という 3 個の TPR モチーフを持つ 293 アミノ酸からなるタンパク質が TPR モチーフを介して G α_{16} と GTP/GDP の結合の違いに関わらず結合し、アダプタータンパク質として機能することも報告されている (C Marty *et al.*, 2003)。そこで AIP が C 末側の TPR モチーフを介して結合することを予想し、N 末側または C 末側を欠損した変異体を作製し *In vitro* binding assay を行った。図 5A に示すとおり、AIP-N と AIP-C はともに G α_{13} を共沈降することが確認されたが、共沈した G α_{13} の量は全長の AIP に比べて少なかった。この結果から、G α_{13} との結合には TPR モチーフが存在する C 末端側だけでなく N 末側も必要であることが示唆された。また酵母ツーハイブリッドスクリーニングによって得られたクローンは N 末端側の 13 アミノ酸が欠失していたことから、N 末端側の 13 アミノ酸は G α_{13} との結合には関与しない可能性が低いと考えられる。しかしながら、詳細な結合部位の同定にはさらに短い欠失変異体や点変異体を用いた解析や各断片の共発現や複合体形成の解析などが必要であり、今後の課題である。

AIP の C 末端側の TPR モチーフは AhR や Hsp90 との結合に関わることが知られている (BK Meyer *et al.*, 2000)。図 5B より、G α_{13} QL の過

剰発現によって AhR から AIP が解離することが示され、図 5A から $G\alpha_{13}$ が AIP の C 末端側と結合する可能性が示唆されていることから AIP の C 末側に $G\alpha_{13}$ が作用することによって AhR と AIP の相互作用を競合的に阻害していると考えられる。これまでに $G\alpha_{12/13}$ が細胞質受容体（核内受容体）やその関連分子に作用する報告はなく、今回の結果から $G\alpha_{12/13}$ の新たなシグナル伝達経路の発見の可能性が示唆された。

G タンパク質の活性化による AhR の転写活性に対する影響

AhR はリガンド刺激に応答して CYP1A1 など脂質薬物代謝酵素遺伝子の転写を促進する。G タンパク質の活性化が AhR の転写活性化に及ぼす影響をレポーターアッセイによって検討した結果、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現や LPA 刺激によって 3-MC 刺激依存的な AhR の転写活性化が抑制されるが、RhoA の活性型変異体の過剰発現は AhR の転写活性化に影響を及ぼさなかった（図 6）。また図 7A、B から、内在性の AhR に対しても同様に G タンパク質の活性化が転写活性化を抑制することが分かった。次に Hepa 1c1c7 細胞において、3-MC 刺激に応答して転写を誘導することが報告されている CYP1A1 の転写量を指標に G タンパク質の活性化の影響を調べた。その結果、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって CYP1A1 の誘導が顕著に抑えられていることが分かった。

これらの結果から $G\alpha$ の活性化は生理的な条件において AhR の転写活性化を抑制する可能性が示唆された。また、図 7A では AhR の転写活性化の抑制に関わる $G\alpha$ の特異性について調べたところ、 $G\alpha_q$ と $G\alpha_{13}$ が抑制効果を示すことが分かった。この特異性は、図 3C において AIP と結合した $G\alpha$ の特異性と一致したことから、 $G\alpha$ の活性化による AhR の転写活性化の抑制には $G\alpha_{13}$ と AIP の結合が関与する可能性が示唆された。しかしながら、Hepa 1c1c7 細胞への AIP に対する siRNA のトランスフェクションによって AIP の発現抑制を行ったが、CYP1A1 の誘導は 20% 程度しか抑制されなかった（図 10A）。この結果から、 $G\alpha_{13}$ は AIP との相互作用だけでなく、他のシグナルにも影響を与えることで CYP1A1 の転写を抑制していることが予想される。図 6B の結果から、RhoA の活性化では AhR の転写活性化の抑制には影響を及ぼさないと考えられ、 $G\alpha_{13}$ の活性化によって引き起こされる RhoA 以外の分子の活性化が関与しているかもしれない。

AhR の細胞内局在に対する G タンパク質の活性化の影響

COS-7 細胞において過剰発現させた AhR は、定常状態では 3-MC 刺激依存的に核へ移行することを確認した。さらに G タンパク質の活性化は 3-MC 非依存的な核局在を促進することが判明した (図 8)。AIP の過剰発現は AhR を細胞質に局在させることが報告されており、リガンド非存在下における AhR の細胞内局在に AIP が関与することが示唆されている (A Kazlauskas *et al.*, 2000)。図 5B から G α 13QL の過剰発現が AIP と AhR の相互作用を阻害することから、G タンパク質の活性化が AIP の AhR からの解離を促進することで、AhR を核へ移行させたと予想した。しかしながら AIP のノックダウンは、AhR の細胞内局在にほとんど影響がなかった。Pollenzs らの報告においても、AIP のノックダウンが AhR の細胞内局在に影響がないことを示しており (RS Pollenz & EJ Dougherty, 2005)、今回の結果と一致する。これらの結果から G タンパク質の活性化は AhR と AIP の相互作用を阻害するだけでなく、AhR の細胞内局在を左右する他のシグナルにも影響を及ぼす可能性が示唆された。

G タンパク質シグナルによる AhR の活性化状態への影響

AhR はダイオキシンなどのリガンドと結合することで核移行シグナルや DNA 結合ドメイン、Arnt との結合部位の露出をともなう構造変化が起こり、核へ移行する。AhR の転写活性化には核への移行だけでなく、Arnt との結合と DNA への結合が必要である。しかしながら、G タンパク質の活性化によって核へ移行した AhR は Arnt との結合能を持たず、したがって DNA 結合能も保持していなかった。これまでの報告より、細胞質に存在する Hsp90 や AIP が AhR のタンパク質安定性やリガンドとの結合を促進することが知られており、G α によって核内へ移行した AhR は Hsp90 や AIP と結合していないため、リガンド刺激依存的な構造変化を起こりにくい状態であると考えられる。G タンパク質の活性化はリガンドの結合していない不活性型の AhR を核へ移行することで、転写を抑

制していると考えられる。(図 14)

G タンパク質シグナルによる AhR のユビキチン化に対する影響

リガンド刺激によって活性化された AhR はユビキチン-プロテアソーム系を介したタンパク質分解を受けることでダウンレギュレーションされる。図 11 では $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって AhR のタンパク量が減少すること、さらにプロテアソーム阻害剤 MG-132 によってタンパク量の減少が回復されることを確認した。さらにパルスチェイスの解析により、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって AhR の半減期が 4.3 時間から 1.5 時間まで短縮され、AhR の分解が促進されていることが明らかとなった。AIP は AhR のユビキチン化を阻害することが報告されている。そこで AhR のユビキチン化について調べた結果、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって AhR のユビキチン化が促進されること、そして AIP の過剰発現が AhR のユビキチン化を抑制することを明らかにした(図 11)。 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現が AhR からの AIP の解離を促進すること、また $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現による AhR のユビキチン化が AIP の過剰発現によって解除されることから、G タンパク質の活性化による AhR のタンパク質量の減少には AIP が主要な役割を担っていると予想した (図 15)。しかしながら、AIP のノックダウンによって若干の AhR タンパク質の減少がみられたが、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現時にみられるほどの劇的な減少量ではなかった。これまでの報告から、AhR との結合部位に変異をいれた AIP 点変異体の過剰発現や、PP5 の TPR モチーフの過剰発現による AhR と AIP の相互作用の競合阻害の実験によって AhR のタンパク質量が減少することが知られており(BK Meyer *et al.*, 2000)、AhR から AIP を解離させることは AhR を不安定化させることが示唆されている。G タンパク質の活性化は AhR から AIP を解離させ、さらにその分解を促進するようなシグナルが働いていると考えられるが、そのメカニズムの解明は今後の課題である。図 13 により、G タンパク質の活性化による CYP1A1 の転写量の減少に対し、MG-132 を作用させると AhR の転写活性化が回復した。このことから、G タンパク質の活性化による AhR の転写活性の抑制は AhR のタンパク質分解が原因であったと考えられる。

図 8 に示すとおり、G タンパク質の活性化は AhR の核移行を促進するが、核内の Arnt とは結合しない。一方、Arnt と結合せずに核に

局在する AhR は分解を受けやすいことが知られている(BJ Roberts & ML Whitelaw, 1999)。G タンパク質の活性化によって核移行が促進されたことが AhR の分解につながった可能性が考えられる。

これまでの報告から AhR のユビキチン化には CHIP (C-terminus of Hsc 70-interacting protein) E3 リガーゼが関与することが知られている(MJ Lees *et al.*, 2003)。CHIPはC末端側にTPRモチーフが存在し、AIPはCHIPとAhRの結合を競合的に阻害することで、AhRのユビキチン化を抑える。Gタンパク質によるAhRの分解に関与するE3リガーゼは未だ不明であるが、CHIPのようなAIPに関連した分子が関与している可能性も考えられる。

近年、AhRがP450の転写活性化だけでなく、他のシグナル伝達経路とクロストークすることが報告されている。例えば、cAMPはAhRに対するリガンド刺激非依存的にAhRの核移行を促進するが、転写活性化は起こらない(B Oesch-Bartlomowicz *et al.*, 2005)。ただし、生体内のどのような刺激で細胞内のcAMP濃度が制御されているのかについては詳しく述べられていない。また反対に、AhRがエストロゲンレセプターやSTAT1に影響を与えることも報告されている(A Kimura *et al.*, 2008; F Ohtake *et al.*, 2007)。

AhRシグナルがG₁₃あるいはGqシグナルに影響する可能性も考えられる。本研究ではGqシグナルによる細胞内カルシウム濃度上昇に対し、AhRの活性化の影響を検討したが、顕著な差は見られなかった(図4)。細胞内でAhRが活性化することでAhR複合体からAIPが解離し、G α_q と結合できるAIPが増加することでGタンパク質シグナルに影響を与える可能性を考えたが、今回検討を行った条件において、3-MC刺激の有無によって、細胞質におけるAhRと結合していないAIPの量がどのくらい変化したのか、またG α_q と結合するAIPの量が変化したのかについては確認できていない。またsiRNAを用いたAIPの発現抑制がGタンパク質シグナルに影響を及ぼす可能性も考えられ、さらに詳細に解析を行う必要がある。本研究ではG₁₃シグナルに対して、AIPやAhRシグナルが影響を及ぼす可能性についてもまだ解析をほとんど進めておらず、今後、検討すべき課題である。本研究がダイオキシンシグナルとGタンパク質シグナルのクロストーク研究の発端となり、AhRを介した細胞内シグナルの生体内での役割解明に発展することを期待したい。

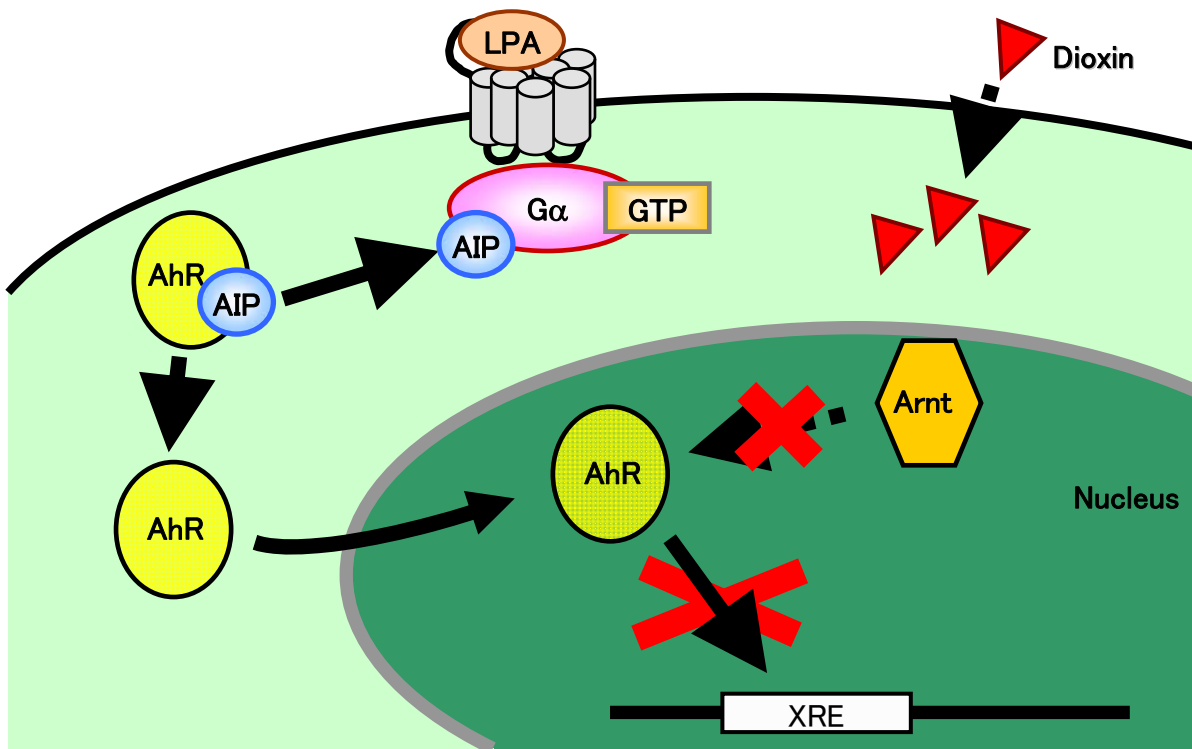


図15

Gタンパク質の活性化がAhRの核移行を促進し転写活性化を抑制するモデル図

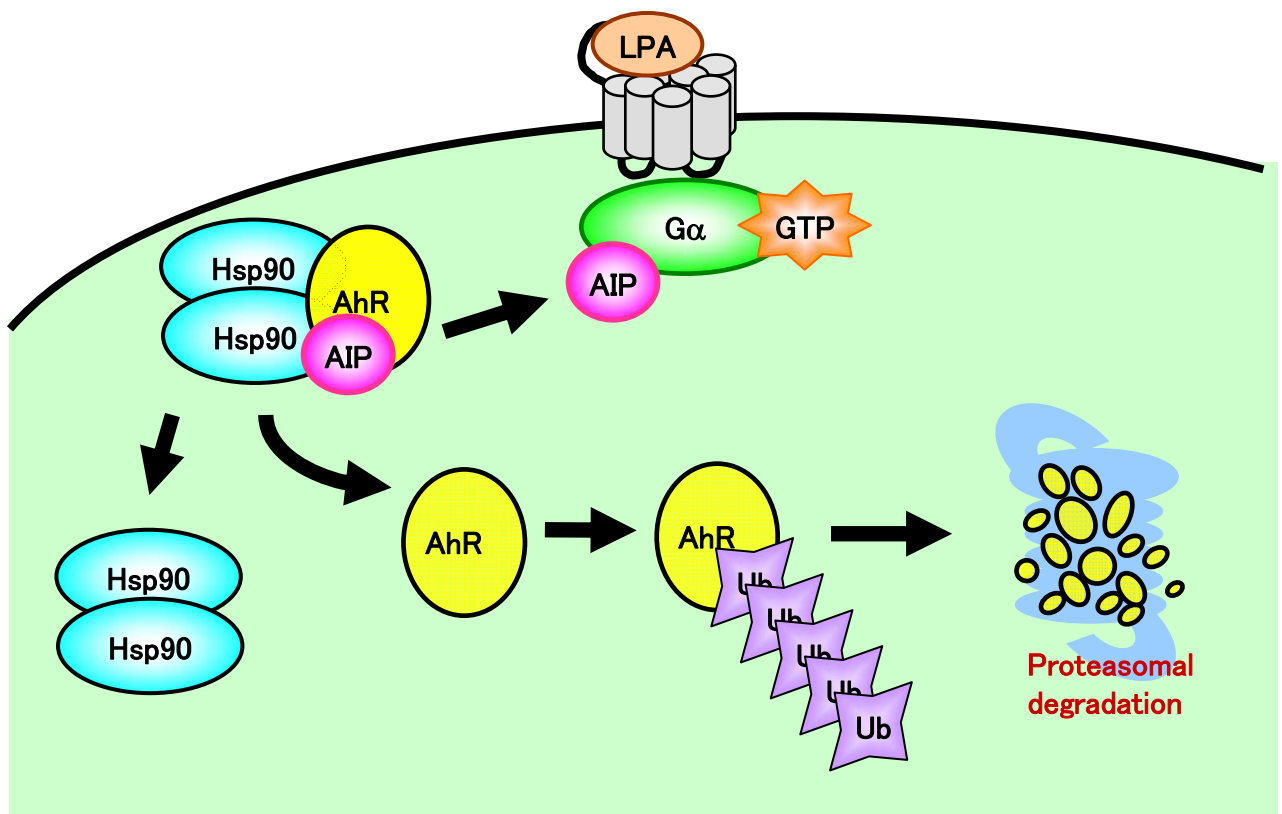


図16

Gタンパク質の活性化がAhRの分解を促進し転写活性化を抑制するモデル図

謝辞

本研究を遂行するにあたり、AhR と Arnt の発現プラスミドをご提供いただいた筑波大学先端学際領域研究センターの藤井義明教授に感謝いたします。

本論文を審査して下さった奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 動物遺伝子機能学講座 川市正史教授、動物分子遺伝学講座 加藤順也教授、分子発生生物学講座 片岡浩介准教授に深く感謝いたします。

研究を進めるにあたり、終始適切なご指導やご助言を賜り、また研究者として成長するための様々なサポートをして下さった奈良先端科学技術大学院大学 細胞内情報学講座 伊東広教授に心から御礼申し上げます。稲垣直之准教授には、異なる視点から多くの有益なご助言をいただき厚く御礼申し上げます。日々の実験データに関する様々なアドバイスをいただいた水野憲一助教に深く感謝いたします。そして数多くの実験手法を教えていただいただけでなく論文投稿の際には私の拙い文章を何度も添削していただいた多胡憲治助教に心から感謝いたします。また日々の実験のサポートをして下さった浦野大輔博士をはじめ研究生生活の苦楽をともにした細胞内情報学講座の皆様に感謝いたします。

参考文献

Baba T, Mimura J, Nakamura N, Harada N, Yamamoto M, Morohashi K, Fujii-Kuriyama Y. (2005) Intrinsic function of the aryl hydrocarbon (dioxin) receptor as a key factor in female reproduction. *Mol Cell Biol*, **25**, 10040-10051.

Blatch GL, Lassar M. (1999) The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays*, **21**, 932-939.

Carver LA, Bradfield CA. (1997) Ligand-dependent interaction of the aryl hydrocarbon receptor with a novel immunophilin homolog in vivo. *J Biol Chem*, **272**, 11452-11456.

Cazabat L, Guillaud-Bataille M, Bertherat J, Raffin-Sanson ML. (2009) Mutations of the gene for the aryl hydrocarbon receptor-interacting protein in pituitary adenomas. *Horm Res*, **71**, 132-141.

Chikumi H, Fukuhara S, Gutkind JS. (2002) Regulation of G protein-linked guanine nucleotide exchange factors for Rho, PDZ-RhoGEF, and LARG by tyrosine phosphorylation: evidence of a role for focal adhesion kinase. *J Biol Chem*, **277**, 12463-12473.

de Oliveira SK, Hoffmeister M, Gambaryan S, Muller-Esterl W, Guimaraes JA, Smolenski AP. (2007) Phosphodiesterase 2A forms a complex with the co-chaperone XAP2 and regulates nuclear translocation of the aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **282**, 13656-13663.

de Oliveira SK, Smolenski A. (2009) Phosphodiesterases link the aryl hydrocarbon receptor complex to cyclic nucleotide signaling. *Biochem Pharmacol*, **77**, 723-733.

Fernandez-Salguero P, Pineau T, Hilbert DM, McPhail T, Lee SS, Kimura S, Nebert DW, Rudikoff S, Ward JM, Gonzalez FJ. (1995) Immune system impairment and hepatic fibrosis in mice lacking the dioxin-binding Ah receptor. *Science*, **268**, 722-726.

Froidevaux MS, Berg P, Seugnet I, Decherf S, Becker N, Sachs LM, Bilesimo P, Nygard M, Pongratz I, Demeneix BA. (2006) The co-chaperone XAP2 is required for activation of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone transcription in vivo. *EMBO Rep*, **7**, 1035-1039.

Gilman AG. (1987) G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, **56**, 615-649.

Hahn ME. (2002) Aryl hydrocarbon receptors: diversity and evolution. *Chem Biol Interact*, **141**, 131-160.

Kawajiri K, Fujii-Kuriyama Y. (2007) Cytochrome P450 gene regulation and physiological functions mediated by the aryl hydrocarbon receptor. *Arch Biochem Biophys*, **464**, 207-212.

Kaziro Y, Itoh H, Kozasa T, Nakafuku M, Satoh T. (1991) Structure and function of signal-transducing GTP-binding proteins. *Annu Rev Biochem*, **60**, 349-400.

Kazlauskas A, Poellinger L, Pongratz I. (2000) The immunophilin-like protein XAP2 regulates ubiquitination and subcellular localization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*, **275**, 41317-41324.

Kimura A, Naka T, Nohara K, Fujii-Kuriyama Y, Kishimoto T. (2008) Aryl hydrocarbon receptor regulates Stat1 activation and participates in the development of Th17 cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 9721-9726.

Kozasa T, Jiang X, Hart MJ, Sternweis PM, Singer WD, Gilman AG, Bollag G, Sternweis PC. (1998) p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for Galpha12 and Galpha13. *Science*, **280**, 2109-2111.

Kurose H. (2003) Galpha12 and Galpha13 as key regulatory mediator in signal transduction. *Life Sci*, **74**, 155-161.

Laenger A, Lang-Rollin I, Kozany C, Zschocke J, Zimmermann N, Ruegg J, Holsboer F, Hausch F, Rein T. (2009) XAP2 inhibits glucocorticoid receptor activity in mammalian cells. *FEBS Lett*, **583**, 1493-1498.

LaPres JJ, Glover E, Dunham EE, Bunger MK, Bradfield CA. (2000) ARA9 modifies agonist signaling through an increase in cytosolic aryl hydrocarbon receptor. *J Biol Chem*, **275**, 6153-6159.

Lees MJ, Peet DJ, Whitelaw ML. (2003) Defining the role for XAP2 in stabilization of the dioxin receptor. *J Biol Chem*, **278**, 35878-35888.

Lin BC, Nguyen LP, Walisser JA, Bradfield CA. (2008) A hypomorphic allele of aryl hydrocarbon receptor-associated protein-9 produces a phenocopy of the AHR-null mouse. *Mol Pharmacol*, **74**, 1367-1371.

Lin BC, Sullivan R, Lee Y, Moran S, Glover E, Bradfield CA. (2007) Deletion of the aryl hydrocarbon receptor-associated protein 9 leads to cardiac malformation and embryonic lethality. *J Biol Chem*, **282**, 35924-35932.

Ma Q, Whitlock JP, Jr. (1997) A novel cytoplasmic protein that interacts with the Ah receptor, contains tetratricopeptide repeat motifs, and augments the transcriptional response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *J Biol Chem*, **272**, 8878-8884.

Marty C, Browning DD, Ye RD. (2003) Identification of

tetratricopeptide repeat 1 as an adaptor protein that interacts with heterotrimeric G proteins and the small GTPase Ras. *Mol Cell Biol*, **23**, 3847-3858.

Meigs TE, Fields TA, McKee DD, Casey PJ. (2001) Interaction of Galpha 12 and Galpha 13 with the cytoplasmic domain of cadherin provides a mechanism for beta -catenin release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 519-524.

Meyer BK, Petrusis JR, Perdew GH. (2000) Aryl hydrocarbon (Ah) receptor levels are selectively modulated by hsp90-associated immunophilin homolog XAP2. *Cell Stress Chaperones*, **5**, 243-254.

Meyer BK, Pray-Grant MG, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. (1998) Hepatitis B virus X-associated protein 2 is a subunit of the unliganded aryl hydrocarbon receptor core complex and exhibits transcriptional enhancer activity. *Mol Cell Biol*, **18**, 978-988.

Mimura J, Fujii-Kuriyama Y. (2003) Functional role of AhR in the expression of toxic effects by TCDD. *Biochim Biophys Acta*, **1619**, 263-268.

Oesch-Bartlomowicz B, Huelster A, Wiss O, Antoniou-Lipfert P, Dietrich C, Arand M, Weiss C, Bockamp E, Oesch F. (2005) Aryl hydrocarbon receptor activation by cAMP vs. dioxin: divergent signaling pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9218-9223.

Ohtake F, Baba A, Takada I, Okada M, Iwasaki K, Miki H, Takahashi S, Kouzmenko A, Nohara K, Chiba T, Fujii-Kuriyama Y, Kato S. (2007) Dioxin receptor is a ligand-dependent E3 ubiquitin ligase. *Nature*, **446**, 562-566.

Petrulis JR, Kusnadi A, Ramadoss P, Hollingshead B, Perdew GH. (2003) The hsp90 Co-chaperone XAP2 alters importin beta recognition

of the bipartite nuclear localization signal of the Ah receptor and represses transcriptional activity. *J Biol Chem*, **278**, 2677-2685.

Petrulis JR, Perdew GH. (2002) The role of chaperone proteins in the aryl hydrocarbon receptor core complex. *Chem Biol Interact*, **141**, 25-40.

Pollenz RS, Dougherty EJ. (2005) Redefining the role of the endogenous XAP2 and C-terminal hsp70-interacting protein on the endogenous Ah receptors expressed in mouse and rat cell lines. *J Biol Chem*, **280**, 33346-33356.

Roberts BJ, Whitelaw ML. (1999) Degradation of the basic helix-loop-helix/Per-ARNT-Sim homology domain dioxin receptor via the ubiquitin/proteasome pathway. *J Biol Chem*, **274**, 36351-36356.

Robles R, Morita Y, Mann KK, Perez GI, Yang S, Matikainen T, Sherr DH, Tilly JL. (2000) The aryl hydrocarbon receptor, a basic helix-loop-helix transcription factor of the PAS gene family, is required for normal ovarian germ cell dynamics in the mouse. *Endocrinology*, **141**, 450-453.

Schmidt JV, Bradfield CA. (1996) Ah receptor signaling pathways. *Annu Rev Cell Dev Biol*, **12**, 55-89.

Schmidt JV, Su GH, Reddy JK, Simon MC, Bradfield CA. (1996) Characterization of a murine Ahr null allele: involvement of the Ah receptor in hepatic growth and development. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 6731-6736.

Singer WD, Miller RT, Sternweis PC. (1994) Purification and characterization of the alpha subunit of G13. *J Biol Chem*, **269**, 19796-19802.

Sumanasekera WK, Tien ES, Turpey R, Vanden Heuvel JP, Perdew GH. (2003) Evidence that peroxisome proliferator-activated receptor alpha is complexed with the 90-kDa heat shock protein and the hepatitis virus B X-associated protein 2. *J Biol Chem*, **278**, 4467-4473.

Suzuki N, Nakamura S, Mano H, Kozasa T. (2003) Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 733-738.

Thurmond TS, Staples JE, Silverstone AE, Gasiewicz TA. (2000) The aryl hydrocarbon receptor has a role in the in vivo maturation of murine bone marrow B lymphocytes and their response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin. *Toxicol Appl Pharmacol*, **165**, 227-236.

Vierimaa O, Georgitsi M, Lehtonen R, Vahteristo P, Kokko A, Raitila A, Tuppurainen K, Ebeling TM, Salmela PI, Paschke R, Gundogdu S, De Menis E, Makinen MJ, Launonen V, Karhu A, Aaltonen LA. (2006) Pituitary adenoma predisposition caused by germline mutations in the AIP gene. *Science*, **312**, 1228-1230.

Yamaguchi Y, Katoh H, Mori K, Negishi M. (2002) Galpha(12) and Galpha(13) interact with Ser/Thr protein phosphatase type 5 and stimulate its phosphatase activity. *Curr Biol*, **12**, 1353-1358.