

論文内容の要旨

申請者氏名 中田飛鳥

ダイオキシン受容体 (aryl hydrocarbon receptor : AhR)は、ダイオキシンによって引き起こされる様々な生体毒性に関与する。細胞質においてダイオキシンと結合し活性化された AhR は核内へ移行し、P450 などの脂質薬物代謝酵素の遺伝子のプロモーター領域に結合することで転写因子として働く。細胞質で AhR は Hsp90 や AIP (AhR intercalating protein) と複合体を形成し、これらの AhR 結合分子によって AhR のリガンド親和性や細胞内局在、タンパク質安定性が制御されている。申請者は G タンパク質 α サブユニットの一つ $G\alpha_{13}$ が AIP と結合すること、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ことを見出した。また、G タンパク質の活性化が AhR の細胞内局在とタンパク質安定性に影響を及ぼすことを明らかにした。

まず申請者は酵母ツーハイブリッド法を用いて $G\alpha_{13}$ の結合分子の探索を行い、AIP を同定した。また *in vitro* binding assay を行い $G\alpha_{13}$ と $G\alpha_q$ が AIP と結合することを証明した。さらに免疫沈降法により細胞内における AhR と AIP の相互作用を $G\alpha_{13}$ が阻害することを明らかにした。AhR の結合配列 (XRE 配列) を用いたレポーターアッセイを行った結果、AhR を過剰発現させた COS7 細胞及び内在的に AhR を発現している Hepa 1c1c7 細胞において、リガンド刺激依存的な AhR の転写活性化に対して、 $G\alpha$ 活性型変異体 ($G\alpha_{QL}$) の過剰発現や LPA 刺激による G タンパク質の活性化によってその転写活性化が抑制されることが明らかになった。また Hepa 1c1c7 細胞において、AhR を介する CYP1A1 遺伝子の発現誘導も同様に G タンパク質の活性化によって抑制されることを明らかにした。

次に申請者は AhR の細胞内局在を免疫染色法を用いて調べたところ、G タンパク質の活性化によって AhR がリガンド刺激非依存的に核へ移行することを示した。さらに核内へ移行した AhR の動態を解析するために AhR と Arnt の二量体形成と AhR の DNA 結合能を解析した。その結果、G タンパク質の活性化によって核内へ移行した AhR は Arnt との親和性が低く、そのため DNA 結合能も低下していることが明らかになった。続いて、AhR のユビキチン化と AhR の半減期を pulse chase 法によって解析を行った。その結果、 $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって AhR のユビキチン化が亢進すること、また AhR の半減期が短縮され、AhR タンパク質が不安定化されていることが判明した。さらに $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって CYP1A1 の転写誘導が抑制された細胞に対してプロテアソーム阻害剤を処理したところ転写活性の抑制が解除されたことから、 $G\alpha_{13}QL$ による転写活性の抑制は AhR タンパク質の分解の亢進によることが明らかとなった。これらの結果から、G タンパク質の活性化が AhR の細胞内局在を変化させ、AhR タンパク質の安定性を低下させることでダイオキシン受容体シグナルを抑制することが明らかとなった。

論文審査結果の要旨

申請者氏名 中田飛鳥

3量体 G タンパク質は生体内の多くの組織において、ホルモンや神経伝達物質、ケモカインなどの細胞外のシグナルを細胞内のシグナル分子に伝達する重要なタンパク質である。一方、ダイオキシン受容体 (AhR) も広範な組織に発現が見られ、本来の生体内での機能は不明の部分が多いが、ダイオキシンによる生殖毒性や肝臓毒性、免疫毒性、発ガン性などの生体毒性に関与することが知られている。申請者は G タンパク質の活性化が AhR シグナルの抑制することを見出し、その抑制機構を解明した。

まず申請者は G タンパク質 α サブユニットの一つ $G\alpha_{13}$ と AhR 結合分子である AIP (AhR interacting protein) の結合様式を解析し、AIP が G タンパク質の不活性化型 3 量体 $G\alpha\beta\gamma$ とは結合せず、 $G\beta\gamma$ から解離した $G\alpha$ に特異的に結合することを示した。さらに細胞内において $G\alpha$ が AhR-AIP 複合体形成を阻害することを見出した。またレポーターアッセイやリアルタイム PCR によって 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ことを示した。次に AhR の細胞内の動態を解析し、G タンパク質の活性化によって AhR が不活性化状態で核へ移行し、核に移行したその AhR は Arnt との 2 量体形成や AhR の DNA への結合が減弱していることを示唆した。さらに G タンパク質の活性化によって AhR のユビキチン化が促進し、AhR のタンパク質量が減少することを見出した。また $G\alpha_{13}QL$ の過剰発現によって、AhR の標的遺伝子 (CYP1A1) の転写誘導が抑制され、その抑制は AhR タンパク質の分解を阻害することで解除されたことから、G タンパク質の活性化による AhR の転写活性化の抑制にはユビキチン-プロテアソーム系を介した AhR タンパク質の分解が関与することが示唆された。

申請者は G タンパク質と AhR 結合分子の相互作用を起点とし、AhR の細胞内局在やタンパク質の安定性を詳細に検討し、G タンパク質シグナルとダイオキシン受容体シグナルというこれまで二つの独立したシグナル経路と考えられていたものがクロストークしていることを初めて見出し、そのメカニズムの一端を解明した。AhR は生体内のリガンドやその生理機能に関して未解明な部分が多く残されている。これまで G タンパク質は様々な生命現象に関わることが知られているが、新たに G タンパク質による AhR シグナルの活性制御機構が明らかになり、AhR の生理機能の解明につながることも期待される。

以上のように、本論文は G タンパク質によるダイオキシン受容体シグナルの抑制機構について多くの知見をもたらすものであり、学術上、応用上貢献するところが少なくない。よって審査委員一同は、本論文が博士 (バイオサイエンス) の学位論文として価値あるものと認めた。