

グルココルチコイド受容体とc-Junの蛋白間相互作用：

酵母two-hybrid 法による解析

鳥取大学医学部生命科学科生体情報学教室 (主任 西連寺 剛教授)

星川淑子・松野光伸

Protein-protein interaction between the glucocorticoid
receptor and c-Jun :

Analysis by yeast two-hybrid system

Yoshiko HOSHIKAWA, Mitsunobu MATSUNO

*Department of Biosignaling, School of Life Science,
Faculty of Medicine, Tottori University, Yonago 683, Japan***ABSTRACT**

The yeast two-hybrid system was used to detect the direct protein-protein interaction between glucocorticoid receptor (GR) and c-Jun. The pGBT9 vector was used to generate a fusion of the GAL4 DNA-binding domain (GAL4BD) with rat GR. The pGAD424 vector was used to generate a fusion of the GAL4 activation domain (GAL4AD) with mouse c-Jun. One or both of hybrid proteins were expressed in yeast strains that have a lacZ gene under the control of GAL4 responsive promoter as a reporter system. GAL4BD-GR constructed with the DNA binding domain and its surrounding sequences resulted in expression of the lacZ gene in the absence of GAL4AD-Jun. Deletion analysis revealed that the amino acid sequence of GR (from 324 to 419) act as a GAL4 activator. These fusion proteins were tested in the two-hybrid system but the interaction could not be observed. Then the two test proteins were switched to the other vectors. GAL4AD-GR constructed with approximately full length of GR was examined in combination with GAL4BD-Jun. However the direct interaction between GR and c-Jun was not be detected under the conditions used in this study.

(Accepted on May 14, 1996)

Key words : glucocorticoid, receptor, c-Jun, yeast, two-hybrid system

はじめに

グルココルチコイド受容体 (GR)は転写因子 AP-1と相互に干渉しあい、AP-1の転写活性化作用をブロックすることによりコラーゲナーゼの産生を抑制することが知られている。このようなコラーゲナーゼ遺伝子のGRによる転写抑制に必要なシスエレメントはAP-1結合配列だけで十分であることが示されている⁹⁾¹⁰⁾。さらにGR, c-Jun, c-Fosの変異蛋白を用いた研究から、GRのDNA結合領域とAP-1を構成するc-Junのロイシンジッパー構造との間に蛋白-蛋白相互作用が生じ転写促進活性のない複合体が形成されるという抑制機構が提唱されている¹⁰⁾。AP-1以外にも転写因子NF- κ Bを構成するp65, NF-IL6など複数の転写因子とGRの相互干渉作用が報告されており、グルココルチコイドの持つ抗炎症作用や免疫抑制作用との関連が注目されている。一方、グルココルチコイドは胸腺細胞や活性化された抹消Tリンパ球にアポトーシスによる細胞死を誘導する。GRについて細胞死の誘導に関与する領域を検索した結果、DNA結合領域とそのごく近傍のアミノ酸配列が効率よく細胞死を引き起こすことが示されている¹⁴⁾。これらの報告は、GRのDNA結合領域はグルココルチコイド応答配列 (GRE) への特異的結合に加えて何らかの重要な役割を持っている可能性を示唆している。本研究は、GRのDNA結合領域を介する蛋白-蛋白相互作用を理解するために酵母細胞内での蛋白間相互作用を検出するtwo-hybrid法¹⁶⁾を用いてGRとc-Junの相互作用について検討した。

材料と実験方法

1. 試薬等

two-hybrid法に用いた宿主酵母株、ベクター、コントロールプラスミドは東洋紡より購入した。合成オリゴヌクレオチドはバイオロジカ社より購入した。制限酵素、DNAリガーゼ、Taq DNAポリメラーゼ、5-buromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactoside (X-Gal)は宝酒造より購入した。bacto peptone, yeast extract, yeast nitrogen base (アミノ酸不含)はDifco社製を使用した。濾紙はタイテック社の No. 50 を使用した。その他の試薬は特級または生化学純度のものを使用した。

2. ベクターおよびプラスミド

融合蛋白質の構築および発現用のプラスミドベクターとしてpGBT9とpGAD424を使用した¹²⁾。pGBT9はGAL4のDNA結合領域を含み、pGAD424はGAL4の転写活性化領域を含む融合蛋白質作製用プラスミドである。ポジティブコントロールプラスミドとしてpCL1, pVA3 およびpTD1を使用した。pCL1は完全長の野生型GAL4, pVA3はマウスp53蛋白とGAL4DNA結合領域の融合蛋白質, pTD1はSV40のlarge T 抗原とGAL4活性化領域の融合蛋白質の発現プラスミドである。ラットGRに対するcDNAクローン, pRba117¹³⁾を鋳型DNAとし、以下のプライマー, GR1 (5'-GGGGATCCAGGCAAGCTTTTCTGGGAG-3'), GR2 (3'-GCTCCACAACATACGTCCTGACGTCGG-5'), GR3 (3'-CAAGGACGTCGTAATGGTGCAGCTGCC-5'), GRA (5'-CCGAATTCCTCCAGATGTAAGCTCTCCTC-3'), GRC (3'-CCCAGCTTCACTAACGTCAGCTGCC-5'), GRD (3'-GGAATGGATGACGAAGGTCCAGCTGCC-5')を使用してPCRを行い、図1に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを増幅した。GR1とGR2, GRBとGR3によって増幅したcDNAをpGBT9を用いてサブクローニングし、クローンG-B118, G-C126を分離した。GRAとGRC, GRAとGRD, GRBとGRC, GRBとGRDによって増幅したcDNAをpGAD424を用いてサブクローニングし、クローンG-E40, G-F26, G-G27, G-H20を分離した。マウスc-Junに対するcDNAクローン, pJac1¹⁵⁾(理研ジーンバンクより)を鋳型DNAとし、以下のプライマー, J1 (5'-GGGAATTCA TCGACATGGAGTCTCAGG-3'), J2 (3'-CACGGTTGAGTACGATTGCTCTAGAGG-5'), J3 (3'-GAGTACGATTGCGTCGTCACAGCTGGG-5')を使用してPCRを行い、図2に示したアミノ酸配列をコードするcDNAを増幅した。J1とJ2によって増幅したcDNAをpGAD424を用いてサブクローニングしクローンJ-A141を分離した。J1とJ3によって増幅したcDNAをpGBT9を用いてサブクローニングしクローンJ-E11を分離した。鋳型DNAとしてマウスc-JunのcDNAを使用した。融合プラスミドJ-A141およびJ-E11に

クローン化した領域のアミノ酸配列はマウスおよびラット間で完全に一致している¹⁰⁾.

3. 宿主酵母細胞株および酵母細胞の形質転換

宿主酵母細胞として *S. cerevisiae* SFY526株²⁾ および HF7c株⁵⁾ を用いた. β -ガラクトシダーゼ活性による蛋白間相互作用の検出には lacZ の発現レベルの高い SFY526 株を主に使用した. 宿主酵母細胞は YPD 培地を用いて培養した. 形質転換体は SD 合成培地よりトリプトファンまたはロイシンを除去した SD 選択培地を用いて培養した. ホルモン処理は, デキサメサゾン (Dex) をエタノールに溶解し, YPD 培地または SD 選択培地に 1/100 容量添加した.

コンピテント細胞は酢酸リチウム法により調整した¹⁷⁾. 一種類のプラスミドまたは二種類のプラスミドを用いて形質転換する場合は 0.1 μ g またはそれぞれ 1 μ g のプラスミド DNA と 100 μ g のキャリアー DNA (仔牛胸腺 DNA) を微量遠心チューブに分注し, 100 μ l のコンピテント細胞を加えた. 600 μ l のポリエチレングリコール (PEG) 溶液 {35 % (w/v) PEG4000, 100 mM 酢酸リチウム, 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5} を加えて混合した後, 30°C, 30 分間保温した. 70 μ l のジメチルスルホキシドを加えて穏やかに攪拌した後, 42°C, 5 分間熱ショックを与えた. 1,400 rpm で 5 秒間遠心し, 沈殿を 800 μ l の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.5) に懸濁した. 同様の遠心によりさらに一回洗った後, 0.5 ml の TE 緩衝液に懸濁した. 100 μ l の細胞懸濁液を適切な SD 選択寒天培地を含む 90 mm プレートにて 30°C で 2~4 日培養した.

4. フィルター法による β -ガラクトシダーゼ活性の検出

無作為に抽出した形質転換体の 10 コロニーを濾紙上にストリークし, SD 選択寒天プレートまたは YPD 寒天プレート上に置き 30°C で一晚培養した. 濾紙を剥がして β -ガラクトシダーゼ活性の検出を行った²⁾. 濾紙をコロニー面を上にして液体窒素に入れ 10 秒間液中に沈めて凍結させた後取り出して室温で融解させた. この濾紙を X-Gal 溶液 (100 mM リン酸ナトリウム, 10 mM 塩化カリウム, 10 mM 硫酸マグネシウム, 40 mM メルカプトエタノール, 0.5 mg/ml X-Gal, pH

7.0) で湿らせた濾紙の上にコロニー面を上にして置き, 30°C で保温し青色コロニーの出現により β -ガラクトシダーゼ活性を確認した.

結 果

1. ラット GR には GAL4 の転写活性化領域と機能的に類似したアミノ酸配列が存在する

GR および c-Jun の変異体を用いた研究から GR は DNA 結合領域を介して c-Jun のロイシンジッパー構造に直接結合すると推論されている¹⁶⁾. DNA 結合領域を中心とした蛋白-蛋白相互作用を解析するために, ラット GR の DNA 結合領域を含むアミノ酸 324 から 525 までを GAL4 活性化領域に繋いだ G-B118 を構築した (図 1). 一方, c-Jun の DNA 結合領域とそれに隣接するロイシンジッパー領域 (B-Zip 領域) を GAL4 DNA 結合領域に繋いだ J-A141 を構築した (図 2). G-B118 と J-A141 を用いて SFY526 株の形質転換を行い融合蛋白質間の相互作用について検討した (表 1, No. 5 - No. 7). G-B118 を単独で用いた場合 (表 1, No. 5) にポジティブコントロール (表 1, No. 23, 24) と同程度の β -ガラクトシダーゼ活性が検出された. この結果はラット GR のアミノ酸 324 から 525 が GAL4 の DNA 結合領域と共同して GAL1 プロモーターからの転写を活性化したことを示している. 実験結果は示さないが, HF7c 株を用いた実験において, ヒスチジンを除去した SD 選択培地上での生育を指標として HIS3 の発現を, β -ガラクトシダーゼ活性を指標として lacZ の発現を調べたが, いずれの検出方法を用いた場合にも G-B118 単独および G-B118 を含むプラスミドの組み合わせを用いて得られた形質転換体においてレポーター遺伝子が発現していることが確認された. G-B118 の cDNA 配列から DNA 結合領域より N 末側を除去した G-C126 を作製し (図 1), 同様の形質転換実験を行った (表 3, No. 8 - No. 10). G-C126 の形質転換体では β -ガラクトシダーゼ活性は検出されなかった (表 1, No. 8). 以上の結果から GR のアミノ酸配列 324 から 419 は GAL4 の DNA 結合領域と共同して転写活性化に関与することが明らかになった.

2. GR と c-Jun の蛋白-蛋白間相互作用

G-C126 と J-A141 を用いて得られた形質転換体において β -ガラクトシダーゼ活性は検出されな

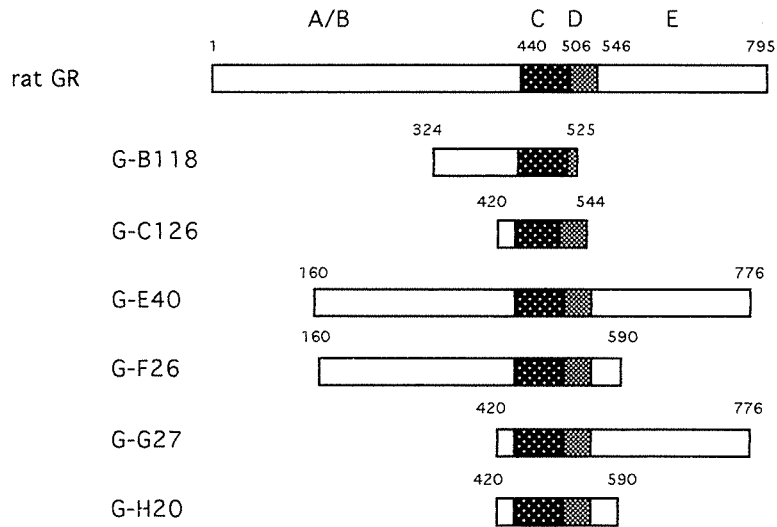


図1 ラットGRの機能ドメインと融合蛋白質の構築に用いたアミノ酸配列

最上段にラットGRの機能ドメイン構造と各ドメインのN末端に位置するアミノ酸の番号を示した¹⁾。A/BはN末端側に位置するドメイン，CはDNA結合領域，DはCドメインとEドメインの間に存在するヒンジ領域，EはC末端側に位置するホルモン結合領域である。下段に形質転換に用いた融合プラスミドのクローン名とそのプラスミドにサブクローニングされているcDNA配列に対応するアミノ酸配列を示した。G-B118とG-C126はベクターとしてpGBT9を，G-E40，G-F26，G-G27およびG-H20はベクターとしてpGAD424を使用した。

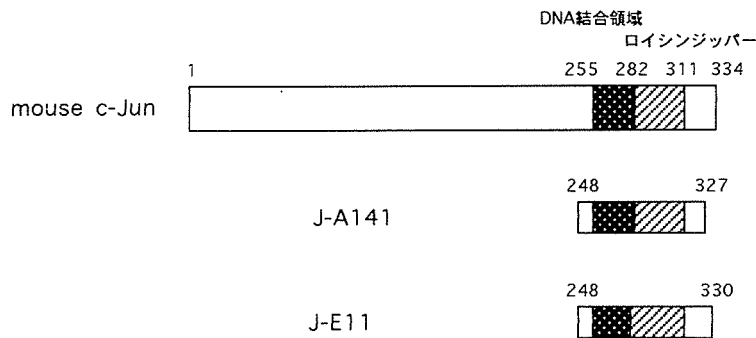


図2 マウスc-Junの機能ドメインと融合蛋白質の構築に用いたアミノ酸配列

最上段にマウスc-Junの機能ドメイン¹⁵⁾と各ドメインのN末端のアミノ酸の番号，下段に形質転換に用いた融合プラスミドのクローン名とそのプラスミドにサブクローニングされているcDNAに対応するアミノ酸配列を示した。J-A141はベクターとしてpGAD424を，J-E11はベクターとしてpGBT9を使用した。

表1 Two-hybrid 法による蛋白-蛋白相互作用の検出

No	plasmid 1 (GAL4 DNA 結合領域)	plasmid 2 (GAL4 活性化 領域)	SD選択培地での増殖*			β -ガラクト シダーゼ活性
			-T	-L	-T, -L	
1	-	J-A141	-	+	-	-
2	pGBT9	J-A141	+	+	+	-
3	J-E11	-	+	-	-	-
4	J-E11	pGAD424	+	+	+	-
5	G-B118	-	+	-	-	+
6	G-B118	pGAD424	+	+	+	+
7	G-B118	J-A141	+	+	+	+
8	G-C126	-	+	-	-	-
9	G-C126	pGAD424	+	+	+	-
10	G-C126	J-A141	+	+	+	-
11	-	G-E40	-	+	-	-
12	pGBT9	G-E40	+	+	+	-
13	J-E11	G-E40	+	+	+	-
14	-	G-F26	-	+	-	-
15	pGBT9	G-F26	+	+	+	-
16	J-E11	G-F26	+	+	+	-
17	-	G-G27	-	+	-	-
18	pGBT9	G-G27	+	+	+	-
19	J-E11	G-G27	+	+	+	-
20	-	G-H20	-	+	-	-
21	pGBT9	G-H20	+	+	+	-
22	J-E11	G-H20	+	+	+	-
23	-	pCL1	-	+	-	+
24	pVA3	pTD1	+	+	+	+

*SD合成培地よりトリプトファン (-T), ロイシン (-L) またはその両方 (-T, -L) を除去したSD選択培地での増殖を調べた。

かった (表1, No.10). すなわち融合蛋白質に含まれるGR側の領域をDNA結合領域とその極近傍に限定した場合, 酵母two-hybrid法によりc-JunのB-Zip領域との蛋白間相互作用を検出することはできなかった. 安定な蛋白複合体を形成するためにはGR蛋白全体の三次構造が必要である可能性が考えられる. そこでDNA結合領域のN末端側に位置するA/BドメインおよびC末端側に位置するEドメインにわたるより広範囲のアミノ酸配列を含む融合プラスミドを構築し蛋白間相互作用を検討した. ただし, G-B118を用いた形質転換実験の結果より, ラットGRのアミノ酸324から419はGAL4のDNA結合領域と共同してGAL

1プロモーターからの転写活性化に関与することが知られているので, A/Bドメインの大部分を含むアミノ酸配列を融合させたプラスミドを構築するベクターとしてpGAD424を使用した. 最も広範囲にわたるGRのアミノ酸配列をコードする融合プラスミドとして, アミノ酸160から776をGAL4活性化領域と融合させたG-E40を作製した (図1). 次にG-E40にサブクローニングした配列からEドメインの大部分を欠失させたG-F26, A/Bドメインの大部分を欠失させたG-G27, A/BドメインおよびEドメインの双方を欠失させたG-H20を作製した. 一方, c-Junのアミノ酸248から330をGAL4のDNA結合領域と融合させてJ-E11

表2 GRとc-Junの蛋白-蛋白相互作用におけるホルモン処理の効果

形質転換体	ホルモン処理後のβ-ガラクトシダーゼ活性				
	Dex 濃度 (M)				
	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴
J-E11/G-E40	-	-	-	-	-
J-E11/G-G27	-	-	-	-	-

を作製した (図2). J-E11, G-E40, G-F26, G-G27, G-H20のいずれの融合プラスミドについても単独で形質転換を行った場合には, 得られた形質転換体のβ-ガラクトシダーゼ活性は陰性であり, GAL4活性は検出されなかった (表1, No. 3, 11, 14, 17, 20). J-E11と4種のGRのアミノ酸配列をコードする融合プラスミドのいずれかひとつを組み合わせて得られた形質転換体についてβ-ガラクトシダーゼ活性を調べたが, 酵素活性は検出されず, レポーター遺伝子の転写活性化は観察できなかった (表1, No. 13, 16, 19, 22). すなわち酵母細胞内での融合蛋白質の発現だけではc-JunのB-Zip領域とGRの間に明確な相互作用は起こらないことが示された.

3. GRとc-Junの蛋白-蛋白間相互作用に対するホルモン処理の効果

Wangらは¹⁸⁾, two-hybrid法を用いてエストロゲン受容体 (ER)のダイマー形成過程を解析し, GAL4DNA結合領域-ER, GAL4活性化領域-ERのいずれの融合蛋白質も酵母細胞内で発現させた場合に高親和性のホルモン結合部位を持ち, 培地に添加したホルモンに反応してダイマーを形成することを報告している. そこで, GRのC末側に存在するホルモン結合領域のほぼ全体を発現する融合プラスミドG-E40とG-G27を用いて得られた形質転換体についてホルモン前処理後β-ガラクトシダーゼ活性を調べた. 1×10^{-8} から 1×10^{-4} MのDexを培地に添加し, 16時間培養した後にβ-ガラクトシダーゼ活性を検出した. しかし, G-E40とG-G27のいずれについてもDex処理によるβ-ガラクトシダーゼ活性の変動は観察されなかった (表2).

考 察

ラット組織由来のcDNAライブラリーをpGAD424のGAL4活性化領域の下流にあるマルチク

ローニングサイトに構築し, GRとの蛋白間相互作用を指標としてスクリーニングを行うことを目的として, ラットGRのDNA結合領域を含むcDNA配列をGAL4DNA結合領域に繋いだG-B118およびG-C126を作製した (図1). 一方, c-JunのB-Zip領域をGAL4活性化領域に繋いだJ-A141を作製した (図2). これらの発現プラスミドを用いて酵母細胞内における融合蛋白質の相互作用について検討した結果, GRのアミノ酸324から419はGAL4DNA結合領域と共同してGAL1プロモーターからの転写を活性化することが見出された. GAL4の転写活性化領域は二カ所に存在し, そのいずれかがDNA結合領域と同一の蛋白複体内にあれば応答性遺伝子の転写を活性化することが明らかにされている. これら二つの活性化領域間のアミノ酸配列上のホモロジーは低く, 類似点は両者が酸性アミノ酸を多く含んでいることである. pGAD424に含まれるC末端側の活性化領域については, その転写活性化能に酸性アミノ酸とα-ヘリックス構造が必要であろうと考えられているが, 明確な結論は得られていない¹⁷⁾. GRのDNA結合領域近傍のA/Bドメインのアミノ酸配列を調べたところ, グルタミン酸及びアスパラギン酸の出現頻度の高い領域は検出されなかった. この領域による転写活性化の機構についてはさらに検討が必要である.

G-C126とJ-A141を用いた結果から, 融合蛋白質に含まれるGR側の領域をDNA結合領域とその極近傍に限定した場合, c-JunのB-Zip領域との相互作用は検出されなかった (表1, No. 10). そこでGRのほぼ全長をGAL4活性化領域に繋いだG-E40とc-JunのB-Zip領域をGAL4DNA結合領域に繋いだJ-E11を作製した. しかし, これらの融合プラスミドを用いて得られた形質転換体でもβ-ガラクトシダーゼ活性は検出されず, 酵母細胞内で融合蛋白質を発現させただけではGRとc-Junの間に明確な相互作用は起こらないことが示

された(表1, No.13).

最近, two-hybrid法を用いたERのダイマー形成過程に関する研究において, GAL4DNA結合領域-ER, GL4活性化領域-ERのいずれの融合蛋白質も酵母細胞内で発現させた場合に高親和性のホルモン結合部位を持つことが報告されている¹⁸⁾. さらに, これらの融合蛋白質はエストロゲン応答性配列を繋いだLacZの転写を野生型ERと同様に活性化することが明らかにされている. G-E40を用いて酵母細胞内で発現させた融合蛋白質についてもc-Junとの相互作用がホルモン結合によって変化する可能性が考えられるので形質転換体のβ-ガラクトシダーゼ活性を測定する前にホルモン処理を行い, その影響について検討した. しかし, 我々の実験条件ではホルモン処理によるレポーター遺伝子の転写活性化を検出することは出来なかった.

一方, 変異体を用いた研究からGRとAP-1の相互干渉作用に必要なc-Junの領域はロイシンジッパーのみであることが報告されていたので¹⁶⁾, c-JunのB-Zip領域周辺のみを含む融合蛋白質を作製した. この領域にはホルボールエステルによってリン酸化の減少する部位, レドックス制御を受けるシステイン残基などが複数存在している. これらの部位のリン酸化・脱リン酸化やレドックス制御がGRとの相互作用に与える影響について検討することが今後の課題である.

結 語

1. GRのアミノ酸324から419はGAL4DNA結合領域と共同してGAL1プロモーターからの転写を活性化することを明らかにした.
2. ラットGRおよびc-Junの部分アミノ酸配列をGAL4のDNA結合領域あるいは転写活性化領域に繋いだ融合蛋白質を酵母細胞内で発現させたが, 融合蛋白質間の相互作用は観察されなかった.
3. GRのホルモン結合領域を発現する融合プラスミドを用いて得られた形質転換体をデキサメサゾン処理したが, レポーター遺伝子の転写活性化を検出することはできなかった.

稿を終えるにあたり, 御指導いただきました鳥取大学医学部生体情報学教室一井昭五名誉教授, 御校閲いただきました西連寺 剛教授に感謝いたします.

文 献

- 1) Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- 2) Bartel, P. L., Chien, C.-T., Sternglanz, R. and Fields, S. (1993). Elimination of false positives that arise in using the two-hybrid system. *BioTechniques* 14, 920-924.
- 3) Breeden, L. and Nasmyth, K. (1985) Regulation of the yeast HO gene. In *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY) 50, 643-650.
- 4) Chien, C. T., Bartel, P. L., Sternglanz, R., and Fields, S. (1991). The two-hybrid system: A method to identify and clone genes for proteins that interact with a protein of interest. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 9578-9582.
- 5) Feilotter, H. E., Hannon, G. J., Ruddel, C. J., and Beach, D. (1994). Construction of an improved host strain for two hybrid screening. *Nucleic Acids Res.* 22, 1502-1503.
- 6) Fields, S. and Song, O.-K. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-247.
- 7) Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K., and Kimura, A. (1983). Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bacteriol.* 153, 163-168.
- 8) Iwabuchi, K., Li, B., Bartel, P. and Fields, S. (1993). Use of the two-hybrid system to identify the domain of p53 involved in oligomerization. *Oncogene* 8, 1693-1696.
- 9) Jonat, C., Rahmsdorf, H. J., Park, K.-K., Cato, A. C. B., Gebel, S., Ponta, H., and Herrlich, P. (1990). Antitumor promotion and antiinflammation: Down-modulation of AP-1 (Fos/Jun) activity by glucocorticoid hormone. *Cell* 62, 1189-1204.

- 10) Kitabayashi, I., Saka, F., Gachelin, G., and Yokoyama, K. (1990). Nucleotide sequence of rat c-jun protooncogene. *Nucleic Acids Res.* **18**, 3400
- 11) Li, B and Fields, S. (1993). Identification of mutations in p53 that affect its binding to SV40 large T antigen by using the yeast two-hybrid system. *FASEB J.* **7**, 957-963.
- 12) Ma, J. and Ptashne, M. (1987). Deletion analysis of GAL4 defines two transcriptional activating segments. *Cell* **48**, 847-853.
- 13) Miesfeld, R., Rusconi, S., Godowski, P. J., Maler, B. A., Okret, S., Wikstrom, A.-C., Gustafsson, J.-A., and Yamamoto, K. R. (1986) Genetic complementation of a glucocorticoid receptor deficiency by expression of cloned receptor cDNA. *Cell* **46**, 389-399.
- 14) Nazareth, L. V., Harbour, D. V. and Thompson E. B. (1991) Mapping the human glucocorticoid receptor for leukemic cell death. *J. Biol. Chem.* **266**, 12976-12980.
- 15) Ryder, K. and Nathans, D. (1988). Induction of protooncogene c-jun by serum growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 8464-8467.
- 16) Schule, R., Rangarajan, P., Kliewer, S., Ransone, L. J., Bolado, J., Yang, N., Verma, I. M., and Evans, M. (1990). Functional antagonism between oncoprotein c-Jun and the glucocorticoid receptor. *Cell* **56**, 1217-1226.
- 17) Swaffield, J. C., Bromberg, J. F., and Johnston, S. A. (1992). Alterations in a yeast protein resembling HIV Tat-binding protein relieve the requirement for an acidic activation domain in GAL4. *Nature* **357**, 698-700.
- 18) Wang, H., Peters, A. P., Zeng, X., Tang, M., Ip, W., and Khan, S. A. (1995). Yeast two-hybrid system demonstrates that estrogen receptor dimerization is ligand-dependent in vivo. *J. Biol. Chem.* **270**, 23322-23329.
- 19) Yang-Yen, H.-F., Chambard, J.-C., Sun, Y.-L., Smeal, T., Schmidt, T. J., Drouin, J., and Karin, M. (1990). Transcriptional interference between c-Jun and the glucocorticoid receptor: Mutual inhibition of DNA binding due to direct protein-protein interaction. *Cell* **56**, 1205-1215.