

新規 BTB-zinc finger 型転写抑制因子 HABZ の機能解析

笹井 信広

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)

平成 17 年 1 月 6 日

目次

1. 序論	5
2. 材料と方法	12
2- 1	
3' RACE および <i>HABZ</i> cDNA のクローニング	12
2-2	
プラスミド	12
2-3	
ノザンブロット	12
2- 4	
Yeast two-hybrid screening	13
2- 5	
Yeast two-hybrid 結合アッセイ	13
2- 6	
細胞培養、レポーターアッセイおよび Mammalian two-hybrid アッセイ	13
2- 7	
抗体	14
2- 8	
免疫沈降	14
2- 9	
大腸菌での蛋白質発現・精製	14
2- 10	
GST-pull down	15
2-11	
ゲルシフト	15
2-12	
免疫蛍光染色	16

3. 結果	17
3- 1	
HABZ は新規 BTB-zinc finger 蛋白質である	17
3- 2	
HABZ はマウス生体各臓器で広範に発現している	18
3- 3	
HABZ は pericentromeric heterochromatin に局在する	19
3- 4	
HABZ は DNA にリクルートされると転写抑制活性を示す	20
3- 5	
HABZ は 2ヶ所の転写抑制ドメイン (BTB と RD2) を持つ	21
3- 6	
HABZ による転写抑制には HDACs が関与する	21
3- 7	
HABZ は酵母細胞および哺乳動物細胞内で、RD2 を介して CtBP1/2 と相互作用する	22
3- 8	
HABZ は PLDLR モチーフを介して CtBP と相互作用する	23
3- 9	
HABZ は PLDLR モチーフを介して CtBP を pericentromeric heterochromatin に誘導する	24
3-10	
CtBP との結合は RD2 の転写抑制活性に必須である	24
3-11	
BTB ドメインは CtBP との結合とは独立して転写抑制ドメインとして機能する	25
3-12	
HABZ のジンクフィンガーは Kaiso コンセンサス配列には結合しない	25
3-13	
HABZ のジンクフィンガーはメチル化 DNA に結合する	26

4. 考察	58
5. 謝辞	68
6. 参考文献	69

序論

生物において発生や分化・増殖といった様々な生命現象は、個々の遺伝子の適切な発現調節によって制御されており、近年の研究から、クロマチン構造が転写調節と密接に関連していることが明らかとなっている。クロマチンは、ヒストン H2A、H2B、H3、H4 それぞれ 2 分子からなる 8 量体に 146bp の DNA が巻きついたヌクレオソームを基本構造とし、それらが多数集まり高度に凝集した状態をいう (Kornberg and Lorch, 1999; Dillon and Festenstein, 2002)。古くからの細胞学的な解析により、クロマチンは大きく 2 つのタイプ、ヘテロクロマチンとユークロマチン、に分類されている。ヘテロクロマチンは高度に凝縮し、色素で濃く染まる染色体の領域であり、セントロメア近傍やテロメア領域が含まれ、遺伝子の発現抑制、正常なセントロメアの機能や核構造に重要であるとされている。また、ヘテロクロマチンは反復 DNA 配列を多く含み、遺伝子の数は少ないものの、ショウジョウバエでは 40 から 50 程度の遺伝子は含まれていると考えられている。セントロメア近傍のような常にヘテロクロマチン構造を維持しているものは構成的ヘテロクロマチン (constitutive heterochromatin) と呼ばれ、一方、不活化 X 染色体のように発生や分化に伴って形成されるヘテロクロマチンは条件的ヘテロクロマチン (facultative heterochromatin) と呼ばれる (Richards and Elgin, 2002)。このようなヘテロクロマチン構造は世代を超えて維持されることが知られており、近年の研究から、それには DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな機構が関係していることが明らかになっている。ヘテロクロマチンに特徴的なエピジェネティックな化学修飾として、ヒストンの脱アセチル化、ヒストン H3 の 9 番目リジン (H3K9) のメチル化や DNA メチル化などが知られている (Richards and Elgin, 2002)。

ヒストンは進化的にも非常によく保存された蛋白質であり、その C 末端側は 8 量体の形成に利用され、一方 N 末端側 (ヒストンテール) はフリーになっており (Luger et al., 1997)、アセチル化、メチル化、リン酸化やユビキチン化などの化学修飾を受けることが知られている (Lund and Lohuizen, 2004)。ヒストンの修飾は、修飾される残基、修飾の種類やその組み合わせによって、多様な制御を可能とし、さらに、その修飾されたヒストンが別の蛋白質によって認識され、その機能を発揮することが明らかとなりつつある (Jenuwein and Allis, 2001)。このようなヒストンの化学修飾の中で最もよく知られているのが、主にヒストン H3 および H4 のリジン残基のアセチル化である。ヒストンのアセチル化は可逆的であり、転写状態によって変化している。ヒストンアセチル化酵素 (HAT) によってヒストンがアセチル化されるとクロマチン構造が緩くなり、転写因子群の相互作用が可能となることで転写活性化の方向へと進むと考えられている (Nakatani, 2001)。逆にヒストンが脱アセチル化されるとクロマチンは凝縮し、転写不活性な構造へと変化する。ヒトではヒストン脱アセチル化酵素はこれまで十数種類同定されており、その構造や機能から 3 つのクラ

ス (Class I, II, III) に分類されている (Khochbin et al., 2001)。

また、最近の研究からヒストンのメチル化も転写調節に重要であることが分かっており、ヘテロクロマチン形成との関係も詳細に解析されている。SET ドメインを持つ SUV39H は H3K9 をメチル化する酵素であり、この SUV39H によりメチル化された H3K9 に、クロモドメインを持つ HP1 蛋白質が結合することでヘテロクロマチン状態が確立されることが示されている (Lachner et al., 2001)。他にも、G9a や SETDB1 などによる H3K9 のメチル化は転写抑制に関与しているが (Tachibana et al., 2002; Schultz et al., 2002)、逆に、ヒストン H3 の 4 番目のリジン (H3K4) のメチル化は転写の活性化に関係していることから (Santos-Rosa, et al., 2002)、ヒストンのメチル化は転写活性化と転写抑制の両方に関与していることが明らかになっている。

コリプレッサーは非 DNA 結合型の転写抑制因子であり、多くの DNA 結合型の転写因子に結合し転写抑制を行っている (Jepsen and Rosenfeld, 2002)。これまでに SMRT/NCoR、mSin3A、C-terminal binding protein (CtBP) やその他多くのコリプレッサーが同定されている。これらコリプレッサーは複合体を形成し、ヒストン修飾やクロマチン構造変換を介して転写を抑制していることが明らかとなりつつある。SMRT/NCoR は始め、リガンド非結合型の核内レセプターに結合し、転写抑制を仲介する因子として同定された (Chen and Evans, 1995; Horlein et al., 1995)。その後、核内レセプターだけではなく様々な種類の転写因子と結合し、コリプレッサーとして機能することが報告されている (Jepsen and Rosenfeld, 2002)。生化学的な精製によって、SMRT/NCoR 複合体は主要な構成因子として、HDAC3、TBL1/TBLR1、GPS2 などを含むことが明らかとされている (Li et al., 2000; Yoon et al., 2003)。また、NCoR は mSin3A や HDAC1、HDAC2 とも相互作用することが知られている (Nagy et al., 1997)。NCoR ノックアウトマウスは神経分化や免疫系に異常が現れ胎生致死となることから、生体内で重要な役割を担っていることが示唆されている (Jepsen et al., 2000)。

CtBP1 は最初、アデノウイルス 2/5 の E1A 蛋白質の C 末端側に結合し、E1A による oncogenic transformation 活性を抑制する細胞内因子として同定された (Boyd et al., 1993; Schaeper et al., 1995)。その後、CtBP1 と高い相同性を示す CtBP2 蛋白質がヒトおよびマウスで同定されている (Katsanis and Fisher, 1998; Turner and Crossley, 1998)。さらに、アフリカツメガエル、ショウジョウバエにおいても 2 種類あるいは 1 種類の CtBP がクローニングされ (Brannon et al., 1999; Sewalt et al., 1999; Nibu et al., 1998)、脊椎動物、無脊椎動物において進化的に保存されていることが明らかとなった。CtBPs は N 末端側領域で、転写因子内のコンセンサス配列 PXDLS (X は任意のアミノ酸) に特異的に結合し、コリプレッサーとして機能する (Chinnadurai, 2002)。さらに最近の研究から、PXDLS に類似した配列にも結合することが明らかとなっており、より多くの転写因子が CtBP への結合

能を有していると推測されている (Chinnadurai, 2002)。また、CtBPsはDNA結合型転写因子以外にも、PXDSL様モチーフを持つ ClassII HDACs、HDAC4, 7, 9 やポリコーム群蛋白質である HPC2 とも相互作用する (Dressel et al., 2001; Zhang et al., 2001; Sewalt et al., 1999)。これは、CtBPsが転写因子とHDACsやポリコーム蛋白質をつなぐアダプター蛋白質としての役割を担っていることを示唆している (Turner and Crossley, 2001)。

遺伝学的、生化学的な解析から、CtBPsは生体内で様々な重要な機能を有していることが明らかとされている。ショウジョウバエにおいて、dCtBPはshort-range転写抑制因子であるSnail、KruppelやKnirpsと結合することで、初期発生における正常な胚形成に重要な役割を果たしている (Nibu et al., 1998a, b)。哺乳動物においては、CtBPsはRas関連の転写因子Net、癌遺伝子Evi-1、WntシグナリングのエフェクターTcf-4など多くの分化や増殖関連因子に結合し、標的遺伝子の転写を抑制することから、癌化への関与が示唆されている (Criqui-Filipe et al., 1999; Izutsu et al., 2001; Valenta et al., 2003)。また、CtBP1/CtBP2欠損マウスの解析により、胚発生に重要な役割を担っていることが示され、CtBP1とCtBP2は独自の機能とオーバーラップした機能の両方を持ち合わせていることも明らかとされた (Hildebrand and Soriano, 2002)。さらに、野生型およびCtBP1/CtBP2欠損細胞を用いたマイクロアレイ解析によって、CtBPsはE-cadherin、plakoglobin、occludinやkeratin-8といった上皮 (epithelial) 特異的遺伝子群や、p21、Bax、NoxaやPERPといったproapoptotic遺伝子群の発現制御を行っていることが明らかとなった (Grooteclaes et al., 2003)。そして、CtBPがリン酸化を受け分解されることによって、実際にアポトーシスが引き起こされることも確認されている (Zhang et al., 2003)。

このようにCtBPsは多くの転写因子や共役因子に結合するコリプレッサーであり、発生や増殖、分化を制御していることが明らかになりつつあるが、その転写抑制の分子機構に関しては未だ不明な点が多い。CtBPsは上述したClassII HDACsに加え、ClassI HDACs (HDAC1, 2, 3)とも直接結合する (Sundqvist et al., 2001)。しかし、CtBPsによる転写抑制には、HDAC依存性機構に加え、HDAC非依存性の機構も存在することが明らかとなっている。NetやEvi-1によるCtBPを介したc-fosプロモーターとPAI-1プロモーターに対する転写抑制は、HDAC依存的である (Criqui-Filipe et al., 1999; Izutsu et al., 2001)。一方で、CtBPを介したpRbやp130によるSV40初期プロモーターの抑制やIkarosによるアデノウイルスのmajor lateプロモーターの抑制はHDAC非依存的である (Dahiya et al., 2001; Meloni et al., 1999; Koipally and Georgopoulos, 2000)。こうしたことから、CtBPは細胞やプロモーターの種類に依存して、数種の転写抑制機構を利用しているのではないかと考えられている。また、CtBPはNAD依存的な脱水素酵素 (NAD-dependent 2-hydroxy acid dehydrogenases) と相同性を持ち、活性中心

に catalytic な His 残基を有し、NAD 結合モチーフも含んでいる。そして、NAD の濃度が CtBP と CtBP 結合蛋白質との結合に影響を与えている報告もなされているが、NAD がどのように CtBP のコリプレッサー活性に影響を与えているかについては現在のところ不明な点が多い (Zhang et al., 2002; Kumar et al., 2002)。さらに、CtBP のコリプレッサー活性の制御には細胞内局在や翻訳後修飾が関係していることが明らかとなりつつあるものの、核内での CtBP の局在と転写抑制活性との相関についてはほとんど明らかになっていない。

哺乳動物や植物においては、ヒストンの脱アセチル化や H3K9 のメチル化に加え、DNA のメチル化が転写抑制と密接に関連している。哺乳動物においては、主に CpG 配列中のシトシンがメチル化修飾を受け、それは組織特異的な遺伝子発現、ゲノムインプリンティングや X 染色体の不活化等に重要な役割を担っている (Bird, 2002)。また、DNA メチル化酵素のノックアウトマウスが重篤な表現型を示すことから、DNA メチル化は胚発生に重要であることが明らかとされている (Li et al., 1992; Okano et al., 1999)。哺乳動物においては、ゲノム中の 70% から 80% 程度の CpG 配列がシトシンのメチル化を受けているとされ、メチル化を受けていない CpG 配列の多くは、CpG リッチなプロモーター領域 (CpG アイランド) に存在している (Bird, 2002)。DNA メチル化は、DNA 結合型転写因子の DNA への結合を物理的に阻害する結果転写抑制に働くのみではなく、メチル化 DNA に特異的に結合するメチル CpG 結合蛋白質が結合することによって転写抑制が行われる。当初はメチル化 DNA に結合する蛋白質として、共通したメチル化 DNA 結合ドメイン (MBD) を持つ MBD1, 2, 3, 4 および MeCP2 の 5 種類が同定されたが、MBD3 に関しては、MBD を持っているもののメチル化 DNA にはほとんど結合できないことが現在では明らかとなっている (Lewis et al., 1992; Hendrich and Bird, 1998)。また最近では、MBD を持たない BTB-ジンクフィンガー型蛋白質である Kaiso も、ジンクフィンガーを介してメチル化 DNA に結合することが報告されている (Prokhortchouk et al., 2001)。これらのうち、DNA ミスマッチ修復に関与する MBD4 以外は (Hendrich et al., 1999)、MBD3 も含めて全て転写抑制に関与することが明らかとなり、それらにはヒストン修飾やクロマチン構造変換が関係している。MeCP2 は mSin3A/HDAC 複合体と (Nan et al., 1998)、MBD2 は ATPase 活性を持つクロマチン構造変換因子 Mi-2 や HDAC を含む NuRD 複合体とそれぞれ相互作用し (Zhang et al., 1999)、また Kaiso は NCoR/HDAC3 と相互作用する。さらに、MeCP2 や MBD1 の複合体は H3K9 に対するヒストンメチル化活性を持つことも明らかとされている (Fuks et al., 2003; Sarraf and Stancheva, 2004)。こうしたことから、DNA メチル化とヒストン修飾、クロマチン構造変換といったエピジェネティックな機構は、互いに連携して働くことで転写抑制状態を確立していることが徐々に明らかになってきている (Richards and Elgin, 2002)。

C₂H₂型ジンクフィンガーモチーフはゲノム中で最も多く見出される DNA 結合モチ

ーフの一つであり、それらジンクフィンガー蛋白質のうち 5~10%程度は、BTB/POZ (broad-complex, tramtrack, bric à brac/poxvirus and zinc finger) ドメインを有すると推測されている (Collins et al., 2001)。BTBドメインは始め、ショウジョウバエにおいてBroad-Complex、bric à brac、tramtrackやその他の発生関連遺伝子群に共通して見出されるドメインとして同定され (Zollman et al., 1994)、また、ZID、GAGA、ZF5 といったジンクフィンガー蛋白質やpoxvirusの蛋白質内にも見られるということから、POZ ドメインとも呼ばれている (Bardwell and Treisman, 1994)。他にも、BTB/POZドメイン (以下BTBドメイン) は酵母からヒトまで数多くの蛋白質に存在することが確認され、その多くはジンクフィンガーやロイシンジッパーといったDNA結合ドメイン、あるいはKelchリピートといったアクチン結合ドメインを持つ蛋白質のN末端側に存在している (Albagli et al., 1995; Collins et al., 2001)。

BTB ドメインの主要な機能は蛋白質間の相互作用である (Albagli et al., 1995)。これまでに、多くの BTB ドメイン間でのホモダイマーあるいはヘテロダイマーの形成が報告されている (Deltour et al., 1999; Kobayashi et al., 2000)。また、NCoR/SMRT、mSin3A といったコリプレッサーや HDAC との結合ドメインとしても機能しており、その結合には BTB ドメインによるダイマー形成が重要であるとされている (Huynh et al., 2000; Melnick et al., 2000)。さらに、最近 BTBドメインは E3 ユビキチンリガーゼ複合体の構成因子である Cul-3 との結合能を持ち、BTB 蛋白質が基質特異的アダプターとしての役割を担っていることが明らかとされている (Pintard et al., 2003; Xu et al., 2003)。しかし、BTBドメインとコリプレッサーとの相互作用が全ての BTB 蛋白質に当てはまるわけではなく (Deltour et al., 1999)、また Cul-3 との結合も同様であると考えられる (Kobayashi et al., 2004)。したがって、BTBドメインの機能は多岐にわたると示唆されている。

また、多くの BTB 蛋白質に共通して見られる現象として、核内での foci の形成が挙げられる (Deltour et al., 2002)。一部の蛋白質に関しては foci の形成には BTB ドメインによるダイマー形成が重要な役割を担っていることが明らかとされているものの、大部分の BTB 蛋白質の foci に関して、その実体や機能、形成の意義等についてはほとんど明らかとなっていない。

このような BTB 蛋白質の中で、ジンクフィンガー蛋白質を中心とした転写因子ファミリーは、多くが転写抑制因子として機能する。BCL-6 や PLZF の BTBドメインはコリプレッサーである SMRT/NCoR や mSin3A、さらには HDAC1 と相互作用することが *in vivo* および *in vitro* で示されている (David et al., 1998; Wong et al., 1998; Dhordain et al., 1997, 1998; Huynh et al., 1998; Lin et al., 1998)。また BCL-6 の BTBドメインは、BCL-6 特異的なコリプレッサーBCoR と結合する (Huynh et al., 2000)。さらに、いくつかの BTB 転写因子は BTB ドメイン以外にも転写抑制活性を持ち、コリプレッサー/HDACs と結合することが明らかとなっている。例えば、

PLZF の RD2 は ETO コリプレッサーと相互作用し、この場合には BTB ドメインによるダイマー形成も必要とされている (Melnick et al., 2000)。また、BCL-6 は BTB ドメインとジンクフィンガーの間の領域を介して、Mi-2/NuRD 複合体の構成因子 MTA3 と結合し (Fujita et al., 2004)、一方ジンクフィンガーでは Class II の HDACs と相互作用する (Lemercier et al., 2002)。HIC-1 は、中央領域の GLDLSKK モチーフを介して CtBP1 と相互作用するが (Deltour et al., 2002)、BTB ドメインでは転写抑制活性を持つものの SMRT/NCoR や HDAC1 との結合は見られない (Deltour et al., 1999)。このように多くの BTB 転写因子は転写抑制因子として機能するものの、その転写抑制機構は様々であり、それぞれ特有の機能を持っていると考えられる。

これら BTB-ジンクフィンガー蛋白質は、BTB ドメインやその他の領域でコリプレッサー/HDAC と結合する一方で、ジンクフィンガーを介してコンセンサス DNA 配列に結合する (Li et al., 1997; Aoki et al., 1998; Daniel et al., 2002; Pinte et al., 2004)。また Kaiso のジンクフィンガーは、上述した通り MBD 蛋白質同様メチル化 DNA にも結合する (Prokhortchouk et al., 2001)。そして、相同性の高いジンクフィンガー同士では類似した配列に結合することが知られており、BAZF や FAZF は、それぞれ相同性の高い BCL6 と PLZF の結合配列に結合することが明らかとなっている (Okabe et al., 1998; Hoatlin et al., 1999)。したがって、これら BTB-ジンクフィンガー蛋白質は、コリプレッサー等を特定の標的 DNA 上にリクルートし、クロマチン構造変換を行うことで転写抑制を行っていると考えられる。

また、これら BTB-ジンクフィンガー因子の生体内での機能も少しずつ明らかとなりつつあり、ヒトの疾患との関連も知られている。例えば、BCL-6 は B 細胞リンパ腫、PLZF は急性骨髄性白血病と関連しており、また HIC-1 は癌抑制遺伝子であり、Miller-Dieker 症候群との関連も疑われている (Carter et al., 2000)。また、初期発生にも重要であることも示されている (Adhikary et al., 2003)。しかし、BTB-ジンクフィンガー型転写因子は数十個存在すると予測されているものの、これら一部の蛋白質を除いて大部分は、その転写制御機構や成体での機能に関してはほとんど不明である。

そこで本研究では、当研究室で行っているジーントラッププロジェクトによって同定された新規の BTB-ジンクフィンガー型遺伝子 HABZ (Heterochromatin-associated BTB-zinc finger protein) の機能解析を行った。HABZ は多くの BTB-ジンクフィンガー因子同様転写抑制因子であり、2ヶ所の転写抑制ドメイン、BTB ドメインと Repression Domain 2 (RD2) を持つことが明らかとなった。それらは、それぞれ HDAC 非依存的、依存的な転写抑制活性を示し、HABZ と HDAC との相互作用も確認できた。また、RD2 は PLDLR モチーフを介してコリプレッサー CtBP と相互作用し、核内で CtBP をヘテロクロマチンにリクルートする機能を有することも明らかとなった。さらに、HABZ のジンクフィンガーは Kaiso のジンクフィンガ

一と高い相同性を示し、Kaiso同様メチル化DNAに特異的に結合することが明らかとなった。以上の結果より、HABZは新規の転写抑制因子であり、CtBP/HDAC複合体を介してDNAメチル化依存的な転写抑制を行うことが示唆された。

材料と方法

3' RACE および *HABZ* cDNA のクローニング

ジーントラップと 3' rapid amplification of cDNA ends (3' RACE) は引用文献に従って行った (Matsuda et al., 2004)。*HABZ* cDNA の全長はマウス腎臓の Total RNA を用いて、EST データベースの情報をもとにし、3' RACE と RT-PCR によりクローニングした。pBluescript II KS(+) (Stratagene) にサブクローニングし、シーケンスにより確認した。

プラスミド

C 末端側に Myc タグを付加した *HABZ* (*HABZ*-Myc) は、*HABZ* cDNA を BamHI/ClaI で切断し、Myc タグをコードする ClaI/XhoI の断片とともに pcDNA3 ベクター (Invitrogen) の BamHI/XhoI サイトに組み込んだ。その後、ClaI で切断し、フレームを合わせるため Klenow fragment で平滑化し、セルフライゲーションを行った。GAL4-*HABZ* (1-1197) は、*HABZ* 全長と GAL4 (1-147) を pcDNA3 の HindIII/XhoI サイトに挿入することで作製した。GAL4-*HABZ* (1-158)、-*HABZ* (158-339)、-*HABZ* (335-538)、-*HABZ* (967-1197)、-*HABZ* (1-339) の各種欠損体は、PCR で増幅した断片を GAL4 (1-147) とともに pcDNA3 の HindIII/XhoI サイトに組み込んで作製した。GAL4-*HABZ* (158-1197)、-*HABZ* (335-1197)、-*HABZ* (539-1197)、-*HABZ* (539-1012)、-*HABZ* (1-538) の各種欠損体は PCR で増幅した断片あるいは制限酵素で切断した断片を、上記のプラスミドから切断したベクターと置き換えることで作製した。Yeast two-hybrid 用のプラスミドは、各種 GAL4 融合コンストラクトから pGBT9 あるいは pGAD424 に移し替えて使用した。

CtBP1、CtBP2、HDACs は RT-PCR により作製し、FLAG 配列を含む pcDNA3 ベクターに組み込んだ。GAL4-RD2 の変異体および *HABZ*-Myc の変異体は two-step PCR あるいは Site-directed mutagenesis (Stratagene) により作製した。VP16-CtBP1 は CtBP1 の EcoRI/SalI 断片を pCMX-VP16 ベクター (Agata et al., 1999) にライゲーションすることで作製した。ルシフェラーゼアッセイ用レポーター遺伝子 (pGL3-G5SV、pGL3-SV、pGL3-G5B および pRL-SV) は引用文献 (Agata et al., 1999) に記載されているものを使用した。

ノザンブロットニング

マウス成体の各臓器および胎児から、ISOGEN (Nippongene) を用いて Total RNA を抽出した。おおよそ 20 μ g の Total RNA を 1.0% の変性アガロースゲルを用いて、1 \times MOPS バッファー中で泳動した。ゲルを DDW で洗浄後、10 \times SSC を用いてナイロンメンブレン (Geenscreen plus) にトランスファーし、UV クロスリンクによってメ

ンブレンに固定した。42°Cで2時間プレハイブリダイゼーションを行った後、³²Pラベルしたプローブ (nt. 436-1022) を加え、42°Cで一晩ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを、2× SSPE/0.1%SDSで15分間室温で一回、1×SSPE/0.1%SDSで15分間55°Cで2回の洗浄を行った後、X線フィルムに一晩感光した。その後、メンブレンを0.1×SSC, 1% SDS中でボイルすることによりプローブを剥離し、再度β-actinプローブを用いて同様にハイブリダイゼーションを行った。

Yeast two-hybrid スクリーニング

酵母株 HF7c を bait プラスミド (pGBT9-BTB-RD2) で形質転換した。この酵母株を 12.5 ml の SD (-Trp) 培地を用いて 30°C で一晩培養した後、50 ml の YPAD 培地に移しさらに 4-5 時間培養した。菌体を回収し、DDW、LiOAc でそれぞれ一回ずつ洗浄後、10 μg のマウス 17 日胚 cDNA ライブラリー (Clontech) を用いて形質転換した。これを、15 cm の SD (-Leu, Trp, His) プレート 10 枚に播いた。全体で 4.5×10^6 クローンのスクリーニングを行った。約 7 日後、コロニーをピックアップし、新たな SD プレート上でシングル化を行った。各クローンから 3 つずつコロニーを拾い、フィルター法により β-ガラクトシダーゼアッセイを行った。ポジティブクローンからプラスミドを抽出し、再度酵母株 SFY526 を用いて β-ガラクトシダーゼアッセイを行い、ポジティブなクローンに関してシーケンスを行った。

Yeast two-hybrid 結合アッセイ

酵母株 SFY526 を、bait (pGBT9-) および prey (pGAD424-) プラスミドを用いて同時に形質転換し、SD (-Leu, -Trp) プレートで選択した。各クローンをシングル化した後、それぞれのクローンから 3 つずつコロニーを拾い、液体培地で培養し、プロトコール (Clontech) に従い β-ガラクトシダーゼ活性 (Miller Unit) を測定した。その結果、結合の見られたものは ++ または +、見られないものは - で示した。

細胞培養、レポーターアッセイおよび Mammalian two-hybrid アッセイ

NIH3T3 細胞は 10% CS を含む DMEM、HEK293 および 293T 細胞は 10% FBS を含む DMEM 中で培養した。

NIH3T3 細胞を 24 ウェルプレートに 5×10^4 cells/ml の細胞密度で播き、24 時間後に Lipofectamine2000 (Invitrogen) を用いて、プロトコール (Invitrogen) に従いトランスフェクションを行った。レポーターアッセイには、0-250 ng の GAL4 融合蛋白質発現プラスミドと 100 ng のレポータープラスミド (pGL3-G5-SV または pGL3-SV) を用い、トランスフェクション効率を調べるためのコントロールとして、同時に 4 ng のプラスミド (pRL-SV) をトランスフェクションした。Mammalian two-hybrid アッセイには、200 ng の GAL4 融合蛋白質発現ベクター、50 ng の VP16 融合蛋白質発現ベクター、100 ng のレポーター遺伝子 (pGL3-G5B) と 4 ng のコ

ントロールプラスミド (pRL-SV) を用いた。全体のプラスミド量はpcDNA3 ベクターを用いて同量に合わせた。トランスフェクションの 48 時間後に細胞をPBSで 2 回洗浄し、Lysisバッファー (Promega) を加えた。TSA処理を行う場合は、トランスフェクションの 24 時間後に、DMSOまたは 100 ng/mlのTSAを培地に加え、さらに 24 時間培養した。細胞を 15 分間室温で溶解した後、Dual-luciferase reporter assay system (Promega) の方法に従い、ルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性を測定し、内部標準の値を用いて補正した。それぞれの実験はduplicateで少なくとも 3 回行い、そのうち代表的な結果を図に示した。

抗体

抗 HABZ ラビットポリクローナル抗体は、KLH を付加した HABZ のアミノ酸 310-322 (NEGDIHFPREDEN) のペプチドを抗原として作製した。Western blot には一次抗体として anti-Myc (9E10 腹水)、anti-FLAG (M2, Sigma)、anti-CtBP (E-12, Santa Cruz Biotechnology)、anti-tubulin 抗体を用いた。二次抗体には、HRP を付加した抗マウス IgG あるいは抗ラビット IgG (Amersham Biosciences) を用いた。免疫染色には、Cy3 でラベルした anti-Myc (Matsuda et al., 2001)、ビオチンラベルした anti-FLAG (Sigma)、anti-CtBP (E-12)、anti-tri methylated K9 of Histone H3 (ab8898, Abcam) を使用した。二次抗体として、FITC ラベルした anti-biotin (F6762)、Texas Red ラベルした anti-rabbit IgG または FITC ラベルした anti-mouse IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories) を用いた。

免疫沈降

293T細胞を 1.2×10^5 cells/mlの細胞密度で 6 cmディッシュに播き、24 時間後、2-3 μ gのプラスミドをCellPfect transfection kit (Amersham Biosciences) を用いてトランスフェクションした。約 40 時間後、細胞をPBSで 2 回洗浄し、protease inhibitor cocktail (Roche) を含む Lysis Buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% NP-40) を加えて、30 分間氷上で蛋白質を抽出した。不溶性画分を 4°Cで 15,000 回転、20 分間の遠心によって除いた後、得られた可溶性画分にFLAG-M2 agarose (SIGMA) を加え、4°Cで 4 時間ローテーションした。一部は発現を確認するために、直接ウエスタンブロットに使用した。アガロースビーズを 1 mlのLysis Bufferで 4 回洗浄した後、等量の 2× SDSサンプルバッファーを加えた。6%もしくは 8%のSDS-PAGEを行い、抗FLAG抗体 (M2, SIGMA) あるいは抗Myc抗体 (9E10 ascitis) を用いてWestern blotを行った。

大腸菌での蛋白質発現・精製

大腸菌株 DH5 α あるいは BL21 (DE3) を各種 pGEX プラスミドで形質転換した。2%グルコースを含む LB 培地 5 ml を用いて大腸菌を 37°Cで一晩培養した後、50

ml の培養液に移し、さらに 37°C で 2 時間培養した。そこに、0.1 mM になるように IPTG を加え、18-30°C で 4-12 時間培養した。遠心により菌を回収し、PBS で洗浄後 0.1% NP-40 を含む PBS に懸濁し、超音波処理した。遠心により破砕物を除いた後、Glutathione Sepharose 4B (Amersham biosciences) を加え、4°C で 4 時間ローテーションした。その後、0.1% NP-40/PBS で 2 回、GST-pull down バッファーあるいはゲルシフト用バッファーで 3 回洗浄し、SDS-PAGE、CBB 染色によって蛋白質を確認した。ゲルシフトアッセイには、還元型グルタチオンを用いて GST 融合蛋白質を溶出し使用した。

GST pull-down

Glutathione Sepharose 4B に結合した 3~5 μg の GST 融合蛋白質に NIH3T3 細胞の抽出液を加え、protease inhibitor を含む binding buffer (20 mM Tris-HCl pH 7.5、120 mM NaCl、5 mM MgCl_2 、2 mM DTT、0.1% NP-40) 中で 2 時間ローテーションした。ビーズを 1 ml の binding buffer で 5 回洗浄した後、等量の 2 \times SDS サンプルバッファーを加え、95°C で 5 分間加熱し、10%-SDS-PAGE と抗 CtBP 抗体による Western blot を行った。

ゲルシフト

必要に応じて、SssI メチル化酵素 (NEB) を用いてプロトコール通りに 2 本鎖オリゴヌクレオチドの CpG 配列をメチル化した。これらを T4 polynucleotide kinase (TOYOBO) と γ - ^{32}P -ATP を用いて末端標識した。10-100 ng の GST 融合蛋白質を binding buffer (25 mM HEPES-KOH pH 7.9、50 mM KCl、2.5 mM MgCl_2 、0.1% NP-40、10 μM ZnSO_4 、5% Glycerol、1 mM DTT、200 ng poly (dI-dC) または poly (dA-dT)) 中で室温、20 分間インキュベーションし、その後、20,000 cpm のプローブを加えてさらに室温で 20 分間インキュベーションした。これを 5% ポリアクリルアミド/0.5 \times TBE/2.5% グリセロールからなるゲルにアプライし、0.5 \times TBE バッファー中で 100V、室温で泳動した。泳動後のゲルをゲルドライヤーで乾燥した後、オートラジオグラフィーを行った。オリゴヌクレオチドは以下のものを使用した。Mmat-F (GTGTTCCCTCCTGCCAATATAAAAAC)、Mmat-R (GTGTTTTTATATTGGCAGGAGGAAC)、CpG1-F (GGCGCGCGAGTCTTTGGGGCGCG)、CpG1-R (CGCGCCCCAAAGACTCGCGCGCC)、Ecad-F (ATCGCCGTCTCGCCCCGCGCACGCA)、Ecad-R (TGCGTGCGCGGGCGAGACGGCGAT)、Sm-F (CAGCAGCCGCGCCCAACGCTGGGA)、Sm-R (TCCCAGCGTTGGGGCGCG GCTGC TG)。Kaiso コンセンサス配列 (Mmat) またはメチル化した CpG 配列 (CpG1、Ecad、Sm) を下線で示した。

免疫蛍光染色

0.1% ゼラチンで処理した 8 ウェルのチャンバースライドに NIH3T3 細胞を播き、24 時間後に Lipofectamin 2000 を用いてプラスミドをトランスフェクションした。24 時間後、細胞を PBS で洗浄し、3%PFA/PBS を用い、室温で 10 分間固定した。0.2% Triton X-100/PBS で処理した後、1:50-1:400 希釈の一次抗体および二次抗体で染色を行った。DNA は 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma) で染色した。封入剤で封入した後、共焦点レーザー顕微鏡で観察した。

3. 結果

3-1. HABZ は新規 BTB-zinc finger 蛋白質である

当研究室において、改良型 polyA トラップベクター・RET を用いたマウス ES 細胞でのランダムなジーントラッププロジェクトを行っており、各トラップクローンに関しては、ノックアウトマウス作製用に ES 細胞を保存するとともに、トラップされた遺伝子の部分配列が 3' RACE によって決定され、FACS により調べられたその遺伝子の ES 細胞での発現の有無とともにデータベースに登録されている (NAISTrap プロジェクト) (Ishida and Leder, 1999; Matsuda et al., 2004)。それらのジーントラップクローンの中で、#2V-43 に関しては約 450 bp の配列が決定されており、BLAST 検索の結果、それはこれまでに報告のない新規の配列であった。さらに、その cDNA 配列は BTB ドメインをコードしていたことから、#2V-43 においてトラップされている遺伝子は、BTB ドメインを含む新規蛋白質をコードしていると考えられた。BTB ドメインを持つ蛋白質の中には、発生や癌化に関与している因子が複数含まれている (Collins et al., 2001)。しかし、一部を除いては BTB 蛋白質の機能や生体内での役割に関しては不明な点が多いことから、この新規遺伝子をクローニングし、機能解析を行うこととした。

主に EST データベースの配列をもとにし、3' RACE と RT-PCR により #2V-43 においてトラップされている遺伝子 (*HABZ*, *Heterochromatin-associated BTB-zinc finger protein*) の cDNA をクローニングした結果、HABZ は 3594 bp の open reading frame (ORF) を含み、1197 アミノ酸からなる蛋白質をコードすると予想された。ゲノム配列に対する BLAST 検索から、HABZ 遺伝子はマウスの 9 番染色体 (9E3.3) に位置し、HABZ の翻訳領域は 1 つのエクソンから構成され、5' 非翻訳領域には複数のエクソンが存在することも明らかとなった (図 1)。またゲノム PCR により、ジーントラップベクターは予想される HABZ の開始コドンより約 16 Kb 上流のイントロンに挿入されていることも確認された (図 1)。cDNA から予想される HABZ 蛋白質は分子量が 134 kDa であり、ドメイン検索によって、N 末端側に BTB ドメイン、中央と C 末端側に 5 つずつ、計 10 個のジンクフィンガーモチーフを有し、BTB-ジンクフィンガー型の転写因子ファミリーに属することが明らかとなった (図 2, 3)。10 個のジンクフィンガーのうち 9 つは C₂H₂ 型 (ZF1, ZF3-10) であり、1 つは C₂HC 型 (ZF2) であった (図 2)。また、2 つのジンクフィンガークラスターに挟まれた領域には両極性核移行シグナル (NLS) が 2 ヶ所見つかった (図 2, 3)。GenBank のデータベース検索によって、少なくともヒト (XP_172341)、ラット (XP_236553) およびニワトリ (XP_422601) において HABZ 相同遺伝子の存在が確認された。最近、HABZ のラット相同遺伝子 ZENON (*zinc finger gene expressed in neurons*, AY623002) が、ラット tyrosine hydroxylase (TH) プロモーターに結合する蛋白質として Yeast one-hybrid screening により同定された (Kiefer et al., 2005)。マウス HABZ、ラッ

トZENONおよびヒトオルソログの予想される構造とアミノ酸配列を図 3, 4 に示した。特に、機能ドメインと思われるBTBドメインとジンクフィンガーで高い相同性を示していることから、これらのドメインがHABZの機能に重要であると予想される。

HABZ の BTB ドメインと、これまでに知られている代表的な BTB 型転写因子の BTB ドメインとのアミノ酸配列の比較を図 5 に示した。これらの中で、HABZ は p120 catenin に結合する因子として同定された Kaiso と最も高い相同性を示していた (Daniel et al., 1999) 。また、HABZ の BTB ドメイン内には、他の BTB ドメインと比較して大きな挿入や欠失は見当たらなかったが、ほとんどの BTB ドメインにおいてリジンあるいはアルギニンで保存されている残基 (図 5▼) が、HABZ ではセリンに置換されていた (HABZ-S48) 。PLZF の BTB ドメインの構造解析から、この S48 に相当する残基は BTB ドメインによるダイマー形成の際に charged pocket に位置し、コリプレッサーとの相互作用に重要な役割を担っているとされている (Melnick et al., 2000, 2002) 。したがって、このアミノ酸置換は HABZ と HABZ の BTB ドメイン結合蛋白質間の相互作用に何らかの影響を与えている可能性が考えられる。

3-2. HABZ はマウス生体各臓器で広範に発現している

マウス成体での HABZ mRNA の発現パターンを調べるために、ノザンブロットを行った。HABZ 特異的なプローブによって、調べた全ての臓器で約 7~8 Kb の転写産物が確認されたことから (図 6) 、HABZ は広範に発現し、機能していると考えられる。また、この転写産物のサイズは、3.6 Kb の ORF よりもかなり大きく、Kaiso 同様 3' 非翻訳領域が非常に長いことが予想される (Daniel et al., 1999) 。

次に発生段階での HABZ の発現を調べるために、マウス胎児から RNA を抽出し、同様にノザンブロットを行った。調べた胎生 9.5 日以降全てで、弱いながらも HABZ の発現が確認できたことから (図 7) 、HABZ は胚発生の段階から何らかの機能を有していると推測される。

また、蛋白質レベルでの HABZ の発現を調べるため、HABZ のアミノ酸 310-322 のペプチドを抗原とし、抗 HABZ ポリクローナル抗体を作製した。この抗体を用いて、マウス各臓器と NIH3T3 細胞での HABZ 蛋白質の発現を Western blotting により調べたところ、約 175 kDa のバンドが調べた全ての臓器と細胞で確認された (図 8) 。このことから、HABZ は mRNA レベル蛋白質レベルともに広範に発現していることが明らかとなった。検出された HABZ 蛋白質の分子量 (175 kDa) は、アミノ酸配列から予想された 134 kDa よりも大きいものであった。Myc タグを付加した HABZ を 293T 細胞に発現させ Western blotting を行ったところ、同じく 185 kDa 付近にバンドが確認できたことから、この分子量と SDS-PAGE における移動度の違いは、Kaiso や Bach1、Bach2 といったいくつかの BTB 蛋白質に見られるものと同様の現象であると考えられる (Daniel et al., 1999; Oyake et al., 1996) 。また、抗原に用いたペプチド配列の大部分を欠損している HABZ (Δ 314-580)-Myc は抗 Myc 抗

体では検出できるものの（図 9, lane 3）、抗 HABZ 抗体では検出できないことから（図 9, lane 6）、この抗体の特異性も確認することができた。

3-3. HABZ は pericentromeric heterochromatin に局在する

HABZ は構造上の特徴から転写因子であると考えられ、また 2 つの核移行シグナル様配列を有することからも（図 2, 3）、核内に局在すると推測された。そこで、HABZ の細胞内局在を調べるため、免疫蛍光染色を行った。まず、抗 HABZ 抗体を用いて NIH3T3 細胞において免疫蛍光染色を行ったが、シグナルが弱く、内在性 HABZ の局在を調べることはできなかった（data not shown）。Western blotting では内在性 HABZ の発現は確認できることから（図 8）、この抗体が免疫染色には不向きであることが原因であると考えられる。したがって、過剰発現した HABZ に関して、タグ抗体を用いて局在を調べることにした。C 末端側に Myc タグが付加された HABZ を発現するベクター（HABZ-Myc）を NIH3T3 細胞に導入し、Cy3 で標識した抗 Myc 抗体で染色を行った。また、核を DAPI で対比染色した。HABZ-Myc を発現している細胞のうち 70%程度において、HABZ は核内のみ（図 10a）、あるいは核内と細胞質の両方に存在し（図 10d）、核内では特徴的なドット構造を示していた。残りの 30%程度の細胞では、核内あるいは細胞質に diffuse に存在していた（data not shown）。また、N 末端側に FLAG あるいは Myc タグを付加した場合にも同様の結果が得られた（data not shown）。NIH3T3 細胞を含むマウスの細胞においては、典型的な構成的ヘテロクロマチンであるセントロメア近傍の pericentromeric heterochromatin 領域は、転位因子やメジャーサテライトリピートを含み、AT リッチな反復配列を中心に構成されることから、細胞周期を通して DAPI でドット状に強く染色されることが知られている（Maison and Almouzni, 2004）（図 10b, d）。HABZ の染色像と DAPI での染色像を重ね合わせると、HABZ のドットは DAPI で強く染まるドットとほぼ一致した（図 10c, f）。また、pericentromeric heterochromatin のマーカーであるヒストン H3トリメチル化 K9（H3 tri-meK9）（Peters et al., 2003）とも共局在したことから（図 10g-i）、過剰発現した HABZ は核内では pericentromeric heterochromatin に局在していることが明らかとなった。

次に、pericentromeric heterochromatin への局在に必要な HABZ の領域を決定するため、Myc タグを付加した HABZ の各種欠失変異体（図 11）を用いて同様に NIH3T3 細胞において抗 Myc 抗体による免疫蛍光染色を行った。BTB ドメインや 158-339 の領域を欠失しても（図 11a, b）、野生型 HABZ と同様核内と細胞質に存在し、核内では pericentromeric heterochromatin に局在した（data not shown）。また、これら両方を欠損した HABZ（図 11f）は、大部分の細胞において核内で pericentromeric heterochromatin に局在し、細胞質への局在はほとんど認められなかった（図 12a-c）。したがって、この N 末端側領域（1-339）は HABZ

の細胞質への局在に寄与しており、また pericentromeric heterochromatin への局在には必要でないことが明らかとなった。次に、中央領域を欠失した HABZ (図 11d) では、核内で pericentromeric heterochromatin に局在する細胞も見られたが、多くは細胞質に局在した (data not shown)。これは、この領域が核移行シグナルを含んでいるため (図 2, 3)、その欠損によって HABZ の核移行が阻害されているためであると考えられる。しかし、いくつかの細胞では核内に局在し、pericentromeric heterochromatin への局在は認められていることから、この領域もヘテロクロマチンへの局在には必要でないと予想される。また、ZF6-10 を欠損した場合でも (図 11e) 局在は野生型とほぼ同じであった (data not shown)。しかし、ZF1-5 を欠損すると (図 11c)、ほとんどの細胞において細胞質のみ (図 12d-f)、あるいは核と細胞質の両方に局在するが (図 12g-i)、核内での pericentromeric heterochromatin への局在は全く認められなかった (図 12g-i)。また、N 末端側 ZF5 までを欠損した HABZ (図 11g) は核内でドットを形成したが、このドットは DAPI で染まるドットとは異なることが分かった (図 13a-c)。この結果と、1-339 を欠損するとヘテロクロマチンに局在していること (図 12a-c) を考え合わせると、ZF1-5 が HABZ の pericentromeric heterochromatin への局在に重要な役割を担っていることが予想される。

そこで、ZF1-5 のみが pericentromeric heterochromatin への局在に必要な十分であるか確認するため、SV40 の NLS を付加した Myc-ZF1-5 (図 11h) を用いて免疫染色を行った。すると、ZF1-5 は核内で diffuse に局在し、pericentromeric heterochromatin への局在は認められなかった (図 13d-f)。したがって、ZF1-5 のみではヘテロクロマチンへの局在には十分ではないことが明らかとなった。

以上の結果をまとめると図 14 のようになり、BTB ドメインを含む N 末端側が HABZ の細胞質への局在、ZF1-5 がヘテロクロマチンへの局在に必要であると予想される。

3-4. HABZ は DNA にリクルートされると転写抑制活性を示す

HABZ は、一般的に転写不活性なヘテロクロマチン領域に局在したことから (図 10)、転写抑制因子としての機能を有することが予想された。そこで、HABZ の転写調節活性を調べるため、ルシフェラーゼアッセイを行った。GAL4-DNA 結合ドメイン (GAL4-DBD) に融合した HABZ の発現ベクター (GAL4-HABZ) と、SV40 プロモーターを持つルシフェラーゼ遺伝子上流に 5 つの GAL4 結合配列を持つレポータープラスミド (pGL3-G5-SV)、あるいは GAL4 結合配列を持たないレポータープラスミド (pGL3-SV) を NIH3T3 細胞に一過性に導入し、ルシフェラーゼ活性を測定した。その結果、GAL4-HABZ の量を段階的に増加していくと、それに伴い GAL4 結合配列を持つレポーター遺伝子のルシフェラーゼ活性の減少が観察された (図 15a, 左)。一方、GAL4 結合配列を持たないレポーター遺伝子に対して

は、GAL4-HABZ を段階的に加えてもルシフェラーゼ活性の減少は認められなかった（図 15a, 右）。同様の結果は、HEK293 細胞を用いた場合にも確認することができ、NIH3T3 細胞での場合に比べて転写抑制効果は顕著であった（図 15b）。これらの結果から、HABZ は DNA 結合依存的に転写抑制活性を示すことが示唆された。

3-5. HABZ は 2 ヶ所の転写抑制ドメイン (BTB と RD2) を持つ

次に HABZ の転写抑制ドメインを決定するため、HABZ の各種欠損体を GAL4-DBD に融合し（図 16, 左）、NIH3T3 細胞を用いて同様にルシフェラーゼアッセイを行った（図 16, 右）。GAL4 単独を用いた場合のルシフェラーゼ活性を 1 とした時の各種欠損体の fold repression の値を測定したところ、HABZ の N 末端側 (1-538) に 5 倍程度の転写抑制活性が見られ、C 末端側 (539-1197) にはそのような活性は見られなかった。さらに N 末端側の中でも、BTB ドメイン (1-158) と、それに隣接した領域 (158-339, Repression Domain2, 以下 RD2) の 2 ヶ所に同程度の転写抑制活性が認められたが、ZF1-5 領域 (335-538) は 2 倍程度の弱い転写抑制活性しか示さなかった。BTB ドメインと RD2 の 2 つの転写抑制ドメインを欠損した HABZ (335-1197) は、逆に弱い転写活性化能を示した。また、ジンクフィンガークラスター間の領域 (539-1012) でも 2 倍程度の転写活性化能が見られたことから、HABZ は転写抑制活性に加え転写活性化能も有していることを示唆している。全長の HABZ (1-1197) での転写抑制活性は 2 倍程度と、BTB ドメインや RD2 に比べて弱い転写抑制活性しか示さなかった。この原因として、転写抑制ドメインと転写活性化ドメインによる競合が考えられる。あるいは、HABZ の発現量による可能性も考えられる。実際、NIH3T3 細胞における GAL4-HABZ (1-1197) の発現は、Western blotting によってわずかに検出されるのみであったが、HEK293 細胞では HABZ は十分に発現し、GAL4 単独に対して 5 倍程度の転写抑制活性を示していた (data not shown, 図 15b)。しかし、この発現量の違いが実際に転写抑制活性の違いであると言い切ることはできず、NIH3T3 と HEK293 という細胞種の違いによる可能性も考えられる。したがって、今後他のいくつかの細胞種を用いて同様にレポーターアッセイを行うこと、また、内在性遺伝子に対しての HABZ の転写抑制効果を調べることも必要である。以上の結果より、HABZ は BTB ドメインと RD2 の 2 ヶ所に転写抑制活性を持つ転写抑制因子であることが明らかとなり、また、C 末端側には弱い転写活性化能も保持することから、何らかの条件によっては転写活性化因子としても機能することが示唆された。

3-6. HABZ による転写抑制には HDACs が関与する

HABZ による転写抑制への HDACs の関与を調べるため、その阻害剤である TSA を用いてルシフェラーゼアッセイを行った。GAL4-BTB (1-158) による転写抑

制活性は TSA の影響をほとんど受けなかったことから、BTB ドメインによる転写抑制は主に HDAC 非依存的であると考えられる (図 17-2)。一方、GAL4-RD2 (158-339) による転写抑制活性は TSA 処理によってほぼ消失したことから、RD2 による転写抑制は主として HDAC に依存していると推測される (図 17-3)。また、GAL4-BTB-RD2 (1-339) による転写抑制活性は TSA によって部分的に解除された (図 17-4)。これは、RD2 による抑制が TSA によって阻害されるものの、BTB ドメインによる HDAC 非依存的な抑制機構が働いているためであると考えられる。

次に、HABZ と HDACs との相互作用を調べるため、共免疫沈降を行った。HABZ-Myc と FLAG タグを付加した 4 種類の HDAC、HDAC1、3、4、6 をそれぞれ 293T 細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った後、沈降物に HABZ が含まれるかどうか抗 Myc 抗体で検出した。その結果、Class I HDAC である HDAC1、3 および Class II HDAC である HDAC6 の沈降物の中には HABZ が存在し (図 18, Lanes 2, 3, 5)、HABZ のみを発現させた細胞の沈降物の中には存在しないことから (図 18, Lane 1)、HABZ はこれら HDAC1、3、6 と相互作用すると考えられる。しかし Class II HDAC、HDAC4 との相互作用はほとんど確認できなかった (図 18, Lane 4)。以上の結果より、HABZ による転写抑制には、複数の HDAC が関与することが示唆された。

3-7. HABZ は酵母細胞および哺乳動物細胞内で、RD2 を介して CtBP1/2 と相互作用する

HABZ による転写抑制機構をさらに詳細に明らかとするため、転写抑制ドメインである BTB-RD2 (1-339) に結合する蛋白質を Yeast two-hybrid screening により探索した。約 450 万クローンのマウス 17 日胚の cDNA ライブラリーをスクリーニングし、複数の HIS 陽性、 β -gal 陽性のポジティブクローンを得ることができた。それらの中に、転写抑制と関連している因子として CtBP1 が 3 クローン含まれていた。CtBP1 と、それに類似した CtBP2 蛋白質は数多くの転写因子のコリプレッサーとして機能しているため (Chinnadurai, 2002)、HABZ に対しても同様にコリプレッサーとして働くことが考えられた。そこで CtBPs と HABZ の相互作用についてさらに詳細に解析を行った。

HABZ 全長 (1-1197) と CtBP1 全長の結合も Yeast two-hybrid 法によって確認でき、また HABZ 全長と GAL4-AD との結合は見られなかったことから、この HABZ と CtBP1 との結合は特異的であると考えられる (図 19)。次に、HABZ の各種欠損体を用いて、Yeast two-hybrid 法により CtBP1 との結合ドメインの決定を行った。BTB ドメインを欠損した HABZ (158-1197) は、全長の HABZ と同様 CtBP1 との結合が見られたが、BTB ドメインと RD2 を欠損した HABZ (335-1197) は CtBP1 との結合能を完全に失った。また、BTB ドメインのみ (1-158) では結合は見られないが、RD2 のみ (158-339)、あるいは BTB-RD2 (1-339) では強い結合

が確認できた。これらの結果から、CtBP1 は HABZ の RD2 に特異的に結合することが明らかとなった。また、HABZ と CtBP2 との相互作用を調べると、CtBP1 の場合と同様、RD2 を介して結合するという結果が得られた (図 19)。次に、大腸菌で精製した GST 融合蛋白質 (GST, GST-BTB, -RD2) と NIH3T3 細胞の抽出液を用いて GST-pull down 法を行ったところ、Yeast two-hybrid 法の結果と同様に、CtBPs は BTB ドメインではなく RD2 に特異的に結合することが確認された (図 20)。以上の結果より、HABZ は RD2 を介して CtBP1 および CtBP2 と結合することが明らかとなった。

次に、これらの蛋白質の哺乳動物細胞内での相互作用を確認するため、共免疫沈降法を行った。HABZ-Myc を単独で (図 21, lanes 1, 3)、あるいは FLAG-CtBP1 (図 21, lane 2) または FLAG-CtBP2 (図 21, lane 4) とともに 293T 細胞に共発現させ、抗 FLAG 抗体で免疫沈降を行った。HABZ-Myc は FLAG-CtBP1 あるいは FLAG-CtBP2 と共発現させた場合のみ抗 FLAG 抗体の沈降物に含まれ (図 21, lanes 2, 4)、単独で発現させた場合には含まれなかったことから (図 21, lanes 1, 3)、HABZ は哺乳動物細胞内で CtBP1 および CtBP2 と相互作用することが確認された。また、マウス脳抽出物を用いた免疫沈降法によって、内在性の CtBPs と HABZ の相互作用も確認することができたため (図 22)、これらは実際に生体内で複合体を形成していると予想される。

3-8. HABZ は PLDLR モチーフを介して CtBP と相互作用する

CtBPs は多くの DNA 結合型転写因子あるいは転写制御因子の CtBP 結合モチーフ、PXDLS やそれに類似したアミノ酸配列、に結合することが明らかとなっている (Chinnadurai, 2002)。HABZ のアミノ酸配列を調べると、RD2 内に 2 つの CtBP 結合モチーフ様配列 PLDLR (182-186) と PLSLV (281-285) が見つかった (図 23)。これらのモチーフはそれぞれ、すでに CtBP との結合が報告されている MITR と Hairy のモチーフと一致した (図 23) (Zhang et al., 2001; Poortinga et al., 1998)。そこで、HABZ のこれらのモチーフが CtBPs との結合に関係しているかどうか調べるため、PLDLR と PLSLV をそれぞれ PLASR と PLASV に置き換え、3 種類の HABZ-Myc の変異体、HABZ (DL/AS)-Myc, HABZ (SL/AS)-Myc および HABZ (DL/AS, SL/AS)-Myc, を作製した (図 24A)。これらの変異体を用いて共免疫沈降法を行ったところ、HABZ (SL/AS) は野生型 (WT) HABZ と同様 CtBP1 との相互作用が見られたが (図 24B, Lanes 2, 4)、HABZ (DL/AS) あるいは HABZ (DL/AS, SL/AS) では CtBP1 との相互作用はほとんど確認できなくなった (図 24B, Lanes 3, 5)。以上の結果より、HABZ と CtBP1 との相互作用には PLDLR モチーフのみが関係し、PLSLV モチーフは必要ではないことが明らかとなった。

3-9. HABZ は PLDLR モチーフを介して CtBP を pericentromeric

heterochromatin に誘導する

ここまでで、HABZ が RD2 内の PLDLR モチーフを介して CtBPs と相互作用し、複合体を形成することが確認できたため、次にこれらが細胞内で共局在するかどうか、NIH3T3 細胞を用いて免疫蛍光染色により検討した。まず HABZ (DL/AS)-Myc を単独で発現させると、野生型 HABZ-Myc (図 10) と同様、核内では pericentromeric heterochromatin に局在した (図 25, a-c)。一方、FLAG-CtBP1 を単独で発現させると、細胞質および核内に diffuse に局在した (図 25, d-f)。次に、野生型 HABZ-Myc と FLAG-CtBP1 を共発現させると、核内の CtBP1 は HABZ の局在である pericentromeric heterochromatin に集積した (図 25, g-j)。しかし、HABZ (DL/AS)-Myc と FLAG-CtBP1 を共発現させると、HABZ (DL/AS)-Myc は pericentromeric heterochromatin に局在するものの、FLAG-CtBP1 は diffuse に局在したままで、pericentromeric heterochromatin への集積は認められなかった (図 25, k-n)。

次に、内在性の CtBPs が過剰発現した HABZ と共局在するかどうか検討した。内在性 CtBPs は、CtBP1 と CtBP2 の両方を認識する抗体を用いて検出した。トランスフェクションを行っていない NIH3T3 細胞では、内在性 CtBPs は主に核内で diffuse に局在していた (図 26, a-c)。野生型 HABZ-Myc を発現させると、内在性の CtBPs は H3 tri-meK9 と共局在したことから (図 26, d-f)、過剰発現した場合と同様、HABZ の局在である pericentromeric heterochromatin に集積することが確認された。一方、HABZ (DL/AS)-Myc を発現させた場合には、内在性 CtBPs の局在に変化はなかった (図 26, g-i)。以上の結果より、HABZ は PLDLR モチーフを介して CtBPs を pericentromeric heterochromatin に誘導する機能を持っていることが明らかとなった。

3-10. CtBP との結合は RD2 の転写抑制活性に必須である

RD2 は転写抑制活性を持ち、また CtBPs と結合することから、RD2 の転写抑制活性には CtBP のコリプレッサーとしての働きが必要であると考えられた。それを検証するために、まず RD2 と CtBP1 との NIH3T3 細胞内での相互作用を Mammalian two-hybrid 法 (図 27, 28) によって確認した。GAL4-DBD に融合した RD2 変異体と、VP16 の転写活性化ドメイン (AD) または VP16-AD に融合した CtBP1 (VP16-CtBP1) を NIH3T3 細胞に共発現させ、GAL4 結合配列を持つレポーター遺伝子 (pGL3-G5B) のルシフェラーゼ活性を測定した。GAL4-RD2 (WT) と VP16-CtBP1 を共発現させると、レポーター遺伝子は GAL4 と VP16 を共発現させた場合に比べて 22 倍程度活性化されたことから (図 28, a, b)、RD2 と CtBP1 は NIH3T3 細胞内で相互作用していると考えられる。次に RD2 変異体を用いて同様の実験を行ったところ、DL/AS (図 28, c) あるいは DL/AS, SL/AS 変異体 (図 28, e) ではレポーター遺伝子の活性化は認められなかったが、SL/AS 変異体 (図

28, d) ではレポーター遺伝子が 12 倍程度活性化されたことから、免疫沈降法の結果同様、HABZ は RD2 内の PLDLR モチーフを介して CtBP1 と相互作用することが確認できた。

次に、各種 GAL4 融合型 RD2 変異体を用いて、NIH3T3 細胞におけるそれぞれの転写抑制活性をルシフェラーゼアッセイによって調べた (図 27, 29)。すると、CtBP1 との結合能を有している GAL4-RD2 (SL/AS) では野生型 RD2 と同程度の転写抑制活性を示した (図 29b, d)。しかし、CtBP1 との結合能を失った GAL4-RD2 (DL/AS) あるいは GAL4-RD2 (DL/AS, SL/AS) は転写抑制活性も完全に失っていた (図 29, c, e)。これらの結果は、CtBPs との結合が RD2 による転写抑制活性に必要不可欠であり、つまり CtBPs が RD2 のコリプレッサーであることを意味している。

3-11. BTB ドメインは CtBP との結合とは独立して転写抑制ドメインとして機能する

上記実験で GAL4-RD2 (DL/AS) は転写抑制活性を失っていたが (図 29, c)、GAL4-BTB-RD2 (DL/AS) では、野生型 GAL4-BTB-RD2 と同程度の転写抑制活性を示した (図 27, 29, f, g)。これは、DL/AS 変異によって RD2 による CtBP を介した転写抑制活性は失われるものの、BTB ドメインが RD2 とは独立して転写抑制ドメインとして機能していることを示唆している。さらに、HABZ 全長の DL/AS 変異体を用いて HEK293 細胞においてルシフェラーゼアッセイを行ったところ、野生型 HABZ よりやや弱いものの、量依存的な転写抑制活性が見られた (図 30)。これらの結果は、HABZ が RD2 による CtBP 依存的な転写抑制活性だけでなく、BTB ドメインあるいは他の領域にも CtBP との結合とは独立した転写抑制活性を持っていることを示唆している。

3-12. HABZ のジンクフィンガーは Kaiso コンセンサス配列には結合しない

HABZ は合計 10 個のジンクフィンガーモチーフを持つことから、それらを介して DNA に結合することが予想される。HABZ のジンクフィンガーと他の蛋白質との相同性をデータベースにより検索すると、HABZ の 3 から 5 番目のジンクフィンガーは、Kaiso の 3 つのジンクフィンガーとアミノ酸配列で 65% 一致し (図 31A, B)、また、mKIAA1538 の 6 つのジンクフィンガーのうち 2 から 4 番目とも非常に高い相同性 (76% のアミノ酸一致) を示すことが明らかとなった (図 31A, B)。しかし、ZF1, 2 および ZF6-10 の領域ではそのように高い相同性を示す蛋白質は見つからなかった。この HABZ (ZF3-5) のみが Kaiso や mKIAA1538 と際立って高い相同性を示していることから、この 3 つのジンクフィンガーが重要な機能を有していることが予想された。Kaiso は、ジンクフィンガーを介してコンセンサス DNA およびメチル化 DNA に結合することが報告されているため (Prokhortchouk et al., 2001; Daniel et al., 2002)、HABZ が Kaiso と類似した配列に結合することが期待された。そこで、大腸

菌で精製した GST 融合型のジンクフィンガーの組換え蛋白質を用いて、ゲルシフト法によりそれぞれの配列への結合を検証した。まず、HABZ (ZF1-5) の Kaiso コンセンサス配列 (CTGCNA) への結合能を調べた。コントロールとして、GST-Kaiso (ZF) はすでに報告されている通り、コンセンサス配列を含む Mmat オリゴ (マウス *matrilysin* プロモーター由来) に対して量依存的に結合することが確認できた (図 32, lanes 3, 4)。しかし GST-HABZ (ZF1-5) に関しては、Mmat オリゴに対しての結合は全く認められなかった (図 32, lanes 5, 6)。GST 単独でも同様に結合は見られなかった (図 32, lanes 1, 2)。したがって、CTGCNA 配列は Kaiso 特異的な結合配列であると考えられる。

3-13. HABZ のジンクフィンガーはメチル化 DNA に結合する

次に、HABZ のメチル化 DNA への結合能を同様にゲルシフト法によって検討した。Kaiso の結合配列はメチル化した CG (mCG) を 2 つタンデムに持つ mCGmCG であると考えられており (Prokhortchouk et al., 2001)、マウス *S100A4* 遺伝子イントロン由来の Sm オリゴや、ヒト *MTA2* プロモーター由来の CpG1 オリゴに対して、メチル化依存的に結合することが報告されている (Prokhortchouk et al., 2001; Yoon et al., 2003)。そこで、これらオリゴの CpG 配列の全てを CG メチル化酵素 (SssI) によってメチル化したもの、およびメチル化していないもののそれぞれに対しての GST-HABZ (ZF1-5) の結合能を調べた。CpG1 オリゴに対しては、GST-Kaiso (ZF) 同様 (図 33, lanes 3-6)、GST-HABZ (ZF1-5) に関しても CpG のメチル化依存的な結合が確認できた (図 33, lanes 7, 8)。一方、GST-HABZ (ZF6-10) に関しては、GST のみの場合 (図 33, lanes 1, 2) と同様メチル化 DNA への結合は見られなかった (図 34, lanes 3, 4)。また Sm オリゴに対しては、GST-Kaiso (ZF) はメチル化依存的に強く結合することが確認でき (図 35, lanes 3, 4)、HABZ (ZF1-5) に関しては Kaiso に比べると非常に弱いものの、メチル化依存的な結合が確認された (図 35, lanes 5, 6)。さらに、いくつかの癌細胞で異常なメチル化が検出されている *E-cadherin* プロモーター領域の CpG アイランド内由来のオリゴ (E-cad オリゴ) に対しても、Kaiso、HABZ ともにメチル化依存的な結合が確認された (図 36)。以上の結果より、HABZ は Kaiso と同じく、ジンクフィンガー型のメチル化 DNA 結合蛋白質であると考えられる。

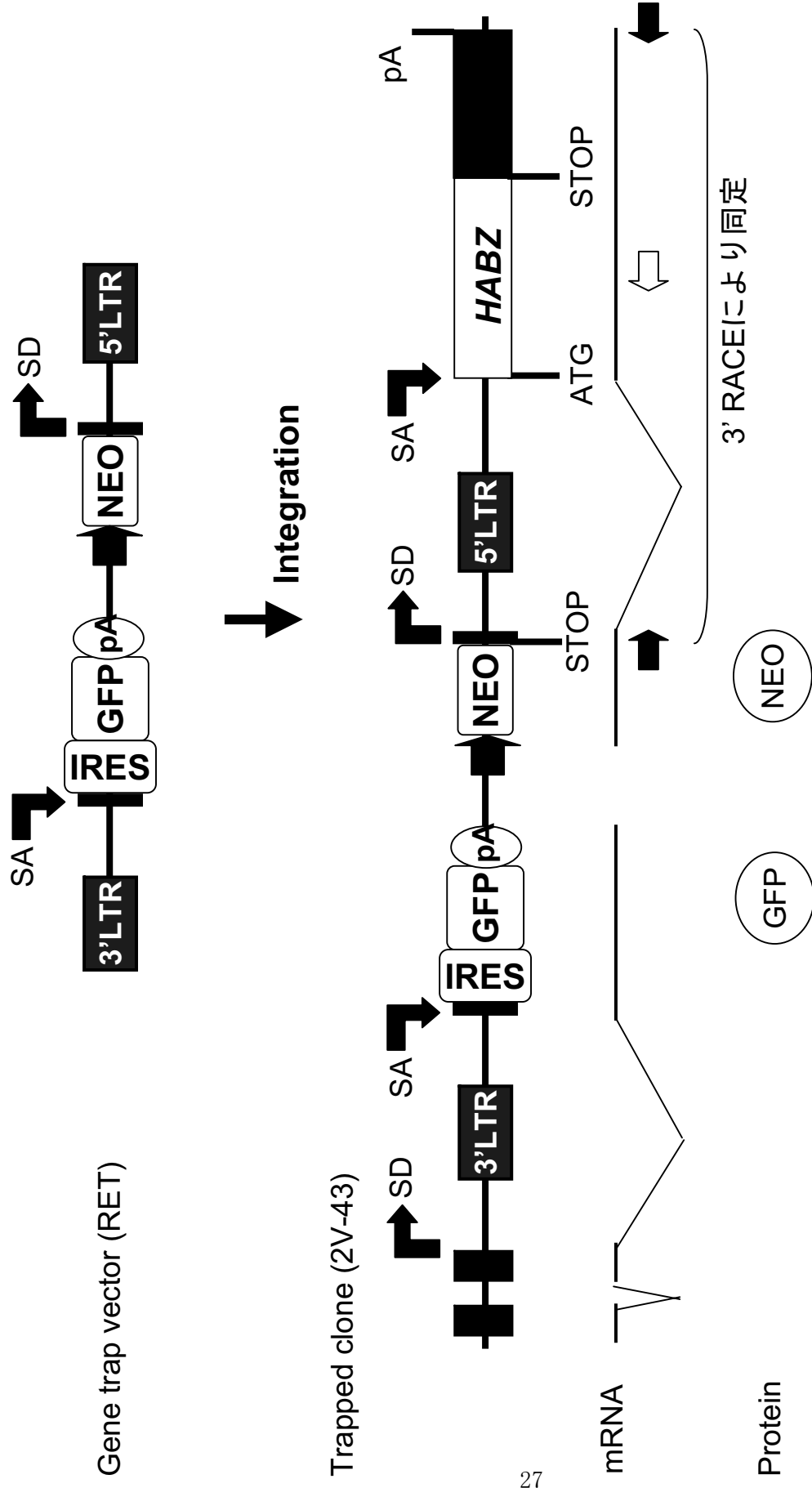


図1. ジーントラップベクターの構造およびトラップクロン2V-43のゲノム構造

(上) ジーントラップベクターの構造。RETベクターはsplice acceptor (SA) とIRES-GFPおよびpoly Aシグナル、pol IIプロモーターにNEO、splice donor (SD) を持つ。これがイントロンに挿入されると、NEOが発現するため、G418によるセレクションを行うことができる。また、その遺伝子のES細胞での発現をGFPにより調べることもできる。

(下) ベクターが挿入されたクロン#2V-43のゲノム構造を示し、その結果生じるmRNAおよび蛋白質も同時に示した。3' RACEはoligo dTプライマーで逆転写後NEO (右向き黒矢印) とoligo dTに付加した配列の (左向き黒矢印) プライマーを用いて行っていたが、結果として、白矢印部分のアリッチな配列から逆転写された配列が増幅されていた。

MTVMSLRDLKDDFHSDTVLSILNEQRIRGILCDVTIIVEDTKFAHSNVLAASSLYFKNIFWSHTICISSHVLELDDLK 80
 AEVFTEILNYIYSSTVVVKRQETVTDLAAAGKKGISFLEDLSDRNFSNSPGPYVVCITEKGVVKEEKNEKRHEEPAVTN 160
 GPRITNAFSIETENSNMFSPLDLRASFKKVSMSRTASLQERASVCHEVEPVRTLAEHSYAVSSI TEAYRSQPPREQ 240
 DSSSAKTGETGDALATKAKPCRKPKPQTQSDSTTENMPLSLVTCPEVNGERSPPAPDL SHSEPPSNEGD IHFPRED 320
 ENQPSDAPGGAAEVPLVYNCSCCSKSFDSSTLSAHMQLHKPTQEPFVCKYCNKQFTTLNRLDRHEQICMRSSHVP IP 400
 GGNPPFLENYPTIGQDGTFRSPESLGPENRIGELSSAGSALSDADHMVKFVNGQML YSCIVCKRSYVTLSSLRRHANVH 480
 SWRRTYPCHYCNKVFALAEYRTRHEIWHGTERRYQCIFCLETFMTYYILKNHQKSFHAIDHRLSINKKTANGGLKPTVYP 560
 YKLYRLLPMRCKRAPYKSYRNSSYVSAQSSQRGESAPDTFIVPNLQSSEMP TLDFOQGRNTLPSSPAVPVETPSRQGAP 640
 TSARVKNAEGIKWRKQAVKTNLVDNFDSTEVSVSSIGTNTVSATLQTEPACVSSVKGSEHSASVISYSGSVPSVIVHSSQ 720
 FSSVIKHSNTIASLTNSNHKSPSPVSPSLIKDSKPETDKASKPASRPKSIKEKKKTAPSNRGEITEEAKYIADHGGSS 800
 GKTNAEETSKIETYIAKPALPGTSTNSNVAPL CQITVKIGNEAIVKRHILGSKLFYKRGRKPKYQMQEETLPRENDPET 880
 PGDSPGLCGAECVEMSEAFDEVSDQDSTDKPWRPYNYKPKKSKQLRKMVKWRKERRRSPVGRCRYPAELDRAEV 960
 KLPPDKAFEEEEEEENKEMPKLQCELCGGCPDGAAGAGAEKPHQHL TSKPYICELCAKQFQSSSTLKMHMRCHTGKCP 1040
 YQCKTCGRCFVQGNLQKHERIHLGVKEFICQYCNKAFTLNETLKIHERIHTGEKRYHCQFCQGFLLYSTKRNHERRHI 1120
 REHDGKGFACFGCPKICKTAAALRMHQKHL YKTLPKQEEETGDTCHENADLLESQLCTDSESEQKDDIKAF AENVL 1197

図2. HABZのアミノ酸配列

cDNAから予想されるマウスZENONのアミノ酸配列を示した。BTBドメインは枠で囲い、ジンクフィンゲインガーモチーフは灰色で示している。また、2つの核移行シグナル様配列は下線で示した。

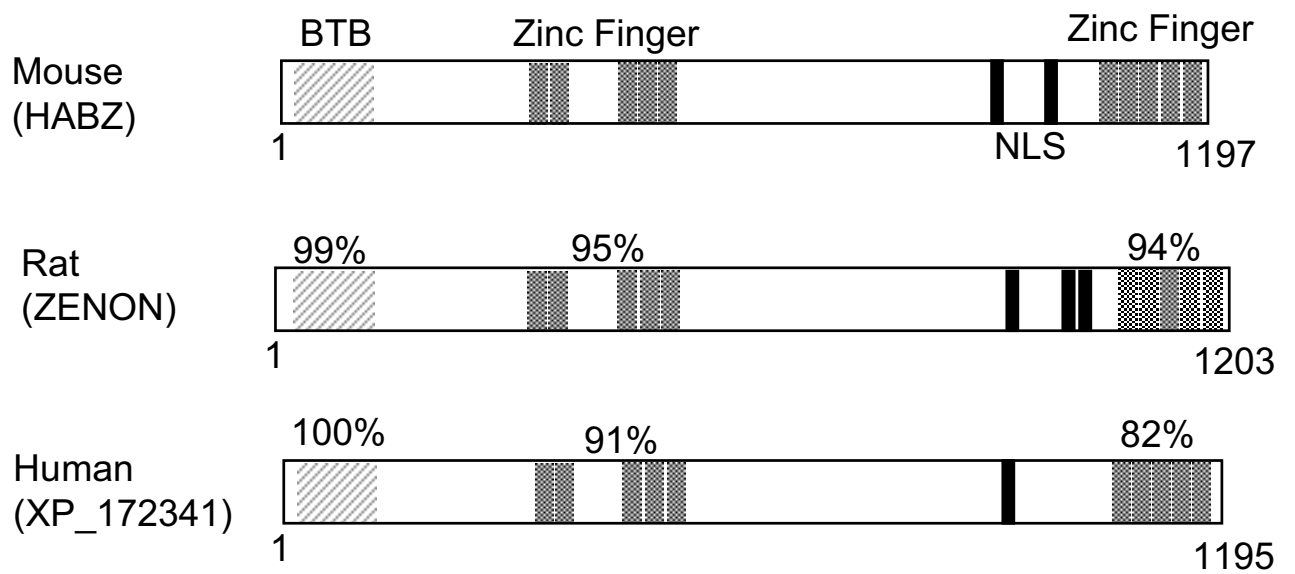


図3. HABZのドメイン構造

マウスのHABZ、ラットのZENON (AY623002) およびヒトのオルソログのドメイン構造を示した。BTBドメインおよびジンクフィンガー領域におけるマウスHABZとのアミノ酸の一致をそれぞれ示している。

BTB

mouse	1	MTVMSLSRDLKDDFHSDTVLSILNEQRIRGILCDVTIIVEDTKFKAHSNVLAASSLYFKN
rat	1	MTVMSLSRDLKDDFHSDTVLSILNEQRIRGILCDVTIIVEDTKFKAHSNVLAASSLYFKN
human	1	MTVMSLSRDLKDDFHSDTVLSILNEQRIRGILCDVTIIVEDTKFKAHSNVLAASSLYFKN
mouse	61	IFWSHTICISSHVLELDDLKAEVFTEILNYIYSSTVVVKRQETVTDLAAAGKKLGISFLE
rat	61	IFWSHTICISSHVLELDDLKAEVFTEILNYIYSSTVVVKRQETVTDLAAAGKRLGISFLE
human	61	IFWSHTICISSHVLELDDLKAEVFTEILNYIYSSTVVVKRQETVTDLAAAGKKLGISFLE
mouse	121	DLSDRNFSNSPGPYVVCITEKGVVKEEKNEKRHEEPAVTNGPRITNAFSI IETENSNNMF
rat	121	DLSDRNFSNSPGPYVVCITEKGVVKEEKNEKRHEEPAVTNGPRITNAFSI IETENSNNMF
human	121	DLSDRNFSNSPGPYVFCITEKGVVKEEKNEKRHEEPAVTNGPRITNAFSI IETENSNNMF
mouse	181	SPLDLRASFKKVSDSMRTASLCQERASVCHEVEPVRTLAEHSYAVSSSITEAYRSQPPREQ
rat	181	SPLDLRASFKKVSDAMRTTSLCQERASVCPAEAPVRTLAEHSYAVSSSITEAYRSQPLREH
human	181	SPLDLRASFKKVSDSMRTASLCLERTDVCHEAEAPVRTLAEHSYAVSSVAEAYRSQPVREH
mouse	241	DSSSS-AKTGKETGDALATKAKPCRKPQP--TQSDSTTENMPLSLVTCPEVNQERSPQ
rat	241	DSSSSSGKTGKENGELTKAKPCRKPQT--TQSDSTTENMPLPLVTCPEVNQERSPQ
human	241	DSSSP-GNTGKENCALAAKPKTCRKPKTFSSIPQSDSATENIPPPVSNLEVNQERSPQ
mouse	298	PAPDLSHSEPPSNEGDIHFPREDENQPSDAPGGGAAEVPLLVYNCSCCSKSFDSSTLLSA
rat	299	PAPILSHSEPPSSEGDVHFREDENQPSSETPGPPAAEVPLLVYNCSCCSKSFDSSTLLGA
human	300	PAAVLTRSKSPNNEGDVHFSREDENQSSDVPGGPAAEVPLLVYNCSCCSKAFDSSTLLSA
mouse	358	HMQLHKPTQEPFVCKYCNKQFTTLNRLDRHEQICMRSSHVPPIGGNPFFLENYPTIGQDG
rat	359	HMQLHKPTQDPFVCKYCNKQFTTLNRLDRHEQICMRSSHMPMPGGNQPFLENYPTIGQDG
human	360	HMQLHKPTQEPVCKYCNKQFTTLNRLDRHEQICMRSSHMPPIGGNQRFLENYPTIGQNG
mouse	418	TSFRSPESLGPENRIGELSSAGSALSADAHMVKFVNGQMLYSCIVCKRSYVTLSSLRRAHA
rat	419	GSFTSPDSLVPESRIGELSSAGSALSADAHMVKFVNGQMLYSCVCKRSYVTLSSLRRAHA
human	420	GSFTGPEPLLSENRIGEFSSITGSLPDTDLMVKFVNGQMLYSCVCKRSYVTLSSLRRAHA
mouse	478	NVHSWRRTYPCHYCNKVFALAEYRTRHEIWHGTGERRYQCIFCLETFTYYILKNHQKSFH
rat	479	NVHSWRRTYPCHYCNKVFALAEYRTRHEIWHGTGERRYQCIFCLETFTYYILKNHQKSFH
human	480	NVHSWRRTYPCHYCNKVFALAEYRTRHEIWHGTGERRYQCIFCLETFTYYILKNHQKSFH
mouse	538	AIDHRLSINKKTANGGLKPTVYPYKLYRLLPMRCKRAPYKSYRNSSYVSAQGS SQRGESA
rat	539	AIDHRLSISKKTANGGLKPTVYPYKLYRLLPMRCKRAPYKSYRNSSYESAQGNQRNESP
human	540	AIDHRLSISKKTANGGLKPSVYPYKLYRLLPMKCKRAPYKSYRNSSYENAREN SQMNESA
mouse	598	PDTFIVPNLQSSSEMPTLDFQDGRNTLPSSPAIPVETPSRQGAPTSARVKNAEGLKWRKQA
rat	599	PDTFVIVPNLPSSEMPTLNFQDGRNSLTSSPAIPVETPSWQGTPTSARKVKNAEGLKWRKQA
human	600	PGTIVVQNPSSSELPTLNFQDITVNTLTNSPAIPLETSAQCDIPTSANVQNAEGTKWGE EA
mouse	658	VKTNLVDNFDSTEVSVSSTGNTVSA TLQTEPA CVSSV GKGSEHSASVISYSGSVPSVIVH
rat	659	LKTDLVD--SAEVSISLGNVSTTLQAEPCVSSG---EHSASVISYSGSVPSVIVH
human	660	LKMDLDNNFYSTEVSVSSTENAVSSDLRAGDVPVLSLSNSSENAASVISYSGSAPSIVH
mouse	718	SSQFSSVIKHSNTIASLTNSNHKSPSQPVVSPSLIKDSKPEADKASKPASRPKSIKEKKK
rat	712	SSQFSSVIKHSNAIACLANSNHQSPSQPVASPSL IKDSKPEADKASKLASRPKNSKEKKK
human	720	SSQFSSVIMHSNAIAAMTSSNHRAFSDPAVSSQLKDDSKPEADKVGRFASRPKSIKEKKK
mouse	778	TAPS NRGEITEEAKYIADHGGSSGKTTNAEETSKIETYIAKPALPGTSTNSNVAPLCQI
rat	772	TVPCNRGEITEEAKYVADLGGSSGKTTNVVEETSKIETYIAKPALPGTSTNSNVAPLCQI
human	780	TTSHTRGEIPEESNYVADP GGSLSKTTNIAEETSKIETYIAKPALPGTSTNSNVAPLCQI
mouse	837	TVKIGNEAIVKRHILGSKLFYKRGRKPKYQMQEETLPRENDPETPGDSPLGLCQAECVEM
rat	832	TVKIGNEAIVKRHILGSKLFYKRGRKPKYQMQEETLPRESDPETRGDSPLGLCQADCVEM
human	840	TVKIGNEAIVKRHILGSKLFYKRGRRPKYQMQEEP LPQGN DPEPSGDSPLGLCQSECEM

```

mouse  897  SEAFDEVSDQDSTDKPWRPYNYKPKKSKQLRKMVRKVKWRKERRSRSPVGRCRYPAELD
rat    892  SEAFDEVSDQDSTDKPWRPYNYKPKKSKQLRKRKVKWRKERGSRSPVGRCRYPAELD
human  900  SEVFDASDQDSTDKPWRPYNYKPKKSRQLKMRKVNWRKEHGNRSPSHKCKYPAELD

mouse  957  RAEVKLP-----PD-KAFEEEEEEENKEMPKLQCELCDDGCPDGAAGAGAEGKPH
rat    952  RAEMGRRRYPAELDRCAEVKLPPDKASEEEEENKEMPKLQCELCDDGDKAAGAGAEGKPH
human  960  CAVGKAP-----QDKPFEEEETKEMPKLQCELCDDGDKAVGAGNQGGRPH

mouse  1006  QHLTSKPYICELCAKQFQSSSTLKMHRCHTGEKPYQCKTCGRCFVQGNLQKHERIHLG
rat    1010  QHLTLKPYICELCAKQFQSSSTLKMHRCHTGEKPYQCKTCGRRFVQGNLQKHERIHLG
human  1003  RHLTSRPYACELCAKQFQSPSTLKMHRCHTGEKPYQCKTCGRCFVQGNLQKHERIHLG

mouse  1066  VKEFICQYCNKAFTLNETLKIHERIHTGEKRYHCQFCFQGFLLYLSLTKRNHERRHIREHDG
rat    1070  VKEFICQYCNKAFTLNETLKIHERIHTGEKRYHCQFCFQGFLLYLSLTKRNHERRHIREHDG
human  1063  LKEFVCQYCNKAFTLNETLKIHERIHTGEKRYHCQFCFQRFLYLSLTKRNHEQRHIREHNG

mouse  1126  KGFACFQCPKICKTAAALRMHQKHLKLYKTLPKQEETGDTCHENADLLESQ LCTDSEDS EQ
rat    1130  KGFACFQCPKICKTAAALRMHQKHLKFLKTLTKQEETDDLCHENSDDLLESQPCTDSEDS DQ
human  1123  KGYACFQCPKICKTAAALGMHQKHLKFSKSPSQQEKIGDVCHENSNP LENDHF IG SEDNDQ

mouse  1186  KDDIKAF AENVL--
rat    1190  KDDIKKPL LKMSFE
human  1183  KDNIQTG VENVVL-

```

図4. マウスHABZおよびラット、ヒトオルソログの amino 酸配列の比較

マウスHABZ、ラットZENONおよびヒトオルソログの amino 酸配列の比較を示した。一致した amino 酸を黒、類似した amino 酸を灰で表している。BTBDメインと10個のジンクフィンガーモチーフ (ZF1-10) は amino 酸配列の上に実線で示した。

```

HABZ  1  ----MTVMSLSRD LKDDFHSDTVLSILNEQRIRGILCDVTI IVEDTKFKAHSNVLAASSLYFKNIF
Kaiso 1  ----MESRKLISATDIQYSASLLNSLNEQRGHGLFCDVTI IVEDRKFRAHRNLSASSTYFHQLF
ZF5   1  -MEFFISMSETIKYNDHDKTLFLKTLNEQRLEGEFCDIAI VVEDVKFRAHRCVLAACSTYFKKLF
PLZF  1  ---MDLTKMGMIQLQNP SHPTGLLCKANQMLAGTLCDDVIMVDSQEFHAHRTVLACTSKMFEILF
Bcl-6 1  ----MASPADSCLQFTRHASDVLNLRNLRSRDILTDVIVVSREQFRAHKTVLMACSGLFYSIF
Bach2 1  MSVDEKPGSPMYVYESTVHCANLLGLNDQRKCDILCDVTI IVERKEFRAHRAVLAACSEYFWQAL

HABZ  63  WSHTICISSHVLELDDLKAEVFT EILNYIYSSVVVVRQETVTDLAAAGKKGISFLEDLSDRNFS
Kaiso 62  S-----VAGQVVELSFIRAEIFAEILNYIYSSKVVVRADLLDELKSGQLLGVKFIAELGVPLSQ
ZF5   66  KKLEVDSSS-VIEIDFLRSDIFEEVLNMYTAKISVKK-EDVNLMMSSGQILGIRFLDKLCSQKRD
PLZF  64  HR-----NSQHYTLDFLSPKTFQIILEYAYTATLQAKA-EDLDDLKYAAEILEIEYLEEQCLKILE
BCL-6 63  TDQLKCNLSVINLDPEISPEGFCILLDFMYTSRLNLR-ENIMAVMTTAMYLQMEHVVDTCRKFIF
Bach2 67  VG-QTKDDLVS LPEEVTARGFGPLLQFAYTAKLLLSR-ENIREVIRCAEFLRMHNLEDSCFSFLQ

```

図5. マウスHABZとその他のBTB蛋白質のBTBDメイン間の比較

HABZのBTBDメインと、これまでに報告されているいくつかのBTB転写因子のBTBDメインの amino 酸配列の比較を示した。一致した amino 酸を黒、類似した amino 酸を灰で示している。また、ほとんどのBTBDメイン間でリジンあるいはアルギニンで保存されている amino 酸を▼で示した。

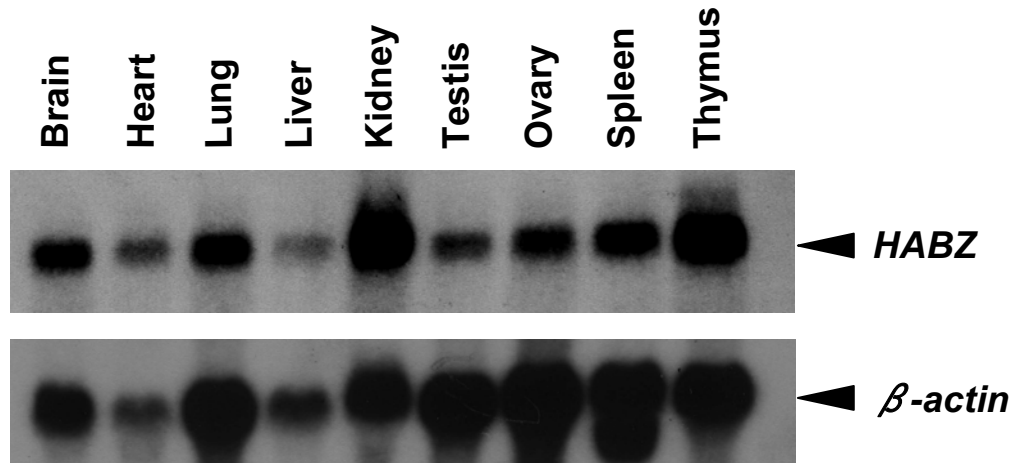


図6. マウス成体におけるHABZ mRNAのノザンブロット解析

マウス成体の様々な臓器からtotal RNAを抽出し、HABZのcDNA断片をプローブとしてノザンブロットを行った（上のパネル）。RNA量を比較するため、プローブを一度剥離し、 β -actinプローブで再度ハイブリダイゼーションを行った（下のパネル）。

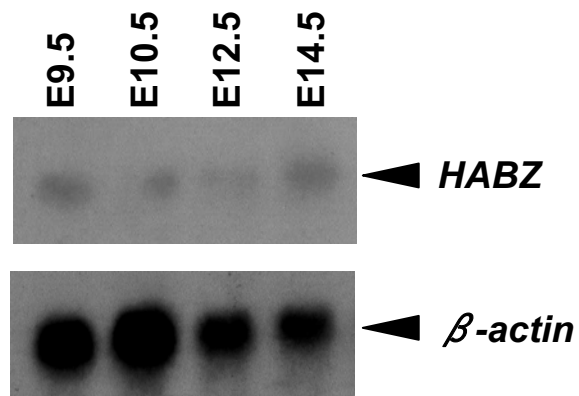


図7. マウス胎児期のHABZ mRNAのノザンブロット解析

マウス胎児の各ステージからtotal RNAを抽出し、HABZのcDNA断片をプローブとし、ノザンブロットを行った（上のパネル）。RNA量を比較するため、プローブを一度剥離し、 β -actinプローブで再度ハイブリダイゼーションを行った（下のパネル）。

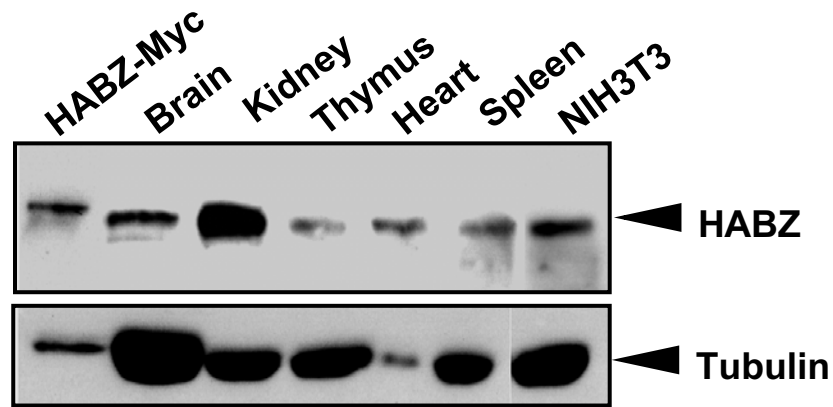


図8. HABZ蛋白質の発現

マウス成体の様々な臓器およびNIH3T3細胞から蛋白質を抽出し、6%-SDS-PAGEを行った後、抗HABZ抗体でWestern blotを行った（上のパネル）。蛋白質量を比較するため、tubulin抗体で再度Western blotを行った（下のパネル）。

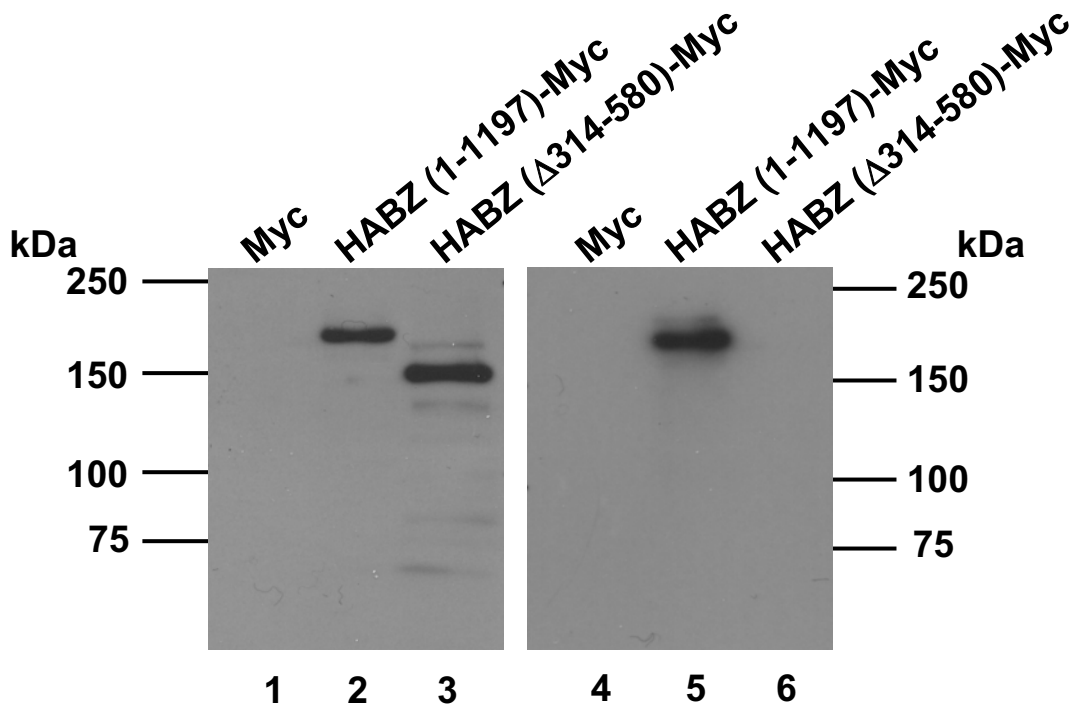


図9. 抗HABZ抗体の評価

Myc (lanes 1, 4)、HABZ (1-1197)-Myc (lanes 2, 5) およびHABZ (Δ 314-580)-Myc (lanes 3, 6) を293T細胞に発現させ、細胞抽出液を6%-SDS-PAGEにより分離後、抗Myc抗体によりWestern blotを行った (lanes 1, 2, 3)。同じプロットを用い、再度抗HABZ抗体によるWestern blotを行った (lanes 4, 5, 6)。

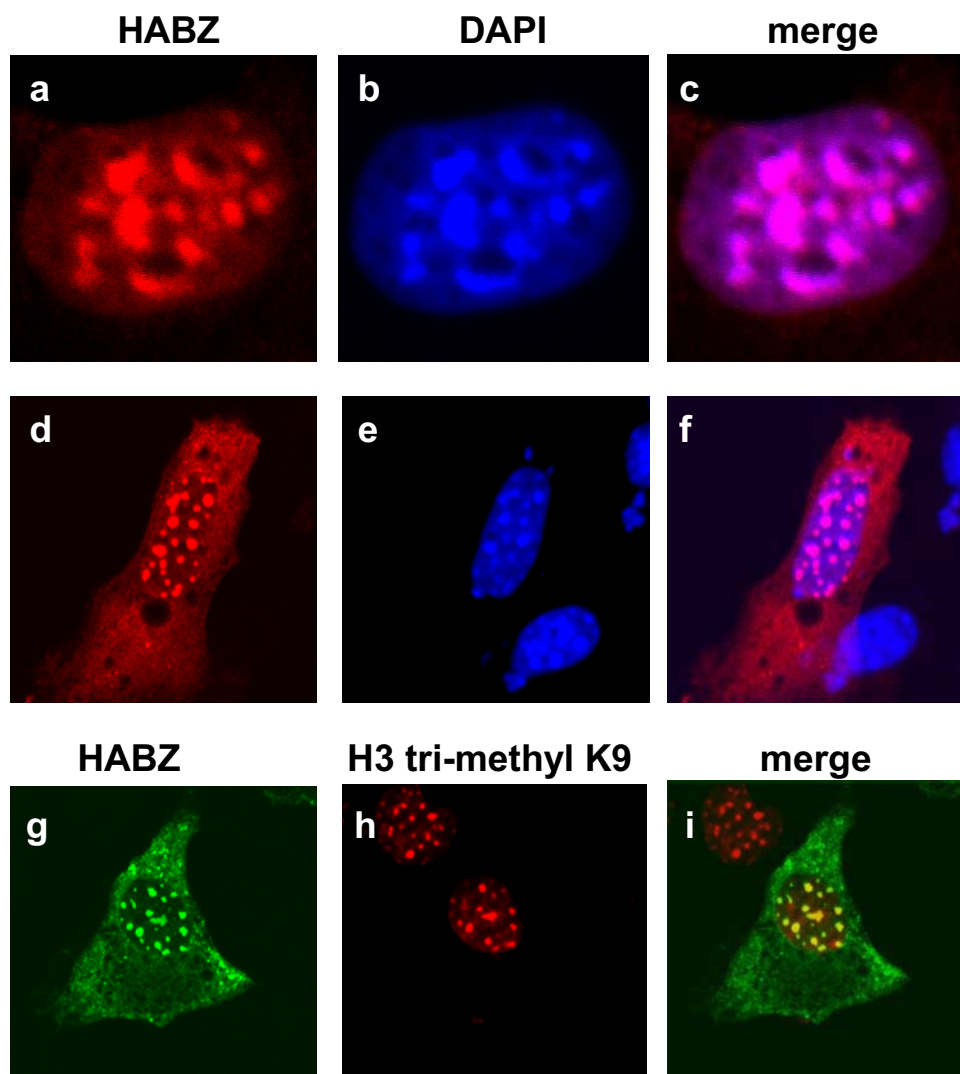


図10. HABZは核と細胞質の両方に局在し、核内ではpericentromeric heterochromatinに局在する

HABZ-Myc発現ベクターをNIH3T3細胞に導入し、24時間後、Cy3でラベルした抗Myc抗体 (9E10) で免疫染色し、共焦点レーザー顕微鏡で観察した (a, d, g)。DNAはDAPIで染色した (b, e)。またpericentromeric heterochromatinのマーカであるH3 tri-methyl K9抗体で染色を行った (h)。右側のパネルはHABZとDAPIの染色像(c, f)あるいはHABZとH3 tri-methyl K9の染色像 (i) を重ね合わせたものを示している。

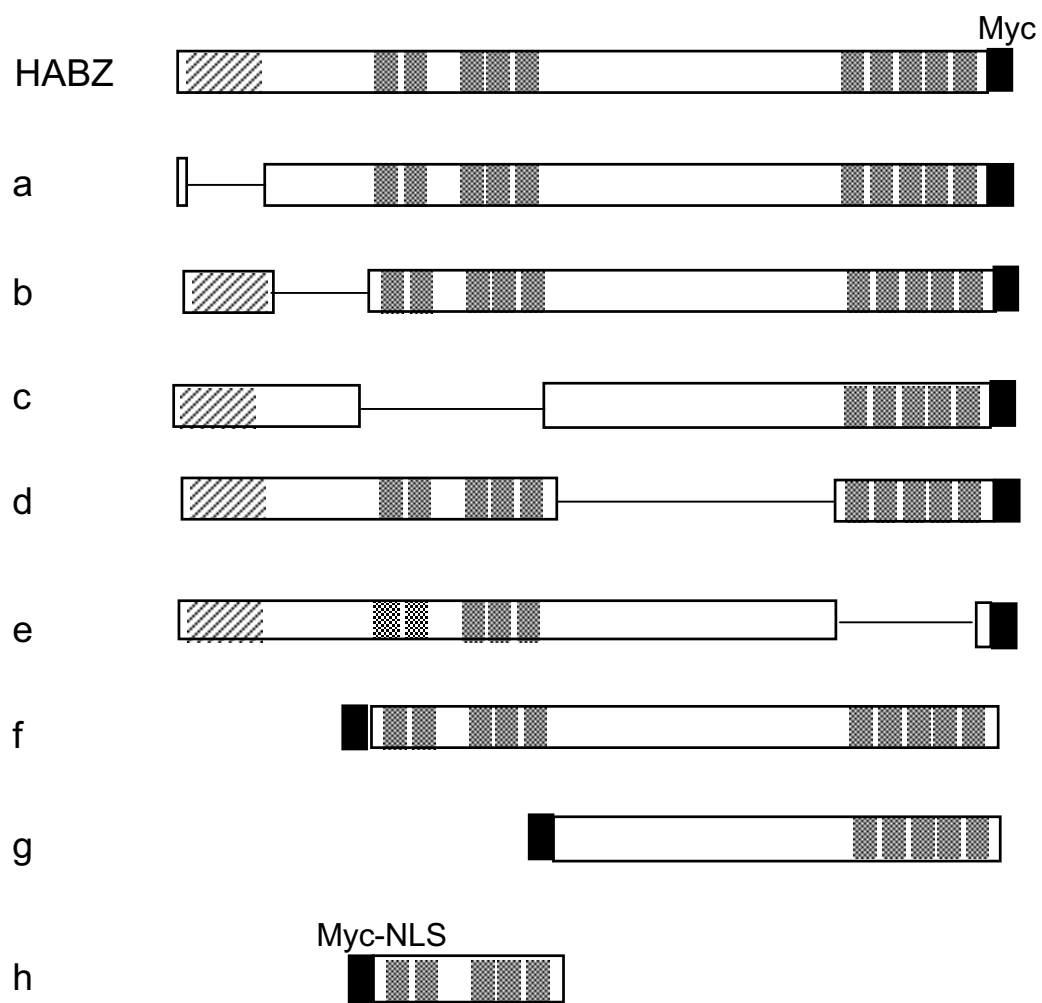


図11. 免疫染色に使用したコンストラクト

HABZの局在を調べるための免疫染色に使用したコンストラクトを示した。a-eはC末端側に、f-hはN末端側にMycタグを付加した。また、hはSV40の核移行シグナル (NLS) を繋いだものを使用した。

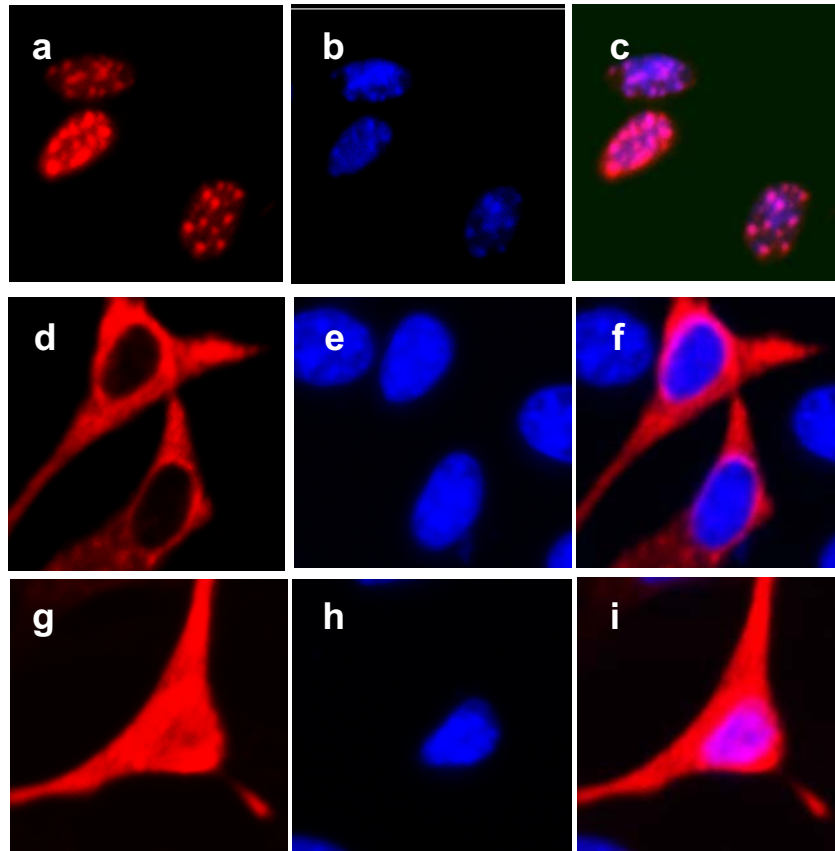


図12. HABZのN末端側は、細胞質への局在、ZF1-5はpericentromeric heterochromatinへの局在に必要である

Mycタグを付加したコンストラクト (図11-f, a-c; 図11-c, d-i) をNIH3T3細胞に導入し、抗Myc抗体 (赤) で免疫染色を行った (a, d, g)。核はDAPI (青) で染色した (b, e, g)。右側のパネルはHABZとDAPIの染色像を重ね合わせたものを示している (c, f, i)。

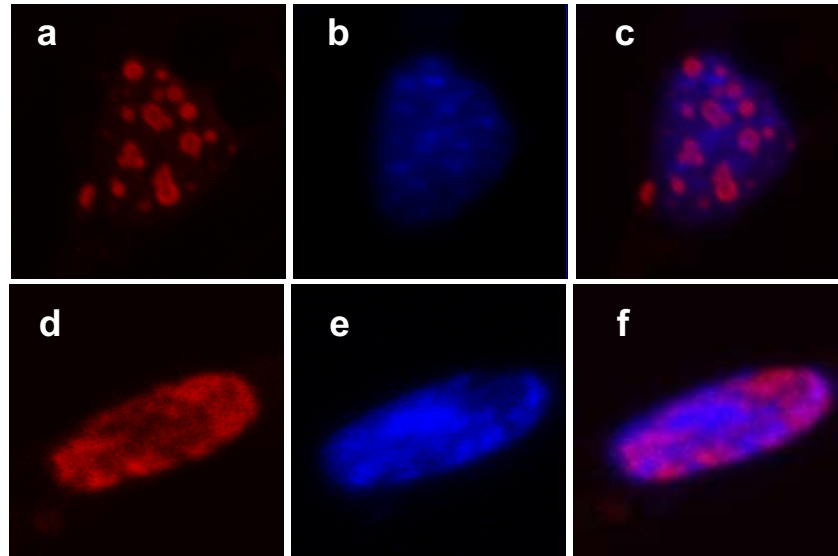


図13. HABZのZF1-5はpericentromeric heterochromatinへの局在に必要なであるが十分ではない。

Mycタグを付加したコンストラクト (図11-g, a-c; 図11-h, d-f) をNIH3T3細胞に導入し、抗Myc抗体 (赤) で免疫染色を行った (a, d)。核はDAPI (青) で染色した (b, e)。右側のパネルはHABZとDAPIの染色像を重ね合わせたものを示している (c, f)。

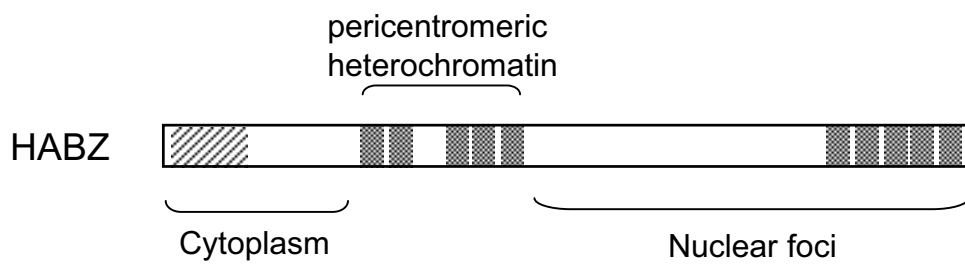


図14. HABZの細胞内局在

図12、13で得られた結果をもとに、細胞内局在におけるHABZの各ドメインの役割を示した。

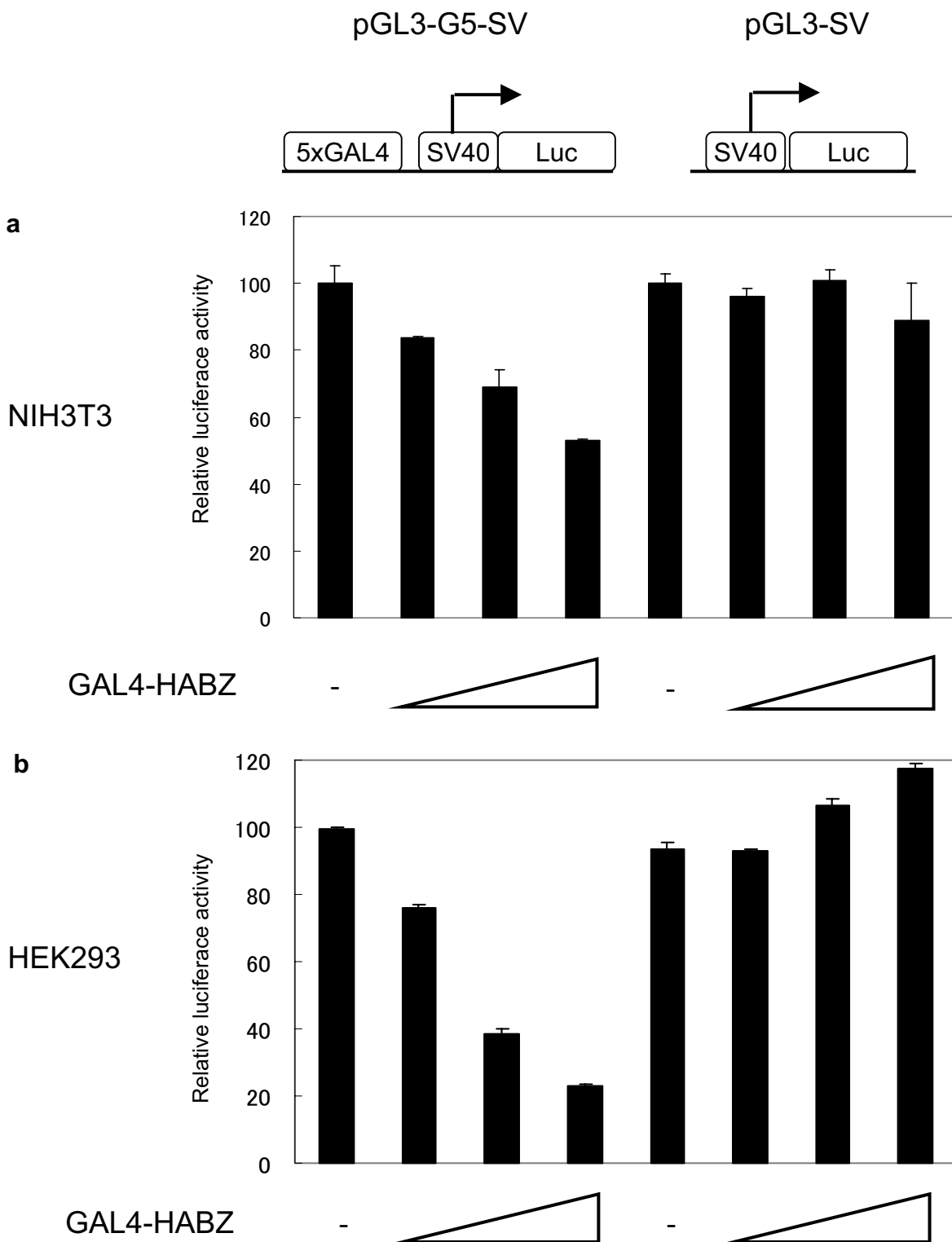


図15. HABZはDNA結合依存的に転写を抑制する

段階的に量を増加したGAL4-HABZ発現ベクター (0-250 ng) を、100 ngのGAL4結合サイトを5つ含むpGL3-G5-SVあるいは含まないpGL3-SVベクターとともにNIH3T3細胞 (上) またはHEK293細胞 (下) に導入し、48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。トランスフェクションの効率を調べるために、4 ngのpRL-SVベクターも同時にトランスフェクションした。GAL4-HABZを加えない場合のルシフェラーゼ活性の値を100とし、それぞれの活性を測定した。

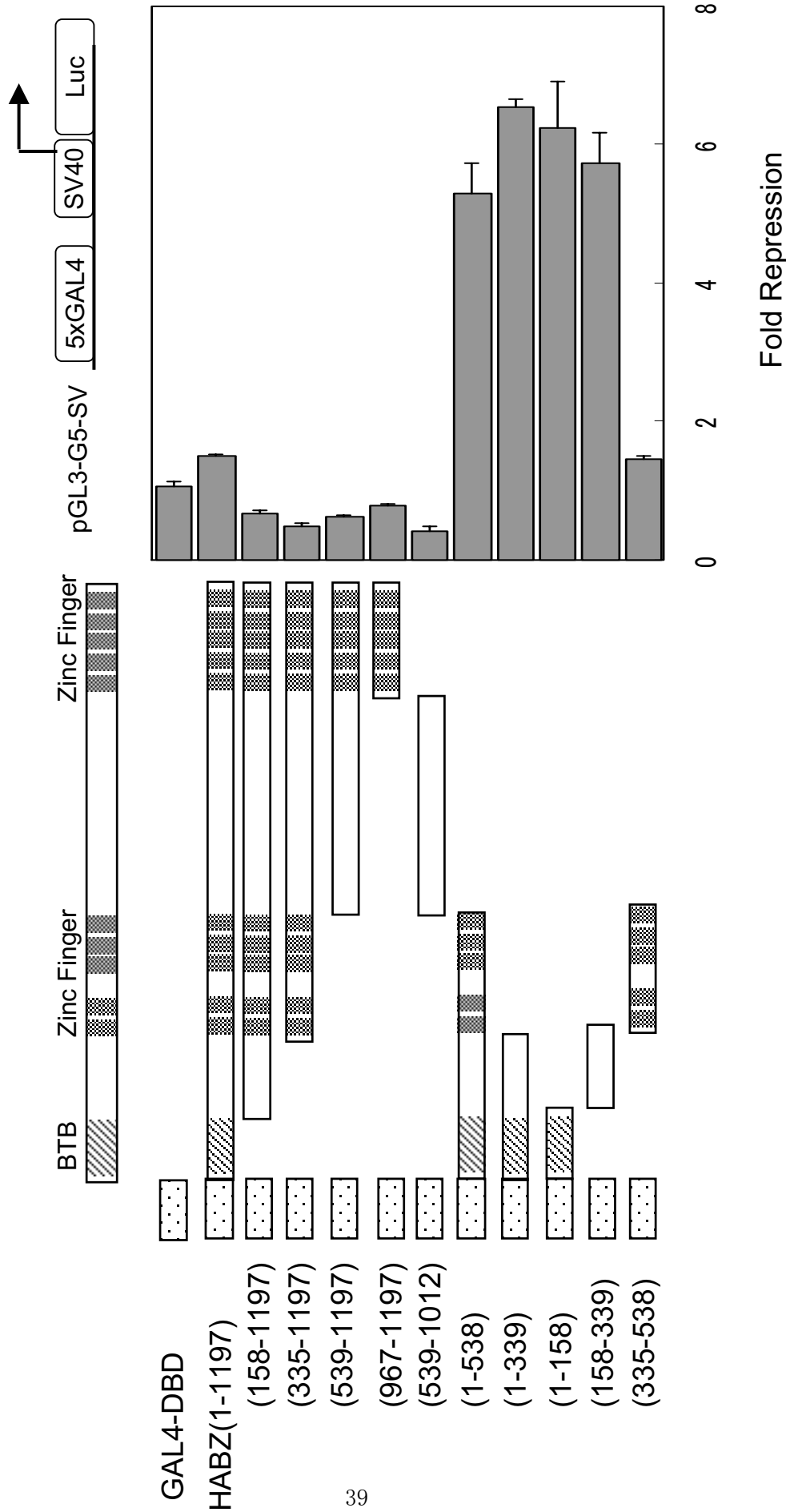


図16. HABZはN末端側に転写抑制活性を持つ

GAL4-DBDに融合したHABZの各種欠損体を用いて、図8同様pGL3-G5SVレポーターに対する影響を調べた。GAL4-DBD単独の値を1とした時の、fold repressionを示した。

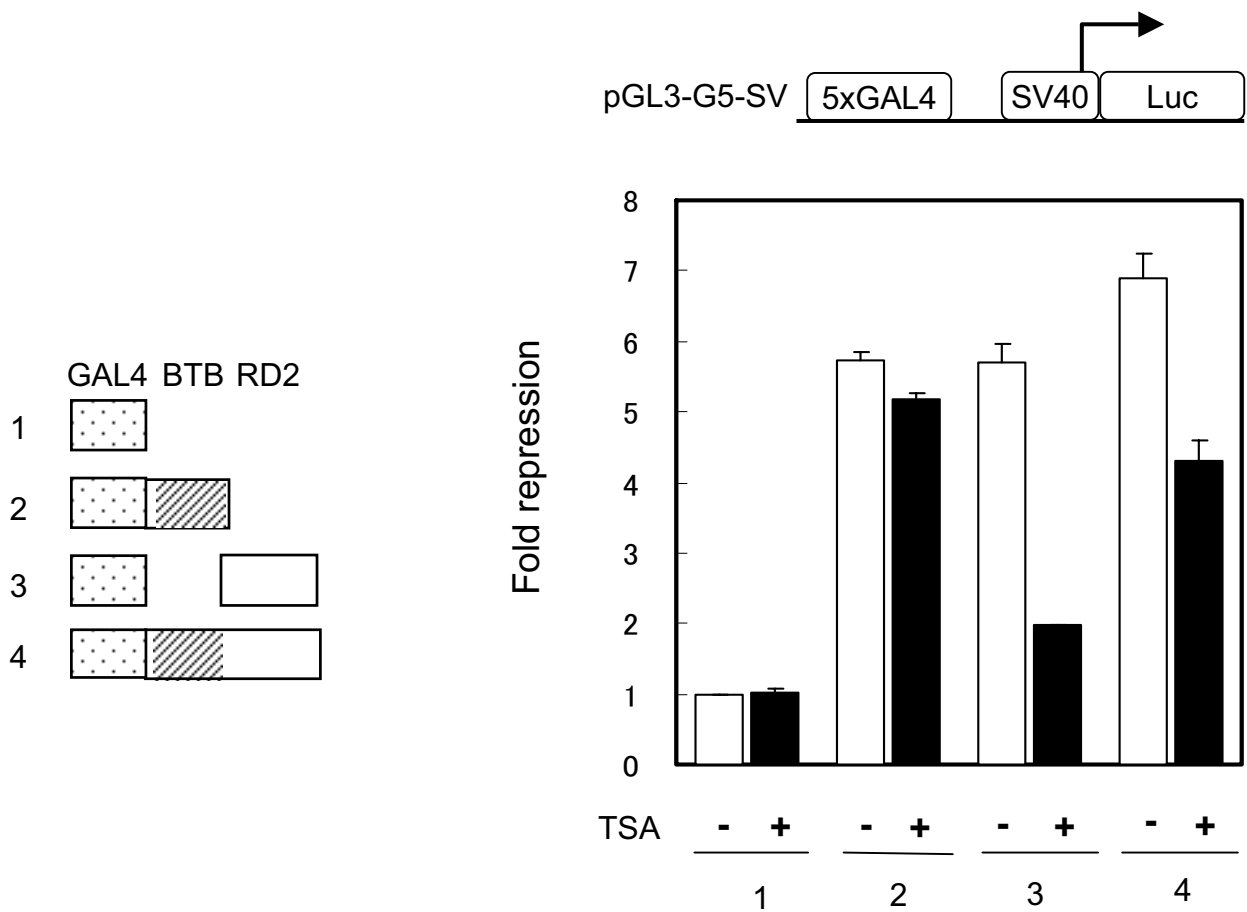


図17. RD2による転写抑制はTSA感受性である

250 ngのGAL4、GAL4-BTB、-RD2、-BTB-RD2発現ベクターを、100 ngのpGL3-G5-SVレポーターおよび4 ngのpRL-SVベクターとともにNIH3T3細胞に導入し、24時間後、DMSOまたは100 ng/mlのTSAを加え、さらに24時間培養した後、ルシフェラーゼ活性を測定した。GAL4単独の活性を1とした場合のFold repressionの値を示した。

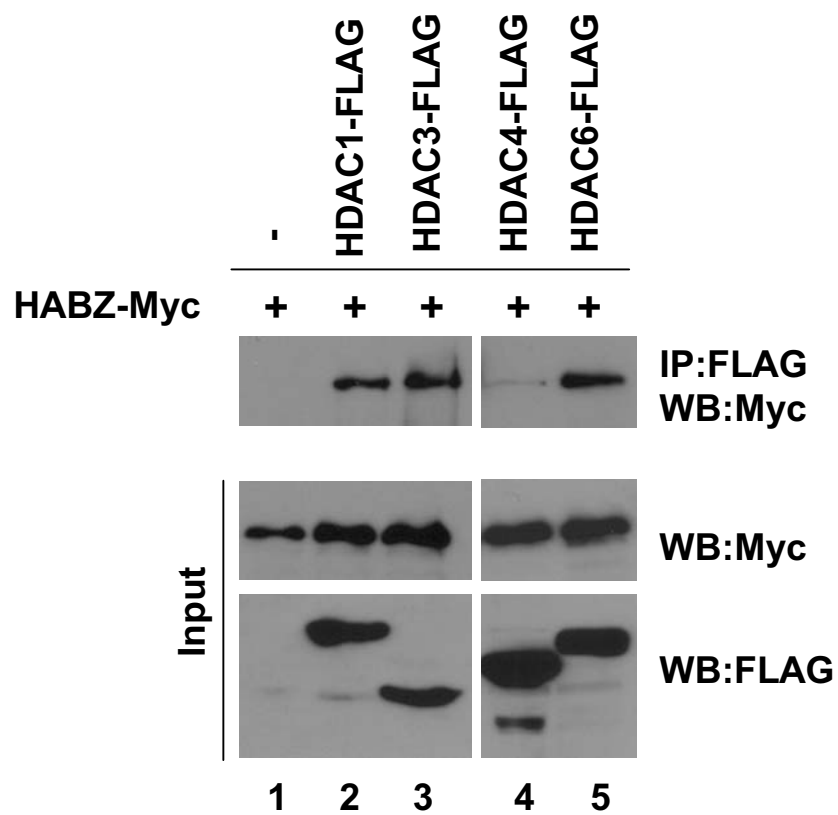


図18. HABZは複数のHDACsと相互作用する

HABZ-MycとHDACs-FLAG発現ベクターを293T細胞に導入し、40時間後細胞を回収した。細胞抽出液を抗FLAG抗体で免疫沈降し、沈降物を抗Myc抗体でWestern blotを行った。Inputは免疫沈降に使った抽出物のうち2.5%を用いて、直接抗Mycおよび抗FLAG抗体でWestern blotを行った。Lane 1, empty vector; 2, HDAC1; 3, HDAC3; 4, HDAC4; 5, HDAC6。


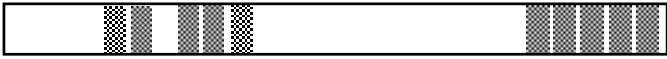




HABZ		CtBP1	CtBP2	GAL4-AD
1-1197		+	+	-
158-1197		+	+	-
335-1197		-	-	-
158-339		++	++	-
1-339		++	++	-
1-158		-	-	-

図19. HABZのRD2がCtBP1、CtBP2と結合する

GAL4-DBDに融合したHABZの各種欠損体と、GAL4-ADに融合したCtBP1、CtBP2またはGAL4-ADのみを酵母株SFY526に導入し、 β ガラクトシダーゼ活性を測定した。++、+、-はそれぞれ、強い結合、弱い結合、結合しないものを表している。

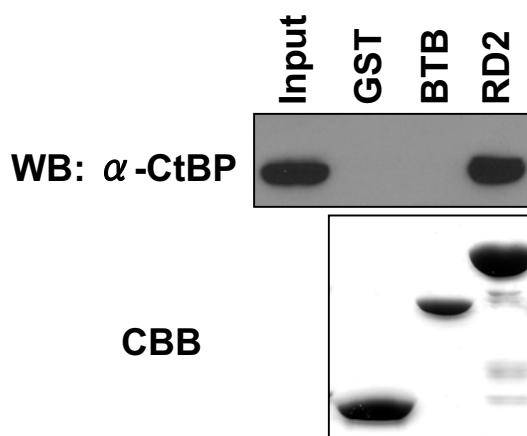


図20. RD2はCtBPと相互作用する

おおよそ3-5 μ gの大腸菌で精製したGST、GST-BTB、GST-RD2蛋白質と、NIH3T3細胞の抽出物を用いてGST pull-downアッセイを行った。洗浄後、結合している蛋白質を、CtBP1、CtBP2の両方を認識する抗CtBP抗体によるWestern blotで検出した(上のパネル)。実験に使用したGST融合蛋白質のCBB染色像を下のパネルに示した。

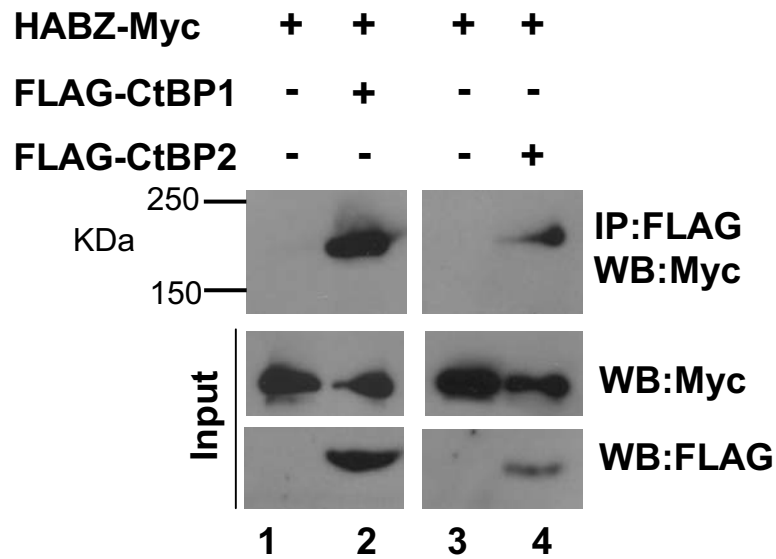


図21. HABZは細胞内でCtBP1、CtBP2と相互作用する

HABZ-Mycのみ (lanes 1, 3)、あるいはHABZ-MycとFLAG-CtBP1 (lane 2) またはFLAG-CtBP2 (lane 4) 発現ベクターを293T細胞に導入し、40時間後細胞を回収した。細胞抽出液を抗FLAG抗体で免疫沈降し、沈降物を抗Myc抗体でWestern blotを行った。Inputは免疫沈降に使った抽出物のうち2.5%を用いて直接Western blotを行った。

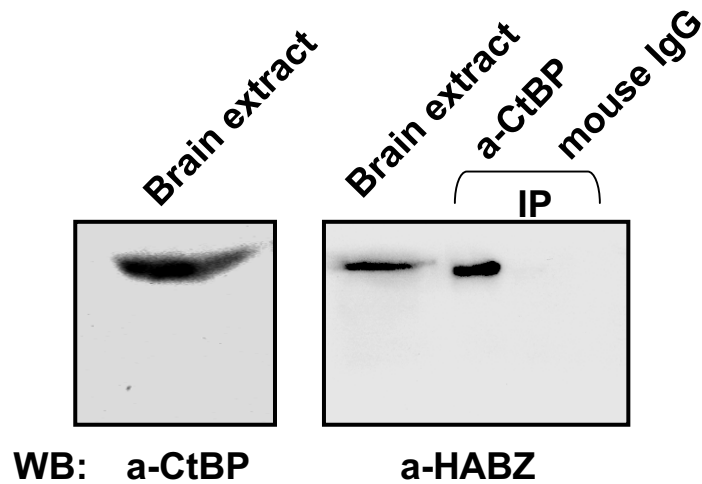
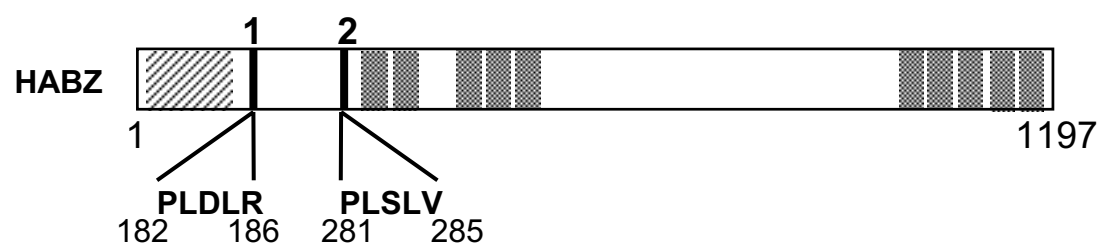


図22. 内在性HABZは内在性CtBPと相互作用する

マウス脳の抽出物を用いて抗CtBP抗体で免疫沈降し、抗HABZ抗体でWestern blotを行った。Inputは免疫沈降に使った抽出物のうち2.5%を用いて直接ウエスタンブロットを行った。



HABZ-Motif1	M	F	S	P	L	D	L	R	A	S	F	K
HABZ-Motif2	E	N	M	P	L	S	L	V	T	C	P	E
Ad2 E1A	P	G	Q	P	L	D	L	S	C	K	R	P
MITR	P	I	S	P	L	D	L	R	T	D	L	R
Hairy	E	Q	Q	P	L	S	L	V	I	K	K	Q
consensus				P	X	D	L	S				

図23. HABZはコンセンサスCtBP結合モチーフに類似した配列をRD2に2つ含んでいる

HABZの予想される2つのCtBP結合モチーフ (PLDLRおよびPLSLV) を示した(上)。また、HABZの2つのモチーフと、これまでにCtBPとの結合が報告されているモチーフの中から、Ad2 E1A、MITRおよびHairyのモチーフの比較を表した(下)。

A

	<u>Motif1</u>	<u>Motif2</u>
WT	PLDLR	PLSLV
(DL/AS)	PL <u>AS</u> R	PLSLV
(SL/AS)	PLDLR	PL <u>AS</u> V
(DL/AS, SL/AS)	PL <u>AS</u> R	PL <u>AS</u> V

B

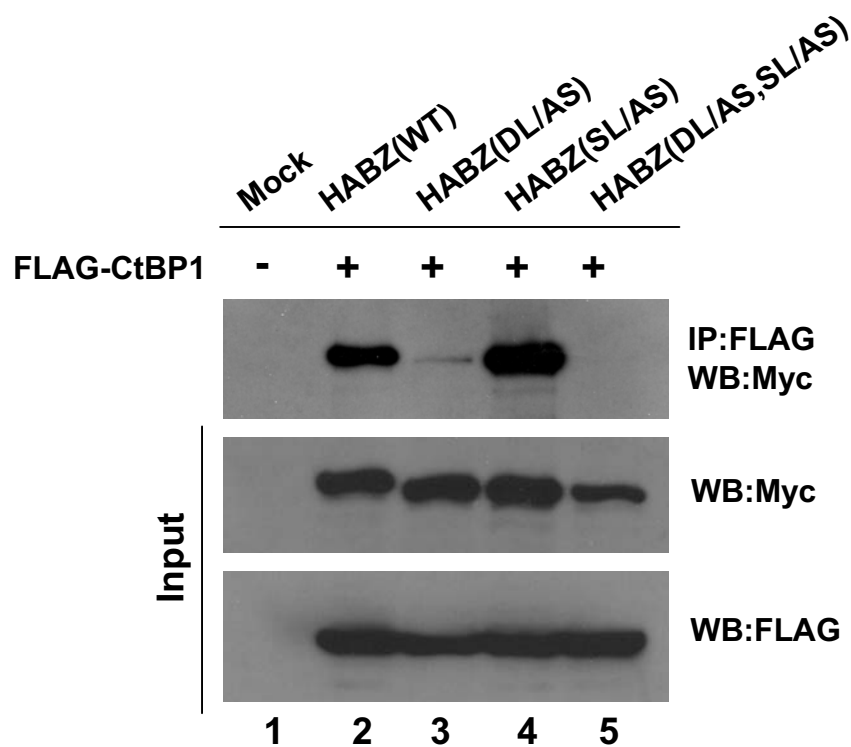


図24. PLDLRモチーフがHABZとCtBPとの相互作用に必須である

A. 実験に使用したCtBP結合モチーフの変異体を示した。変異を入れたアミノ酸は下線で示した。B. Mycタグを付加したHABZあるいはHABZ変異体とFLAGタグを付加したCtBP1を293T細胞に共発現させ、細胞抽出物を抗FLAG抗体で免疫沈降し、抗Myc抗体でWestern blotを行った。Lane1, empty vector; 2, wild type; 3, DL/AS; 4, SL/AS; 5, DL/AS, SL/AS。Inputは免疫沈降に使った抽出物のうち2.5%を用いて直接Western blotを行った。

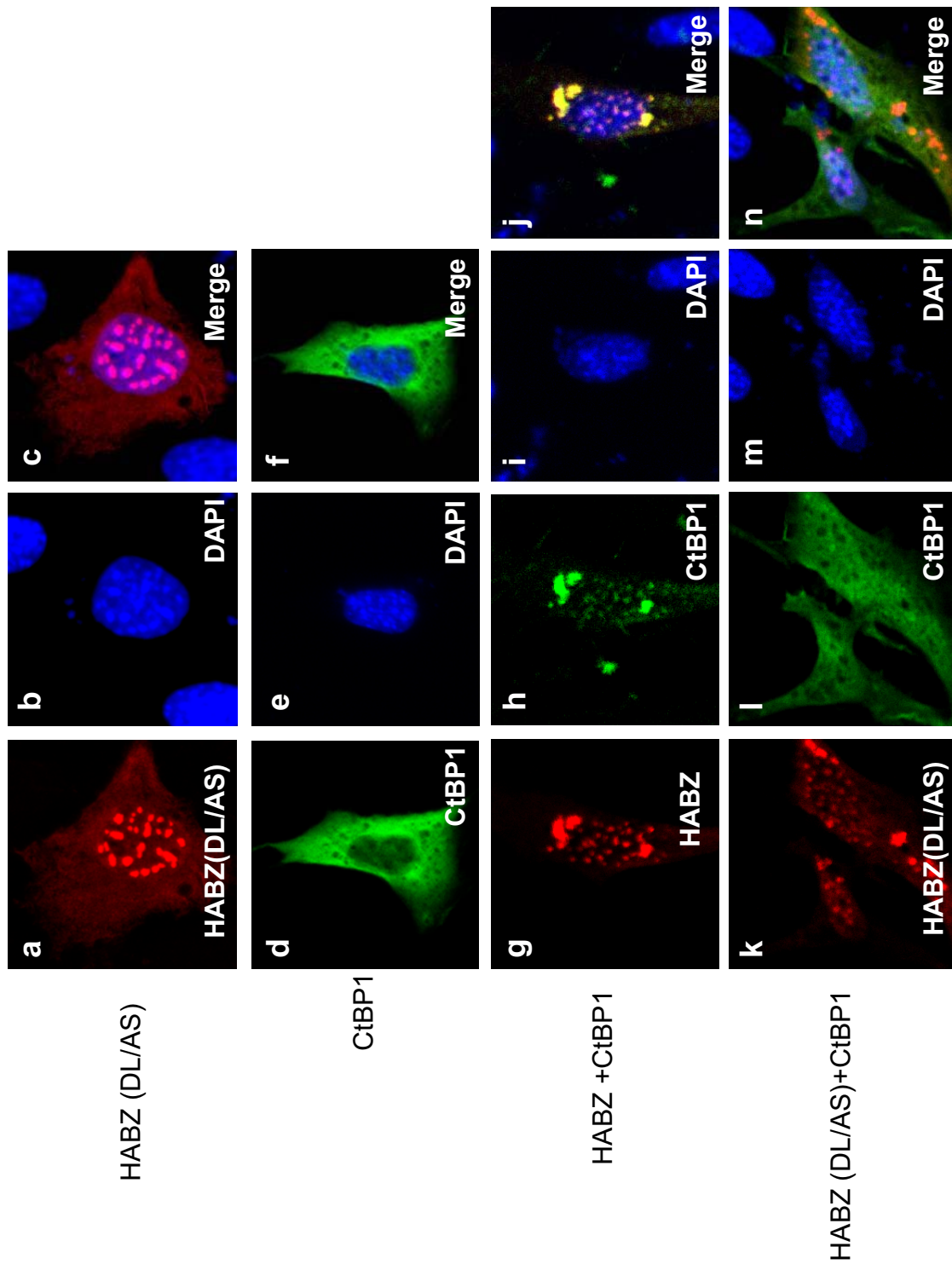


図25. HABZはPLDLRモチーフを介してCtBP1をpericentromeric heterochromatinにリクルートする NIH3T3細胞にHABZ (DL/AS)-Mycのみ (a-c)、FLAG-CtBP1のみ (d-f)、HABZ-Myc + FLAG-CtBP1 (g-j)、HABZ (DL/AS)-Myc + FLAG-CtBP1 (k-n)を発現させ、抗Myc抗体 (赤) および抗FLAG抗体 (緑) で免疫染色を行った。また、核は DAPI (青) で染色した。c、f、i、nはそれぞれの染色像を重ね合わせたものである。

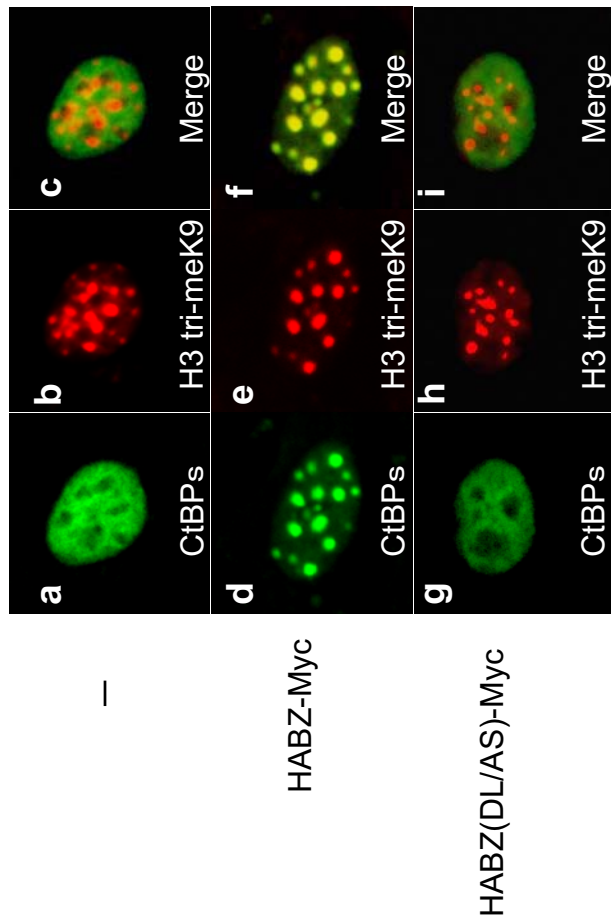


図26. HABZはPLDLRモチーフを介して内在性CtBPsをpericentromeric heterochromatinにリクルートする

トランスフェクションを行わないNIH3T3細胞 (a-c)、HABZ-Myc (d-f)、HABZ(DL/AS)-Myc (g-i) をトランスフェクションした細胞を、抗CtBP抗体 (緑) および抗H3 tri-meK9抗体 (赤) で免疫染色を行った。右側のパネルはそれぞれの染色像を重ね合わせたものである。

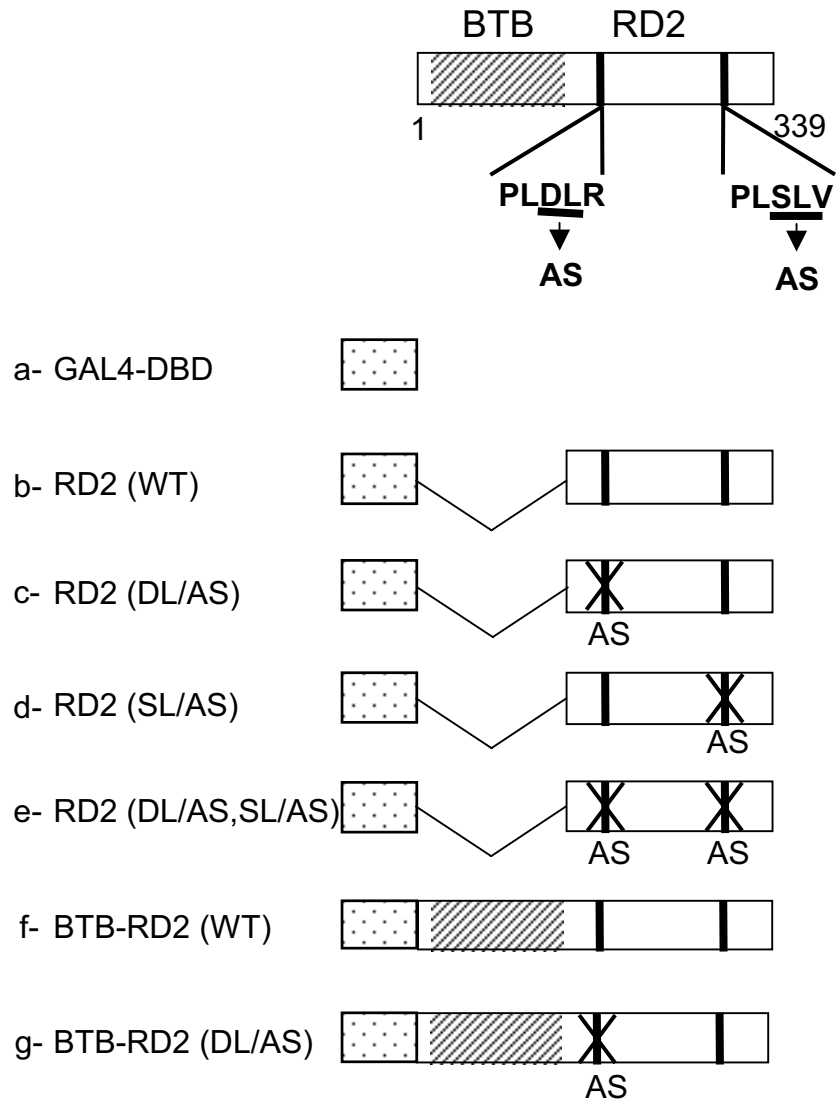


図27. Mammalian two-hybridアッセイあるいはRepressionアッセイに使用したコンストラクト

図28, 29で使用したGAL4融合蛋白質のコンストラクトを示した。変異を入れたアミノ酸は図中にASで示した。

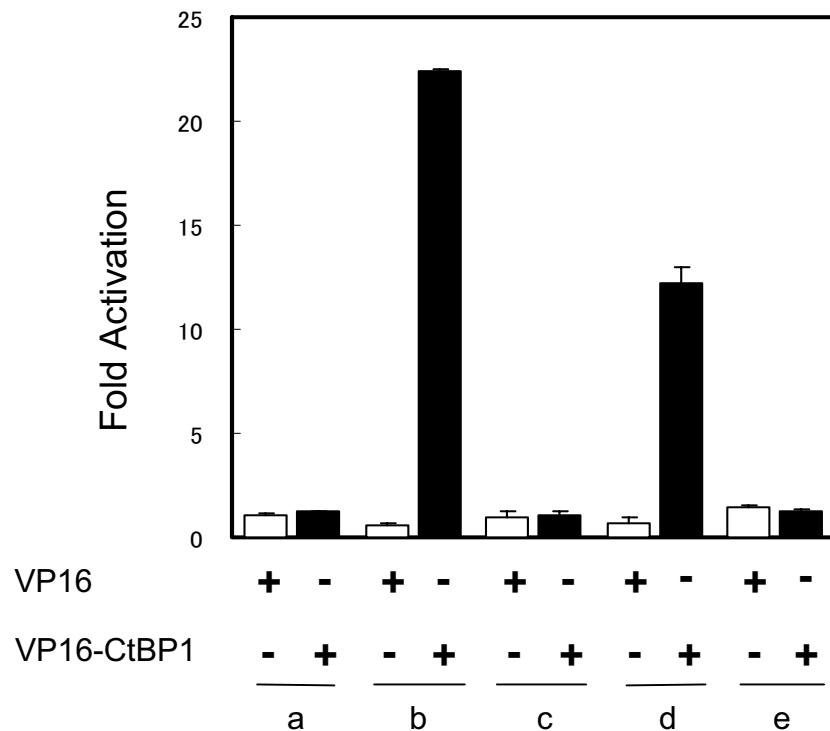
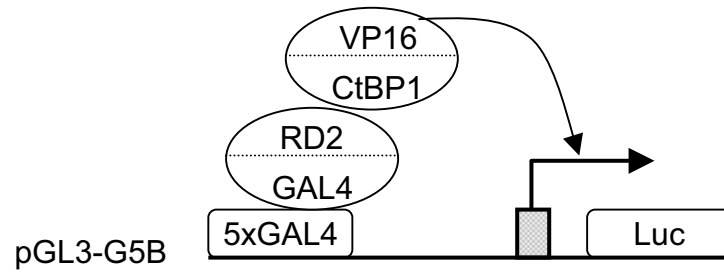


図28. RD2はPLDLRモチーフを介してNIH3T3細胞内でCtBP1と相互作用する

(上) Mammalian two-hybrid assayの概略図。レポーター遺伝子として、ルシフェラーゼ遺伝子の5'上流にE1Bのminimal TATAプロモーターと5つのGAL4結合配列を持つpGL3-G5Bを用いた。(下) 200 ngのGAL4、GAL4-RD2、-RD2 (DL/AS)、-RD2 (SL/AS)、-RD2 (DL/AS, SL/AS) 発現ベクターを50 ngのVP16あるいはVP16-CtBP1発現ベクターおよび100 ngのpGL3-G5Bレポーターと共にNIH3T3細胞に導入し、48時間後ルシフェラーゼ活性を測定した。GAL4-DBDとVP16との共発現の場合の値を1とし、それぞれの活性を測定した。

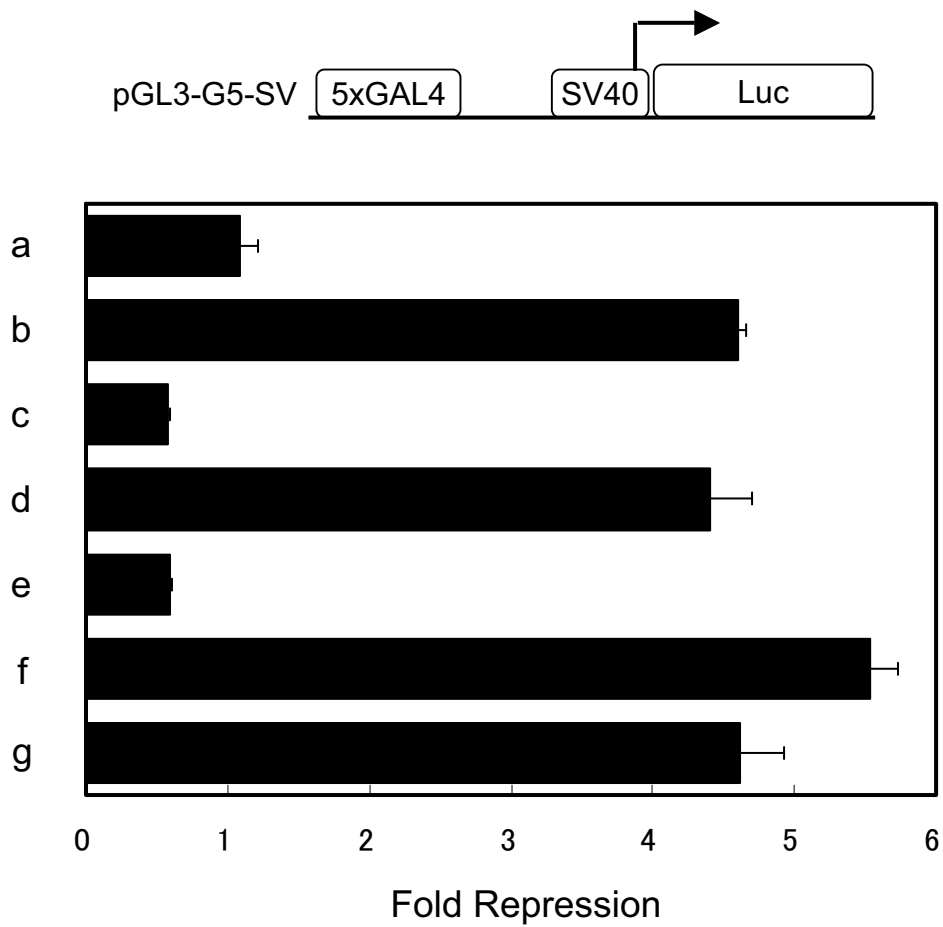


図29. PLDLRモチーフがRD2の転写抑制活性に必要なである

250 ngの各種GAL4-RD2あるいはGAL4-BTB-RD2の変異体を、100 ngのpGL3-G5SVレポーターとともにNIH3T3細胞に導入し、48時間後ルシフェラーゼ活性を測定した。GAL4-DBD単独の活性に対するFold repressionの値をグラフに示した。

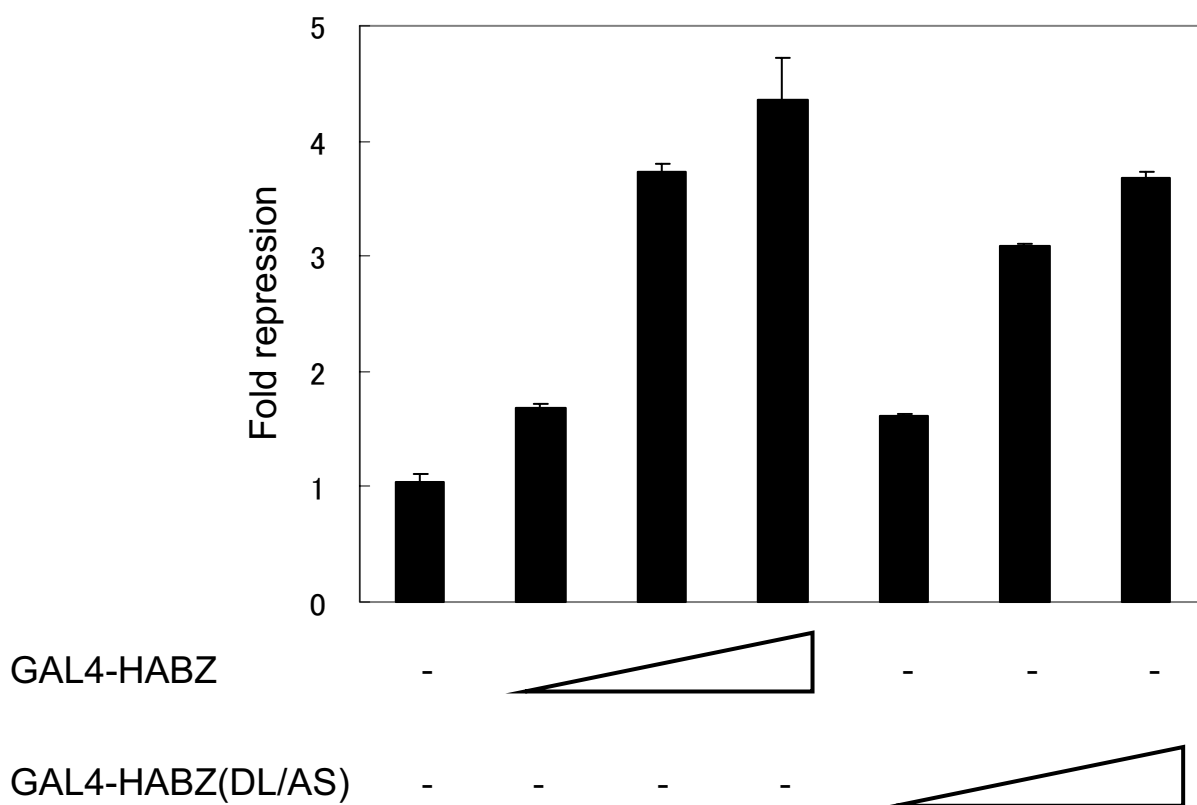
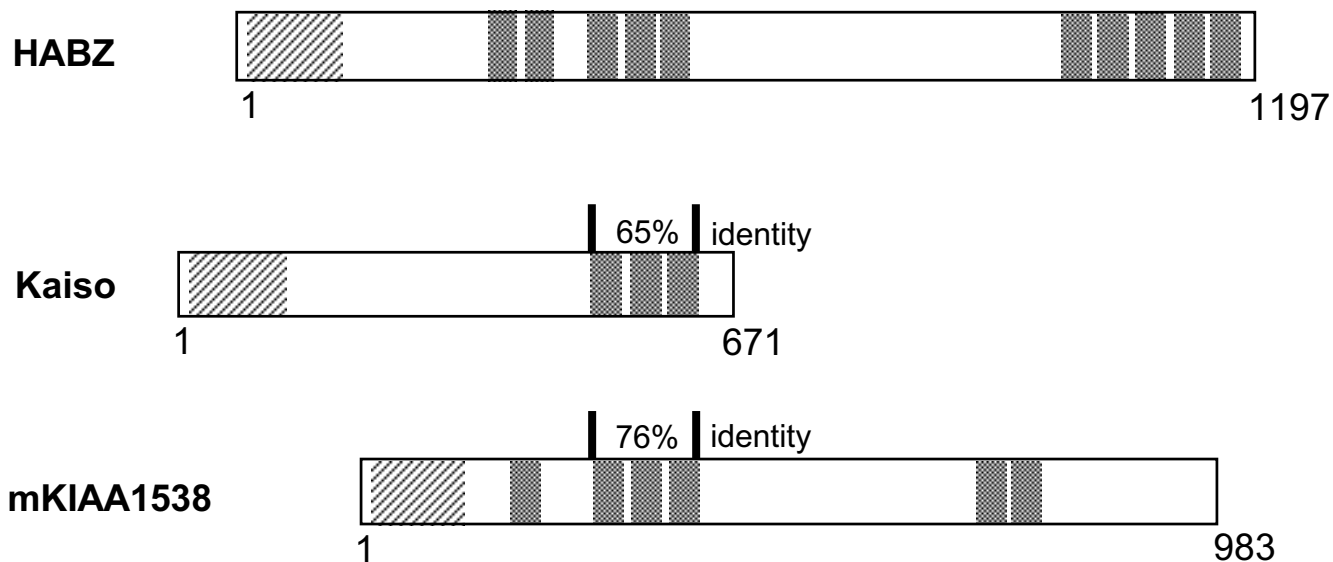


図30. GAL4-HABZ (DL/AS) は転写抑制活性を持つ

段階的に量を増加したGAL4-HABZまたはGAL4-HABZ (DL/AS) (0-250 ng) を、100 ngのGAL4結合サイトを含むpGL3-G5-SVレポーターとともにHEK293細胞に導入し、48時間後にルシフェラーゼ活性を測定した。HABZを加えない場合の値を1とし、それぞれのFold repressionの値を示した。

A



B



図31. HABZのジンクフィンガーはKaiso、mKIAA1538のジンクフィンガーと高い相同性を示す

A. マウスHABZ、KaisoおよびmKIAA1538の構造を示した。HABZのZF3-5と、KaisoのZF1-3およびmKIAA1538のZF2-4とのアミノ酸の一致を%で表した。

B. HABZ、Kaiso、mKIAA1538内の相同性のみられる3つのジンクフィンガーのアミノ酸配列の比較。一致するアミノ酸を黒、類似したアミノ酸を灰で表している。

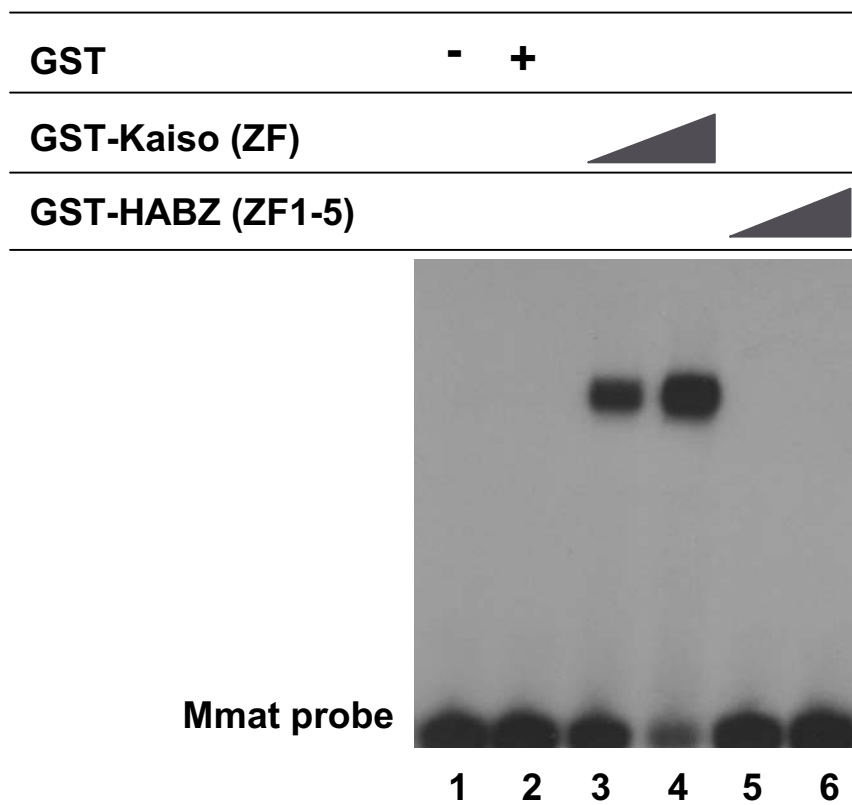


図32. HABZのジンクフィンガー (ZF1-5) はKaisoコンセンサス配列には結合しない

コントロール (lane 1)、100 ngのGST (lane 2)、10 ng (lane 3)、20 ng (lane 4) のGST-Kaiso-ZF、50 ng (lane 5)、100 ng (lane 6) のGST-HABZ (ZF1-5) を用いて、マウス *matrilysin* プロモーター由来のMmatオリゴとの結合をゲルシフト法によって調べた。

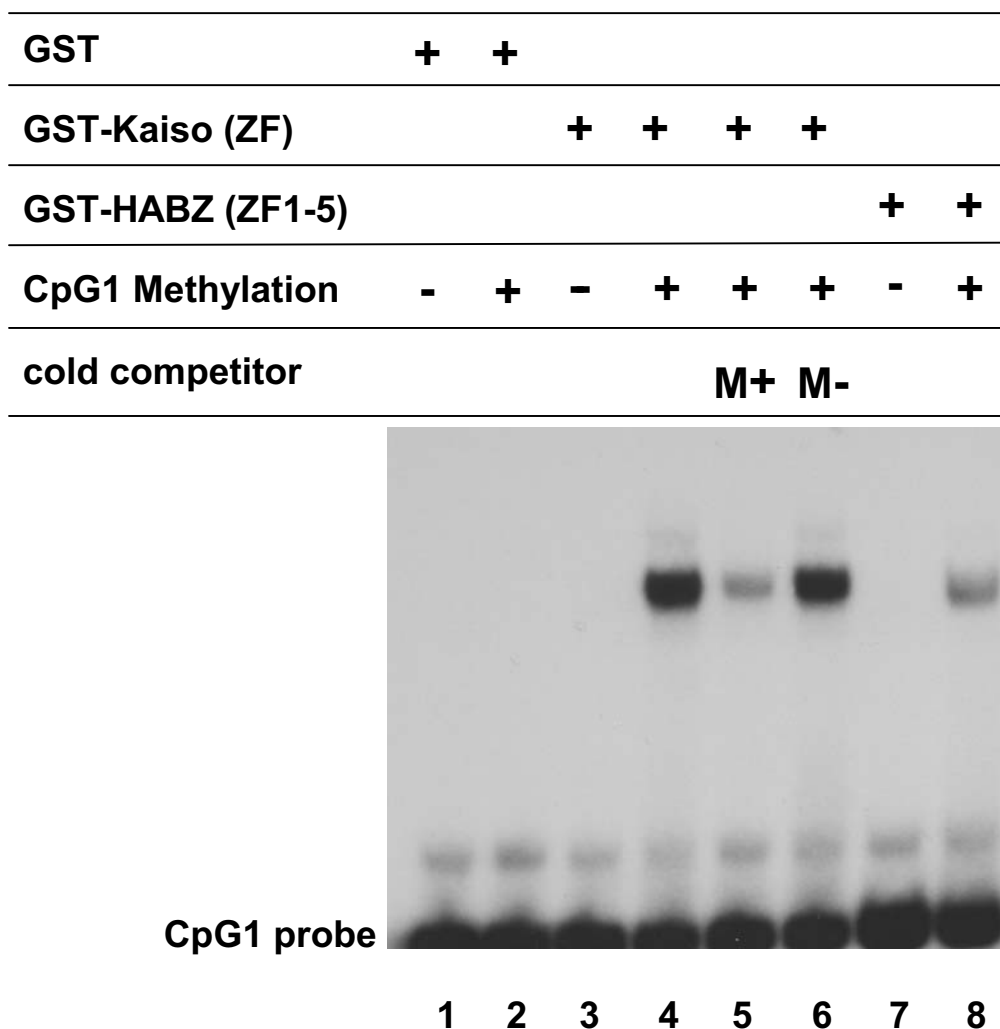


図33. HABZのジンクフィンガー (ZF1-5) はCpG1オリゴにメチル化依存的に結合する

100 ngのGST (lanes 1, 2)、10 ngのGST-Kaiso (ZF) (lanes 3-6)、50 ngのGST-HABZ (ZF1-5) (lanes 7, 8) を用いてゲルシフトを行った。プローブとして、CpG配列を5つ含むヒトMTA2プロモーター由来のCpG1オリゴを用いた。Lanes 1, 3, 7 はメチル化していないオリゴ、lanes 2, 4, 5, 6, 8 はSssIで5箇所全てのCpGをメチル化したオリゴを用いた。また、lanes 5, 6 にはcoldのメチル化したオリゴ (lane 5) あるいはメチル化していないオリゴ (lane 6) をコンペティターとして加えた。

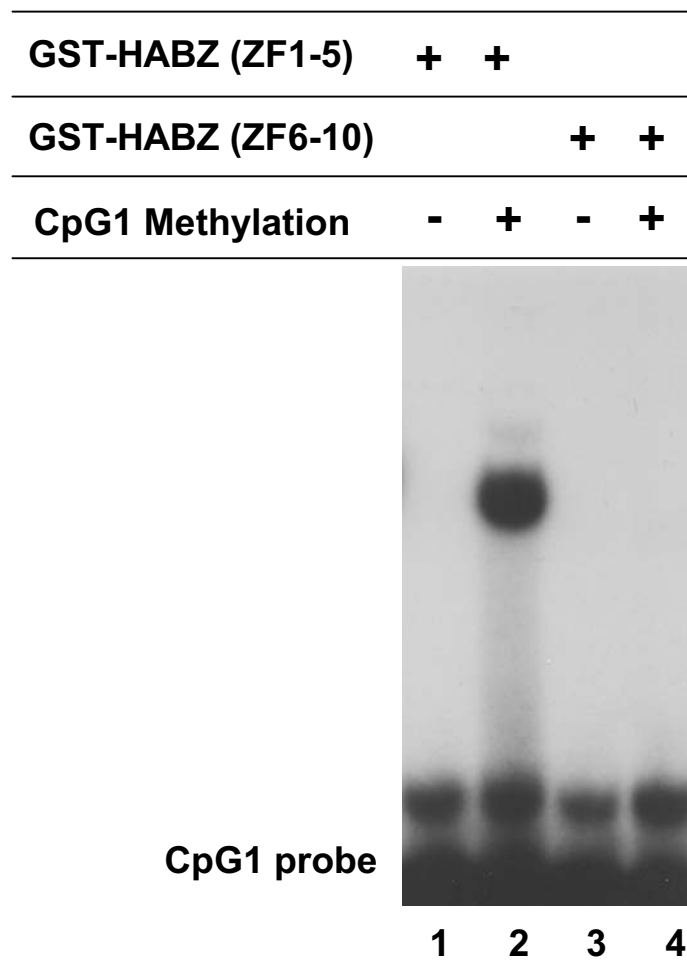


図34. HABZのジンクフィンガー (ZF6-10) はメチル化DNAへの結合能は持たない

50 ngのGST-HABZ (ZF1-5) (lanes 1, 2)、50 ngのGST-HABZ (ZF6-10) (lanes 3, 4) を用いてゲルシフトを行った。プローブとして、ヒト*MTA2*プロモーター由来のCpG1オリゴを用いた。Lanes 1, 3はメチル化していないオリゴ、lanes 2, 4はSssIでCpGをメチル化したオリゴを用いた。

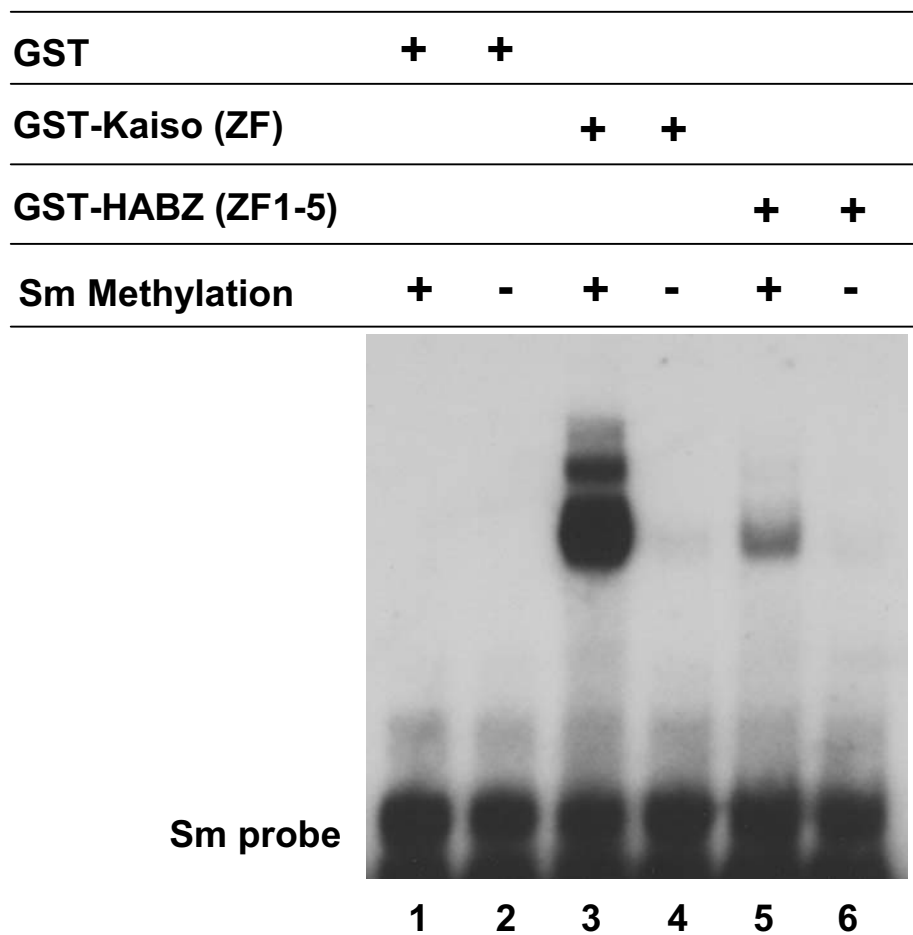


図35. HABZのジンクフィンガー (ZF1-5) はSmオリゴに対してもメチル化依存的に結合する

100 ngのGST (lanes 1, 2)、10 ngのGST-Kaiso (ZF) (lanes 3, 4)、50 ngのGST-HABZ (ZF1-5) (lanes 5, 6)を用いてゲルシフトを行った。プローブとして、マウス*S100A4*遺伝子イントロン由来のSmオリゴを用いた。Lanes 2, 4, 6はメチル化していないオリゴ、lanes 1, 3, 5はSssIで3箇所全てのCpGをメチル化したオリゴを用いた。

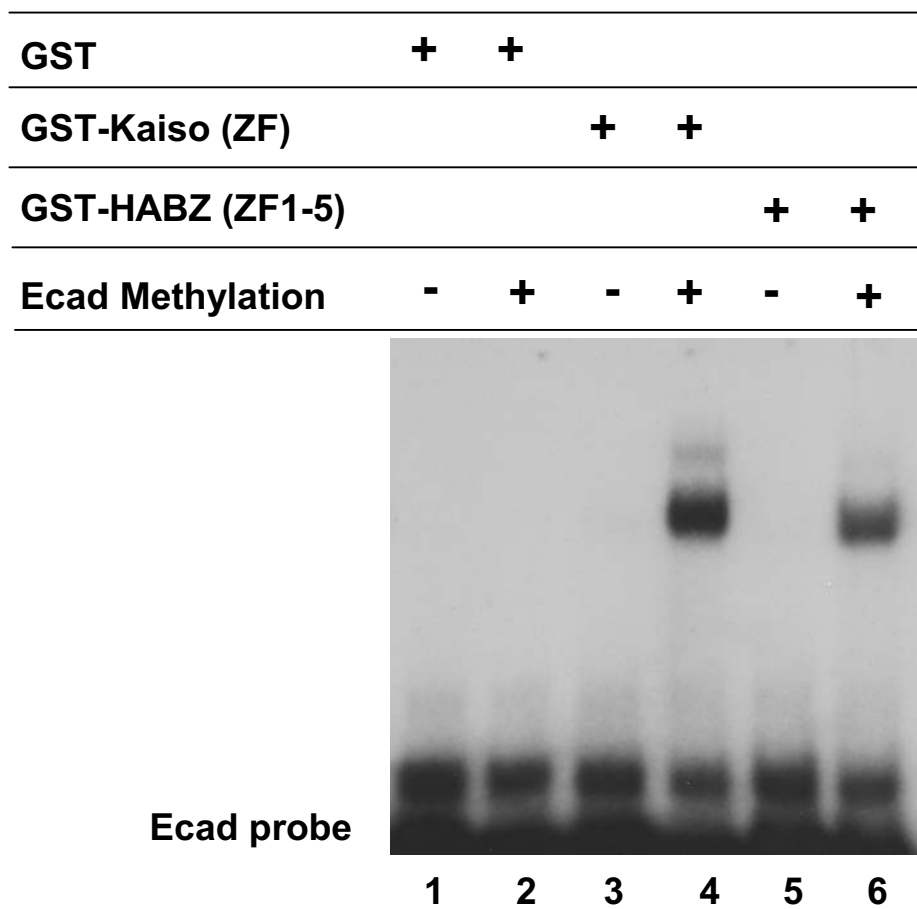


図36. HABZのジンクフィンガーはE-cadオリゴに対してもメチル化依存的に結合する

100 ngのGST (lanes 1, 2)、10 ngのGST-Kaiso (ZF) (lanes 3, 4)、50 ngのGST-HABZ (ZF1-5) (lanes 5, 6) を用いてゲルシフトを行った。プローブとして、マウス*E-cadherin*プロモーター内のCpGアイランド由来のE-cadオリゴを用いた。Lanes 1, 3, 5 はメチル化していないオリゴ、lanes 2, 4, 6 はSssIで6箇所全てのCpGをメチル化したオリゴを用いた。

考察

本研究では、新規の BTB-ジンクフィンガー型転写因子 HABZ を同定し、その機能解析を行った。HABZ は CtBP や HDAC を介する転写抑制因子であり、主にヘテロクロマチン領域に局在することを明らかとした。また、HABZ がメチル化 DNA に結合することも見出し、HABZ が DNA メチル化依存的な転写抑制因子であることが示唆された。

GAL4 に融合した HABZ 蛋白質を用いたレポーターアッセイの結果、HABZ は BTB ドメインと RD2 の 2 ヶ所に転写抑制活性を持つことが明らかとなった。そして、RD2 による転写抑制活性は PLDLR モチーフを介した CtBP との結合に完全に依存しており (図 29)、HDAC 阻害剤である TSA に感受性でもあった (図 17)。また、HABZ と複数の HDAC との相互作用を免疫沈降法により確認することもできた。CtBP と HDACs との結合はこれまでも報告されていることから (Sundqvist et al., 2001; Zhang et al., 2001)、RD2 は CtBP を介して HDAC と相互作用していると推測される。したがって、HABZ は標的遺伝子のプロモーター上に、PLDLR モチーフを介して CtBP や、HDAC 等の CtBP と相互作用する複合体構成因子をリクルートすることで、クロマチン構造変換を介した転写抑制を行っていると考えられる。最近、生化学的な精製により、CtBP 複合体はこれまでに相互作用の知られていた HDACs やポリコーム群蛋白質 HPC2 に加えて、H3K9 に対するヒストンメチル化酵素 (G9a, EuHMT) を含んでいることが明らかになった (Shi et al., 2003)。さらに、CtBP 複合体の構成因子の一つである KIAA0601/LSD1 が、H3K4 に対するヒストン脱メチル化酵素であることも明らかとされ (Shi et al., 2004)、CtBP 複合体は、ヒストンの脱アセチル化や H3K9 のメチル化を行うと同時に、H3K4 の脱メチル化をも行うことで、協調的なヒストン修飾によって転写を抑制していることが示唆されている。また、CtBP 複合体は CtBP 自身も含めて酵素活性を持つ蛋白質を複数含んでいることから (Shi et al., 2003)、CtBP は他のコリプレッサー複合体とは多少異なる興味深い複合体であるといえる。今後、それらの蛋白質が HABZ と CtBP を含む複合体にも含まれ、HABZ による転写抑制に関与しているかどうか検討する必要がある。

HABZ の RD2 は CtBP との結合に必要十分であり、その結合には PLDLR モチーフが関与していることが明らかとなった (図 24, 28)。RD2 には 2 つの CtBP 結合モチーフ様配列を含んでいるが、CtBP との結合や転写抑制には PLDLR モチーフのみが関与していた。PLSLV モチーフは CtBP との相互作用や転写抑制には関係せず、さらに、ヒトやラットでは保存されていないことも明らかとなった (図 4)。これまでの多数の報告から、CtBP 結合モチーフは PXDLS あるいはそれに類似した配列であるとされているが (Chinnadurai, 2002)、この配列に必ずしも CtBP が結合するわけではない (Zhang et al., 2001; Hickabottom et al., 2002)。また、2 つ

の CtBP 結合モチーフが 10 から 20 アミノ酸のスペーサーを挟んで並んでおり、その両方が協調して CtBP との結合に利用されているという報告もされている (Hickabottom et al., 2002)。したがって、CtBP との結合にはコンセンサス配列に加えて、全体的な蛋白質の立体構造、あるいはコンセンサス配列に隣接したアミノ酸配列が影響を与えていることが考えられる。

CtBP と相互作用する転写因子 Net、HIC-1 や Ikaros などは、CtBP 依存的転写抑制機構に加えて、CtBP 非依存的な転写抑制機構をも有していることが知られている (Criqui-Filipe et al., 1999; Deltour et al., 2002; Koipally and Georgopoulos, 2002)。今回の研究で得られたいくつかの結果から、HABZ に関しても CtBP 非依存的な転写抑制機構が存在することが推察される。まず、Yeast two-hybrid 法や GST-pull down 法によって BTB ドメインは CtBP と結合しないこと、また RD2 と CtBP との結合にも必要でないことが示されたが (図 19, 20)、GAL4 融合蛋白質を用いたレポーターアッセイでは、BTB ドメイン単独で転写抑制活性を持つことが確認された (図 16)。さらに、PLDLR モチーフに変異を持ち、CtBP との結合能を失っている BTB-RD2 (DL/AS) や全長の HABZ (DL/AS) も、GAL4 に融合した蛋白質を用いたレポーターアッセイで転写抑制活性を保持していた (図 29, 30)。これらの結果は、BTB ドメイン、さらにはその他の領域も CtBP 非依存的な転写抑制に機能していることを強く示唆している。BTB ドメインと RD2 の 2 ヶ所の転写抑制活性の強さと、BTB-RD2 による転写抑制活性の強さはほぼ同程度であり、2 つのドメインによる協調的な転写抑制効果は認められなかった (図 16)。これは、2 つのドメインが独立して機能していることを示唆している。BTB ドメインと RD2 はそれぞれ別の転写抑制複合体と相互作用する能力を持っているが、それらは相互排除の関係にあり、どちらか一方しか転写抑制複合体と結合していないということが考えられる。細胞やプロモーターの種類によってどちらかのドメインのみが転写抑制複合体と結合し転写抑制を行っている、あるいは 2 種類の複合体が連続的にリクルートされることで転写抑制状態が確立されるといった機構が推測される。したがって、この機構を明らかにするためには、まず BTB ドメインによる転写抑制機構を解明することが重要である。いくつかの BTB 転写因子の BTB ドメインは、SMRT/NCoR、mSin3A といった HDAC を含む複合体と相互作用することが知られている (David et al., 1998; Wong et al., 1998; Dhordain et al., 1997, 1998; Huynh et al., 1998; Lin et al., 1998; Yoon et al., 2003)。しかし、HABZ の BTB ドメインによる転写抑制は主に HDAC 非依存性であり (図 17)、また BTB ドメインによる SMRT/NCoR、mSin3A のリクルートは一般的な機構ではないとされていることから (Deltour et al., 1999)、何らかの別の転写抑制機構が示唆される。今後、BTB ドメイン結合蛋白質の同定が必要である。

これまでに、多くの BTB 蛋白質は核内で foci を形成することが報告されている (Deltour et al., 2002; Liu et al., 2004)。PLZF および Bach2 に関しては、その

foci が PML ボディーと一致し (Ruthardt et al., 1998; Muto et al., 2002) 、また、Bach2 は PML ボディー周辺での転写活性を抑制することが最近明らかとされている (Tashiro et al., 2004) 。しかし、大部分の BTB 転写因子による foci 形成の意義やその機能に関しては未だ不明である。本研究では、HABZ は PML ボディーと異なり、pericentromeric heterochromatin へ局在するという結果が得られたものの (図 10) 、HABZ のヘテロクロマチン領域での機能について、現在は明らかとなっていない。Ikaros や YY1 といったジンクフィンガー蛋白質に関しても、HABZ と同様 pericentromeric heterochromatin に局在するが、そこでの機能に関しては明らかとなっていない (Cobb et al., 2000; Shestakova et al., 2004) 。HABZ は単独で発現させた場合にも pericentromeric heterochromatin に局在すること、またその時に CtBP を pericentromeric heterochromatin にリクルートする能力を持っているという今回の研究で得られた結果をもとにして、HABZ の pericentromeric heterochromatin での機能として 2 つのモデルが考えられる (図 37) 。一つは、pericentromeric heterochromatin 領域に局在する HABZ が、そこに CtBP や、HDAC 等の CtBP 相互作用因子をリクルートすることで、pericentromeric heterochromatin 領域でのヘテロクロマチン構造の確立等に寄与しているモデルである (図 37, モデル 1) 。2 つ目は、ヘテロクロマチンに局在している HABZ が、ジンクフィンガーあるいは HABZ が相互作用する DNA 結合蛋白質を介してユークロマチン領域の遺伝子をヘテロクロマチン領域にリクルートし、CtBP/HDAC 複合体の働きによるクロマチン構造変換を介して、それら遺伝子の発現抑制を行うモデルである (図 37, モデル 2) 。

今後、HABZ のヘテロクロマチンへの局在の意義とその機能を明らかとするためには、HABZ のヘテロクロマチンへの局在化機構について検討する必要がある。現時点では、その可能性として大きく 3 つ考えられる。一つ目は、HABZ のサテライト DNA への結合である。Ikaros や YY1 は、それらのジンクフィンガーを介して pericentromeric heterochromatin を構成している γ -satellite DNA に結合することが、*in vivo*、*in vitro* で明らかにされている (Cobb et al., 2000; Shestakova et al., 2004) 。HABZ は 10 個のジンクフィンガーを有することから、それらが同様に pericentromeric heterochromatin 領域のサテライト DNA に結合することで、HABZ をヘテロクロマチンに局在させている可能性が考えられるため、今後 HABZ がサテライト DNA への結合能を持つかどうか調べる必要がある。

2 つ目として、サテライト DNA ではなく、メチル化 DNA への結合によってヘテロクロマチンに局在している可能性が考えられる。pericentromeric heterochromatin 領域は CpG 配列が高頻度にメチル化されており、いくつかの MBD 型メチル化 DNA 結合蛋白質は pericentromeric heterochromatin に局在している (Hendrich and Bird, 1998) 。MeCP2 では、その局在には DNA のメチル化が必要であり、DNA メチル化を消失した細胞においては pericentromeric heterochromatin には局

在できない。また、メチル CpG 結合ドメイン (MBD) を欠損した MeCP2 も pericentromeric heterochromatin に局在できないことから、MeCP2 はメチル化 DNA への結合によって pericentromeric heterochromatin に局在していると考えられている (Nan et al., 1996)。HABZ の 3 から 5 番目のジンクフィンガーは、メチル化 DNA への結合能を持つ Kaiso のジンクフィンガーと高い相同性を示し (図 31) (Prokhortchouk et al., 2001; Daniel et al., 2002; Yoon et al., 2003)、実際にメチル化 DNA に特異的に結合することも確認できた (図 33, 34, 35, 36)。また、これは図 14 で示した HABZ のメチル化 DNA 結合領域 (ZF1-5) がヘテロクロマチンへの局在に必要であるという結果と一致しており、HABZ がメチル化 DNA への結合によってヘテロクロマチン領域に局在しているという結果を支持するデータであるといえる。今後、メチル化 DNA への結合能を失った HABZ の変異体を用いてその局在を調べることで、また、大部分の DNA メチル化を消失している Dnmt1 欠損細胞を用いて HABZ の局在を調べることで、DNA メチル化と HABZ のヘテロクロマチン局在化機構の関係を明らかにできると考えられる。

先に述べたように、HABZ の欠損体を用いた解析からは、ZF1-5 の領域がヘテロクロマチンへの局在に重要な役割を担っていることが示唆された。しかしながら、ZF1-5 のみではヘテロクロマチンへの局在は認められなかった (図 13)。これは、Ikarsos の場合のように、ダイマー形成が必要であることを示唆している (Cobb et al., 2000)。HABZ がダイマーあるいはオリゴマーを形成することは確認しているが、どの領域がダイマー形成に必要であるかは現時点では同定できていない (data not shown)。多くの BTB 蛋白質は BTB ドメイン同士でホモダイマーを形成するが、HABZ に関しては BTB ドメイン間のダイマー形成は確認できなかった (data not shown)。したがって、今後 HABZ のダイマー形成に関係するドメインを決定し、HABZ の局在との関係を明らかにする必要がある。

このように HABZ がサテライト DNA、あるいはメチル化 DNA に結合することによって pericentromeric heterochromatin に局在した場合、HABZ の pericentromeric heterochromatin での機能としては、図 37 で示したモデル 1 が考えられる。しかし、HABZ のジンクフィンガーは 10 個存在し、大きく 2 つのクラスターに分かれているため、片方が pericentromeric heterochromatin への局在に利用され、もう一方がユークロマチン領域の遺伝子との結合に利用されるというように、図 37 のモデル 2 の可能性も考えられる。

HABZ のヘテロクロマチン局在化機構の 3 つ目の可能性として、DNA への結合ではなく、蛋白質間相互作用が考えられる。pericentromeric heterochromatin には SUV39H や HP1 を含む多くの蛋白質が局在することが知られているため、そういった蛋白質との相互作用によって HABZ がヘテロクロマチン領域に局在していることが予想される。この場合、図 37 のモデル 2 である可能性が高く、ジンクフィンガーでユークロマチンの遺伝子を pericentromeric heterochromatin 領域にリクルート

することが考えられる。今後、さらに詳細にヘテロクロマチンへの局在に必要な領域を同定すること、また HABZ の相互作用蛋白質や HABZ の DNA 結合配列を同定することで、HABZ の pericentromeric heterochromatin への局在化機構と、その機能を明らかにできると考えられる。

NCoR/SMRT コリプレッサーは蛋白質間相互作用による細胞内局在の変化や蛋白質分解といった様々なレベルで活性制御されていることが明らかとなっている (Jepsen and Rosenfeld, 2002)。近年の研究から、CtBP に関してもその活性制御機構についての知見が得られつつある。CtBP は PDZ ドメインを持つ蛋白質 nNOS と結合することで核内から細胞質に排出され、その結果、標的遺伝子の転写抑制が解除されると考えられており、逆に CtBP の SUMO 化は nNOS との結合と競合し、CtBP の核内局在を維持していると考えられている (Riefler et al., 2001, Lin et al., 2003)。また、核スペckルに局在する Pnn/DRS は、CtBP と結合することで、CtBP による E-cadherin プロモーターに対するコリプレッサー活性を失わせる機能を持っている (Alpatov et al., 2004)。さらに、HIPK2 による CtBP のリン酸化が引き金となり CtBP の分解が導かれ、結果として転写抑制活性が解除されることも明らかとなっている (Zhang et al., 2003)。しかし一方で、CtBP が核内でどのように転写抑制活性を発揮しているかについてはほとんど明らかとなっていない。核内に存在する転写因子 Net や HIC-1 は、細胞質の CtBP を核内にリクルートすることも示されているが、核内のどのようなコンパートメントにリクルートし、またそのリクルートが実際に転写抑制と関係しているかについては明らかとなっていない (Criqui-Filipe et al., 1999; Deltour et al., 2002)。また CtBP は、ポリコム群蛋白質であり SUMO E3 酵素でもある HPC2 と PcG ボディーにおいて部分的に共局在するものの、PcG ボディーと CtBP のコリプレッサー活性との関係は明らかとなっておらず、SUMO 化修飾の場 (SUMOylation center) である可能性も示唆されている (Sewalt et al., 1999; Kagey et al., 2003)。本研究では、CtBP が HABZ によってヘテロクロマチン領域にリクルートされるという結果が得られたことから、CtBP がヘテロクロマチン依存的に転写抑制活性を発揮することが示唆される。しかし、現時点では pericentromeric heterochromatin での CtBP の機能、さらには HABZ の機能も明らかとなっておらず、Ikaros に関して提案されているように、蛋白質の貯蔵に利用されている可能性も考えられる (Cobb et al., 2000)。したがって、上述したように、今後 HABZ と CtBP の pericentromeric heterochromatin での役割を明らかにすることが必要である。

先に述べたように、HABZ は BTB ドメインと RD2 において転写抑制活性を示したが、逆に中央領域には弱いながらも転写活性化能が認められた。多くの BTB 転写因子は転写抑制因子として機能するが (Okabe et al., 1998; Aoki et al., 1998)、一部には転写活性化因子として機能するもの (Peukert et al., 1997; Kobayashi et al., 2000)、また転写抑制と活性の両方の機能を持つもの (Kaplan

et al., 1997) が知られている。HABZ に類似した蛋白質 Kaiso は、メチル化した MTA2プロモーターに結合すると NCoR/HDAC をリクルートすることで転写を抑制し、また Wnt11プロモーターのコンセンサス配列に結合した場合や、GAL4 融合蛋白質を用いた場合にも転写を抑制するが (Yoon et al., 2003; Kim et al., 2004)、Rapsyn プロモーター内のコンセンサス配列に結合すると、転写を活性化する (Rodova et al., 2004)。こうしたことから、Kaiso は標的プロモーターによって転写抑制と活性の両方に働くことが明らかとなっている。最近、HABZ のラット相同遺伝子 ZENON が、THプロモーターの E-box 配列に結合し、転写を活性化することが報告された (Kiefer et al., 2005)。したがって、HABZ も Kaiso のようにプロモーターや細胞の種類によって、転写活性化と転写抑制の両方に機能することが考えられる。

HABZのジンクフィンガーでのDNA結合配列を決定するため、ジンクフィンガー 1-5 と 6-10 のそれぞれをGSTに融合した組換え蛋白質と 20merのランダム配列を含むオリゴDNAを用いて、Binding Site Selection (Cyclic Amplification and Selection of Targets, CAST法) (Wright et al., 1991) を行った。6 サイクルの Binding-Wash-PCRの後、PCR産物を ^{32}P でラベルしゲルシフトを行ったところ、ZF6-10 を用いた場合にはシフトバンドが確認されたことから (data not shown)、ZF6-10 はDNAへの結合能を有していると考えられる。しかし、シフトしたバンドからDNAを抽出後、再度PCRを行い、サブクローニングし、その中から数十クローンのシーケンスを行ったところ、それらの間にコンセンサス配列は見当たらなかった (data not shown)。この結果から、ZF6-10 は広範なDNA配列に結合することが示唆される。一方、ZF1-5 を用いたCAST法では、PCRでは増幅されるものの、ゲルシフトでのバンドを確認することができなかった (data not shown)。しかし、ラット ZENONはZF1-5 でE-box配列に結合することから (Kiefer et al., 2005)、ZF6-10 の場合も含めて、今回の実験では非特異的な結合が多く本来の結合配列が得られていない可能性が考えられる。

また、相同性の高いジンクフィンガー同士は類似した配列に結合することが知られているが、HABZ の ZF3-5 は Kaiso と高い相同性を示しているものの、Kaiso の結合配列 CTGCNA (Daniel et al., 2002) に対しての結合もやはり確認できなかった (図 32)。Kaiso は ZF2, 3 (HABZ の ZF4, 5 に相当) を介して CTGCNA 配列に結合するが、ZF3 (HABZ の ZF5) においては HABZ とそれほど相同性が高くないため (図 31B)、HABZがこの配列に結合できないのではないかと推測される。実際、アフリカツメガエルの Kaiso も、ZF3 のみではヒトの Kaiso との相同性は低く (アミノ酸レベルで 61%の一致)、CTGCNA 配列への結合はほとんど認められない (Ruzov et al., 2004)。

このように、マウスのHABZおよびアフリカツメガエルのKaisoはともにCTGCNA配列への結合は見られないが、一方で、メチル化DNAへの結合はいずれも確認でき

ている (Ruzov et al., 2004) (図 33, 34, 35, 36)。したがって、これらの保存されたジンクフィンガーは、コンセンサス配列よりもむしろメチル化DNAに対して高い親和性を示すドメインではないかと推測される。MBD型メチル化DNA結合蛋白質は、MBDを介してメチル化されたシトシンとグアニンを認識することが構造解析の結果から明らかとされている (Ohki et al., 2001)。しかし、メチル化DNA結合蛋白質が実際に細胞内でどのような配列に特異性を持っているかは明らかになっておらず、メチル化されていても、プロモーターの種類によって特定のMBDのみが結合していることも明らかとなりつつある (Ballestar et al., 2003)。つまり、メチル化したCpG配列が存在しても、そこに全てのメチル化DNA結合蛋白質が結合できるわけではないらしい。またKaisoに関しては、ジンクフィンガーが少なくとも2つのメチル化したシトシン (mCG) を含むmCGmCG配列を認識することがゲルシフトの結果から示唆されているが (Prokhortchouk et al., 2001)、これに関しても実際にmCGmCGのみに結合するかどうかは明らかとなっていない。HABZについても、ゲルシフトの結果、調べた3つのオリゴに対してそれぞれ結合の強さが異なっており、また、Kaisoに比べても結合が弱かった (図 33, 35, 36)。今後HABZの全長を用いてゲルシフトを行うこと、また細胞内でメチル化したプロモーターにリクルートされているかどうかをクロマチン免疫沈降法で調べることで、実際にこれらの配列が細胞内でのHABZの標的になっているかどうか確認する必要がある。HABZはマウス、ヒト、ラットやニワトリに存在し、Kaisoはさらにアフリカツメガエルやゼブラフィッシュにも存在する。またmKIAA1538もいくつかの種に保存されていることが確認された (data not shown)。いずれの場合も、この3つのジンクフィンガー領域では非常に高い相同性を示しており、DNAメチル化の存在する種で保存されている。したがって、これらのジンクフィンガー蛋白質は新たなジンクフィンガー型メチル化DNA結合蛋白質ファミリーであることが示唆される。さらに、SRA (SET and RING finger-associated) ドメインを持つICBP90/Np95と、それに類似したNIRFが非MBD型のメチル化DNA結合蛋白質であることが最近明らかとされた (Unoki et al., 2004)。DNAメチル化は癌化と密接に関わっており、癌細胞ではいくつかの癌抑制遺伝子のプロモーター領域 (CpGアイランド) における異常なメチル化が検出されており、また逆に、低メチル化による癌遺伝子の発現上昇も確認されている (Jones and Baylin, 2002)。しかし、このようにDNAメチル化と細胞の癌化の関連性が示されているものの、転写抑制に関与するMBD型メチル化DNA結合蛋白質 (MBD1, MBD2, MeCP2) のノックアウトマウスは、いずれも神経系等に影響が現れ、行動異常などの表現型も観察されるが、癌化との関連は確認できていない (Hendrich et al., 2001; Guy et al., 2001; Zhao et al., 2003)。また、DNAメチル化酵素をノックアウトした場合のように胎生致死になるというような発生に大きな異常は見られていない (Jaenisch and Bird, 2003; Lund and Lohuizen, 2004)。したがって、DNAメチル化はMBD蛋白質のみではなく、KaisoやHABZ、ICBP90/Np95といった非MBD型蛋白質によっても

認識されることで発生において重要な制御がなされている可能性が考えられ、アフリカツメガエルのKaisoは初期発生において重要な役割を担っていることも示唆されている (Ruzov et al., 2004)。さらに、これら以外にも非MBD型メチル化DNA結合蛋白質の存在が示唆され、DNAメチル化は当初考えられていたよりも複雑な機構によって制御されていることが予想される。

近年、DNAメチル化とヒストン修飾が関連していることが明らかとなりつつあり、メチル化DNA結合蛋白質MBD1はH3K9に対するメチル化酵素SETDB1やSUV39H1と相互作用することが知られている (Sarraf and Stancheva, 2004; Fujita et al., 2003)。さらにKaisoもH3K9に対するメチル化活性を持つ蛋白質と相互作用するようであり (Yoon et al., 2003)、先に述べたようにCtBP複合体はH3K9に対するメチル化活性ならびにH3K4に対する脱メチル化活性を持つため、HABZ複合体に関してもCtBP/HDACsだけではなく、ヒストンメチル化にも関与しているかどうか調べることで、複雑なDNAメチル化依存的転写抑制機構を明らかにできることが予想される。

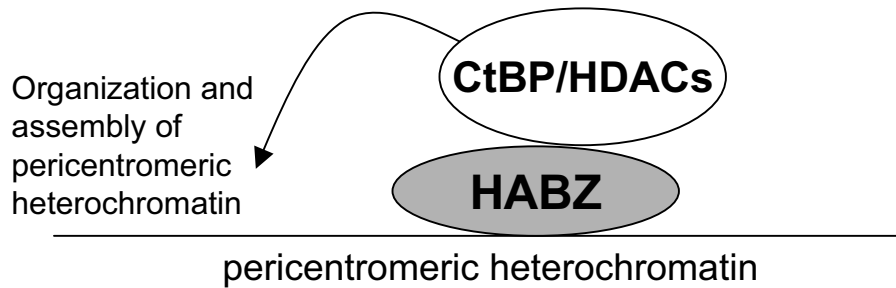
HABZのジンクフィンガーはZEBやSnailといったTwo-handed zinc finger蛋白質のようにジンクフィンガークラスターが2つに分かれている構造をとっている (図3)。ZEBやSnailでは、それら2つのクラスターはともに同様の配列 (E-box) に結合することが明らかとなっている (Genetta et al., 1994)。しかしHABZに関しては、ZF1-5のみがメチル化DNAに結合し、ZF6-10ではメチル化DNAへの結合は見られなかった (図34)。また、ラットのZENONについても、ZF1-5のみでE-boxに結合し、ZF6-10の結合は見られていない (Kiefer et al., 2005)。したがって、これらHABZ/ZENONはtwo-handed zinc finger蛋白質とは異なり、それぞれのクラスターが異なる配列への結合能を持っていると予想される。

また、興味深いことに、このZENONが結合するE-box配列 (CAGGTG) はZEBやSIP1のE-cadherinプロモーター内の結合配列と同じである。ZEBやSIP1はCtBPと相互作用することが知られており、またZEB、SIP1とCtBPはともにE-cadherinが標的遺伝子であることから、ZEBやSIP1がE-boxに結合し、そこにCtBPをリクルートすると示唆されているが、SIP1によるE-cadherinの抑制にCtBPは必要ではないという報告もなされている (Grunsvan et al., 2003)。しかし、CtBPは明らかにE-cadherinをターゲットとしていることから (Shi et al., 2003; Zhang et al., 2003)、HABZがE-cadherinのE-box配列に結合し、CtBPを介して転写抑制を行っている可能性が考えられる。さらに本研究では、HABZがE-cadherinプロモーターにメチル化依存的に結合することが示されたため、メチル化したE-cadherinプロモーターに対してCtBPを介して転写抑制を行っている可能性も考えられる。今後、実際にE-cadherinがHABZの標的であるかどうか、もしそうである場合、E-box、メチル化のどちらに結合するのか調べる必要がある。また逆に、ラットZENONはTHプロモーターのE-boxに結合し転写を活性化することから、HABZ

がどのような転写活性を持っているかを検討する必要がある。ZENON が E-box に結合することが明らかとされたため、TH プロモーター以外にもいくつかの E-box を持つ遺伝子のプロモーターに対して HABZ が結合するかどうか、また結合する場合、転写抑制、活性化のどちらに働くのか調べる必要がある。

ラット ZENON は神経で強く発現しており、mature な神経細胞のアポトーシスを抑制する働きを持つことが示唆されている (Kiefer et al., 2005)。また CtBP もアポトーシスを抑制する働きを持っていることが報告されている (Zhang et al., 2003)。したがって、HABZ はメチル化 DNA ならびに E-box に結合しアポトーシスの抑制を行っていることが予想される。今後、HABZ の標的遺伝子を同定することや、欠損マウスの解析を行うことが HABZ の生体内での機能解明に今後重要であるといえる。

Model 1



Model 2

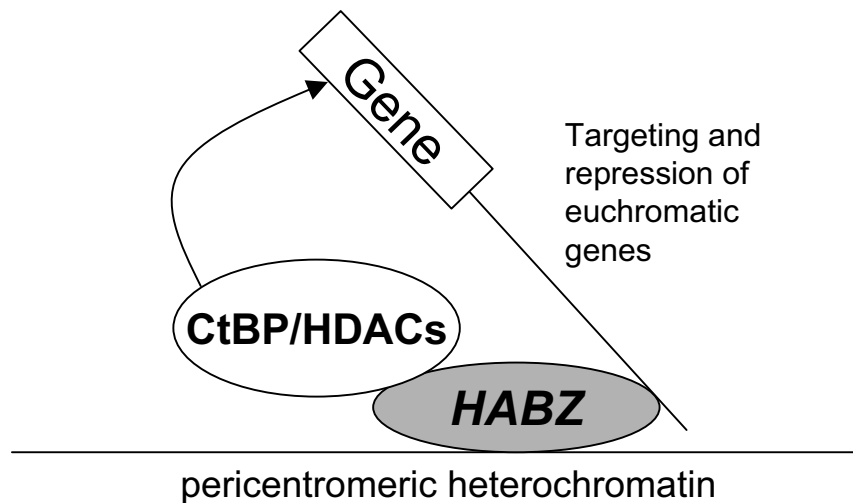


図37. HABZのpericentromeric heterochromatin領域での機能のモデル

A. HABZはpericentromeric heterochromatinに局在し、そこにCtBP、HDACやそれらに相互作用する蛋白質をリクルートし、それらの働きによってヘテロクロマチンの構造や機能に寄与している。

B. HABZはpericentromeric heterochromatinに局在し、そこにジンクフィンガーを介して、発現を抑制すべき遺伝子をリクルートしてくる。その遺伝子をCtBP/HDAC複合体によるクロマチン構造変換によって発現抑制する。

謝辞

本研究を行うにあたり、素晴らしい環境を与えてくださるとともに、貴重なご助言を賜りました川市正史教授に感謝いたします。また、研究を進めるに際し、ご指導いただきました松田永照助手、ご助言を賜りました石田靖雅助教授、岡千緒助手ならびに動物遺伝子機能学講座の皆様にお礼申し上げます。

参考文献

Agata, Y., Matsuda, E., and Shimizu, A. (1999) Two novel Kruppel-associated box-containing zinc-finger proteins, KRAZ1 and KRAZ2, repress transcription through functional interaction with the corepressor KAP-1 (TIF1beta/KRIP-1). *J. Biol. Chem.*, **274**, 16412-16422.

Albagli, O., Dhordain, P., Deweindt, C., Lecocq, G., and Leprince, D. (1995) The BTB/POZ domain: a new protein-protein interaction motif common to DNA- and actin-binding proteins. *Cell Growth Differ.*, **6**, 1193-1198.

Alpatov, R., Munguba, G. C., Caton, P., Joo, J. H., Shi, Y., Hunt, M. E., and Sugrue, S. P. (2004) Nuclear speckle-associated protein Pnn/DRS binds to the transcriptional corepressor CtBP and relieves CtBP-mediated repression of the E-cadherin gene. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 10223-10235.

Aoki, K., Meng, G., Suzuki, K., Takashi, T., Kameoka, Y., Nakahara, K., Ishida, R., and Kasai, M. (1998) RP58 associates with condensed chromatin and mediates a sequence-specific transcriptional repression. *J. Biol. Chem.*, **273**, 26698-26704.

Bardwell, V. J., and Treisman, R. (1994) The POZ domain: a conserved protein-protein interaction motif. *Genes Dev.*, **8**, 1664-1677.

Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.*, **16**, 6-21.

Boyd, J. M., Subramanian, T., Schaeper, U., La Regina, M., Bayley, S., and Chinnadurai, G. (1993) A region in the C-terminus of adenovirus 2/5 E1a protein is required for association with a cellular phosphoprotein and important for the negative modulation of T24-ras mediated transformation, tumorigenesis and metastasis. *EMBO J.*, **12**, 469-478.

Brannon, M., Brown, J. D., Bates, R., Kimelman, D., and Moon, R. T. (1999) XCtBP is a XTcf-3 co-repressor with roles throughout *Xenopus* development. *Development*, **126**, 3159-3170.

Carter, M. G., Johns, M. A., Zeng, X., Zhou, L., Zink, M. C., Mankowski, J. L., Donovan, D. M., and Baylin, S. B. (2000) Mice deficient in the candidate tumor suppressor gene *Hic1* exhibit developmental defects of structures affected in the Miller–Dieker syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 413–419.

Chen, J. D., and Evans, R. M. (1995) A transcriptional co-repressor that interacts with nuclear hormone receptors. *Nature*, **377**, 454–457.

Chinnadurai, G. (2002) CtBP, an unconventional transcriptional corepressor in development and oncogenesis. *Mol. Cell*, **9**, 213–224.

Cobb, B. S., Morales–Alcelay, S., Kleiger, G., Brown, K. E., Fisher, A. G., and Smale, S. T. (2000) Targeting of Ikaros to pericentromeric heterochromatin by direct DNA binding. *Genes Dev.*, **14**, 2146–2160.

Collins, T., Stone, J. R., and Williams, A. J. (2001) All in the family: the BTB/POZ, KRAB, and SCAN domains. *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 3609–3615.

Criqui–Filipe, P., Ducret, C., Maira, S. M., and Wasylyk, B. (1999) Net, a negative Ras–switchable TCF, contains a second inhibition domain, the CID, that mediates repression through interactions with CtBP and de–acetylation. *EMBO J.*, **18**, 3392–3403.

Dahiya, A., Wong, S., Gonzalo, S., Gavin, M., and Dean, D. C. (2001) Linking the Rb and polycomb pathways. *Mol. Cell*, **8**, 557–569.

Daniel, J. M., and Reynolds, A. B. (1999) The catenin p120^{ctn} interacts with Kaiso, a novel BTB/POZ domain zinc finger transcription factor. *Mol. Cell. Biol.*, **19**, 3614–3623.

Daniel, J. M., Spring, C. M., Crawford, H. C., Reynolds, A. B., and Baig, A. (2002) The p120^{ctn}–binding partner Kaiso is a bi–modal DNA–binding protein that recognizes both a sequence–specific consensus and methylated CpG dinucleotides. *Nucleic Acids Res.*, **30**, 2911–2919.

David, G., Alland, L., Hong, S. H., Wong, C. W., DePinho, R. A., and Dejean, A. (1998) Histone deacetylase associated with mSin3A mediates repression by

the acute promyelocytic leukemia-associated PLZF protein. *Oncogene*, **16**, 2549–2556.

Deltour, S., Guerardel, C., and Leprince, D. (1999) Recruitment of SMRT/N-CoR-mSin3A-HDAC-repressing complexes is not a general mechanism for BTB/POZ transcriptional repressors: the case of HIC-1 and γ FBP-B. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 14831–14836.

Deltour, S., Pinte, S., Guerardel, C., Wasylyk, B., and Leprince, D. (2002) The human candidate tumor suppressor gene HIC1 recruits CtBP through a degenerate GLDLSKK motif. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 4890–4901.

Dhordain, P., Albagli, O., Lin, R. J., Ansieau, S., Quief, S., Leutz, A., Kerckaert, J. P., Evans, R. M., and Leprince, D. (1997) Corepressor SMRT binds the BTB/POZ repressing domain of the LAZ3/BCL6 oncoprotein. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 10762–10767.

Dhordain, P., Lin, R. J., Quief, S., Lantoine, D., Kerckaert, J. P., Evans, R. M., and Albagli, O. (1998) The LAZ3(BCL-6) oncoprotein recruits a SMRT/mSIN3A/histone deacetylase containing complex to mediate transcriptional repression. *Nucleic Acids Res.*, **26**, 4645–4651.

Dillon, N., and Festenstein, R. (2002) Unravelling heterochromatin: competition between positive and negative factors regulates accessibility. *Trends Genet.*, **18**, 252–258.

Dressel, U., Bailey, P. J., Wang, S. C., Downes, M., Evans, R. M., and Muscat, G. E. (2001) A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 17007–17013.

Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T., and Nakao, M. (2003) Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J. Biol. Chem.*, **278**, 24132–24138.

Fujita, N., Jaye, D. L., Geigerman, C., Akyildiz, A., Mooney, M. R., Boss, J. M., and Wade, P. A. (2004) MTA3 and the Mi-2/NuRD complex regulate cell

fate during B lymphocyte differentiation. *Cell*, **119**, 75–86.

Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P., and Kouzarides, T. (2003) The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.*, **278**, 4035–4040.

Grooteclaes, M., Deveraux, Q., Hildebrand, J., Zhang, Q., Goodman, R. H., and Frisch, S. M. (2003) C-terminal-binding protein corepresses epithelial and proapoptotic gene expression programs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4568–4573.

Hendrich, B., and Bird, A. (1998) Identification and characterization of a family of mammalian methyl-CpG binding proteins. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 6538–6547.

Hendrich, B., Hardeland, U., Ng, H. H., Jiricny, J., and Bird, A. (1999) The thymine glycosylase MBD4 can bind to the product of deamination at methylated CpG sites. *Nature*, **401**, 301–304.

Hickabottom, M., Parker, G. A., Freemont, P., Crook, T., and Allday, M. J. (2002) Two nonconsensus sites in the Epstein-Barr virus oncoprotein EBNA3A cooperate to bind the co-repressor carboxyl-terminal-binding protein (CtBP). *J. Biol. Chem.*, **277**, 47197–47204.

Hildebrand, J. D., and Soriano, P. (2002) Overlapping and unique roles for C-terminal binding protein 1 (CtBP1) and CtBP2 during mouse development. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 5296–5307.

Hoatlin, M. E., Zhi, Y., Ball, H., Silvey, K., Melnick, A., Stone, S., Arai, S., Hawe, N., Owen, G., Zelent, A., and Licht, J. D. (1999) A novel BTB/POZ transcriptional repressor protein interacts with the Fanconi anemia group C protein and PLZF. *Blood*, **94**, 3737–3747.

Horlein, A. J., Naar, A. M., Heinzl, T., Torchia, J., Gloss, B., Kurokawa, R., Ryan, A., Kamei, Y., Soderstrom, M., Glass, C. K. and Rosenfeld, M. G. (1995) Ligand-independent repression by the thyroid hormone receptor mediated by a nuclear receptor co-repressor. *Nature*, **377**, 397–404.

Huynh, K. D., and Bardwell, V. J. (1998) The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT. *Oncogene*, **17**, 2473–2784.

Huynh, K. D., Fischle, W., Verdin, E., and Bardwell, V. J. (2000) BCoR, a novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev.*, **14**, 1810–1823.

Ishida, Y., and Leder, P. (1999) RET: a poly A-trap retrovirus vector for reversible disruption and expression monitoring of genes in living cells. *Nucleic Acids Res.*, **27**, e35.

Izutsu, K., Kurokawa, M., Imai, Y., Maki, K., Mitani, K., and Hirai, H. (2001) The corepressor CtBP interacts with Evi-1 to repress transforming growth factor beta signaling. *Blood*, **97**, 2815–2822.

Jenuwein, T., and Allis, C. D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074–1080.

Jepsen, K., Hermanson, O., Onami, T. M., Gleiberman, A. S., Lunyak, V., McEville, R. J., Kurokawa, R., Kumar, V., Liu, F., Seto, E., Hedrick, S. M., Mandel, G., Glass, C. K., Rose, D. W., and Rosenfeld, M. G. (2000) Combinatorial roles of the nuclear receptor corepressor in transcription and development. *Cell*, **102**, 753–763.

Jepsen, K., and Rosenfeld, M. G. (2002) Biological roles and mechanistic actions of co-repressor complexes. *J. Cell Sci.*, **115**, 689–698.

Kaplan, J., and Calame, K. (1997) The ZiN/POZ domain of ZF5 is required for both transcriptional activation and repression. *Nucleic Acids Res.*, **25**, 1108–1116.

Katsanis, N., and Fisher, E. M. (1998) A novel C-terminal binding protein (CTBP2) is closely related to CTBP1, an adenovirus E1A-binding protein, and maps to human chromosome 21q21.3. *Genomics*, **47**, 294–299.

Khochbin, S., Verdel, A., Lemerrier, C., and Seigneurin-Berny, D. (2001) Functional significance of histone deacetylase diversity. *Curr. Opin. Genet.*

Dev. **11**, 162–166.

Kiefer, H., Chatail-Hermitte, F., Ravassard, P., Bayard, E., Brunet, I., and Mallet, J. (2005) HABZ, a novel POZ Kruppel-like DNA binding protein associated with differentiation and/or survival of late postmitotic neurons. *Mol. Cell. Biol.*, **25**, 1713–1729.

Knoepfler, P. S., and Eisenman, R. N. (1999) Sin meets NuRD and other tails of repression. *Cell*, **99**, 447–450.

Kobayashi, A., Yamagiwa, H., Hoshino, H., Muto, A., Sato, K., Morita, M., Hayashi, N., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2000) A combinatorial code for gene expression generated by transcription factor Bach2 and MAZR (MAZ-related factor) through the BTB/POZ domain. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 1733–1746.

Kobayashi, A., Kang, M. I., Okawa, H., Ohtsuji, M., Zenke, Y., Chiba, T., Igarashi, K., and Yamamoto, M. (2004) Oxidative stress sensor Keap1 functions as an adaptor for Cul3-based E3 ligase to regulate proteasomal degradation of Nrf2. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7130–7139.

Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2000) Ikaros interactions with CtBP reveal a repression mechanism that is independent of histone deacetylase activity. *J. Biol. Chem.*, **275**, 19594–19602.

Koipally, J., and Georgopoulos, K. (2002) Ikaros-CtIP interactions do not require C-terminal binding protein and participate in a deacetylase-independent mode of repression. *J. Biol. Chem.* **277**, 23143–23149.

Kornberg, R. D., and Lorch, Y. (1999) Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, **98**, 285–294.

Kumar, V., Carlson, J. E., Ohgi, K. A., Edwards, T. A., Rose, D. W., Escalante, C. R., Rosenfeld, M. G., and Aggarwal, A. K. (2002) Transcription corepressor CtBP is an NAD(+)-regulated dehydrogenase. *Mol. Cell*, **10**, 857–869.

Lemercier, C., Brocard, M. P., Puvion-Dutilleul, F., Kao, H. Y., Albagli, O., and Khochbin, S. (2002) Class II histone deacetylases are directly recruited by BCL6 transcriptional repressor. *J. Biol. Chem.*, **277**, 22045–22052.

Lewis, J. D., Meehan, R. R., Henzel, W. J., Maurer-Fogy, I., Jeppesen, P., Klein, F., and Bird, A. (1992) Purification, sequence, and cellular localization of a novel chromosomal protein that binds to methylated DNA. *Cell*, **69**, 905–914.

Li, E., Bestor, T. H., and Jaenisch, R. (1992) Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, **69**, 915–926.

Lin, R. J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W. H., Jr., and Evans, R. M. (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*, **391**, 811–814.

Lin, X., Sun, B., Liang, M., Liang, Y. Y., Gast, A., Hildebrand, J., Brunicardi, F. C., Melchior, F., and Feng, X. H. (2003) Opposed regulation of corepressor CtBP by SUMOylation and PDZ binding. *Mol. Cell*, **11**, 1389–1396.

Luger, K., Mader A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., and Richmond, T. J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251–260.

Lund, A. H., and van Lohuizen, M. (2004) Epigenetics and cancer. *Genes Dev.*, **18**, 2315–2335.

Maison, C., and Almouzni, G. (2004) HP1 and the dynamics of heterochromatin maintenance. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **5**, 296–304.

Matsuda, E., Agata, Y., Sugai, M., Katakai, T., Gonda, H., and Shimizu, A. (2001) Targeting of Kruppel-associated box-containing zinc finger proteins to centromeric heterochromatin. Implication for the gene silencing mechanisms. *J. Biol. Chem.*, **276**, 14222–14229.

Matsuda, E., Shigeoka, T., Iida, R., Yamanaka, S., Kawaichi, M., and Ishida, Y. (2004) Expression profiling with arrays of randomly disrupted genes in mouse

embryonic stem cells leads to in vivo functional analysis. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **101**, 4170–4174.

Melnick, A. M., Westendorf, J. J., Polinger, A., Carlile, G. W., Arai, S., Ball, H. J., Lutterbach, B., Hiebert, S. W., and Licht, J. D. (2000) The ETO protein disrupted in t(8;21)-associated acute myeloid leukemia is a corepressor for the promyelocytic leukemia zinc finger protein. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 2075–2086.

Melnick, A., Ahmad, K. F., Arai, S., Polinger, A., Ball, H., Borden, K. L., Carlile, G. W., Prive, G. G., and Licht, J. D. (2000) In-depth mutational analysis of the promyelocytic leukemia zinc finger BTB/POZ domain reveals motifs and residues required for biological and transcriptional functions. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 6550–6567.

Melnick, A., Carlile, G., Ahmad, K. F., Kiang, C. L., Corcoran, C., Bardwell, V., Prive, G. G., and Licht, J. D. (2002) Critical residues within the BTB domain of PLZF and Bcl-6 modulate interaction with corepressors. *Mol. Cell. Biol.*, **22**, 1804–1818.

Meloni, A. R., Smith, E. J., and Nevins, J. R. (1999) A mechanism for Rb/p130-mediated transcription repression involving recruitment of the CtBP corepressor. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **96**, 9574–9579.

Muto, A., Tashiro, S., Tsuchiya, H., Kume, A., Kanno, M., Ito, E., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (2002) Activation of Maf/AP-1 repressor Bach2 by oxidative stress promotes apoptosis and its interaction with promyelocytic leukemia nuclear bodies. *J. Biol. Chem.*, **277**, 20724–20733.

Nakatani, Y. (2001) Histone acetylases--versatile players. *Genes Cells*, **6**, 79–86.

Nan, X., Tate, P., Li, E., and Bird, A. (1996) DNA methylation specifies chromosomal localization of MeCP2. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 414–421.

Nan, X., Ng, H. H., Johnson, C. A., Laherty, C. D., Turner, B. M., Eisenman, R. N., and Bird, A. (1998) Transcriptional repression by the methyl-CpG-binding protein MeCP2 involves a histone deacetylase complex.

Nature, **393**, 386–389.

Ng, H. H., and Bird, A. (2000) Histone deacetylases: silencers for hire. *Trends Biochem. Sci.*, **25**, 121–126.

Nibu, Y., Zhang, H., Bajor, E., Barolo, S., Small, S., and Levine, M. (1998a) dCtBP mediates transcriptional repression by Knirps, Kruppel and Snail in the *Drosophila* embryo. *EMBO J.*, **17**, 7009–7020.

Nibu, Y., Zhang, H., and Levine, M. (1998b) Interaction of short-range repressors with *Drosophila* CtBP in the embryo. *Science*, **280**, 101–104.

Ohki, I., Shimotake, N., Fujita, N., Jee, J., Ikegami, T., Nakao, M., and Shirakawa, M. (2001) Solution structure of the methyl-CpG binding domain of human MBD1 in complex with methylated DNA. *Cell*, **105**, 487–497.

Okabe, S., Fukuda, T., Ishibashi, K., Kojima, S., Okada, S., Hatano, M., Ebara, M., Saisho, H., and Tokuhisa, T. (1998) BAZF, a novel Bcl6 homolog, functions as a transcriptional repressor. *Mol. Cell. Biol.*, **18**, 4235–4244.

Okano, M., Bell, D. W., Haber, D. A., and Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, **99**, 247–257.

Oyake, T., Itoh, K., Motohashi, H., Hayashi, N., Hoshino, H., Nishizawa, M., Yamamoto, M., and Igarashi, K. (1996) Bach proteins belong to a novel family of BTB-basic leucine zipper transcription factors that interact with MafK and regulate transcription through the NF-E2 site. *Mol. Cell. Biol.*, **16**, 6083–6095.

Peters, A. H., Kubicek, S., Mechtler, K., O’Sullivan, R. J., Derijck, A. A., Perez-Burgos, L., Kohlmaier, A., Opravil, S., Tachibana, M., Shinkai, Y., Martens, J. H., and Jenuwein, T. (2003) Partitioning and plasticity of repressive histone methylation states in mammalian chromatin. *Mol. Cell*, **12**, 1577–1589.

Peukert, K., Staller, P., Schneider, A., Carmichael, G., Hanel, F., and Eilers,

M. (1997) An alternative pathway for gene regulation by Myc. *EMBO J.*, **16**, 5672–5686.

Pintard, L., Willis, J. H., Willems, A., Johnson, J. L., Srayko, M., Kurz, T., Glaser, S., Mains, P. E., Tyers, M., Bowerman, B., and Peter, M. (2003) The BTB protein MEL-26 is a substrate-specific adaptor of the CUL-3 ubiquitin-ligase. *Nature*, **425**, 311–316.

Poortinga, G., Watanabe, M., and Parkhurst, S. M. (1998) Drosophila CtBP: a Hairy-interacting protein required for embryonic segmentation and hairy-mediated transcriptional repression. *EMBO J.*, **17**, 2067–2078.

Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jorgensen, H., Ruzov, A., Wilm, M., Georgiev, G., Bird, A., and Prokhortchouk, E. (2001) The p120 catenin partner Kaiso is a DNA methylation-dependent transcriptional repressor. *Genes Dev.*, **15**, 1613–1618.

Richards, E. J., and Elgin, S. C. (2002) Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, **108**, 489–500.

Riefler, G. M., and Firestein, B. L. (2001) Binding of neuronal nitric-oxide synthase (nNOS) to carboxyl-terminal-binding protein (CtBP) changes the localization of CtBP from the nucleus to the cytosol: a novel function for targeting by the PDZ domain of nNOS. *J. Biol. Chem.*, **276**, 48262–48268.

Rodova, M., Kelly, K. F., VanSaun, M., Daniel, J. M., and Werle, M. J. (2004) Regulation of the rapsyn promoter by kaiso and delta-catenin. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 7188–96.

Ruthardt, M., Orleth, A., Tomassoni, L., Puccetti, E., Riganelli, D., Alcalay, M., Mannucci, R., Nicoletti, I., Grignani, F., Fagioli, M. *et al.* (1998) The acute promyelocytic leukaemia specific PML and PLZF proteins localize to adjacent and functionally distinct nuclear bodies. *Oncogene*, **16**, 1945–1953.

Ruzov, A., Dunican, D. S., Prokhortchouk, A., Pennings, S., Stancheva, I., Prokhortchouk, E., Meehan, R. R. (2004) Kaiso is a genome-wide repressor of transcription that is essential for amphibian development. *Development*, **131**,

6185-6194.

Santos-Rosa, H., Schneider, R., Bannister, A. J., Sherriff, J., Bernstein, B. E., Emre, N. C., Schreiber, S. L., Mellor, J., and Kouzarides, T. (2002) Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature*, **419**, 407-411.

Sarraf, S. A., and Stancheva, I. (2004) Methyl-CpG binding protein MBD1 couples histone H3 methylation at lysine 9 by SETDB1 to DNA replication and chromatin assembly. *Mol. Cell*, **15**, 595-605.

Schaeper, U., Boyd, J. M., Verma, S., Uhlmann, E., Subramanian, T., and Chinnadurai, G. (1995) Molecular cloning and characterization of a cellular phosphoprotein that interacts with a conserved C-terminal domain of adenovirus E1A involved in negative modulation of oncogenic transformation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **92**, 10467-10471.

Schultz, D. C., Ayyanathan, K., Negorev, D., Maul, G. G., and Rauscher, F. J., 3rd. (2002) SETDB1: a novel KAP-1-associated histone H3, lysine 9-specific methyltransferase that contributes to HP1-mediated silencing of euchromatic genes by KRAB zinc-finger proteins. *Genes Dev*, **16**, 919-932.

Sewalt, R. G., Gunster, M. J., van der Vlag, J., Satijn, D. P., and Otte, A. P. (1999) C-Terminal binding protein is a transcriptional repressor that interacts with a specific class of vertebrate Polycomb proteins. *Mol. Cell. Biol.* **19**, 777-787.

Shestakova, E. A., Mansuroglu, Z., Mokrani, H., Ghinea, N., and Bonnefoy, E. (2004) Transcription factor YY1 associates with pericentromeric gamma-satellite DNA in cycling but not in quiescent (G0) cells. *Nucleic Acids Res.*, **32**, 4390-4399.

Shi, Y., Sawada, J., Sui, G., Affar el, B., Whetstine, J. R., Lan, F., Ogawa, H., Luke, M. P., Nakatani, Y., and Shi, Y. (2003) Coordinated histone modifications mediated by a CtBP co-repressor complex. *Nature*, **422**, 735-738.

Shi, Y., Lan, F., Matson, C., Mulligan, P., Whetstine, J. R., Cole, P. A.,

Casero, R. A., and Shi, Y. (2004) Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1. *Cell*, **119**, 941–953.

Sundqvist, A., Bajak, E., Kurup, S. D., Sollerbrant, K., and Svensson, C. (2001) Functional knockout of the corepressor CtBP by the second exon of adenovirus E1a relieves repression of transcription. *Exp. Cell Res.*, **268**, 284–293.

Tachibana, M., Sugimoto, K., Nozaki, M., Ueda, J., Ohta, T., Ohki, M., Fukuda, M., Takeda, N., Niida, H., Kato, H., and Shinkai, Y. (2002) G9a histone methyltransferase plays a dominant role in euchromatic histone H3 lysine 9 methylation and is essential for early embryogenesis. *Genes Dev*, **16**, 1779–1791.

Tashiro, S., Muto, A., Tanimoto, K., Tsuchiya, H., Suzuki, H., Hoshino, H., Yoshida, M., Walter, J., and Igarashi, K. (2004) Repression of PML nuclear body-associated transcription by oxidative stress-activated Bach2. *Mol. Cell. Biol.*, **24**, 3473–3484.

Turner, J., and Crossley, M. (2001) The CtBP family: enigmatic and enzymatic transcriptional co-repressors. *Bioessays*, **23**, 683–690.

Unoki, M., Nishidate, T., and Nakamura, Y. (2004) ICBP90, an E2F-1 target, recruits HDAC1 and binds to methyl-CpG through its SRA domain. *Oncogene*, **23**, 7601–7610.

Valenta, T., Lukas, J., and Korinek, V. (2003) HMG box transcription factor TCF-4's interaction with CtBP1 controls the expression of the Wnt target Axin2/Conductin in human embryonic kidney cells. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 2369–2380.

Wong, C. W., and Privalsky, M. L. (1998) Components of the SMRT corepressor complex exhibit distinctive interactions with the POZ domain oncoproteins PLZF, PLZF-RARalpha, and BCL-6. *J. Biol. Chem.*, **273**, 27695–27702.

Wright, W. E., Binder, M., and Funk, W. (1991) Cyclic amplification and

selection of targets (CASTing) for the myogenin consensus binding site. *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 4104–4110.

Xu, L., Wei, Y., Reboul, J., Vaglio, P., Shin, T. H., Vidal, M., Elledge, S. J., and Harper, J. W. (2003) BTB proteins are substrate-specific adaptors in an SCF-like modular ubiquitin ligase containing CUL-3. *Nature*, **425**, 316–321.

Yoon, H. G., Chan, D. W., Reynolds, A. B., Qin, J., and Wong, J. (2003) N-CoR mediates DNA methylation-dependent repression through a methyl CpG binding protein Kaiso. *Mol. Cell*, **12**, 723–734.

Zhang, C. L., McKinsey, T. A., Lu, J. R., and Olson, E. N. (2001) Association of COOH-terminal-binding protein (CtBP) and MEF2-interacting transcription repressor (MITR) contributes to transcriptional repression of the MEF2 transcription factor. *J. Biol. Chem.*, **276**, 35–39.

Zhang, Q., Yoshimatsu, Y., Hildebrand, J., Frisch, S. M., and Goodman, R. H. (2003) Homeodomain interacting protein kinase 2 promotes apoptosis by downregulating the transcriptional corepressor CtBP. *Cell*, **115**, 177–186.

Zhang, Y., Ng, H. H., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Bird, A., and Reinberg, D. (1999) Analysis of the NuRD subunits reveals a histone deacetylase core complex and a connection with DNA methylation. *Genes Dev.*, **13**, 1924–1935.

Zollman, S., Godt, D., Prive, G. G., Couderc, J. L., and Laski, F. A. (1994) The BTB domain, found primarily in zinc finger proteins, defines an evolutionarily conserved family that includes several developmentally regulated genes in *Drosophila*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **91**, 10717–10721.