

BTB-zinc finger タンパク質 CIBZ の機能解析

及川 優

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 21 年 1 月 26 日提出

目次

1. 序論.....	2
2. 材料と方法	
2-1.プラスミド.....	9
2-2.細胞培養.....	9
2-3.半定量 RT-PCR.....	10
2-4.siRNA トランスフェクション.....	10
2-5.ウェスタンブロットニング.....	11
2-6.AnnexinV-FITC アポトーシスアッセイ.....	11
2-7. <i>In vitro</i> Caspase cleavage アッセイ.....	11
2-8.レポーターアッセイ.....	11
2-9.クロマチン免疫沈降法.....	12
3. 結果	
3-1.C2C12 細胞でアポトーシスを誘導すると CIBZ タンパク質の発現が減少する.....	14
3-2.C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが誘導される.....	14
3-3.CIBZ をノックダウンして誘導されるアポトーシスは p53 には依存しない.....	15
3-4.CIBZ は Caspase-3 によって切断される.....	16
3-5.Caspase-3 による切断箇所は CIBZ アミノ酸配列内に二カ所ある.....	16
3-6.CIBZ タンパク質は筋分化の誘導に伴って発現が減少する.....	17
3-7.CIBZ をノックダウンすると myogenin の発現が誘導される.....	17
3-8.CIBZ はメチル化依存的に Myogenin プロモーターの活性を制御する.....	18
3-9.CIBZ は Myogenin プロモーターに結合する.....	19
図 1. CIBZ の構造と各ドメインの機能.....	20
図 2. CIBZ と Kaiso のジンクフィンガーは相同性が高い.....	21
図 3. C2C12 細胞を低血清条件下で培養してアポトーシスを誘導すると CIBZ タンパク 質発現が減少する.....	22
図 4. C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが誘導される.....	23

図 5. p53 を欠損したマウス胚性繊維芽細胞で CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが生じる.....	24
図 6. CIBZ は caspase-3 の基質である.....	25
図 7. CIBZ アミノ酸配列内の caspase-3 切断サイトを同定.....	26
図 8. 筋分化の進行に伴って CIBZ の発現は減少し、myogenin の発現は上昇する.....	27
図 9. CIBZ をノックダウンすると myogenin の発現が上昇する.....	28
図 10 CIBZ は myogenin プロモーターをメチル化依存的に抑制する.....	29
図 11 CIBZ を抑制するとメチル化された myogenin プロモーターが活性化される.....	30
図 12 CIBZ は myogenin プロモーターに結合する.....	31
図 13 筋分化誘導によってアポトーシスが生じる細胞と分化する細胞に分かれる.....	32
図 14 CIBZ が myogenin プロモーターを制御する機構のモデル.....	33
4. 考察	
4-1. CIBZ によるアポトーシスの制御.....	34
4-2. CIBZ による筋分化抑制のメカニズム.....	37
4-3. CIBZ の生理機能.....	38
5. 謝辞.....	41
6. 参考文献.....	42

1. 序論

遺伝子の発現を時期、組織特異的に制御する機構は、生物の生存にとって非常に重要であり、転写因子がこの過程で重要な役割を担っている。転写因子は、DNA と結合するための特徴的なドメイン構造を有している。タンパク質には構造的に保存されているドメインが多数存在し、これらは特異的な分子機能を担っていることから、タンパク質の機能の推測と解明及びファミリーの分類に利用されている。つまり、機能未知のタンパク質であっても、そのドメイン構造を既知のタンパク質と比較解析することで機能を予測することが可能となる。このことから、ドメインによる機能予測はタンパク質の機能解析において有力な手段となっている(Zollman, Godt, et al, 1994)。DNA 結合ドメインの中でも良く知られているものの一つに、ジンクフィンガーモチーフがある (Klug, and Schwabe, 1995)。このモチーフは連続した繰り返し配列からなり、二つずつのシステイン及びヒスチジンによって亜鉛イオンを保持して高次構造を形成し、DNA と結合することができる (Klug, and Schwabe, 1995)。ヒトのゲノムには、ジンクフィンガーモチーフをコードしている遺伝子が 600~700 個あるといわれており、つまり少なくともこれだけの数の転写因子が存在していると考えられている (Venter, Adams, et al, 2001)。これらのジンクフィンガー型転写因子は、その他の転写因子や細胞内因子と選択的に相互作用することで、標的因子の細胞内局在や転写調節活性などをコントロールしている (Collins, Stone, and Williams, 2001)。この相互作用のモジュールとして、BTB ドメイン、KRAB ドメイン、SCAN ドメインなどが知られている (Bardwell, and Treisman, 1994; Bellefroid, Poncelet, et al, 1991; Williams, Khachigian, et al, 1995)。

BTB ドメインは酵母からヒトに至るまで進化的に高度に保存されている (Collins, Stone, and Williams, 2001)。ヒトのシーケンスデータベース上では約 100 個の BTB ドメインを有したタンパク質が見つかっており、ジンクフィンガー因子の 5~10 % がこの BTB ドメインを有していると見積もられている(Venter, Adams, et al, 2001)。これまでに、BTB ジンクフィンガー型タンパク質の多くが転写因子として機能していることが多数報告されている(Collins, Stone, and Williams, 2001)。BTB ドメインの主要な機能はタンパク質間の相互作用であり (Albagli, Dhordain, et al, 1995)、BTB ドメイン間でのホモダイマーまたはヘテロダイマーの形成に関する報告が数多くされてい

る (Deltour, Guerardel, and Leprince, 1999)。また、SMRT/N-CoR や mSin3A などのコリプレッサーとの結合ドメインとして機能し HDAC (histone deacetylase) と相互作用する一方で、BTB 蛋白質によってはこれらとは異なるコリプレッサーと相互作用する HIC-1 や γ FBP-B なども報告されており (Deltour, Guerardel, and Leprince, 1999)、BTB ドメインの機能は一様ではない。また、BTB 蛋白質の多くが核内で foci を形成していることが確認されており (Deltour, Pinte, et al, 2002)、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と考えられているが、この機能や意義に関しては完全に解明されていない。

ヒトのゲノム上には約 60 個の BTB ジンクフィンガー型タンパク質がコードされており (Van Roy, and McCrea, 2005)、その多くが発生や分化、癌化プロセスに直接または間接的に関わっていることが報告されている (Kelly, and Daniel, 2006)。これらの BTB ジンクフィンガータンパク質はコリプレッサーと相互作用することで、転写因子としての機能を発揮することが可能となる (Van Roy, and McCrea, 2005)。コリプレッサーは DNA に直接結合しない転写抑制因子で、DNA と直接結合する転写因子と相互作用することで転写を抑制している (Jepsen, and Rosenfeld, 2002)。これまでに SMRT/N-CoR、mSin3A、CtBP (C-terminal binding protein of E1A)、その他多くのコリプレッサーが同定されている。これらのコリプレッサーはそれぞれ HDAC などと複合体を形成し、ヒストン修飾やクロマチンリモデリングを介して転写を抑制していることが明らかになっている。CtBP コリプレッサーは、これまでに数十種類の転写因子との相互作用が確認されており、発生、分化、癌化などその機能は多岐にわたる (Hildebrand, and Soriano, 2002)。近年、CtBP がアポトーシスを抑制しているという現象が、CtBP 欠損マウス胚性線維芽細胞の研究より明らかにされた (Grooteclaes, Deveraux, et al, 2003)。CtBP を欠損することで、アポトーシス促進因子として知られている p21、Bax、Noxa の発現上昇が確認でき、これらの因子は p53 による制御を受けることから、CtBP と p53 の関係が示唆された。しかし、p53 欠損マウス胚性線維芽細胞を用いた実験でも同様の結果が得られたことから、CtBP の抑制によって誘導されるアポトーシスは p53 に依存しない経路によるものだと考えられており、その複雑な制御メカニズムは明らかになっていない。

近年、BTB ジンクフィンガー転写因子のなかで、メチル化された DNA 配列に結合することが可能なタンパク質が同定されている。DNA のメチル化はエピジェネティックな修飾のひとつで主にヘテロクロマチンの構築と転写抑制に関連しており、X-染色体不活化、ゲノムインプリンティング、正常な発達などに重要である。このメチル化修飾はバクテリアから哺乳類まで保存されており、脊椎動物では 5'-CpG-3' 配列の cytosine が主にメチル化されている(Clouaire, and Stancheva, 2008)。哺乳類ゲノムの CpG のうち 70% から 80% がメチル化されているが、遺伝子プロモーター領域近傍に存在する“CpG アイランド”と呼ばれる連続した CpG の繰り返し配列はそのほとんどがメチル化されていない(Clouaire, and Stancheva, 2008)。つまり、メチル化されていない CpG の大部分が CpG アイランドだと考えられている。一般的に DNA のメチル化は転写抑制状態を反映しており、一部の癌化した細胞や組織では、CpG アイランドや tumor suppressor 遺伝子プロモーターがメチル化を受けていることが確認されている(Costello, Fruhwald, et al, 2000; Jones, and Baylin, 2002)。このことから、異常なメチル化によって伴う遺伝子発現変化が癌化原因の一つとなっていることが明らかとなっているが、どのようにして CpG アイランドの脱メチル化状態を維持しているのかは現在までに明らかとなっていない(Clouaire, and Stancheva, 2008)。DNA メチル化の生物学的意義は近年明らかにされつつある。ゲノムワイドなメチル化解析より、異なる組織や細胞では同一の遺伝子であってもそれぞれのメチル化状態もまた異なっていることがわかっており、DNA メチル化状態がそれぞれの遺伝子発現に影響することで個々の細胞の運命を決定していることが明らかになっている(Bernstein, Meissner, and Lander, 2007)。

DNA にメチル基を修飾する酵素として DNA メチルトランスフェラーゼファミリータンパク質が報告されており、哺乳類では Dnmt1、Dnmt3a、Dnmt3b の三種類が知られている(Bestor, 2000)。Dnmt1 はヘミメチル化 DNA を認識することで、DNA 複製の際に生じた娘鎖などのような片側の strand がメチル化されていない DNA をメチル化する維持メチル化酵素として機能する(Chuang, Ian, et al, 1997)。Dnmt3 は de novo 型のメチル化酵素として、特に胚形成時の DNA メチル化パターン構築に重要であることが明らかになっている(Okano, Bell, et al, 1999)。Dnmt のノックアウトマウスはいずれも胎生致死であり、これらの動物では異常な遺伝子発現が多数認められることから、DNA メチル化は正常な遺伝子発現に必須であり、発生や分化段階で重要

な機能を担っていることが明らかになっている(Jackson-Grusby, Beard, et al, 2001; Li, Bestor, and Jaenisch, 1992)。

DNA メチル化が転写を抑制する機構は大きく分けて二つのモデルが提唱されている。第一のモデルは、転写因子の結合サイト付近の DNA 配列がメチル化されることで転写因子が相互作用できなくなり、転写活性化が阻害されるというものである。これは E2F や CREB などの転写因子の結合配列で報告されている (Campanero, Armstrong, and Flemington, 2000; Iguchi-Ariga, and Schaffner, 1989)。第二のモデルは、メチル化された cytosine にメチル化 DNA 結合タンパク質が結合して、コリプレッサーなどをリクルートして転写抑制複合体を形成することによるものである(Klose, and Bird, 2006)。

メチル化 DNA 結合タンパク質は構造的に分類されており、よく知られているのが MBD (methyl-CpG binding domain) ファミリータンパク質と、非 MBD 型の Kaiso ファミリータンパク質である。MBD ファミリータンパク質は MeCP2、MBD1、MBD2、MBD3、MBD4 が同定されている。はじめに発見されたのは MeCP2 で、N 末端領域にメチル化 DNA と結合するための MBD と、C 末端領域に転写抑制ドメインを持ったタンパク質として同定された(Nan, Ng, et al, 1998; Nan, Meehan, and Bird, 1993)。その後、哺乳類の EST を用いた MBD のホモロジー検索の結果その他の四つが同定された(Hendrich, and Bird, 1998)。MBD ファミリータンパク質は脊椎動物で高度に保存されており(Clouaire, and Stancheva, 2008)、MBD3 以外は全てメチル化 DNA に結合することが確認されている(Hendrich, and Bird, 1998)。一部の癌細胞において MeCP2、MBD2、MBD4 の発現低下や、*p16CDKN2A* や *MGMT* のプロモーターの異常なメチル化サイトへの結合などが確認されていることから、メチル化 DNA 結合タンパク質の癌化への関与が報告されている(Nakagawachi, Soejima, et al, 2003; Nguyen, Gonzales, and Jones, 2001)。一方でその詳細なメカニズムはよくわかっておらず、例えば MeCP2 ノックアウトマウスによる解析では、ヒト神経疾患の Rett 症候群に似た症状が誘発されることから長期間にわたるマウスの飼育が不可能なため癌化への影響を検討できていない(Guy, Hendrich, et al, 2001)。加えてヒト、マウスともに *MeCP2* に変異が生じると Rett 症候群が誘発されるが、これらの患者からは特異的な癌化傾向は認められず、その機能は未だ謎が多い(Amir, Van den Veyver, et al, 1999; Chen, Akbarian, et al, 2001; Guy, Hendrich, et al, 2001)。また、特定のメチル化 DNA 結合タンパク質がどの

様にして結合するメチル化サイトを同定しているのかは明らかになっていない (Setoguchi, Namihira, et al, 2006)。さらに、それぞれリダンドアンシーがあることから解析が困難となっており、個々の生理機能も完全に解明されていない (Setoguchi, Namihira, et al, 2006)。しかし、正常な遺伝子発現に必須なタンパク質ファミリーであることは明らかなことから、メチル化 DNA 結合タンパク質の更なる詳細な解析が期待されている。

Kaiso ファミリータンパク質は、メチル化 DNA に結合することができる BTB ジンクフィンガー型タンパク質として報告されている (Clouaire, and Stancheva, 2008)。最初に発見された Kaiso は p120(ctn) と結合する因子として同定され (Daniel, and Reynolds, 1999)、その後の研究でメチル化された CpG 配列にジンクフィンガーを利用して結合し、転写を抑制することが報告された (Prokhortchouk, Hendrich, et al, 2001)。このことから、MBD ファミリーとは“異なる”メチル化 DNA 結合タンパク質として注目されている。

CIBZ (**C**tBP **i**nteracting **B**TB-**z**inc finger protein) は当研究室がジーントラップ法と RT-PCR により初めて同定したマウスのタンパク質である (Matsuda, Shigeoka, et al, 2004; Sasai, Matsuda, et al, 2005)。アミノ酸配列の解析より、CIBZ は BTB ドメインとジンクフィンガーモチーフを有していることがわかったことから (図 1)、転写因子として機能していることが予想された。実際に当グループは、CIBZ が SV40 プロモーターと VP16 プロモーターそれぞれに対する転写抑制活性を有していることを、以前確認している (Sasai, Matsuda, et al, 2005)。さらに、コリプレッサー CtBP や HDAC などと相互作用すること、CIBZ の転写抑制活性には CtBP との結合が重要であることを併せて報告している (Sasai, Matsuda, et al, 2005)。同時期に、Kiefer らは CIBZ のラットオーソログ遺伝子 ZENON を Tyrosine hydroxylase プロモーター配列上の E-box に結合する因子として同定し、ZENON がこのプロモーターの転写を活性化することを報告した (Kiefer, Chatail-Hermitte, et al, 2005)。翌年には、ZBTB38 (human CIBZ) が、メチル化された CpG 配列に結合することが Filion らのグループより報告されている (Filion, Zhenilo, et al, 2006)。メチル化 CpG に結合するための CIBZ と Kaiso のジンクフィンガーは相同性が高く (図 2)、特に Kaiso は、標的遺伝子のプロモーター配列上にあるメチル化 CpG にメチル化依存的に結合するこ

とで、転写調節に重要な機能を果たしていることが既に報告されている (Prokhortchouk, Hendrich, et al, 2001)。このことから、CIBZ も DNA のメチル化依存的な機構で標的遺伝子の転写調節を行っていることが示唆されている。CIBZ はノックアウトマウスの解析が進んでいないことから生理機能は明らかになっていないが、他のメチル化 DNA 結合タンパク質同様、生体内で重要な機能を担っているものと考えられている。実際に、本研究において CIBZ がアポトーシスを抑制していることが明らかにされており (Oikawa, Matsuda, et al, 2008)、更なる解析が期待されている。

本論文では、CIBZ が CtBP と結合する BTB-zinc finger タンパク質であるという事実に着目し、CIBZ が CtBP と同様アポトーシスに関与している可能性を検証している。マウス筋芽細胞 C2C12 および p53 欠損マウス胚性線維芽細胞を用いた結果から、CIBZ が p53 に依存しない経路のアポトーシスを抑制していることを明らかにした。また、CIBZ はアポトーシスの際 caspase-3 の基質となることも確認した。さらに、CIBZ は筋分化マーカータンパク質 myogenin の発現を、*myogenin* プロモーターのメチル化依存的に制御していることも明らかにしており、これらの結果を併せて報告する。

2. 材料と方法

2-1. プラスミド

N 末端に Flag タグを付加した CIBZ (Flag-CIBZ) は、すでにある CIBZ cDNA (Sasai, Matsuda, et al, 2005) を *Bam*HI/*Xho*I で切断し、Flag タグが組み込まれている pcDNA3 ベクター (Invitrogen) に組み込んだ。GST-BTB (1–158), -RD2 (158–339), -zinc finger 1–5 (335–538), -spacer (539–1012), zinc finger 6–10 (967–1197) の各種欠損体は、PCR で増幅した後 pGEX-5X-2 ベクター (GE Healthcare) の *Bam*HI/*Xho*I サイトに組み込んだ。N 末端に Flag タグを付加した MyoD 及び myogenin は、制限酵素配列を付加したプライマーを用いて cDNA より ORF を増幅し、Flag タグが組み込まれている pcDNA3 ベクターに組み込んだ。Myogenin プロモーター配列の 228 bp は、制限酵素配列を付加したプライマーを用いて genomic PCR により増幅し、pGL3 basic ベクターの *Kpn*I/*Xho*I サイトに組み込んだ。GST-CIBZ SP2 (D618A/D910A)、Flag-CIBZ (D618A/D910A) は QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene) を用いて作製した。全てのプラスミドシーケンスは BigDye terminator と ABI PRISM3100 によって確認した。

2-2. 細胞培養

C2C12 細胞は 15% FBS、2 mM L-glutamine、1% penicillin/streptomycin を含む DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) 中で培養した。アポトーシスと筋分化を誘導するため、2% house serum を含む DMEM 中でそれぞれの時間培養した。プラスミドのトランスフェクションには lipofectamine 2000 (Invitrogen) を添付のマニュアルに従って用いた。293T 細胞は 10% FBS、2 mM L-glutamine、1% penicillin/streptomycin を含む DMEM 中で培養した。トランスフェクションには CellPfect transfection kit (GE Healthcare) を用いて、添付のマニュアルに従って行った。p53 knockout mouse embryonic fibroblast (p53^{-/-} MEF) 細胞は、10% FBS、2 mM L-glutamine、1% penicillin/streptomycin、1 mM sodium pyruvate を含む DMEM 中で培養した。

2-3. 半定量 RT-PCR

Total RNA は Sepasol^(R)-RNA I super (Nacalai Tesque) を用いて培養細胞から抽出した。1–5 ug の total RNA から Super Script III reverse transcriptase (Invitrogen) とオリゴ d(T) プライマーを用いて cDNA を合成し、それぞれ特異的なプライマーを用いて PCR を行った。プライマーの配列を以下に示す。

CIBZ Forward: 5'-CCGGATCCCCATAGATCACAGACTCTCCAT-3', Reverse: 5'-CCGCTCGAGCTGTAGCTGATCACAGAGGCCGAG-3'; GAPDH Forward: 5'-CCATCACCATCTTCCAGGAG-3', Reverse: 5'-CCTGCTTACCACCTTCTTG-3'; p53 Forward: 5'-ACTGCATGGACGATCTGTTG-3', Reverse: 5'-GCCATAGTTGCCCTGGTAAG-3'; p21 Forward: 5'-ACGGTGGAACCTTGGACTTCG-3', Reverse: 5'-TCTGCGCTTGGAGTGATAGA-3'; p27 Forward: 5'-CGGGATCCAGATGTCAAACGTGAGAGTGTC-3', Reverse: 5'-CCGCTCGAGGTCGACTTACGTCTGGCGTCGAAGGC-3'.

PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド染色で確認した。予想されたバンドサイズの産物をゲルから抽出し、シーケンス反応で目的の配列であることを確認した。

2-4. siRNA トランスフェクション.

CIBZ に特異的な Dicer substrate siRNA または Dicer substrate scrambled negative control siRNA (Integrated DNA Technologies) は、C2C12 細胞と p53^{-/-} MEF 細胞に lipofectamine 2000 を用いて添付のマニュアルに従ってトランスフェクションした。トランスフェクション後 24–48 時間で細胞を回収し、RT-PCR とウェスタンブロッティングで CIBZ の発現抑制を確認した。siRNA の配列を以下に示す。

CIBZ siRNA-1 sense sequence, 5'-Phos-GCGGACCACAUGGUGAAAUUUGUdGdA-3'; antisense sequence, 5'-UCACAAAUUUCACCAUGUGGUCCGCGU-3'.

CIBZ siRNA-2 sense sequence, 5'-Phos-GCUGAAGAAACCAGUAAGAUAUGAdAdA-3'; antisense sequence, 5'-UUUCAAUUCUUCUGGUUUUCUUCAGCGU-3'.

2-5. ウェスタンブロッティング

細胞を 4 °C で lysis buffer (50 mM HEPES pH 7.5、150 mM NaCl、1% NP-40、1 mM EDTA) に protease inhibitor cocktail (Roche Applied Science) を含む溶液中で 20 分氷上で溶解し、4 °C で 15000 回転、20 分の遠心で不溶性画分を取り除いた。得られた可溶性画分に 5×SDS サンプルバッファーを加え、6–15% で SDS-PAGE を行い、PVDF メンブレンにセミドライトランスファーした後、それぞれの抗体と ECL-plus (GE Healthcare) を用いてタンパク質の検出を行った。

2-6. AnnexinV-FITC アポトーシスアッセイ

Annexin V kit (MBL, Nagoya, Japan) を用いて添付のマニュアルに従って行った。siRNA 導入後の C2C12 細胞を PBS で洗浄後、Annexin V と Propidium iodide を含んだ溶液中で 15 分間室温でインキュベーションし、fluorescence-activated cell sorting (BD Biosciences) を用いて細胞数を解析した。

2-7. *In vitro* Caspase cleavage アッセイ.

GST 融合タンパク質を BL21 株に発現させ、glutathione-Sepharose 4B (GE Healthcare) を用いて精製した。得られた融合タンパク質を recombinant caspase-3 (Sigma) 290 ng とリアクションバッファー (50 mM HEPES、100 mM NaCl、1 mM EDTA、10 mM dithiothreitol、pH 7.5) 中で混合し、37 °C で 8–12 時間インキュベーションした。5×SDS サンプルバッファーを加え反応を止め、10% の SDS-PAGE 後 Coomassie Brilliant Blue 染色でタンパク質のバンドを確認した。Flag-CIBZ または Flag-CIBZ (D618A/D910A) の切断アッセイでは、それぞれのコンストラクトを 293T 細胞に過剰発現させ、タンパク質の可溶性画分を anti-FLAG M2 affinity gel (Sigma) で免疫沈降したのち、得られた産物を同様に用いた。

2-8. レポーターアッセイ

293T 細胞は 10×10^4 個の密度で 24-well プレートに撒き、CellPfect transfection kit を用いてトランスフェクションした。50 ng の Flag 融合タンパク質発現プラスミド、100 ng のレポーターベクター(pGL3 basic-Mgn228)、5 ng のコントロールベクター(pRL-SV) をコトランスフェクションした。C2C12 細胞は 7.5×10^4 個の密度で

lipofectamin 2000 を用いてトランスフェクションした。CIBZ に対する siRNA (最終濃度 5 nM)、上述のレポーターベクター、コントロールベクターをコトランスフェクションした。必要に応じて、レポーターベクターを SssI methylase (NEW ENGLAND BioLabs) であらかじめ *in vitro* でメチル化した。トランスフェクションの 24 時間後に PBS で洗浄した後、Passive lysis buffer (Promega) で溶解して、Dual-luciferase reporter assay system (Promega) を用いてマニュアルの方法に従ってルミノメーターを用いてルシフェラーゼ活性の値を測定した。それぞれの値は、コントロールプラスミドのルシフェラーゼ活性の値を用いて補正した。それぞれの実験は少なくとも 3 回繰り返しその平均値を算出した。

2-9. クロマチン免疫沈降法

10 cm ディッシュで培養している細胞にホルムアルデヒドを 10% になるように加えて 30 分室温でインキュベーションし、DNA とタンパク質を架橋した。グリシンを 10% になるように加えて反応を止めた後、PBS で洗浄して細胞を回収した。Swelling buffer (25 mM HEPES、1.5 mM MgCl₂、10 mM KCl、0.1% NP-40、1 mM dithiothreitol、0.5 mM PMSF、pH 7.8、protease inhibitor cocktail) で溶解して遠心分離によって核画分を沈澱させ、SDS lysis buffer (50 mM Tris、10 mM EDTA、1% SDS、pH 8.0、protease inhibitor cocktail) に再び溶解し、氷上で 10 分インキュベーションした。ソニケーション処理をした後、4 °C、15000 回転、20 分の遠心分離で不溶画分を取り除き、ChIP Dilution buffer (16.7 mM Tris-HCl、167 mM NaCl、0.01% SDS、1.1% Triton X-100、1.2 mM EDTA、pH 8.0、protease inhibitor cocktail) で 10 倍希釈した。Protein G Agarose (GE Healthcare) を加えて 4 °C で 30 分ローテーションした後、上澄みを新しいチューブに移し、一部を Input として保存した。残りの上澄みを等分し、それぞれの抗体を 2 ug 加えて 4 °C で一晩インキュベーションした。再び Protein G Agarose を加えて 4 °C で一時間ローテーションした後、Low Solt Immune Complex Wash buffer (20 mM Tris-HCL、150 mM NaCl、0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、pH 8.1)、High Solt Immune Complex Wash buffer (20 mM Tris-HCL、500 mM NaCl、0.1% SDS、1% Triton X-100、2 mM EDTA、pH 8.1)、LiCl Immune Complex Wash buffer (10 mM Tris-HCl、250 mM LiCl、1% NP-40、1% deoxycholic acid、1 mM EDTA、pH 8.1)、TE でそれぞれ二

回ずつ合計 8 回洗浄した。ビーズを Direct elution buffer (10 mM Tris-HCl, 300 mM NaCl, 0.5% SDS, 5 mM EDTA) で希釈し、65 °C で一晩インキュベーションして脱架橋とビーズからの溶出を行った。RNase 及び Proteinase K 処理をした後、フェノール/クロロホルム処理をして DNA を回収した。得られた産物を用いて、Blend Taq (TOYOBO) による PCR を行った。プライマーの配列は以下に示す。primer 1 Forward: 5'-TGGAACGTCTTGATGTGCAG-3', Reverse: 5'-GGTGCCATTTAAACCCTCCCT-3', primer2 Forward: 5'-ATTCTAGAGTTGTATGACGCAGGC-3', Reverse: 5'-GGTCGATAAGGAGAAAGAG-3'

3. 結果

3-1. C2C12 細胞でアポトーシスを誘導すると CIBZ タンパク質の発現が減少する

CIBZ はアポトーシス抑制因子 CtBP と相互作用する BTB ジンクフィンガータンパク質であることから(Sasai, Matsuda, et al, 2005)、アポトーシスに何らかの機能を発揮していることが予想された。CIBZ とアポトーシスの関連を調べるため、C2C12 細胞における CIBZ の発現を RT-PCR とウェスタンブロッティングで解析した。CIBZ は 15% FBS を含む培地 (growth medium; 以下 GM) 中で培養している C2C12 細胞で高発現していることが確認された (図 3)。GM を 2% horse serum を含む培地 (differentiation medium; 以下 DM) に交換して培養を続けると、24 時間以内にアポトーシスが誘導されたことを、アポトーシスのマーカーとして知られている切断された Caspase-3 及び PARP の検出により確認した。興味深いことに、GM を DM に交換してから 8 時間以内に CIBZ タンパク質の発現が減少し始め、その後減少を続け、48 時間までには検出不可能なレベルにまで低下した。一方で、RT-PCR の結果では CIBZ の mRNA レベルにはほとんど変化が認められなかった。これらの結果より、CIBZ タンパク質の発現はアポトーシスの誘導に何らかの影響を受け、このタンパク質の減少は転写後の調節によるものであることが示唆された。

3-2. C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが誘導される

CIBZ を抑制することでアポトーシスが誘導されるかを検証するため、CIBZ に対する 27-mer からなる siRNA を設計した。CIBZ の異なる配列が標的となるように二種類設計し、その効果をそれぞれ確認した。オフターゲット効果を避けるため、siRNA の最終濃度を 5 nM となるようにトランスフェクションに用いた。C2C12 細胞にトランスフェクション後、RT-PCR とウェスタンブロッティングで CIBZ の発現レベルを確認したところ、双方の siRNA とともに効果的に CIBZ の発現を抑制することがわかった (図 4 A)。図 4 A に示したように、CIBZ をノックダウンすることで caspase-3 の活性化と PARP の切断が確認できたことから、CIBZ を抑制するとアポトーシスが誘導されることが分かった。興味深いことに、caspase-9 及び caspase-7 の活性化も認められたことから、CIBZ が関係するアポトーシスはミトコンドリアの経路による調節を利用していることが考えられた。更に、CIBZ の減少で p21 及び p27 の発現も

上昇している (図 4 A)。これは、これまでに報告されている C2C12 細胞で低血清によるアポトーシスを誘導すると、これら二つの cyclin-dependent kinase の発現が上昇するという報告と一致している (Shen, Collier, et al, 2003; Tannu, Rao, et al, 2004)。CtBP を抑制することでも p21 と caspase-3 の活性化が認められることから (Grooteclaes, Deveraux, et al, 2003; Wang, Iordanov, and Zhang, 2006)、CIBZ と CtBP それぞれが関係しているアポトーシスは共通の経路によるものである可能性がある。CIBZ を抑制することでアポトーシスが誘導される事実を更に立証するために、annexin V アッセイによるアポトーシスの確認も行った。Annexin V は初期のアポトーシスが生じている細胞の膜上に露出するホスファチジルセリンに結合するので、annexin V に結合させた FITC をフローサイトメトリーで解析することで、アポトーシスが生じている細胞数をカウントすることができる。さらに Propidium iodide (PI) で同時に染色することで、後期のアポトーシスが生じている細胞も検出することができる。図 4 B に示したように、siRNA で CIBZ を抑制するとアポトーシスが生じている細胞数が増加したことが確認できた。初期のアポトーシス (annexin V-FITC 陽性/PI 陰性) と後期のアポトーシス (annexin V-FITC 陽性/PI 陽性) 双方が増加していたことから、C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが誘導されることが改めて確認された。

3-3. CIBZ をノックダウンして誘導されるアポトーシスは p53 に依存しない

p53 タンパク質はアポトーシスに重要な機能を果たしている。CIBZ が関連しているアポトーシスに p53 が関わっているか検討するために、p53 欠損マウス胚性繊維芽細胞 (p53^{-/-} MEF) で CIBZ を抑制したときのアポトーシスの挙動を調べた。二種類の siRNA とともに CIBZ を効果的に抑制しており (図 5)、このとき Caspase-3 の活性化と PARP の切断が確認できた。さらに、C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンした際も p53 の発現量に影響を与えなかったことから (図 4 A)、CIBZ が関連しているアポトーシスは p53 の活性に依存しないものであることがわかった。

3-4. CIBZ は Caspase-3 によって切断される

CIBZ のアミノ酸配列に、caspase-3 の切断認識コンセンサス配列 (DXXD) が5カ所存在しており、2ヶ所は BTB ドメイン内で、残りの3カ所はスペーサー領域にある (図6A)。CIBZ を抑制するとアポトーシスが誘導されることから、CIBZ が caspase-3 の新規の基質である可能性が示唆された。これらを検証するため、GST タグを付加した CIBZ の欠損変異体コンストラクトを作製し、GST 融合タンパク質を発現・精製した後、*in vitro* における caspase-3 切断アッセイを行った。図6B に示したように、GST-BTB、GST-RD2、GST-ZF1-5、GST-ZF6-10 はリコンビナント caspase-3 と一緒に 37°C で8時間インキュベーションしても切断分解されなかった。一方で、GST-SP は同じ条件下で完全に切断されることが確認された。これらのことから、CIBZ が caspase-3 の新規の基質であることが示唆され、その切断認識配列は SP 領域内に存在することが明らかとなった。

3-5. Caspase-3 による切断箇所は CIBZ アミノ酸配列内に二ヶ所ある

次に、caspase-3 に切断されるサイトの同定を試みた。上述したように、SP 領域には3カ所 DXXD 配列が存在する。このうち、DFQD⁶¹⁸ 及び DSTD⁹¹⁰ が種間で保存されていたことから (図7A)、この二ヶ所が切断配列である可能性が考えられた。これを検証するために、PCR を用いた site-directed mutagenesis で Asp⁶¹⁸ 及び ASP⁹¹⁰ をそれぞれアラニンに置換した変異体 (以下 D618A、D910A とする) を作製した。さらに、Asp⁶¹⁸ と ASP⁹¹⁰ 両方をアラニンに置換した変異体 (D618A/D910A) も作製した。これらをそれぞれ *in vitro* caspase-3 切断アッセイを行ったところ、GST-SP(D618A) と GST-SP(D910A) とともに caspase-3 による切断を完全に回避することができなかった (data not shown)。一方で、GST-SP(D618A/D910A) は caspase-3 に切断されなくなった (図7A)。このことより、DFQD⁶¹⁸ 及び DSTD⁹¹⁰ が *in vitro* における caspase-3 切断配列として重要であることが明らかとなった。この結果をさらに検証するため、Flag-CIBZ(D618A/D910A) の発現コンストラクトを作製し、293T 細胞に過剰発現させた。この cell lysate を抗 Flag アフィニティーゲルを用いた免疫沈降法で回収し、得られた産物を *in vitro* caspase-3 切断アッセイに用いた。図7B に示したように、Flag-CIBZ は caspase-3 によって切断されたのに対し、Flag-CIBZ(D618A/D910A) は切断されなかった。以上の結果より、SP 領域内にある

DFQD⁶¹⁸ 及び DSTD⁹¹⁰ が caspase-3 による切断の際に認識される配列であることが明らかとなった。

3-6. CIBZ タンパク質は筋分化の誘導に伴って発現が減少する

C2C12 細胞は DM 環境下で培養を続けることで筋分化を誘導することができることから、筋肉の分化研究においても多用されている培養細胞のひとつである (Kislinger, Gramolini, et al, 2005)。筋芽細胞が筋管細胞に分化する際に caspase-3 の活性化が重要であることがわかっており (Fernando, Kelly, et al, 2002)、実際に caspase-3 を欠損させた筋芽細胞を用いた実験では、筋分化能が低下することが明らかとなっている。細胞の分化に伴い caspase-3 が活性化することからアポトーシスと筋分化の関係が示唆されているが、その詳細な機構は明らかとなっていない。CIBZ をノックダウンすると caspase-3 が活性化することから (図 4 A)、CIBZ が筋分化に何らかの機能を果たしている可能性が考えられた。これらを検証するため、C2C12 細胞で分化誘導した際の CIBZ と筋分化のマーカータンパク質として知られている myogenin の発現を比較した。分化誘導後 1 日目で CIBZ タンパク質の発現は著しく減少しており、これに伴って myogenin の発現はタンパク質と mRNA とともに上昇した (図 8)。これらの結果より、C2C12 細胞を DM で培養したことで分化誘導されたことが確認でき、CIBZ の発現が筋分化に何らかの影響を与えている可能性が示唆された。

3-7. CIBZ をノックダウンすると myogenin の発現が誘導される

CIBZ を抑制することで筋分化が誘導されるか検証するため、C2C12 細胞に CIBZ 特異的な siRNA をトランスフェクションし、筋分化マーカータンパク質の発現を解析した。筋肉の分化では、MyoD、Myf5、Maf4、myogenin の四つの bHLH 型の転写因子が重要な機能を担っていることが明らかとなっている (Massari, and Murre, 2000)。CIBZ をノックダウンしても MyoD、Myf5、Maf4 の発現に変化は認められなかった (data not shown)。一方で、myogenin の発現は mRNA、タンパク質ともに増加していたことから、CIBZ をノックダウンしたことで筋分化が誘導されたことがわかった (図 9)。

3-8. CIBZ はメチル化依存的に Myogenin プロモーターの活性を制御する

CIBZ は BTB-zinc finger タンパク質であり実際に転写抑制活性を有している (Sasai, Matsuda, et al, 2005)。CIBZ が myogenin の転写を調節している可能性が考えられたことから、直接 myogenin プロモーターを制御するかを検討した。Genomic PCR より得られた myogenin プロモーター配列を pGL3 basic レポーターベクターに組み込んだコンストラクト (pGL3-Mgn228) を作製し、レポーターアッセイによって CIBZ の影響を解析した。C2C12 細胞は内在性 CIBZ の発現が高いため、CIBZ 過剰発現の影響の判断が困難であることが考えられたので、内在性 CIBZ の発現が低いことが確認されている 293T 細胞を用いた。図 10B に示したように、CIBZ を過剰発現させても pGL3-Mgn228 の活性に変化は認められなかった。CIBZ はメチル化された DNA 配列に結合することが報告されている (Filion, Zhenilo, et al, 2006)。また、myogenin プロモーター領域の DNA 配列は分化の前は高度にメチル化されていて、分化後はメチル化が解除されることが報告されており、分化の前後でメチル化状態が変化していることが明らかとなっている (Jost, Oakeley, et al, 2001; Lucarelli, Fusco, et al, 2001)。このことから、CIBZ による myogenin プロモーターの制御はこの配列がメチル化されることが必要である可能性が考えられた。そこで、SssI methylase を用いてレポータープラスミドを *in vitro* でメチル化した後、293T にトランスフェクションしてレポーターアッセイを行った。図 10B に示したように、メチル化された pGL3-Mgn228 は CIBZ を過剰発現することでそのレポーター活性が抑制された。また、C2C12 細胞にメチル化前の pGL3-Mgn228 をトランスフェクションして CIBZ をノックダウンしてもレポーター活性は影響を受けなかったが、pGL3-Mgn228 をメチル化後トランスフェクションして CIBZ をノックダウンするとレポーター活性が増強された (図 11B)。以上のことから、CIBZ は myogenin プロモーターを負に制御していることが示され、そのためにはこのプロモーターの DNA 配列がメチル化されていることが重要であることがわかった。

3-9. CIBZ は Myogenin プロモーターに結合する

CIBZ のノックダウンが myogenin の mRNA レベルに影響し、レポーターアッセイの結果から CIBZ が myogenin のプロモーターを制御できることが示された。CIBZ が *in vivo* で myogenin プロモーター領域に局在することを確かめるために、クロマ

チン免疫沈降法 (ChIP) による解析を行った。*myogenin* のプロモーター調節の研究報告は数多くされており (CHARGE, and RUDNICKI, 2004; Long, Creemers, et al, 2007; Mal, Sturniolo, et al, 2001)、転写開始点から上流 184 bp までの配列と 5'UTR を含んだ合計 228 bp の領域がその転写調節に重要であることが明らかとなっている。この領域には MyoD や MEF2C の結合配列、TATA box などが存在しており、多くの転写因子が *myogenin* の発現調節をしていることが知られている (Pownall, Gustafsson, and Emerson, 2002)。ホルムアルデヒド処理で DNA とタンパク質を架橋した C2C12 細胞の cell lysate を、抗 CIBZ 抗体、抗 MyoD 抗体、ウサギ IgG、滅菌蒸留水 それぞれで免疫沈降した後、得られた産物を用いて *myogenin* プロモーターに特異的なプライマーで PCR を行った。MyoD は常に *myogenin* プロモーターに結合していることが報告されている (Mal, and Harter, 2003)。図 1 2 B に示したように、CIBZ も MyoD 同様 *myogenin* プロモーターに結合していることが確認された。また、転写開始点の約 1.5 kb 上流の領域では、CIBZ と MyoD とともに *myogenin* プロモーターへの結合は確認されなかった。

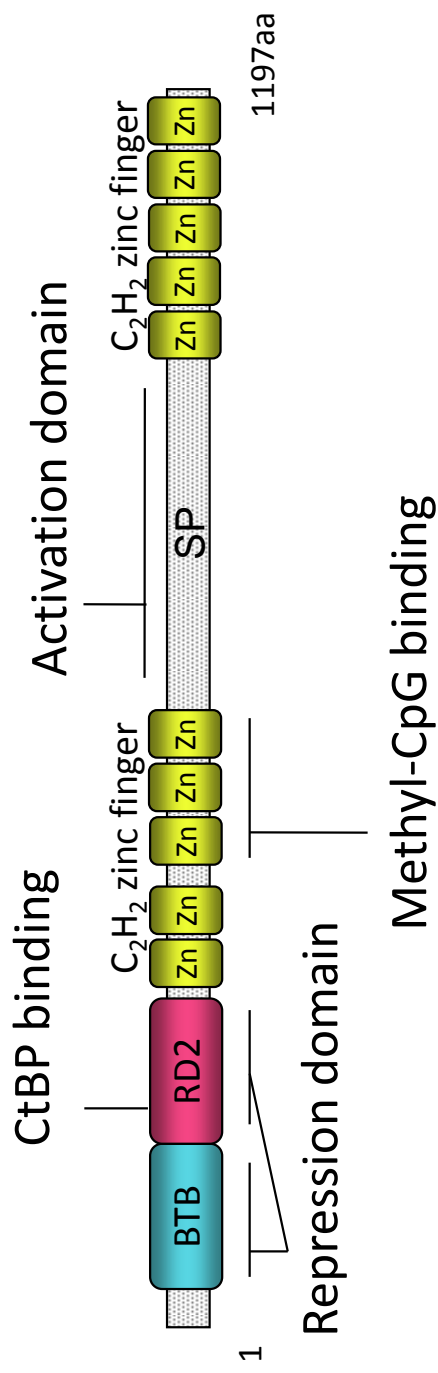


図.1 CIBZ の構造と各ドメインの機能

CIBZ のドメイン構造の模式図を示した。CIBZ は全長 1197 アミノ酸からなるタンパク質で、N 末端領域に BTB ドメイン、中央と C 末端領域にそれぞれ五個のジンクフィンガーを有している。BTB と RD2 (repression domain 2) にはそれぞれ独立した転写抑制活性があり、SP (spacer) 領域には転写活性化能があることが確認されている。また、RD2 でコリプレッサー CIBP と結合し、RD2 の転写抑制活性は CtBP との結合に依存する。さらに、3-5 番目のジンクフィンガーを用いてメチル化された CpG 配列に結合する。

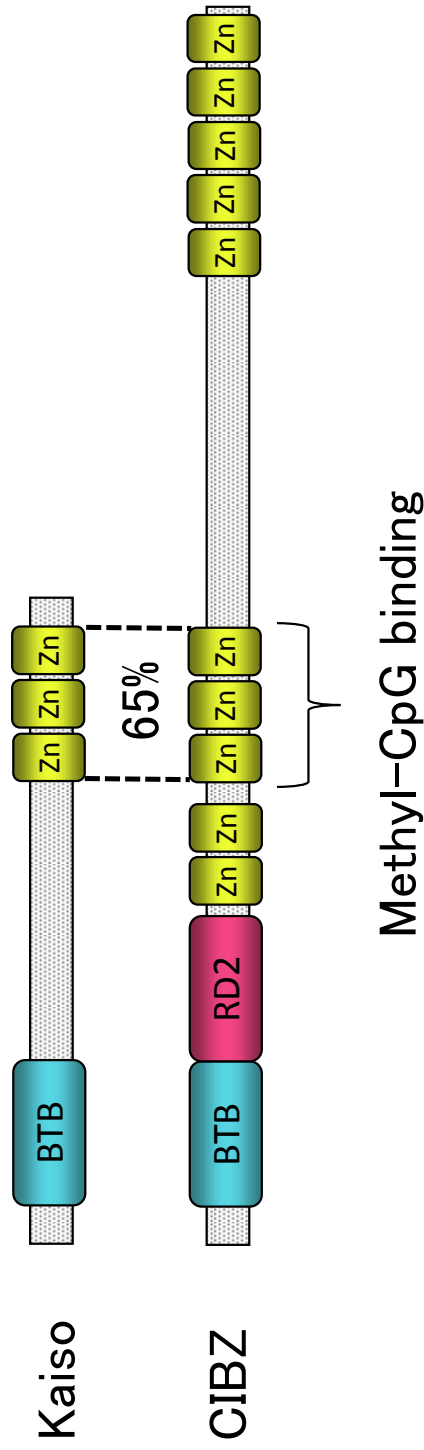


図.2 CIBZ と Kaiso のジンクフィンガーは相同性が高い

CIBZ と Kaiso の構造の模式図を示した。それぞれ BTB ジンクフィンガー型のタンパク質であり、Kaiso のジンクフィンガーと CIBZ のジンクフィンガー3番から5番目までは保存性が高い。共にこのジンクフィンガーを利用してメチル化された DNA に結合することがわかっている。

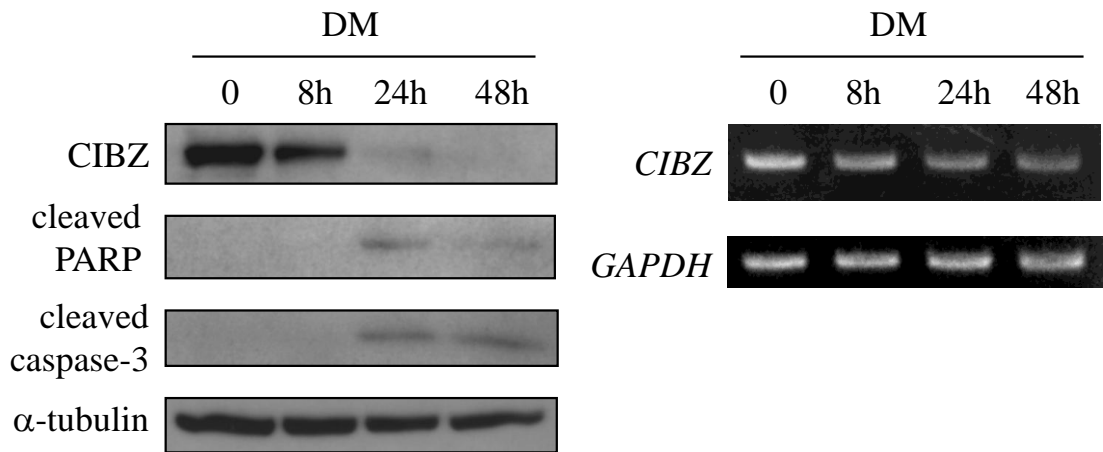


図.3 C2C12 細胞を低血清条件下で培養してアポトーシスを誘導すると CIBZ タンパク質の発現が減少する

C2C12 細胞でアポトーシスを誘導するために DM を用いた。DM に交換後、図に示した時間に細胞を回収し、ウェスタンブロッティング (左図) と半定量 RT-PCR (右図) でそれぞれの発現量を解析した。図中に示したタンパク質はそれぞれのタンパク質に対する抗体で検出した。 α -Tubulin と glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) をそれぞれウェスタンブロッティングと RT-PCR の内部標準とした。

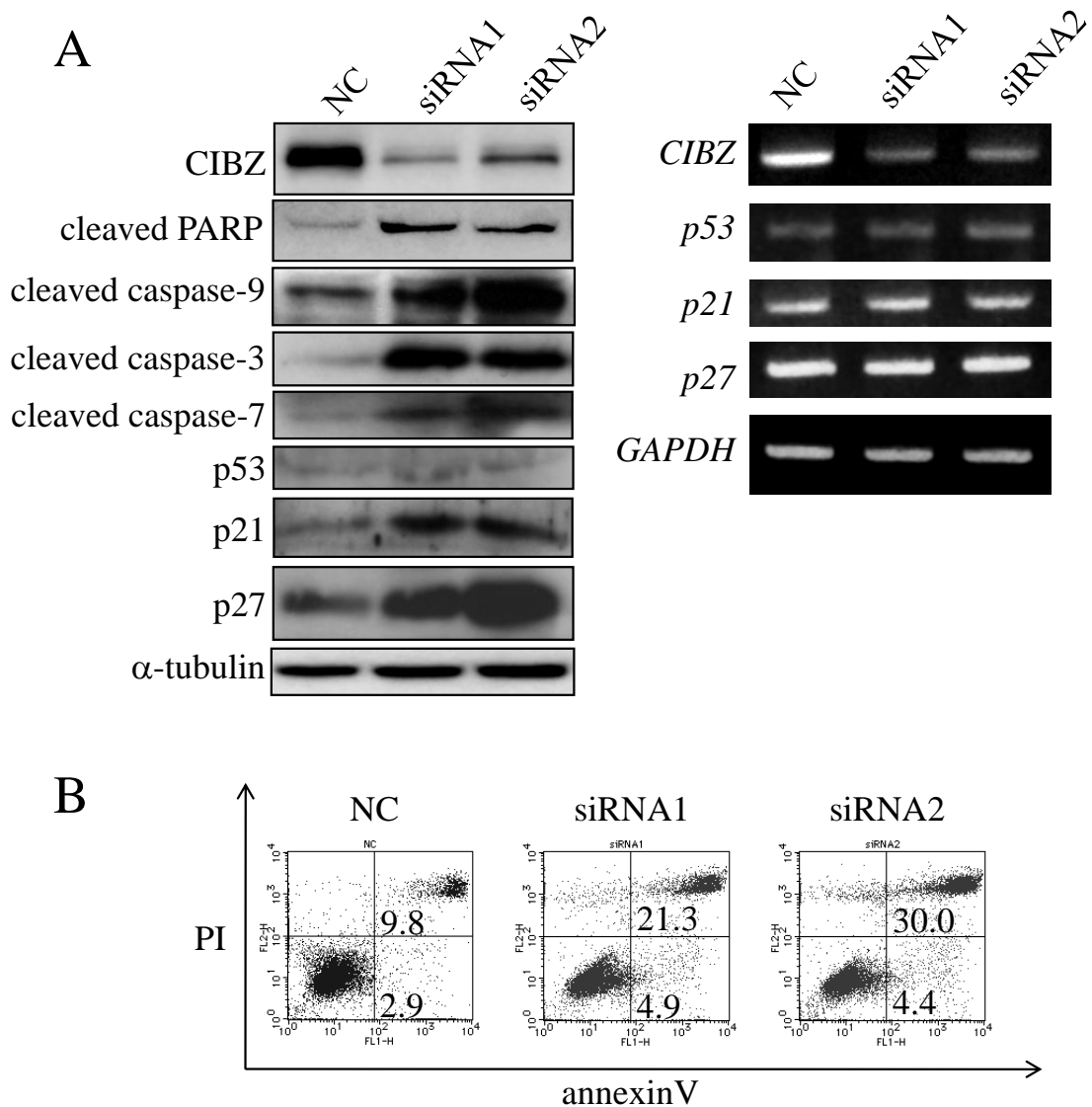


図.4 C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが誘導される

(A) C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンするために、二種類の siRNA を用いた。siRNA または scrambled negative control (NC) をトランスフェクション後36時間で細胞を回収し、ウェスタンブロッティング(左図)と半定量 RT-PCR (右図)を行った。内在性のCIBZ、cleaved of PARP、caspase-3、caspase-7、caspase-9 はそれぞれの抗体で検出した。p53、p21、p27 の発現はそれぞれの抗体を用いたウェスタンブロッティング及び特異的なプライマーを用いた RT-PCR によって解析した。 α -Tubulin と glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をそれぞれウェスタンブロッティングと RT-PCR の内部標準とした。

(B) Annexin V-FITC/PI 染色によるアポトーシスアッセイの結果を示した。C2C12 細胞に siRNA または NC をトランスフェクションして、36時間後に PI を含んだ annexin V-FITC 溶液で細胞を染色し、フローサイトメトリーでそれぞれの染色のポジティブ及びネガティブな細胞の数をカウントした。

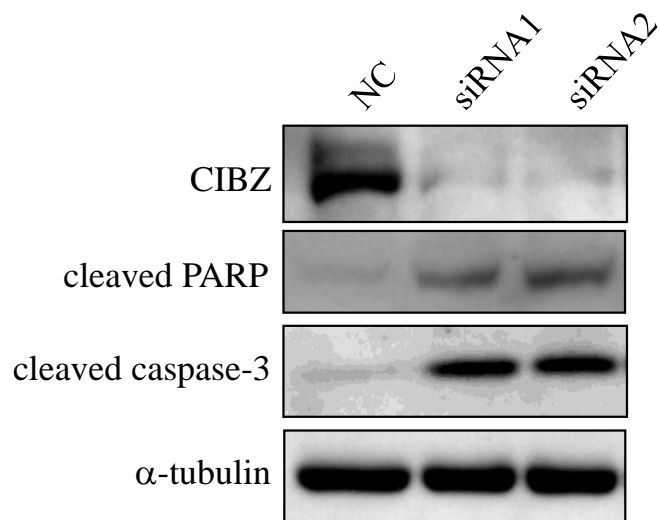


図.5 p53を欠損したマウス胚性繊維芽細胞でCIBZをノックダウンするとアポトーシスが生じる

p53を欠損したマウス胚性繊維芽細胞においてCIBZをノックダウンするために、二種類のsiRNAまたはscrambled negative control (NC)をそれぞれトランスフェクションした。細胞のlysateを調製し、それぞれの抗体によるイムノブロットでタンパク質を検出した。再現性を取るために3回同様の実験を行った。

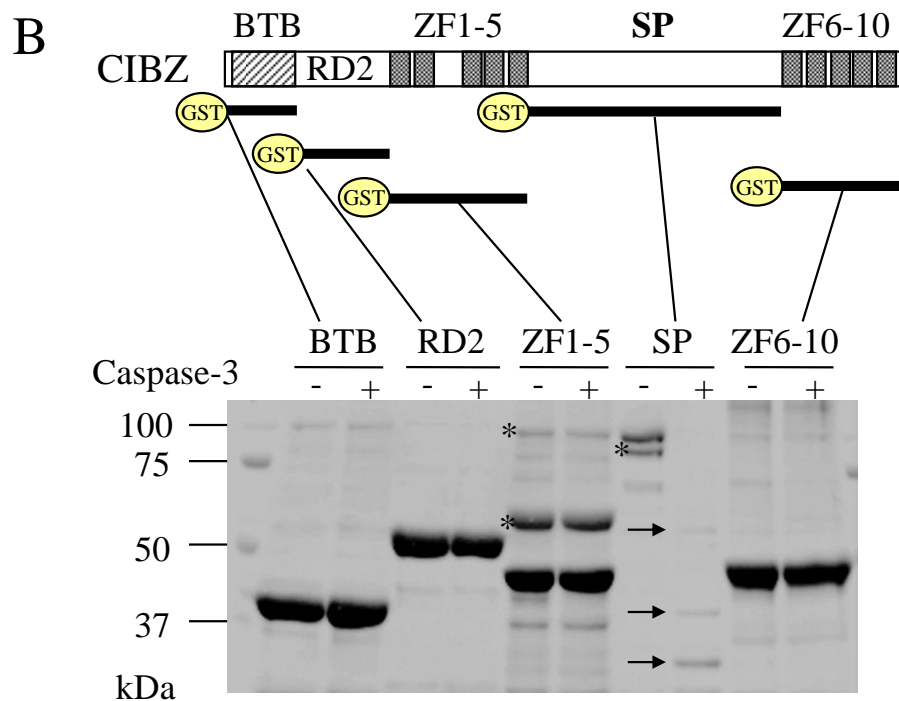
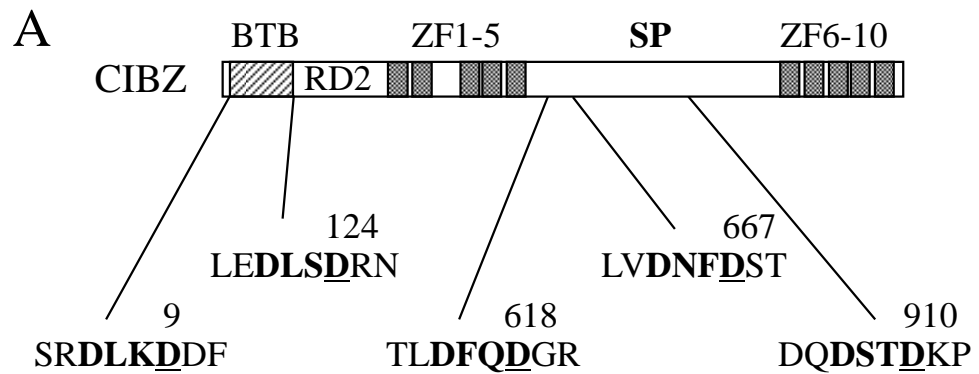


図6. CIBZ は caspase-3 の基質である

(A) CIBZ の構造の模式図と、caspase-3 の切断コンセンサス配列の場所 (計五箇所) を示した。

(B) *In vitro* caspase-3 切断アッセイに用いた、GST タグを融合した CIBZ 変異体のコンストラクトの模式図とその結果を示した。それぞれの GST 融合タンパク質を 37°C、8 時間の条件でリコンビナントの caspase-3 とインキュベーションし、12% SDS-PAGE にかけた後 CBB 染色を行った。アスタリスクは非特異的なバンドを、矢印はリコンビナント caspase-3 によって切断された断片をそれぞれ示している。

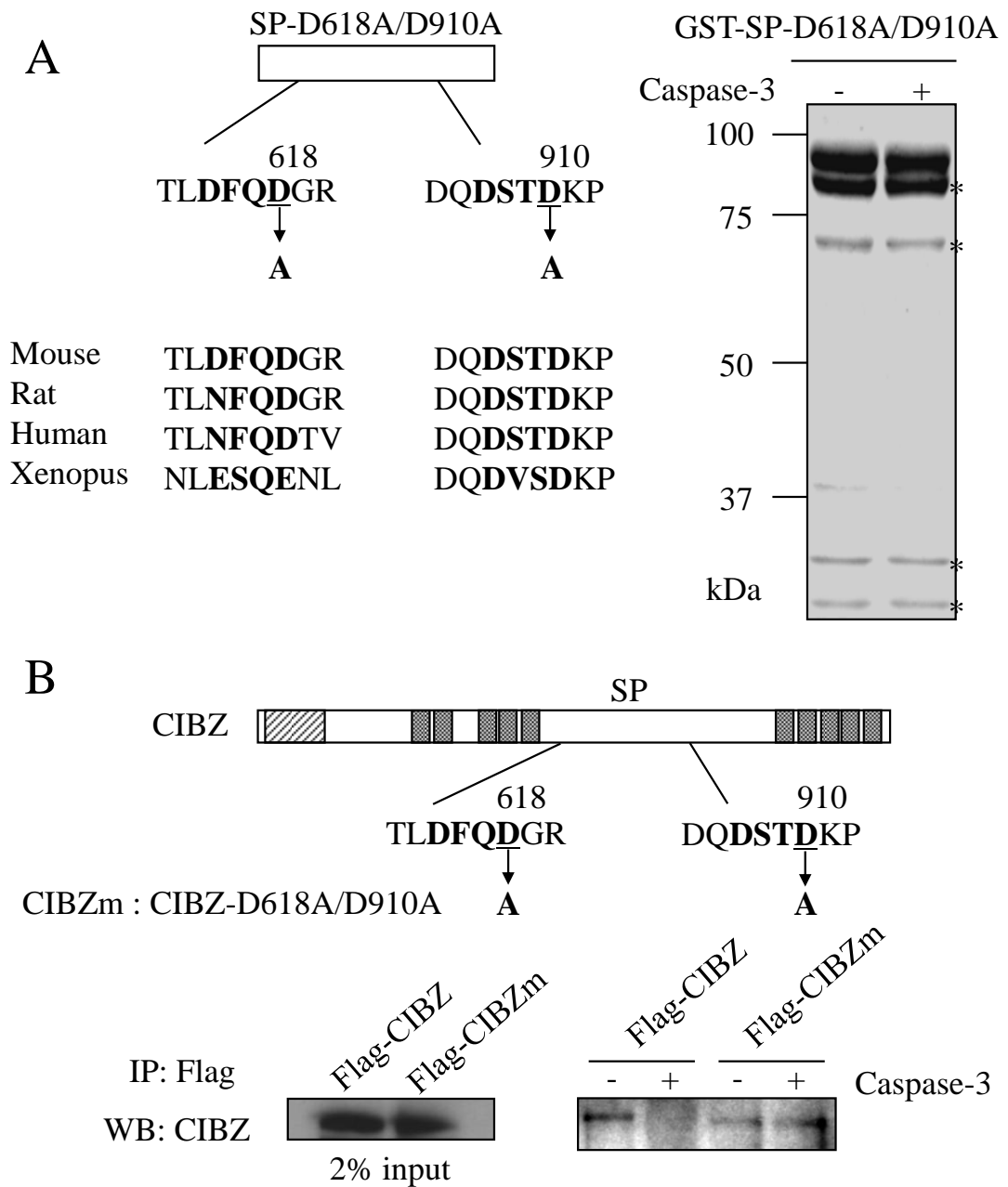


図.7 CIBZ アミノ酸配列内の caspase-3 切断サイトを同定

(A) SP 領域内のアミノ酸配列が保存された caspase-3 切断コンセンサス配列の模式図を示した(左図)。Caspase-3 に切断されない変異体を作製するために、Asp⁶¹⁸ と Asp⁹¹⁰ をアラニンに置換したコンストラクトを作製した。GST-SP2(D618A/D918A) 変異体をリコンビナント caspase-3 の非存在下または存在下で12時間37 °Cインキュベーションし、得られた産物を SDS-PAGE と CBB 染色により確認した(右図)。アスタリスクは非特異的バンドを示している。

(B) CIBZ (D618A/D910A) 変異体の構造の模式図を示した(上図)。293T 細胞に wild CIBZ または CIBZ (D618A/D910A) を過剰発現させ、48時間後に cell lysate を回収し、抗 Flag アフィニティーゲルで免疫沈降した。得られた産物を *in vitro* caspase-3 切断アッセイに用い、ウェスタンブロットティング後抗 CIBZ 抗体で検出した。

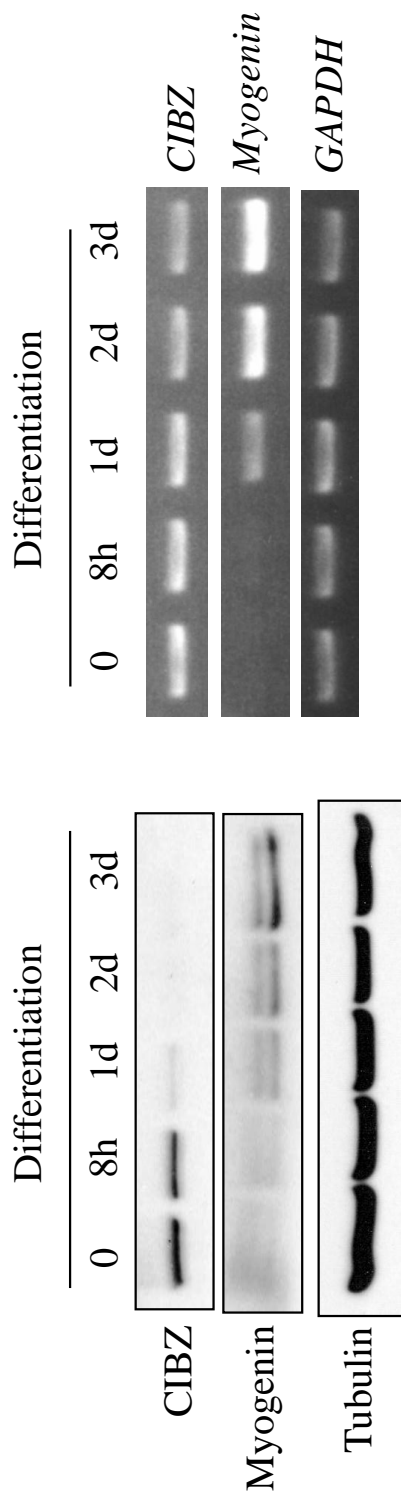


図.8 筋分化の進行に伴ってCIBZタンパク質の発現は減少し、myogenin の発現は上昇する

C2C12 細胞を DM 処理し、筋分化の進行と CIBZ の発現を解析した。DM に交換後図に示した時間に細胞を回収し、ウェスタンブロットティング(左図)と半定量 RT-PCR (右図)でそれぞれの発現量を解析した。図中に示したタンパク質はそれぞれのタンパク質に対する抗体で検出した。筋分化の進行は myogenin の発現上昇によって確認した。 α -Tubulin と glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をそれぞれウェスタンブロットティングと RT-PCR の内部標準とした。

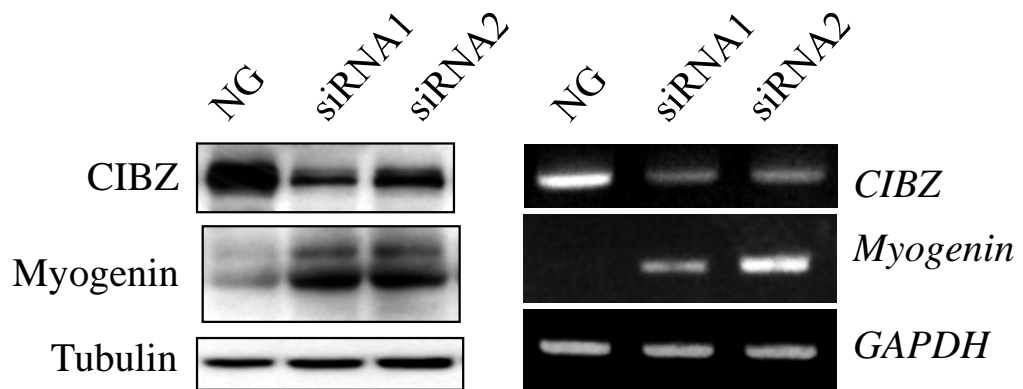


図.9 CIBZ をノックダウンすると myogenin の発現が上昇する

C2C12 細胞に CIBZ 特異的な siRNA またはコントロール siRNA をトランスフェクションし、36時間後に細胞を回収した。ウェスタンブロッティング(左図)と半定量 RT-PCR (右図)でそれぞれの発現を解析した。 α -Tubulin と glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) をそれぞれウェスタンブロッティングと RT-PCR の内部標準とした。

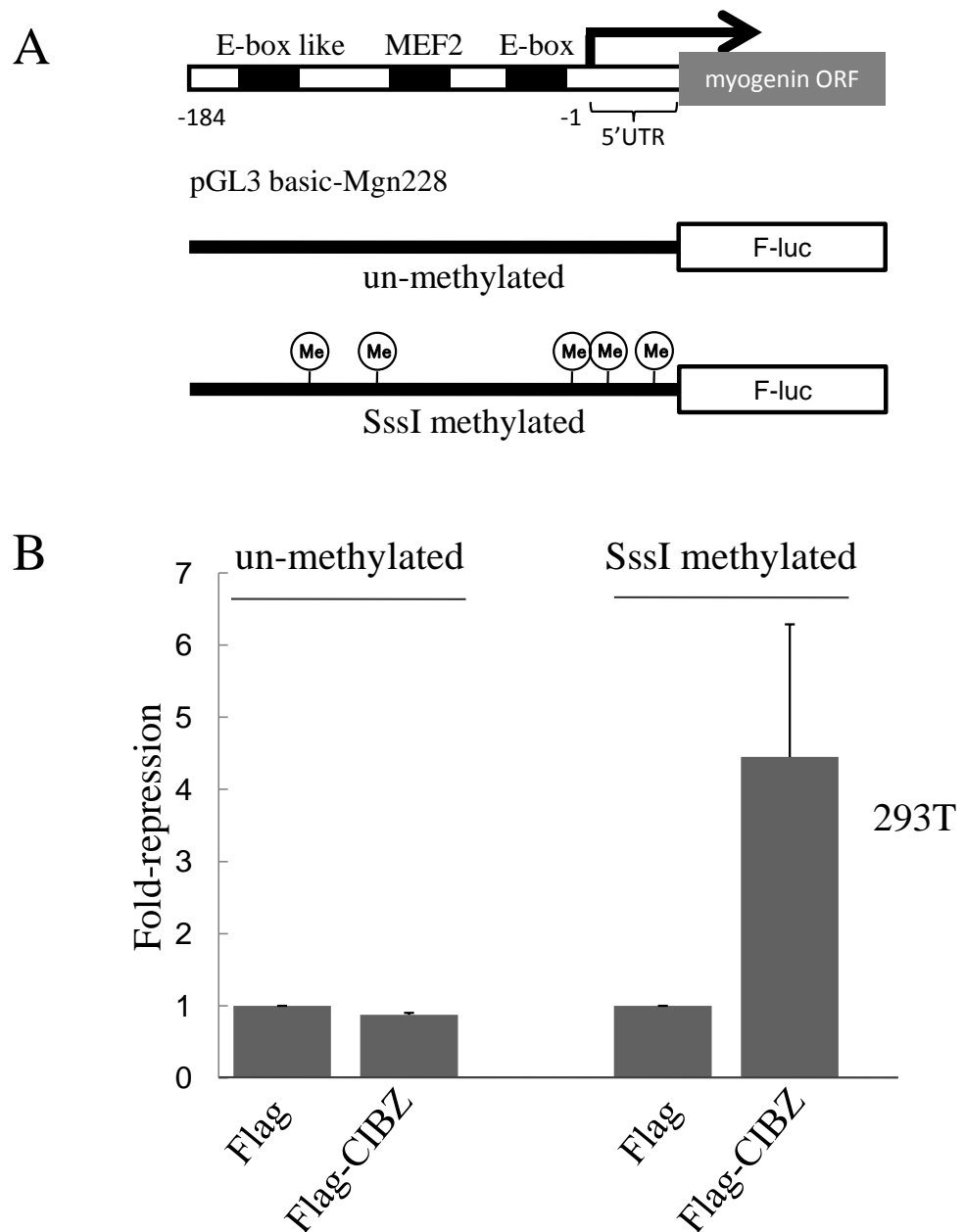


図.10 CIBZ はmyogenin プロモーターをメチル化依存的に抑制する

(A) レポーターアッセイに用いたコンストラクトの模式図を示した。myogenin のコアプロモーター領域(転写開始点上流 184 bp と 5'UTR を含んだ配列) 228 bp を genomic PCR にて増幅し、pGL3 basic ベクターに挿入した (pGL3-Mgn228)。SssI methylase でメチル化されるプロモーター配列内の CpG サイトを図中に示している。

(B) レポーターアッセイの結果を示した。293T 細胞に pGL3-Mgn228、pRL-SV40 (コントロールベクター)、そして Flag または Flag-CIBZ をコトランスフェクションし、24時間後に細胞を回収してルシフェラーゼ活性を測定した。必要に応じて、SssI を用いて *in vitro* で pGL3-Mgn228 をメチル化したものをトランスフェクションに使用した。グラフは、それぞれのルシフェラーゼ活性の値をコントロールベクターの活性で補正し、ベクター毎にCIBZ を加えていない場合の値を1として fold repression を示した。

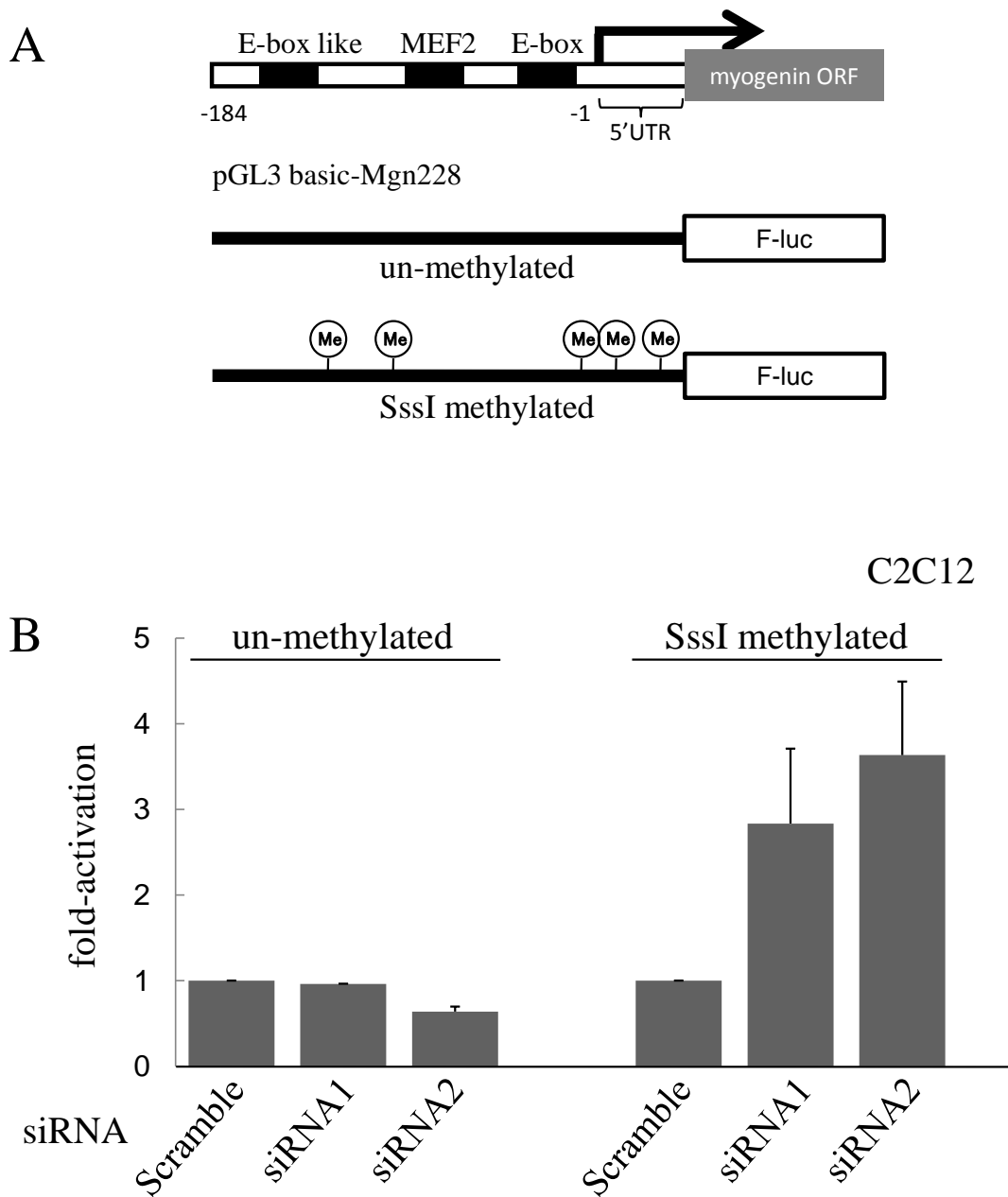


図.11 CIBZ を抑制するとメチル化された myogenin プロモーターが活性化される

(A)レポーターアッセイに用いたコンストラクトの模式図を示した。図.10 と同じものを用いている。

(B)レポーターアッセイの結果を示した。C2C12 細胞に SssI で *in vitro* メチル化した pGL3-Mgn228 と、pRL-SV40、CIBZ 特異的な siRNA①、siRNA② または scramble siRNA をコトランスフェクションした。24時間後に細胞を回収して、ルシフェラーゼ活性を測定した。グラフは、それぞれのルシフェラーゼ活性の値をコントロールベクターの活性で補正し、ベクター毎にscramble siRNAを加えた場合の値を1として fold activation を示した。

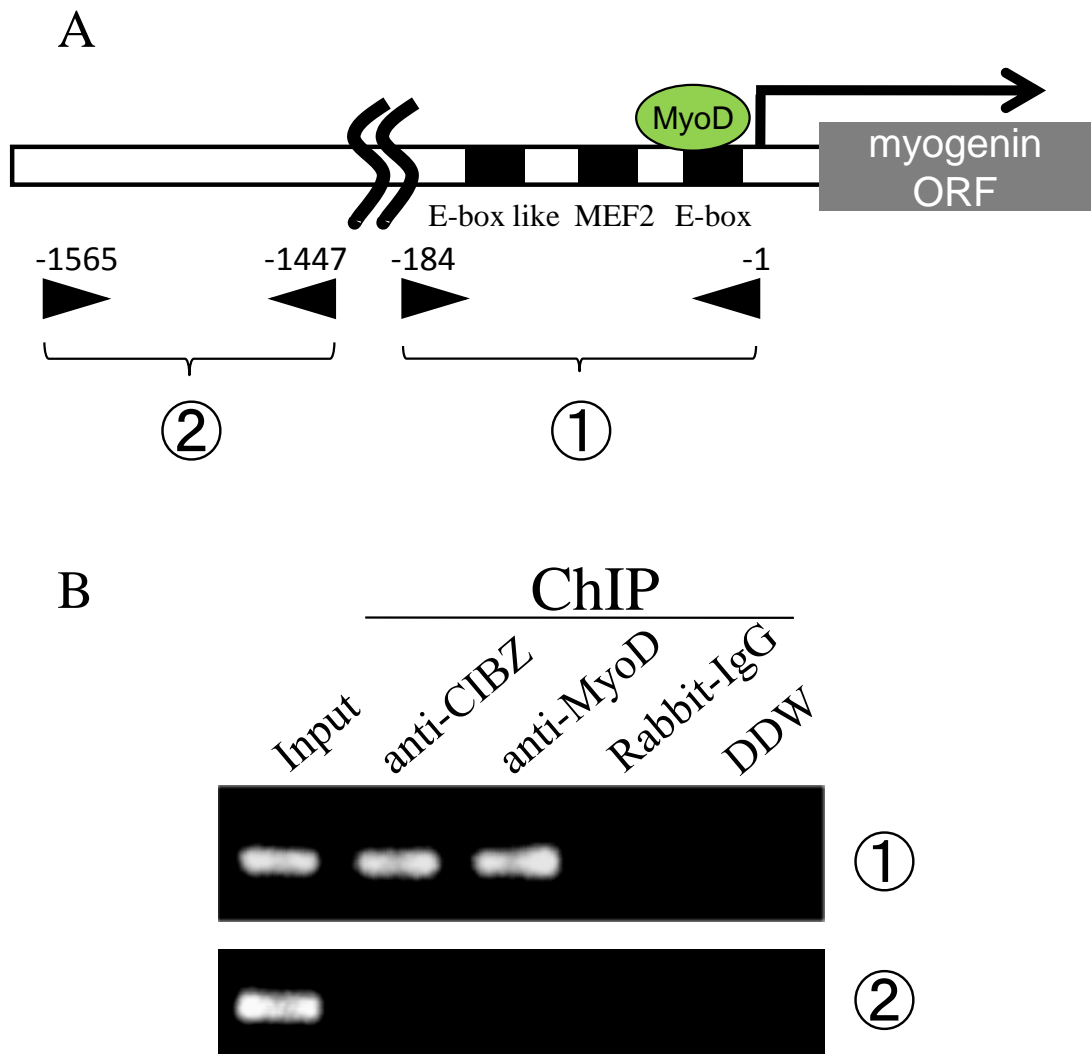


図.12 CIBZ は myogenin プロモーターに結合する

(A) myogenin プロモーターの模式図を示した。コアプロモーターは転写開始点の上流 184 bp から 5'UTR を含んだ計 228 bp である。黒四角はそれぞれ E-box 様配列、MEF2 結合配列、E-box を示している。-1、-184、-1447、-1565 の数字はそれぞれ転写開始点からの距離を表している。黒三角は ChIP アッセイの PCR に用いたプライマーの位置を示している。①はコアプロモーター領域、②は転写開始点上流約 1.5 kb 付近の配列が増幅されるようにプライマーを設計した。

(B) ChIP の結果を示した。GM 中で培養している C2C12 細胞の培養液中にホルムアルデヒドを加えて DNA とタンパク質を架橋したものをサンプルとした。それぞれの抗体は 2 ug 毎使用した。ネガティブコントロールとして、抗体の代わりにウサギ IgG (R-IgG) または抗体の代わりに滅菌蒸留水を入れて免疫沈降した。

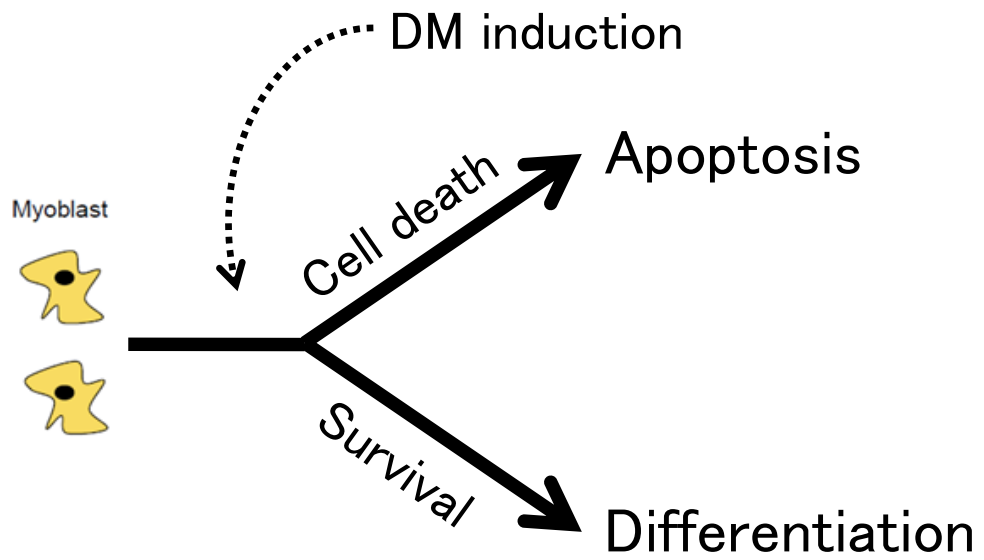


図.13 筋分化誘導によってアポトーシスが生じる細胞と分化する細胞に分かれる

筋芽細胞が分化する際の細胞の挙動の略図を示した。C2C12 細胞を低血清条件下で培養することで、筋芽細胞を筋管細胞へ分化させることが可能である。その際、一部の細胞は分化せずに細胞死が生じる。分化誘導後の生死を分けるメカニズムは明らかになっていないが、筋分化が生じるためには caspase の活性化が重要であることがわかっており、アポトーシスと筋分化は密接に関係している。

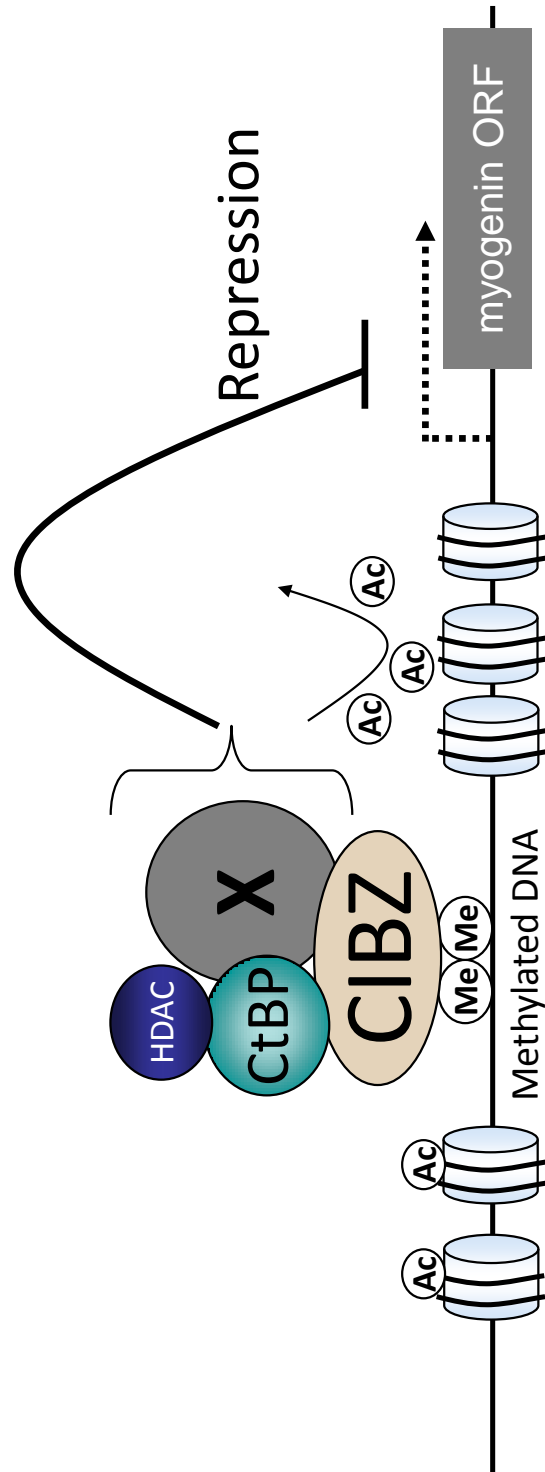


図.14 CIBZ が myogenin プロモーターを制御する機構のモデル

CIBZ による myogenin プロモーターの抑制機構のモデルを示した。筋分化誘導前、myogenin プロモーター領域は高度にメチル化されており、その中のメチル化 CpG に CIBZ が結合する。CIBZ は転写抑制のコンポーネント (CtBP、HDAC など) をリクルートし、転写抑制複合体を形成して、myogenin プロモーターが活性化することを抑えていることが予想される。Me はメチル基、Ac はアセチル基、水色の円柱はヒストン、X は未解明の複合体因子を示している。

4. 考察

4-1. CIBZ によるアポトーシスの制御

アポトーシスの耐性を獲得することは細胞の癌化プロセスの最も典型的な特徴のひとつであり、この場合アポトーシスが誘導されるようなシグナルが伝達されたとしても、細胞は細胞死を起こすことなく生き続けることができる。最もよく知られているアポトーシス促進因子である p53 の変異は癌細胞の代表的な特徴の一つであり、アポトーシスが誘導されなくなることで細胞は死を免れて増殖を続けることが可能になり、結果として癌細胞となる。一方で p53 が関与しないアポトーシスの制御も数多く報告されており (Yee, and Vousden, 2005)、細胞の癌化メカニズムは非常に複雑で完全に解明するのは未だ容易ではない。p53^{-/-} MEF で CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが生じた (図 5) ことは、p53 に依存しない経路でアポトーシスが誘導された結果であり、CIBZ がこの経路に重要な役割を担っていることが示唆された。NIH3T3 細胞で CIBZ をノックダウンしてもアポトーシスは誘導されないが、UV 照射や actinomycin D 処理などのアポトーシス誘導刺激に高い感受性を示すようになることから (data not shown)、CIBZ を抑制することによるアポトーシスへの影響の程度は細胞の種類に依存するものと考えられる。CIBZ をノックダウンするとアポトーシスが誘導される現象を C2C12 細胞と p53^{-/-} MEF で確認できた (図 4、5) ことも考慮すると、CIBZ がアポトーシスの制御を担っているという現象はマウスの細胞で共通しているものと思われる。

当グループでは CIBZ が CtBP と相互作用することを明らかにしており (Sasai, Matsuda, et al, 2005)、CtBP もまた p53 に依存しないアポトーシスの抑制因子として報告されている (Paliwal, Pande, et al, 2006)。このことから、CIBZ と CtBP には共通の標的因子と共通のアポトーシス調節経路が存在していることが考えられる。加えて、caspase-3 の活性化と p21 の発現上昇は、CIBZ のノックダウン (図 4 A) 及び CtBP ノックアウト細胞の解析 (Grooteclaes, Deveraux, et al, 2003; Wang, Iordanov, and Zhang, 2006) の双方で確認されたことから、共通のアポトーシス調節経路の存在が強く示唆される。したがって、p21 は CIBZ と CtBP の共通の標的因子の一つであると推測される。一方で、CtBP のノックアウト細胞ではアポトーシス促進因子 Bax や Noxa の発現増加が確認されているが (Grooteclaes, Deveraux, et al, 2003)、CIBZ のノ

ックダウンでは認められなかった (data not shown)。また、CtBP のノックアウトが caspase-9 や caspase-7 に影響するかどうかは明らかになっていない。さらに、CIBZ のノックダウンで観察される p21 の発現上昇はタンパク質レベルのみだが (図 4 A)、CtBP のノックアウトでは mRNA レベル、タンパク質レベルの双方が影響を受ける (Grooteclaes, Deveraux, et al, 2003)。したがって、CIBZ と CtBP は異なる調節経路でアポトーシスを制御していることも考えられる。CIBZ と CtBP それぞれの報告では異なる細胞種を使用していることもその違いの原因の一つであると考えられる。

CIBZ をノックダウンすると caspase-3、caspase-9、caspase-7 の活性化が認められた一方で、caspase-8 の活性化は確認されなかった (data not shown)。このことより、CIBZ が関連しているアポトーシスはミトコンドリアの経路に依存しているものであると考えられる。Gal4-DNA 結合ドメインを融合させた CIBZ は転写抑制活性を有していることから (Sasai, Matsuda, et al, 2005)、CIBZ はアポトーシス促進因子または抑制因子の発現調節をしていることが考えられた。しかし、C2C12 細胞や p53^{-/-} MEF で CIBZ をノックダウンしても、いくつかのアポトーシス促進因子 (Bax、Bak、Noxa) やアポトーシス抑制因子 (Bcl-2、Mcl-1、Bcl-xL) などの、既知の代表的なアポトーシス関連タンパク質の発現への影響をこれまでに確認できていない (data not shown)。このことから、CIBZ が関連するアポトーシスの調節経路は複雑であることが予想される。ミトコンドリア経路によるアポトーシスにおいて、caspase-3、caspase-9、caspase-7 のインヒビタータンパク質 (IAP: Inhibitor of apoptosis protein) ファミリーの存在が明らかとなっている (Fesik, and Shi, 2001)。また、caspase タンパク質は IAP が Smac/DIABLO や HtrA2/Omi によって阻害されることで活性化されることも知られている (Fesik, and Shi, 2001; Shi, 2004)。今後、CIBZ の抑制がこれらの因子の発現に影響するかどうかを検証する必要がある。

C2C12 細胞と p53^{-/-} MEF において CIBZ を siRNA によって抑制するとアポトーシスが誘導され (図 4、5)、CIBZ がアポトーシス抑制因子として機能していることが示唆された。このことから、CIBZ を過剰発現することでアポトーシス誘導刺激に対して抵抗性を示す可能性が考えられた。しかし、CIBZ の過剰発現が、低血清、UV 照射、actinomycin D 処理などによるアポトーシスの誘導を阻害するという効果は、現在まで確認できていない (data not shown)。これはおそらく、アポトーシス誘導後の CIBZ タンパク質の速やかな分解 (図 3) に起因するもので、CIBZ 自身の翻訳修

飾などが関わっている可能性がある。実際に、当グループでは CIBZ が SUMO (small ubiquitin-like modifier) 化修飾を受けることを明らかにしている (当グループ未発表データ)。CtBP も CIBZ 同様アポトーシスの誘導とともにタンパク質レベルで発現が減少し、過剰発現しただけではアポトーシスを抑制することはできない (Zhang, Yoshimatsu, et al, 2003; Zhang, Nottke, and Goodman, 2005)。しかし、リン酸化サイトである S422 がアラニンに置換されてリン酸化を受けなくなるとプロテアソームにより分解されなくなり、この変異体の過剰発現では効果的にアポトーシスを抑制することが報告されている (Zhang, Yoshimatsu, et al, 2003; Zhang, Nottke, and Goodman, 2005)。

caspase-3 による CIBZ タンパク質の切断は、アポトーシス誘導時における CIBZ タンパク質の発現減少の主要なメカニズムではないことが、以下の点より推測される。

(1) アポトーシスを誘導した後の CIBZ の断片化したバンドをウェスタンブロッティングで検出できなかった。また、N 末端や C 末端に myc タグを付加した CIBZ を過剰発現させた後、アポトーシスを誘導して断片化した CIBZ の抗 myc 抗体による検出を試みたが確認できなかった (data not shown)。(2) caspase-3 による切断を受けない Flag-CIBZ(D618A/D910A) (図 7) を過剰発現してもアポトーシス抑制の効果は確認されず、アポトーシス誘導後はワイルドタイプと同様速やかに分解された (data not shown)。実際に、プロテアソーム阻害因子 MG132 処理を施した培養細胞では、アポトーシス誘導後でも CIBZ の発現低下が確認されなくなったことから (data not shown)、CIBZ の分解は CtBP と同様にプロテアソームによる経路が重要である可能性が考えられる。

CIBZ は caspase-3 の基質であることが新たにわかり (図 6)、SP 領域内にある DFQF⁶¹⁸ 及び DSTD⁹¹⁰ で切断を受けることが明らかとなった (図 7)。これまでに数多くの caspase-3 の基質が報告されており (Fischer, Janicke, and Schulze-Osthoﬀ, 2003)、その多くが切断されることで機能を失うが、中には切断を受けることで新たな機能を発揮できるようになるタンパク質も知られている (Fischer, Janicke, and Schulze-Osthoﬀ, 2003)。CIBZ の SP 領域には核移行シグナルと思われる配列が二つ存在する (845–865 aa と 922–940 aa)。興味深いことに、二つ目の caspase-3 切断サイトである DSTD⁹¹⁰ はこの核移行シグナルの間に存在しており、切断後の断片がアポトーシスに関して何らかの機能を発揮している可能性が考えられる。今後、切断された後のコンストラクトや切断されない変異体を用いた実験により、これらの細胞内局在や転写調

筋活性、アポトーシスの調節、DNA への結合能、タンパク質間相互作用の解析などを検討する必要がある。

4-2. CIBZ による筋分化抑制のメカニズム

細胞が正常に分化するためには、その分化に必要な遺伝子が正確な時期と場所で発現調節を受ける必要がある。遺伝子の発現調節は一般的に転写因子が重要な役割を担っているが、転写因子がどのようにして正確な時期と場所を特定して標的遺伝子を制御しているのかというメカニズムは、いまだ謎が多い。

筋芽細胞 C2C12 細胞は *in vitro* における分化とアポトーシス誘導の系が確立していることから(Kislinger, Gramolini, et al, 2005; Shiokawa, Kobayashi, and Tanuma, 2002)、筋分化の研究分野で多用されてきた細胞のひとつである。筋分化の進行には caspase-3 の活性化が重要であることが明らかになっており、その活性を阻害すると筋分化も阻害されることが報告されている(Fernando, Kelly, et al, 2002)。筋分化の進行に伴って caspase-3 の活性が上昇することから、筋分化とアポトーシスには密接な関係があることが示唆されている。しかし、細胞分化には細胞死が必要という、一見矛盾する二つの現象の詳細な関係は明らかになっていない (図 1 3)。筋芽細胞が筋管細胞に分化する際、個々の細胞が融合して多核細胞を形成することから、この多核細胞の形成段階に caspase-3 の活性が必要であるという仮説が考えられている(Fernando, Kelly, et al, 2002)。

C2C12 細胞で CIBZ をノックダウンすると caspase-3 の活性化が確認されたことから (図 4 A)、CIBZ は筋分化に何らかの機能を発揮している可能性が考えられた。分化誘導前の C2C12 細胞において CIBZ は高い発現を示しており、DM による分化誘導後はタンパク質レベルで速やかに分解される (図 8)。さらに CIBZ をノックダウンすると筋分化マーカータンパク質である myogenin の発現が上昇したことから、CIBZ のタンパク質レベルが筋分化に関係していることが確認された。これまでに多くの転写因子が筋分化に重要であることが報告されており、中でも良く知られているのが、bHLH 型の転写因子ファミリーである MyoD、Myf5、Maf4、myogenin の四つのタンパク質である。その中でも myogenin はノックアウトマウスの解析より、筋不全が原因の呼吸困難により生後まもなく致死となることが明らかとなっている(Pownall, Gustafsson, and Emerson, 2002)。CIBZ を siRNA でノックダウンすることで、

4 因子の中では *myogenin* だけがその発現に変化が認められたことから (図 9、data not shown)、CIBZ は *myogenin* を介して筋分化に重要な役割を担っていることが示唆された。また、CIBZ ノックダウンによる *myogenin* の発現への影響は mRNA レベルでも確認できたことから (図 9)、CIBZ が *myogenin* プロモーターを直接制御している可能性が示された。*myogenin* プロモーターの制御に関する報告は数多くされており、特に MyoD や MEF2C による転写活性化調節がよく知られている (Mal, and Harter, 2003; Potthoff, and Olson, 2007)。また、DNA メチル化が *myogenin* の発現に影響しているとする報告もあり (Lucarelli, Fuso, et al, 2001; Scarpa, Lucarelli, et al, 1996)、分化前は高度にメチル化されている *myogenin* プロモーターが分化後には脱メチル化されていることから、メチル化による発現調節が示唆されている。しかし、これらの報告は脱メチル化剤の影響やゲノムレベルにおけるメチル化状態の変化を解析したものであり、一般的な転写調節機構の理にかなったものではあったが、その詳細なメカニズムに関しては明らかになっていなかった。本研究におけるレポーターアッセイの結果より、CIBZ は *myogenin* プロモーター配列がメチル化されているときのみ、その影響力を発揮できることがわかった (図 10、11)。また、CIBZ タンパク質が *myogenin* プロモーター領域の DNA 配列と相互作用することを明らかにした (図 12)。CIBZ はジンクフィンガーでメチル化 CpG 配列に結合できること及び、転写抑制活性を有していることが確認されている (Filion, Zhenilo, et al, 2006; Sasai, Matsuda, et al, 2005)。これらのことから、分化前の C2C12 細胞における *myogenin* の抑制メカニズムは、CIBZ がメチル化されたプロモーター領域に結合して転写を抑制しているというモデルが示された (図 14)。今後、分化後に *myogenin* プロモーターのメチル化が解除されて実際に CIBZ がこの領域に結合しなくなることを証明する必要がある。

4-3. CIBZ の生理機能

本論文では CIBZ の機能として、アポトーシスの抑制および *myogenin* プロモーターのメチル化依存的な制御による筋分化の抑制という二つの知見を明らかにし、報告した。CIBZ は 1197 アミノ酸からなる比較的分子量の大きいタンパク質で、BTB ドメインやジンクフィンガーモチーフなど転写因子特有の構造を有していることから、発見当初から転写因子として機能しているものと考えられていた (図 1)。当グルー

プは、CIBZ が SV40 プロモーター及び VP16 プロモーターに対する転写抑制活性をもっていることを以前報告している(Sasai, Matsuda, et al, 2005)。本論文で *in vivo* における機能として *myogenin* プロモーターを抑制することを報告した。また、当グループによる解析によって CIBZ は Caspase-3 の調節因子のひとつである XIAP (X-linked inhibitor of apoptosis protein) の転写調節をしていることが明らかになっている(当グループ未発表データ)。さらに、CIBZ の二つのジンクフィンガークラスター間のスペーサー領域 (SP) には転写活性化能を有しており(Sasai, Matsuda, et al, 2005)、これについても実際に CIBZ が Tyrosine hydroxylase プロモーターを活性化することが報告されている(Kiefer, Chatail-Hermitte, et al, 2005)。BTB-zinc finger 型転写因子の中には、標的因子やリクルートする複合体の種類によって転写抑制、転写活性化双方の制御をするタンパク質も知られている(Kaplan, and Calame, 1997)。これらのことから、CIBZ は転写の抑制と活性化双方の機能を担っている“転写因子”として実際に機能していることが示された。

CIBZ は三番目から五番目のジンクフィンガーを用いてメチル化 CpG に結合することが明らかになっており(Filion, Zhenilo, et al, 2006)、*myogenin* プロモーターの制御もこの三つのジンクフィンガーで、メチル化されたプロモーター領域に結合することに依存しているものと思われる。CIBZ と同様の機構で MeCP2 が標的因子の発現を調節して神経細胞の分化調節を行っていることが明らかになっている(Setoguchi, Namihira, et al, 2006)。MeCP2 はアストロサイト特異的な遺伝子 GFAP のエクソン1領域内にあるメチル化された CpG 配列に結合することで、この遺伝子の転写を抑制してアストロサイトへの分化を阻止している(Setoguchi, Namihira, et al, 2006)。したがって、これらの分化調節機構はメチル化 DNA 結合タンパク質の共通した機能であることが予想される。また、CIBZ の発現は各組織でユビキタスであることから(Sasai, Matsuda, et al, 2005)、筋細胞以外の細胞分化にも関与している可能性が示唆される。

これまでの研究より、メチル化 DNA 結合タンパク質は DNA のメチル化や DNA メチル化酵素などと協調して細胞の発生、分化、癌化などに重要な役割を担っていることが報告されている(Clouaire, and Stancheva, 2008; Fatemi, and Wade, 2006)。その他多くのメチル化 DNA 結合タンパク質同様、CIBZ は Dnmt1 と相互作用することを確認している(当グループ未発表データ)。Dnmt1 は G9a、SUV39H1 などのヒストン修飾酵素や LSH といったクロマチンリモデリングタンパク質と相互作用すること

が明らかとなっており (Estève, Chin, et al, 2006; Fuks, Hurd, et al, 2003; Myant, and Stancheva, 2008)、CIBZ もクロマチン関連タンパク質として、ヒストンのメチル化や脱アセチル化、クロマチンリモデリングなどに関わっている可能性が考えられる。また、Dnmt1 が DNA 複製後のメチル化維持を行うためには MeCP2 や NP95 といったメチル化 DNA 結合タンパク質との相互作用によるヘミメチル化部位への結合が必要なことから (Kimura, and Shiota, 2003; Sharif, Muto, et al, 2007)、CIBZ も DNA メチル化維持に何らかの役割を果たしている可能性が考えられる。以上のことから、CIBZ の生理機能は単純に転写調節のみではないことが予想される。

5. 謝辞

本研究を行うに当たり、最高の研究環境と多くの貴重な助言を賜りました川市正史教授に厚く御礼申し上げます。また、研究を進めるに際し、直接御指導いただきました松田永照助教に心から感謝いたします。貴重な助言をいただきました石田靖雅准教授、岡千緒助教、ならびに動物遺伝子機能学講座の皆様に御礼申し上げます。

6. 参考文献

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.

Amir, R.E., Van den Veyver, I.B., Wan, M., Tran, C.Q., Francke, U., and Zoghbi, H.Y. (1999). Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat. Genet.* 23, 185-188.

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

Bellefroid, E.J., Poncelet, D.A., Lecocq, P.J., Revelant, O., and Martial, J.A. (1991). The evolutionarily conserved Krüppel-associated box domain defines a subfamily of eukaryotic multifingered proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88, 3608-3612.

Bernstein, B.E., Meissner, A., and Lander, E.S. (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128, 669-681.

Bestor, T.H. (2000). The DNA methyltransferases of mammals. *Hum. Mol. Genet.* 9, 2395-2402.

Campanero, M.R., Armstrong, M.I., and Flemington, E.K. (2000). CpG methylation as a mechanism for the regulation of E2F activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97, 6481-6486.

CHARGE, S.B.P., and RUDNICKI, M.A. (2004). Cellular and Molecular Regulation of Muscle Regeneration. *Physiol. Rev.* 84, 209-238.

Chen, R.Z., Akbarian, S., Tudor, M., and Jaenisch, R. (2001). Deficiency of methyl-CpG binding protein-2 in CNS neurons results in a Rett-like phenotype in mice. *Nat. Genet.* 27, 327-331.

Chuang, L.S.-., Ian, H., Koh, T., Ng, H., Xu, G., and Li, B. (1997). Human DNA-(Cytosine-5) Methyltransferase-PCNA Complex as a Target for p21WAF1. *Science* 277, 1996-2000.

Clouaire, T., and Stancheva, I. (2008). Methyl-CpG binding proteins: specialized transcriptional repressors or structural components of chromatin? *Cell Mol. Life Sci.* 65, 1509-1509-22.

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.

Costello, J.F., Fruhwald, M.C., Smiraglia, D.J., Rush, L.J., Robertson, G.P., Gao, X., Wright, F.A., Feramisco, J.D., Peltomaki, P., Lang, J.C. *et al.* (2000). Aberrant CpG-island methylation has non-random and tumour-type-specific patterns. *Nat. Genet.* 24, 132-138.

Daniel, J.M., and Reynolds, A.B. (1999). The Catenin p120ctn Interacts with Kaiso, a Novel BTB/POZ Domain Zinc Finger Transcription Factor. *Mol. Cell. Biol.* 19, 3614-3623.

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. U. S. A.* 96, 14831-14836.

Deltour, S., Pinte, S., Guerardel, C., Wasyluk, 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.

Estève, P., Chin, H.G., Smallwood, A., Feehery, G.R., Gangisetty, O., Karpf, A.R., Carey, M.F., and Pradhan, S. (2006). Direct interaction between DNMT1 and G9a coordinates DNA and histone methylation during replication. *Genes Dev.* 20, 3089-3103.

Fatemi, M., and Wade, P.A. (2006). MBD family proteins: reading the epigenetic code. *J. Cell. Sci.* 119, 3033-3037.

Fernando, P., Kelly, J.F., Balazsi, K., Slack, R.S., and Megeney, L.A. (2002). Caspase 3 activity is required for skeletal muscle differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *99*, 11025-11030.

Fesik, S.W., and Shi, Y. (2001). STRUCTURAL BIOLOGY: Controlling the Caspases. *Science* *294*, 1477-1478.

Filion, G.J., Zhenilo, S., Salozhin, S., Yamada, D., Prokhortchouk, E., and Defossez, P.A. (2006). A family of human zinc finger proteins that bind methylated DNA and repress transcription. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 169-181.

Fischer, U., Janicke, R.U., and Schulze-Osthoff, K. (2003). Many cuts to ruin: a comprehensive update of caspase substrates. *Cell Death Differ.* *10*, 76-100.

Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R., and Kouzarides, T. (2003). The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucl. Acids Res.* *31*, 2305-2312.

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. U. S. A.* *100*, 4568-4573.

Guy, J., Hendrich, B., Holmes, M., Martin, J.E., and Bird, A. (2001). A mouse *Mecp2*-null mutation causes neurological symptoms that mimic Rett syndrome. *Nat. Genet.* *27*, 322-326.

Hendrich, B., and Bird, A. (1998). Identification and Characterization of a Family of Mammalian Methyl-CpG Binding Proteins. *Mol. Cell. Biol.* *18*, 6538-6547.

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.

Iguchi-Arigo, S.M., and Schaffner, W. (1989). CpG methylation of the cAMP-responsive enhancer/promoter sequence TGACGTCA abolishes specific factor binding as well as transcriptional activation. *Genes Dev.* 3, 612-619.

Jackson-Grusby, L., Beard, C., Possemato, R., Tudor, M., Fambrough, D., Csankovszki, G., Dausman, J., Lee, P., Wilson, C., Lander, E., and Jaenisch, R. (2001). Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. *Nat. Genet.* 27, 31-39.

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

Jones, P.A., and Baylin, S.B. (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 3, 415-428.

Jost, J., Oakeley, E.J., Zhu, B., Benjamin, D., Thiry, S., Siegmann, M., and Jost, Y. (2001). 5-Methylcytosine DNA glycosylase participates in the genome-wide loss of DNA methylation occurring during mouse myoblast differentiation. *Nucl.Acids Res.* 29, 4452-4461.

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

Kelly, K.F., and Daniel, J.M. (2006). POZ for effect--POZ-ZF transcription factors in cancer and development. *Trends Cell Biol.* 16, 578-587.

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

Kimura, H., and Shiota, K. (2003). Methyl-CpG-binding Protein, MeCP2, Is a Target Molecule for Maintenance DNA Methyltransferase, Dnmt1. *J. Biol. Chem.* 278, 4806-4812.

Kislinger, T., Gramolini, A.O., Pan, Y., Rahman, K., MacLennan, D.H., and Emili, A. (2005). Proteome Dynamics during C2C12 Myoblast Differentiation. *Mol Cell Proteomics* 4, 887-901.

Klose, R.J., and Bird, A.P. (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31, 89-97.

Klug, A., and Schwabe, J. (1995). Protein motifs 5. Zinc fingers. *FASEB J.* 9, 597-604.

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

Long, X., Creemers, E.E., Wang, D., Olson, E.N., and Miano, J.M. (2007). Myocardin is a bifunctional switch for smooth versus skeletal muscle differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104, 16570-16575.

Lucarelli, M., Fuso, A., Strom, R., and Scarpa, S. (2001). The Dynamics of Myogenin Site-specific Demethylation Is Strongly Correlated with Its Expression and with Muscle Differentiation. *J. Biol. Chem.* 276, 7500-7506.

Mal, A., Sturniolo, M., Schiltz, R.L., Ghosh, M.K., and Harter, M.L. (2001). A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *EMBO J.* 20, 1739-1753.

Mal, A., and Harter, M.L. (2003). MyoD is functionally linked to the silencing of a muscle-specific regulatory gene prior to skeletal myogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 1735-1739.

Massari, M.E., and Murre, C. (2000). Helix-loop-helix proteins: regulators of transcription in eucaryotic organisms. *Mol. Cell. Biol.* 20, 429-440.

- 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. U. S. A.* *101*, 4170-4174.
- Myant, K., and Stancheva, I. (2008). LSH Cooperates with DNA Methyltransferases To Repress Transcription. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 215-226.
- Nakagawachi, T., Soejima, H., Urano, T., Zhao, W., Higashimoto, K., Satoh, Y., Matsukura, S., Kudo, S., Kitajima, Y., Harada, H. *et al.* (2003). Silencing effect of CpG island hypermethylation and histone modifications on O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) gene expression in human cancer. *Oncogene* *22*, 8835-8844.
- 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.
- Nan, X., Meehan, R.R., and Bird, A. (1993). Dissection of the methyl-CpG binding domain from the chromosomal protein MeCP2. *Nucl.Acids Res.* *21*, 4886-4892.
- Nguyen, C.T., Gonzales, F.A., and Jones, P.A. (2001). Altered chromatin structure associated with methylation-induced gene silencing in cancer cells: correlation of accessibility, methylation, MeCP2 binding and acetylation. *Nucl.Acids Res.* *29*, 4598-4606.
- Oikawa, Y., Matsuda, E., Nishii, T., Ishida, Y., and Kawaichi, M. (2008). Down-regulation of CIBZ, a novel substrate of caspase-3, induces apoptosis. *J. Biol. Chem.* *283*, 14242-14247.
- 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.
- Paliwal, S., Pande, S., Kovi, R.C., Sharpless, N.E., Bardeesy, N., and Grossman, S.R. (2006). Targeting of C-terminal binding protein (CtBP) by ARF results in p53-independent apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* *26*, 2360-2372.

Potthoff, M.J., and Olson, E.N. (2007). MEF2: a central regulator of diverse developmental programs. *Development* *134*, 4131-4140.

Pownall, M., Gustafsson, M., and Emerson, C. (2002). Myogenic regulatory factors and the specification of muscle progenitors in vertebrate embryos. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *18*, 747-747-83.

Prokhortchouk, A., Hendrich, B., Jørgensen, 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.

Sasai, N., Matsuda, E., Sarashina, E., Ishida, Y., and Kawaichi, M. (2005). Identification of a novel BTB-zinc finger transcriptional repressor, CIBZ, that interacts with CtBP corepressor. *Genes Cells* *10*, 871-885.

Scarpa, S., Lucarelli, M., Palitti, F., Carotti, D., and Strom, R. (1996). Simultaneous myogenin expression and overall DNA hypomethylation promote in vitro myoblast differentiation. *Cell Growth Differ.* *7*, 1051-1058.

Setoguchi, H., Namihira, M., Kohyama, J., Asano, H., Sanosaka, T., and Nakashima, K. (2006). Methyl-CpG binding proteins are involved in restricting differentiation plasticity in neurons. *J. Neurosci. Res.* *84*, 969-979.

Sharif, J., Muto, M., Takebayashi, S., Suetake, I., Iwamatsu, A., Endo, T.A., Shinga, J., Mizutani-Koseki, Y., Toyoda, T., Okamura, K. *et al.* (2007). The SRA protein Np95 mediates epigenetic inheritance by recruiting Dnmt1 to methylated DNA. *Nature* *450*, 908-912.

Shen, X., Collier, J.M., Hlaing, M., Zhang, L., Delshad, E.H., Bristow, J., and Bernstein, H.S. (2003). Genome-wide examination of myoblast cell cycle withdrawal during differentiation. *Dev. Dyn.* *226*, 128-138.

Shi, Y. (2004). Caspase activation, inhibition, and reactivation: a mechanistic view. *Protein Sci.* *13*, 1979-1987.

- Shiokawa, D., Kobayashi, T., and Tanuma, S. (2002). Involvement of DNase gamma in Apoptosis Associated with Myogenic Differentiation of C2C12 Cells. *J. Biol. Chem.* *277*, 31031-31037.
- Tannu, N.S., Rao, V.K., Chaudhary, R.M., Giorgianni, F., Saeed, A.E., Gao, Y., and Raghov, R. (2004). Comparative proteomes of the proliferating C(2)C(12) myoblasts and fully differentiated myotubes reveal the complexity of the skeletal muscle differentiation program. *Mol. Cell. Proteomics* *3*, 1065-1082.
- van Roy, F.M., and McCrea, P.D. (2005). A role for Kaiso-p120ctn complexes in cancer? *Nat. Rev. Cancer.* *5*, 956-964.
- Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., Li, P.W., Mural, R.J., Sutton, G.G., Smith, H.O., Yandell, M., Evans, C.A., Holt, R.A. *et al.* (2001). The Sequence of the Human Genome. *Science* *291*, 1304-1351.
- Wang, S.Y., Iordanov, M., and Zhang, Q. (2006). c-Jun NH2-terminal kinase promotes apoptosis by down-regulating the transcriptional co-repressor CtBP. *J. Biol. Chem.* *281*, 34810-34815.
- Williams, A.J., Khachigian, L.M., Shows, T., and Collins, T. (1995). Isolation and Characterization of a Novel Zinc-finger Protein with Transcriptional Repressor Activity. *J. Biol. Chem.* *270*, 22143-22152.
- Yee, K.S., and Vousden, K.H. (2005). Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis* *26*, 1317-1322.
- Zhang, Q., Nottke, A., and Goodman, R.H. (2005). Homeodomain-interacting protein kinase-2 mediates CtBP phosphorylation and degradation in UV-triggered apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 2802-2807.

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.

Zollman, S., Godt, D., Privé, 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. U. S. A.* *91*, 10717-10721.