

熱ショック蛋白質の機能

Function of heat shock proteins

- 代表者研究 (財)東京都臨床医学総合研究所副所長 矢原 一郎
Vice-Director, The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science
Ichiro YAHARA
- 協同研究者 (財)東京都臨床医学総合研究所 飯田 和子
細胞生物学研究部門研究員
Research Scientist, Dept. of Cell Biology, The Tokyo Metropolitan
Institute of Medical Science
Kazuko IIDA
- (財)東京都臨床医学総合研究所 松本 清治
細胞生物学研究部門研究員
Research Scientist, Dept. of Cell Biology, The Tokyo Metropolitan
Institute of Medical Science
Seiji MATSUMOTO
- (財)東京都臨床医学総合研究所 米原 美奈子
細胞生物学研究部門研究員
Research Scientist, Dept. of Cell Biology, The Tokyo Metropolitan
Institute of Medical Science
Minako YONEHARA
- (財)東京都臨床医学総合研究所 宮田 愛彦
細胞生物学研究部門研究員
Research Scientist, Dept. of Cell Biology, The Tokyo Metropolitan
Institute of Medical Science
Yoshihiko MIYATA
- (財)東京都臨床医学総合研究所 石井 愛
細胞生物学研究部門研究員
Research Scientist, Dept. of Cell Biology, The Tokyo Metropolitan
Institute of Medical Science
Ai ISHII
- Post-doctoral Fellow, University of Chicago 木村 洋子
Yoko KIMURA
- (財)東京都臨床医学総合研究所 南 康文
細胞生物学研究部門研究員
Research Scientist, Dept. of Cell Biology, The Tokyo Metropolitan
Institute of Medical Science
Yasufumi MINAMI

The aims of this research are elucidation of (i) structure and function of the 90-kDa heat shock protein, HSP90, and (ii) structure and function of an actin-binding protein, cofilin.

HSP90 is ubiquitous among all species from bacteria to human. Though HSP90 has been known to interact with various target proteins including steroid hormone receptors and certain protein kinases, structure and function of the protein remained to be investigated. We have elucidated native molecular structures and some domain structures of HSP90. We have found that HSP90 protects casein kinase II, a physiologically key protein kinase, from self-aggregation and inactivation. In addition, we have created temperature-sensitive mutants of HSP90 in the budding yeast and suggested functions of HSP90 from their terminal phenotypes at the restrictive temperature. We have also genetic evidence that YDJ1, another major stress protein, interacts with HSP90 in the expression of the both proteins.

Thermotolerance can be induced to some extents even in the presence of an inhibitor of protein synthesis, suggesting that reorganization of cellular structures such as cytoskeleton might be in part involved in the acquisition of thermotolerance. We found that cofilin, an actin-binding protein, is translocated together with actin from the cytoplasm to the nucleus upon heat-shock. This phenomenon leading to reorganization of the nucleus may be related in the acquisition of thermotolerance. We have shown that cofilin is essential for yeast cells to survive and that hyper-expression of the protein also causes cell death. The nuclear location signal, an actin-binding domain and a phospholipid-binding domain of this protein were identified.

研究目的

ストレスタンパク質はストレスによって変性したタンパク質の再生を促すことによって、細胞をストレスから防御する。さらに、ストレスタンパク質は平常時の細胞でも発現して、タンパク質の folding や細胞内輸送で必須の機能を発揮している。本研究は、主要なストレスタンパク質の中で最もユニークな分子的性質と機能をもつと予想される HSP90 の構造と機能を解明することを第 1 の目的としている。また、ストレス応答には、ストレスタンパク質の発現以外に、細胞構築の改変によって細胞防御に寄与している部分がある。これに関連して、熱ショックによって核内移行する細胞骨格タンパク質コフィリンの構造と機能を明らかにすることを第 2 の目的としている。

研究経過

我々がストレス応答に注目するようになったのは、次の二つの知見による。まず、培養細胞の熱ショック抵抗性変異株を単離したところ、高分子量のストレスタンパク質 HSP90 を高発現する変異株であった (1986)。ついで、HSP90 がアクチン結合タンパク質であることを見だし (1986)、興味のある展開となり、本研究の中心的課題とした。

一方、培養細胞をマイルドな熱ショック処理す

ると、タンパク質合成を抑えた条件でも、ある程度のストレス抵抗性を獲得する。この現象と、その頃我々が見いだした熱ショックによるアクチンの核内移行 (1986)、とが関連する可能性が検討に値すると考え研究を進め、アクチンの核内移行にアクチン結合タンパク質コフィリンが関わることを見いだした (1987)。この問題をさらに追求することを、本研究の第 2 の課題とした。

研究成果

1. HSP90 の分子構造

大部分の HSP90 は 2 量体である

精製したマウス HSP90 を未変性ゲル電気泳動で分離したところ、2 本の 2 量体と 1 本の単量体に分かれた。一方、HSP90 には α と β のアイソフォームがあり、その量比は 4:6 であった。そこで、上記 2 量体と単量体のアイソフォーム組成を以下の実験によって解析した。① 未変性ゲル電気泳動と SDS-PAGE を組み合わせた 2 次元電気泳動、② 未変性ゲルから切り出したバンドのペプチドマップ、③ 同バンドのアミノ酸配列決定。その結果、二つの 2 量体は α/α , β/β のホモ 2 量体であり、単量体は HSP90 β であった。次に、L5178Y 細胞の全抽出液を未変性ゲル電気泳動にかけ、抗マウス HSP90 抗体を用いて免疫ブロッティングを行った。再度、2 本の 2 量体と 1 本の単量体の

バンドが検出され、細胞内においても HSP90 は、 α/α , β/β の 2 量体か β 単量体として存在することが明らかになった。

2 量体形成に必要な HSP90 領域

精製したマウス HSP90 を *m*-カルパインで処理すると限定的に分解され、SDS-PAGE 上で未処理試料より 5~10 K ほど小さい数本のバンドが生成した。どの限定分解物も N 末端アミノ酸配列は未処理使用と同じであったので、C 末端部分が切除されたものである。*m*-カルパイン分解の経時的変化をネイティブ電気泳動により調べたところ、HSP90 α と HSP90 β の 2 量体は共にカルパイン分解によって単量体に解離したことがわかった。したがって、HSP90 は C 末端部分を介して 2 量体を形成していると結論した。

ヒト HSP90 α の cDNA から *in vitro* の転写/ウサギ網状赤血球抽出液によるタンパク質合成を行った。予期したように、HSP90 α は 2 量体を形成した。そこで、HSP90 α の C 末端アミノ酸 50 残基を欠失するように突然変異を導入した cDNA からタンパク質を合成したところ、2 量体は形成されず、単量体のみであった。一方、N 末端から 118 アミノ酸残基を欠失する HSP90 α は 2 量体を形成した。これらの結果から、HSP90 の 2 量体形成に必要な領域は C 末端の数十残基と結論できる。

出芽酵母の HSP90 関連遺伝子は *HSP82* と *HSC82* の二つで、これらのどちらかが発現していないと酵母細胞は生存できない。しかし、ヒト HSP90 α cDNA を酵母 *HSP90* 遺伝子欠損変異株に導入発現させると生育できる。しかし、上記の C 末端領域を欠損したヒト HSP90 cDNA を発現しても酵母の致死性を救うことはできなかった。この結果は、HSP90 の 2 量体化がその機能発現に必要なことを示唆している。

HSP90 のカルモデュリン結合部位とカルシウム結合部位

HSP90 はカルモデュリン結合蛋白質である。まず、 Ca^{2+} に依存してカルモデュリンと化学架橋剤 EDC で架橋される HSP90 α および β の CNBr 断片を同定した。これらの断片は、HSP90

の C 末端から 1/3 の部位にある約 40 アミノ酸残基であった。これらの中には、カルモデュリン結合能を有すると予想される両親媒性の α ヘリックスを形成する 21 アミノ酸残基の配列が含まれていた。化合物化したこれらの配列のペプチドは、 Ca^{2+} に依存してカルモデュリンに結合し、カルモデュリンの HSP90 への結合を阻害した。これらの結果より、この部位で HSP90 はカルモデュリンに結合すると結論した。

HSP90 の二つのアイソフォーム (α と β) の N 末端側にある約 45 kDa の領域にカルシウムが結合することを見いだした。さらに、HSP90 のカルモデュリン結合部位に相当する 21 アミノ酸残基からなる合成ペプチドがカルシウムの HSP90 への結合を阻害した。これはこの合成ペプチドがカルシウムと競合する形で HSP90 に結合したためと推測された。実際に、放射性ラベルした合成ペプチドは HSP90 に結合することを確認した。一方、HSP90 は 43°C に加温すると多量体を形成し、カルシウムはこの反応を促進するが、合成ペプチドにも促進活性があった。したがって、多量体形成につながる HSP90 の高温下での構造変化に、カルモデュリン結合部位とカルシウム結合部位が密接に関わっていると考えられる。一つの可能性として、二つの部位が HSP90 分子内で結合しており、この分子結合の解除が多量体形成をもたらすのではないかと推測される。

HSP90 の多量体形成

精製した HSP90 を 43°C に加温すると、高分子量の多量体が形成された。多量体形成は、Triton X-100、ホスファチジルイノシトール、リゾホスファチジルエタノールアミンによって促進された。 Ca^{2+} イオンは促進的であったが、さらにカルモデュリンを加えると、多量体形成は抑制された。

2. HSP90 の分子機能

ステロイドホルモン受容体-HSP90 複合体とアクチンとの結合

molybdate 存在下に調製した培養細胞粗抽出液中で 8 S グルココルチコイド受容体 (GR) (GR-HSP90 複合体) は重合アクチンと結合し、

一方 HSP90 を含まない 4 S 受容体はアクチンに結合しないことを見いだした。次に、ラット肝臓から phosphocellulose, DEAE-Sepharose, Superdex-200 ゲルろ過の 3 種のカラムクロマトグラフィーによって GR を部分精製した。この分画はアクチンを含まず、GR は HSP90 を含む 8 S タイプであった。この分画中の 8SGR を放射性ステロイドで標識しウサギ骨格筋アクチンと混合すると、受容体はアクチン濃度依存的に重合アクチンと結合した。この結合は、精製 HSP90 やトロポミオシン添加により完全に抑制された。また、カルモデュリンは Ca^{2+} 依存的にこの結合を阻害した。これらの性質は *in vitro* の HSP90 とアクチンの結合の性質と同じである。これらの結果は、GR-HSP90 複合体が HSP90 を介してアクチンと結合することを示唆する。細胞内でも GR は HSP90 を介してアクチンと結合しており、GR が細胞骨格にアンカーとすることが、リガンドが結合していない GR が細胞質に留まる理由と考えられる。

カゼインキナーゼ II(CKII) と HSP90 の複合体形成

電気泳動上単一バンドにまで精製した HSP90 フラクシオンに、HSP90 自身をリン酸化するキナーゼが含まれていることを見いだした。このキナーゼは heparin-Sepharose または phosphocellulose 樹脂に吸着し、HSP90 と分離可能であった。このキナーゼ活性は、(1) mM オーダーの Mg^{2+} または Mn^{2+} を要求する；(2) GTP を ATP とほぼ同程度にリン酸供与体として利用できる；(3) 低濃度のヘパリンによって抑制される；(4) ポリリジンによって活性化される；(5) カゼインキナーゼ II(CK II) 特異的な基質ペプチドを基質とするなどの性質を持っていた。これらの結果に基づき、このキナーゼが、遺伝子発現に関与する様々な核内蛋白質をリン酸化することで生理的に重要な役割を担っていると考えられる CK II であると結論した。HSP90 の精製の各過程で、HSP90 と CK II は、常にほぼ同位置に検出されるので、CK II は HSP90 と複合体を形成して共精製されると考えられる。

さらに、低塩濃度バッファー中で培養細胞粗抽出液から HSP90 を免疫沈降すると、CK II が共沈降することを活性ゲル内リン酸化法によって示した。同抽出液中では CK II は 8 S の沈降係数の単一のピークを示す複合体として存在していたが、この複合体の沈降ピークは抗 HSP90 抗体によって重い方へシフトした。以上の結果は細胞粗抽出液中で、CK II が HSP90 と複合体を形成していることを示している。

ブタ精巢から精製した CK II は高塩濃度溶液中で 6 S の $\alpha_2\beta_2$ テトラマーとして存在する。この CK II は低イオン強度下で会合して集合塊を形成するが、HSP90 を加えると集合塊は解離し、8 S の HSP90-CK II 複合体が再構成された。同時に HSP90 は CK II の活性を上昇させた。したがって、HSP90 は CK II の正常なコンフォメーションを安定に保持する機能を果たしており、その細胞内局在や活性制御に関与していると考えられる。

CK II は触媒サブユニット $\alpha\cdot\alpha'$ と機能不明の β サブユニットから成る。精製 CK II は低イオン強度下では自己会合して大きな会合体を形成した。CK II の会合体に HSP90 を加えると、会合体は解離し、沈降係数 8 S の CK II-HSP90 複合体を生成した。また、HSP90 は CK II の α サブユニットに結合することをメンブレンオーバーレイ法によって示した。

生理的条件下で HSP90 は CK II の安定化に必要である

精製した CK II は低イオン強度や高温などの条件下で自己会合しアグリゲートを形成する。そこに、細胞内で CK II と複合体を形成している HSP90 を加えると CK II-HSP90 複合体が再構成され、それに伴い CK II のアグリゲートが解離し、活性化された。生理的な温度、イオン環境で CK II は沈澱形成し、失活する。この CK II の不溶化と失活を HSP90 は複合体を形成することによって予防する。従来の分子シャペロンの定義は「蛋白質のフォールディングやアセンブリー形成を寄り添って補助するが、最終的構造には含まれていない蛋白質」(Ellis) である。HSP90 はこの概念に

は相当しないが (CK II が働くときも結合している), HSP90 の CK II に対する作用は広義のシャペロン機能の発現というべきであろう。一方, CK II α は DNA・ヘパリン結合能を持つが, CK II の DNA 結合能は HSP90 によって, HSP90 結合能は DNA によって, いずれも部分的に阻害された。ヘパリンは CK II の HSP90 結合能を完全に阻害した。DNA・ヘパリン・HSP90 は CK II α 上で近傍に結合するが, CK II 活性に異なる作用を及ぼすことがわかった。

HSP90 遺伝子に変異をもつ酵母温度感受性変異株

一方, 出芽酵母の二つの HSP90 関連遺伝子, HSP82 および HSC82 の中, HSC82 を破壊し, HSP82 に突然変異を導入し, 五つの温度感受性変異株をプラスミッド・シャッフリング法によって作製した。これらの変異はすべて点変異で, それぞれ 1 アミノ酸置換を引き起こしていた。これらの点変異は三つの部位に局在し, それぞれの変異株は制限温度下において特有の表現型を示した。これらの結果は, HSP82 分子が少なくとも三つの機能ドメインからなることを示唆する。しかし, これらの温度感受性変異株の間に相補性は認められなかったため, ドメイン間には相互依存性があると考えられる。変異株の一つは, 制限温度下で, G1 期が長くなり DNA 合成が顕著に阻害され, 出芽した芽の形態や核の配置にも異常が見られた。また, 通常の生育温度で, 耐熱性を獲得している変異株もあった。

さらに, これらの HSP82 温度感受性変異株と合成致死変異 (synthetic lethal mutation) を起こす第 2 の変異遺伝子 (*slhl*) の単離を試みた。その候補となる遺伝子を単離したところ, HSP82 とは独立に分離するので別の遺伝子に起こった変異であることが明らかとなった。この合成致死変異を抑圧する遺伝子を centromere plasmid library と multi-copy plasmid library をスクリーニングしてそれぞれ一つ得た (HSP82 と HSC82 以外の)。前者のライブラリーより YDJ1, 後者のライブラリーより SISI 遺伝子を得た。どちらも, 大腸菌のストレスタンパク質 DnaJ の同族タンパ

ク質をコードしている遺伝子である。遺伝的手法によって, *SLHI* 遺伝子が YDJ1 であることを証明した。この結果は, HSP82 (あるいは HSC82) が YDJ1 と同一の反応を分担しているか, 両者の複合体を形成して機能しているかのいずれかを示唆している。

HSP90 の (狭義の) 分子シャペロン機能の検討

HSP90 にもいわゆる分子シャペロン機能があるかどうかを検討するために, 6 M グアニジン塩酸によりアンフォールドさせたジヒドロ葉酸還元酵素 (DHFR) との結合を調べた。希釈により, DHFR はそれ自身でリフォールドして酵素活性を回復するが, GroEL (大腸菌の HSP60 に相当する) を加えるとアンフォールドした DHFR が GroEL に結合して, リフォールディングが阻害されることが報告されている。変性させた DHFR にネイティブな HSP90 をそのまま加えても何の変化もなかったが, 多量体形成が起こる程度に晒した HSP90 は, 濃度依存的に DHFR のリフォールディングを阻害した。さらに, そこに GroE 複合体 (GroEL と GroES) を加えると, ATP 依存的に DHFR がリフォールドして活性を発現した。したがって, 高温条件では HSP90 は構造変化 (前項を参照) を起こして分子シャペロン機能を獲得し, アンフォールドしたタンパク質に結合するが, その結合は少なくとも GroE 存在下には再びフォールディングできるような可逆性を保持していることを示唆しており, ストレス条件下での HSP90 の機能を考える上で重要である。実際, NRK 細胞の粗抽出液と HSP90 を混合して加温すると, 複数のタンパク質が多量体化した HSP90 と結合することが確かめられた。

3. ストレスによって核内移行するアクチン結合タンパク質コフィリンの構造と機能

コフィリンの核内移行シグナル様の配列の解析

コフィリンの熱ショックによる核内移行の機構を明らかにすることを目的として, 正常および改変組換え体コフィリンを安定に発現するマウス C3H-2K 細胞形質転換株を作製した。組換え体コフィリンの cDNA と, その核移行シグナル様配列 (KKRKK) を (KTLKK) に改変した cDNA と

をβアクチンプロモーターの下流に連結し、ネオマイシン耐性遺伝子とともにマウス C3H-2K 細胞に導入し、安定な G418 耐性形質転換体を多数得た。組換え体コフィリンの発現量は、内在性コフィリンと同程度かそれ以下であった。組換え体コフィリンの C3H-2K 細胞内での挙動を調べた結果、KKRKK の部分を改変したコフィリンは、熱ショックによって核内移行せず、この配列が核内移行に必要なものであることが明らかになった。

酵母コフィリン遺伝子の単離

分子遺伝学的解析が容易な酵母 *Saccharomyces cerevisiae* よりコフィリン遺伝子をクローニングした。酵母細胞の抽出液より、アクチン結合活性を有する DNaseI のアフィニティカラムに特異的に結合する 1.8 K のタンパク質を精製した。その部分アミノ酸配列をもとに混合オリゴヌクレオチドを合成し、酵母全遺伝子ライブラリーをスクリーニングして酵母コフィリン遺伝子 *yCOF1* を得た。DNA の塩基配列から推定した酵母コフィリン蛋白質は、143 残基のアミノ酸よりなり、高等動物のコフィリンのアミノ酸配列とのホモロジーは約 40% (相同も含めると約 70%) であった。Southern 解析の結果、*yCOF1* 遺伝子は酵母ハプロイド当たり 1 コピーであった。遺伝子破壊の結果、*yCOF1* 遺伝子は酵母の生育にとって必須であることがわかった。

次に組換え型 (ブタ) コフィリンおよびデストリンの cDNA が、酵母の *COF1* の欠損を相補することを明らかにした。また、GAL1 プロモーターの系を用いてコフィリンを欠乏させた酵母細胞は、小さな芽を出したところで増殖を停止することを明らかにした。そのような酵母細胞の核を DAPI を用いて染色したところ、母細胞に 2 個の核がある細胞が高頻度で見いだされた。この結果は、コフィリンは芽の成長と核の出芽部位への移行に関与していることを示唆するものである。

COF1 を組み込んだプラスミドをヒドロキシアミンで処理し、*COF1* を破壊した一倍体の酵母に導入し増殖が高温感受性となる株を選択することにより、酵母コフィリンの高温感受性変異体を 2 種類得た。2 種類とも、ブタコフィリンについて

の研究から明らかにされた、アクチン及びポリホスホイノシチドとの結合部位のごく近傍にアミノ酸の変異が生じていた。この結果は、アクチン、あるいは、ポリホスホイノシチドとの結合が、コフィリンの酵母細胞内での機能に重要であることを示している。

今後の課題と発展

HSP90 の構造と機能

1) HSP90 の分子作用を明らかにするために、HSP90 が標的タンパク質と結合する領域を決定しなければならない。

2) カゼインキナーゼ II のように単独だと生理的条件下でも不安定で、いつも HSP90 の作用を必要とするタンパク質を広く検索する必要がある。

3) 遺伝学的手法で HSP90 と YDJ1 (HSP40) が相互作用する可能性を指摘したが、HSP90 は HSP70 などとも結合する。ストレスタンパク質がチームワークを組んで機能している可能性を探る。

4) HSP70 や HSP60 と違って、HSP90 は高温処理すると初めて発現するシャペロン機能がある。この現象の生理的意義を明らかにする。

5) HSP90 のトランスジェニックマウスを作成し、生体における機能解明の手がかりとする。

コフィリンの構造と機能

1) 出芽酵母の *COF1* 温度感受性変異株を使って、*COF1* タンパク質の作用を推定する研究を行う。Suppressor や synthetic lethal mutations を単離する。

2) コフィリンの分子機能がリン酸化によって制御されている可能性を追求する。

3) コフィリンの 3 次構造を NMR によって決定し、分子機能との関わりを検討する。

4) コフィリンは欠乏しても、過剰に発現しても細胞は死滅する。この現象をさぐるために、各種のプロモーターを使ったトランスジェニックマウスを作る。

発表論文リスト

1. HSP90 の構造と機能について

- 1) Yahara, I., Miyata, Y., Minami Y., Kimura, Y.,

- Matsumoto, S., Koyasu, S., Yonezawa, N., Nishida, E., and Sakai, H.: HSP90, a carrier of key proteins that regulate cell function. *In Heat Shock* (eds. Maresca, B. and Lindquist, S.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 118-122 (1991).
- 2) Yahara, I., Koyasu, S., Iida, K., Iida, H., Matsuzaki, F., Matsumoto, S., and Miyata, Y.: Cell growth, cytoskeleton and heat shock proteins. *In Results and Problems in Cell Differentiation; Heat Shock and Development* (eds. Hightower, L. and Nover, L.), Springer-Verlag, Heidelberg, pp. 210-216 (1991).
 - 3) Kimura, Y., Taniguchi, T., and Yahara, I.: An alteration in molecular form associated with activatin of human heat shock factor. *Cell Struct. Funct.*, **16**(3): 263-271 (1991).
 - 4) Minami, Y., Kawasaki, H., Miyata, Y., Suzuki, K., and Yahara, I.: Analysis of native forms and isoform compositions of the mouse 90-KDa heat shock protein, HSP90. *J. Biol. Chem.*, **266**(16): 10099-10103 (1991).
 - 5) Miyata, Y., and Yahara, I.: Cytoplasmic 8S-glucocorticoid receptor binds actin filaments through the HSP90 moiety. *J. Biol. Chem.*, **266**(14): 8779-8783 (1991).
 - 6) Miyata, Y., and Yahara, I.: The 90-kDa heat shock protein, HSP90, binds and protects casein kinase II from self-aggregation and enhances its kinase activity. *J. Biol. Chem.*, **267**(10): 7042-7047 (1992).
 - 7) Takemoto, H., Yoshimori, T., Yamamoto, A., Miyata, Y., Yahara, I., Inoue, K., and Tashiro, Y.: Heavy chain binding protein (BiP/GRP78) and endoplasmic reticulum are exported from the endoplasmic reticulum in rat exocrine pancreatic cells, similar to protein disulfide-isomerase. *Archiv. Biochem. Biophys.*, **296**(1): 129-136 (1992).
 - 8) Minami, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Yahara, I.: The calmodulin-binding domain of the mouse 90-kDa heat shock protein. *J. Biol. Chem.*, **268**: 9604-9610 (1993).
 - 9) Kimura, Y., Matsumoto, S., and Yahara, I.: Temperature-sensitive mutants of *hsp82* of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, in press (1993).
 - 10) Minami, Y., Kimura, Y., Kawasaki, H., Suzuki, K., and Yahara, I.: The carboxy-terminal region of mammalian HSP90 is required for its dimerization and function *in vivo*. *Mol. Cell. Biol.*, in press (1994).
2. コフィリンの構造と機能について
- 1) Moriyama, K., Nishida, E., Yonezawa, N., Sasaki, H., Matsumoto, S., Iida, K., and Yahara, I.: Destrin, a mammalian actin-depolymerizing protein, is closely related to cofilin—Cloning and expression of porcine brain destrin cDNA. *J. Biol. Chem.*, **265**(10): 5768-5773 (1990).
 - 2) Moriyama, K., Matsumoto, S., Nishida, E., Sakai, H., and Yahara, I.: Nucleotide sequence of mouse cofilin cDNA. *Nucl. Acid Res.*, **18**(10): 3053 (1990).
 - 3) Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Yahara, I., and Sakai, H.: Inhibition of the interaction of cofilin, destrin, and deoxyribonuclease I with actin by phosphoinositides. *J. Biol. Chem.*, **265**(15): 8382-8386 (1990).
 - 4) Natori, S., and Yahara, I.: Cytochalasins. *In Mycotoxins and Phytoalexins in Human and Animal Health. Part 1. Mycotoxins* (eds. Pharma, R. P. and Salunkhe, D. K.), CRC Press, Inc., pp. 291-336 (1990).
 - 5) Yonezawa, N., Nishida, E., Iida, K., Kumagai, H., Yahara, I., and Sakai, H.: Inhibition of actin polymerization by a synthetic dodecapeptide patterned on the sequence around the actin-crosslinking site of cofilin. *J. Biol. Chem.*, **266**(16): 10485-10498 (1991).
 - 6) Yonezawa, N., Homma, Y., Yahara, I., Sakai, H., and Nishida, E.: A short sequence responsible for both phosphoinositide-binding and actin-binding activities of cofilin. *J. Biol. Chem.*, **266**(26): 17218-17221 (1991).
 - 7) Iida, K., Matsumoto, S., and Yahara, I.: The KKRRKK sequence is involved in heat shock-induced nuclear translocation of the 18-kDa actin-binding protein, cofilin. *Cell Struct. Funct.*, **17**: 39-46 (1992).
 - 8) Moriyama, K., Yonezawa, N., Sakai, H., Yahara, I., and Nishida, E.: Mutational analysis of an actin-binding site of cofilin and characterization of chimeric proteins between cofilin and destrin. *J. Biol. Chem.*, **267**(11): 7240-7244 (1992).
 - 9) Iida, K., Moriyama, K., Matsumoto, S., Nishida, E., and Yahara, I.: Isolation of a yeast essential gene, *COF1*, that encodes a homologue of mammalian cofilin, a low-*M_r* actin-binding and depolymerizing protein. *Gene*, **124**: 115-120 (1993).