チロシン脱リン酸化の強力な阻害による核内及び紡錘糸とリソソーム上での新規チロシンリン酸化シグナルの発見

山口 直人

Novel Tyrosine Phosphorylation Signals in the Nucleus and on Mitotic Spindle Fibers and Lysosomes Revealed by Strong Inhibition of Tyrosine Dephosphorylation

Naoto Yamaguchi

Laboratory of Molecular Cell Biology, Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Chiba University; Inohana 1-8-1, Chuo-ku, Chiba 260-8675, Japan.

(Received March 7, 2021)

Protein-tyrosine phosphorylation is one of the posttranslational modifications and plays critical roles in regulating a wide variety of cellular processes, such as cell proliferation, differentiation, adhesion, migration, survival, and apoptosis. Protein-tyrosine phosphorylation is reversibly regulated by protein-tyrosine kinases and protein-tyrosine phosphatases. Strong inhibition of protein-tyrosine phosphatase activities is required to undoubtedly detect tyrosine phosphorylation. Our extremely careful usage of Na_3VO_4 , a potent protein-tyrosine phosphatase inhibitor, has revealed not only the different intracellular trafficking pathways of Src-family tyrosine kinase members but also novel tyrosine phosphorylation signals in the nucleus and on mitotic spindle fibers and lysosomes. Furthermore, despite that the first identified oncogene product v-Src is generally believed to induce transformation through continuous stimulation of proliferation signaling by its strong tyrosine kinase activity, v-Src-driven transformation was found to be caused not by continuous proliferation signaling but by v-Src tyrosine kinase activity-dependent stochastic genome alterations. Here, I summarize our findings regarding novel tyrosine phosphorylation signaling in a spatiotemporal sense and highlight the significance of the roles of tyrosine phosphorylation in transcriptional regulation inside the nucleus and chromosome dynamics.

Key words—tyrosine phosphorylation; Src; Abl; nucleus; Golgi; trafficking

1. はじめに

1-1. 筆者が辿った分子細胞生物学への道のり

筆者は千葉大学薬学部薬物学教室（北川晴雄教授主宰）で卒研テーマ「ラット肝臓の薬物代謝酵素チトクロム P450 の精製」という生化学・酵素学に関した研究をスタートした。そして、東京大学大学院生命薬学研究科生体異物免疫化学教室（大澤利昭教授主宰）で修士・博士課程テーマ「レクチンによる免疫系細胞活性化現象の研究」を行い、^{1,2)} 次に、摂南大学薬学部生化学教室（伊藤文昭教授主宰）助手として、上皮成長因子 (epidermal growth factor; EGF) のシグナル伝達の研究に従事し、^{3,4)} その間、

京都大学ウイルス研究所細胞ウイルス学部門（川出由己教授主宰）でインターフェロンの抗ウイルス作用発揮に関するシグナル伝達研究の研鑽を積んだ。その後、熊本大学医学部附属免疫医学研究施設生物学部門（高津聖志教授主宰）助手として、サイトカインの一種であるインターロイキン 5 の機能及びその受容体の同定とシグナル伝達に関する研究を行った。⁵⁻²⁹⁾ 続いて、米国 Dana-Farber Cancer Institute/Harvard Medical School 免疫学研究室（Cox Terhorst 教授主宰）博士研究員として T リンパ球活性化機構の研究を経て、米国 La Jolla Cancer Research Foundation（現 Sanford Burnham Prebys Medical Discovery Institute）糖鎖生物学研究室（Michiko N. Fukuda 教授主宰）博士研究員として、ガラクトース糖転移酵素のゴルジ装置局在化機構の研究を行った。^{30,31)} 米国留学後、熊本大学医学部附属遺伝発生医学研究施設分化制御学部門（須田年生

千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学研究室
(〒260-8675 千葉市中央区亥鼻 1-8-1)

e-mail: nyama@faculty.chiba-u.jp

本総説は、2019 年度退職にあたり在職中の業績を中心に記述されたものである。

Fig. 1. Reversible Regulation of Protein-tyrosine Phosphorylation

Protein-tyrosine kinases recognize the amino acid sequences flanking the tyrosine residues. Introduction of phosphate ions to tyrosine residues (phospho-tyrosine; pTyr) induces conformational changes in kinase substrates due to the negative charge, and pTyr serves as a binding site for signaling proteins that contain a protein module of the SH2 domain.

教授主宰) 助手・助教授として、血液細胞におけるチロシンリン酸化シグナルの研究を行った。³²⁻⁴³⁾ そして、静岡県立大学薬学部放射薬品学/医薬生命化学教室 (奥 直人教授主宰) 助教授として、リポソームを用いたがんの drug delivery system 研究に従事した。⁴⁴⁾ 筆者は 2000 年から千葉大学薬学部教授として自ら研究室を主宰する立場になり、上述の 9 名の教授によるご指導の下で得た貴重な経験をすべて注ぎ込み、筆者自身の感性を信じて「独自の視点を持つ細胞内シグナル伝達の分子細胞生物学的研究」を推進した。

1-2. 細胞内シグナル伝達の分子細胞生物学的研究とは ヒトは約 37 兆個の細胞で構成されていると言われており、核にはタンパク質コード遺伝子が約 2 万個とタンパク質非コード遺伝子が約 2 万 5 千個収納されている。⁴⁵⁾ その DNA 暗号に基づき RNA 及びタンパク質が作られ生命活動が営まれており、そして、生命活動は様々な分子反応によって巧妙に調節されている。その中でも、チロシンリン酸化反応は生命活動に係わる基本的な制御機構の 1 つであることがはっきりしてきた。ヒトには 90 種のチロシンリン酸化酵素 (チロシンキナーゼ) と 107 種のチロシン脱リン酸化酵素 (チロシンホスファターゼ) が存在し、チロシンリン酸化酵素と脱リン酸化酵素は高等生物特有のシグナル伝達分子である。^{46,47)}

チロシンリン酸化酵素は、細胞膜を貫通する受容体型と細胞質内に存在する非受容体型に大別され、主に細胞膜とその直下辺りの細胞質に位置し、外界の刺激に応答して、細胞膜とその近傍の基質タンパク質の特定チロシン残基にリン酸基を脱水縮合させる「リン酸エステル化」を触媒する (Fig. 1)。負

電荷を持つリン酸基の付加は、基質タンパク質の高次構造を変化させ活性化を誘導し、SH2 ドメインを持つシグナル分子との複合体を形成するなど、シグナル伝達に重要な役割を果たしている。⁴⁸⁻⁵⁰⁾ ヒトゲノムにコードされる 518 種のリン酸化酵素のうち 90 種がチロシンリン酸化酵素であるが、その内訳は 58 種の受容体型チロシンリン酸化酵素と 32 種の非受容体型チロシンリン酸化酵素である。そして、それぞれのチロシンリン酸化酵素はチロシン残基周辺のアミノ酸配列の違いを認識して基質特異性を発揮する (Fig. 1)。^{46,47,51)} チロシンリン酸化シグナルは、チロシンリン酸化酵素活性とチロシン脱リン酸化酵素活性のバランスにより、細胞の増殖・分化・形態変化・運動・代謝・転写・神経伝達・成長と老化など広範囲な細胞機能の可逆的調節に係わっており、その異常は、がん・動脈硬化・自己免疫疾患・糖尿病などの様々な疾患の原因となっている。^{51,52)}

例えば、がんは無秩序な無限増殖能や浸潤・転移能を獲得するが、がん原遺伝子やがん抑制遺伝子などの融合遺伝子形成を含む遺伝子変異 (塩基置換・塩基欠失・塩基重複・塩基挿入・染色体逆位・染色体重複・染色体転座などが原因) によって生ずる細胞内シグナル伝達異常に起因する「遺伝子の病気」

山口直人

千葉大学薬学部卒業後、東京大学大学院薬学系研究科修士・博士課程修了。摂南大学薬学部助手、熊本大学医学部免疫医学研究施設助手、ハーバード大学及びラホヤ癌研究所博士研究員、熊本大学医学部遺伝発生医学研究施設助手・助教授、静岡県立大学薬学部助教授を経て、2000 年千葉大学薬学部教授、2020 年定年退職。現在、千葉大学名誉教授。

であることが分かってきた。^{53,54)} 種々のヒトがん細胞において、90 種のチロシンリン酸化酵素のうち少なくとも 51 種に遺伝子変異が検出され、恒常的活性化型のがん遺伝子に変化させる。^{51,54)} チロシンリン酸化シグナルの研究は、「生命活動の理解」のみならず「新たながん治療薬の開発」につながる。実際、がんの分子標的薬として、様々なチロシンリン酸化酵素に対する阻害薬が数多く開発されている。⁵⁵⁾

1979 年にチロシンリン酸化反応が発見^{56,57)} されて以来、世界中で精力的な研究が行われてきたとは言え、筆者には、チロシンリン酸化シグナル伝達系の全容の解明にはまだ不十分であると思える。その理由として、チロシンリン酸化の研究は生化学的・分子生物学的手法による研究が主流で、細胞内の位置情報を考慮した分子細胞生物学的解析はほとんど行われていない。さらに、チロシンリン酸化反応の主要経路として、チロシンリン酸化はシグナル伝達最上流にある細胞膜と細胞膜直下で起こり、その下流は低分子量 G タンパク質活性化反応、続く mitogen-activated protein kinase (MAPK)/extracellular signal-regulated kinase (ERK) 経路によりセリン/トレオニンリン酸化反応に情報変換され核内へと伝達することが確立されている (Fig. 2)。⁴⁸⁻⁵⁰⁾ しかし、細胞は複雑な細胞膜構造を持ち、細胞内の様々な区画に特定のタンパク質が局在し、タンパク質-タンパク質相互作用などにより、高次機能を司ることが知られているので、チロシンリン酸化によるシグナル伝達の解明には時間情報と細胞内位置情報 (時空間情報) に焦点を当てた分子細胞生物学的解析が必須であると考えた。

本稿では、筆者が主宰した千葉大学大学院薬学研究分子細胞生物学研究室 (2000 年 6 月-2020 年 3 月) のメンバー達と一緒にやってきた研究、特にチロシンリン酸化酵素の局在と輸送及び機能に関する時空間的研究の成果を中心に、その他の研究成果 (他研究室との共同研究も含めた) も併せて紹介したい。

2. チロシンリン酸化シグナルの分子細胞生物学的解析のための方法開発

筆者は米国留学中の 1992 年に、サンディエゴの研究所 La Jolla Cancer Research Foundation における最新鋭共焦点レーザー蛍光顕微鏡の競争入札に遭

Fig. 2. The MAPK/ERK Signal Transduction Pathway for Cell Proliferation

Receptor-type tyrosine kinases, such as epidermal growth factor receptor (EGFR), tyrosine-phosphorylate themselves by ligand binding. Tyrosine phosphorylation signals are converted to serine/threonine phosphorylation signals via the MAPK/ERK pathway to induce cell proliferation.

遇し、その際立った高性能を体感し、そしてデモ機を使用させてもらい、高画質細胞画像データを取得して論文発表することができた。³¹⁾ チロシンリン酸化シグナルの分子細胞生物学的解析には、従来の落射型蛍光顕微鏡ではなく、最新鋭の共焦点レーザー蛍光顕微鏡を自在に使い熟す必要性が実感された。そこで、筆者は帰国後の早い時期に共焦点レーザー蛍光顕微鏡を完璧にマスターして実験に取り入れた。

そのほかにも、筆者らは下記のように、(2-1) 独自の優れた遺伝子誘導発現系、(2-2) 安価な遺伝子導入法、(2-3) 遺伝子安定ノックダウン細胞株と遺伝子レスキュー細胞株の作製、(2-4) チロシン脱リン酸化の強力阻害法、(2-5) DNA 構造変化の定量法などの開発に成功したことによって、チロシンリン酸化シグナルの時空間的研究が可能となった。さらに、タンパク質局在や機能発揮の程度は個々の細胞ごとに同一ではなく、クローン化細胞でも細胞ごとの個性が反映されて偏差がみられるので、従来の生化学的解析による細胞 1 個 1 個の偏差を考慮しないデータ解析はふさわしくない。そこで、(2-6) 細胞 1 個 1 個の個性によるバラツキがわかるようにデータを提示する方法も考案した。

2-1. 遺伝子発現を随意調節できるベクターシステムの開発 チロシンリン酸化酵素遺伝子を構成的に導入した安定発現細胞株は発現量や発現時期を調節できず、継代培養中に獲得形質の消失あるいは

細胞毒性がみられることが多い。興味の対象となるチロシンリン酸化酵素遺伝子の発現量調節が自在にでき、時間限定的に誘導発現する必要がある。しかし、様々な市販の遺伝子誘導発現 ON/OFF システムは高額であり、遺伝子発現の漏れがみられ、また誘導発現量の調節が難しいなどの欠陥も多い。そこで、筆者らは、発現漏れのない遺伝子随意誘導発現ベクターシステムを自力開発し、⁵⁸⁾ 米国特許 US8343759 B2 を取得した。テトラサイクリン類縁体ドキシサイクリン添加 1-2 時間後には遺伝子発現による新生タンパク質が検出でき、ドキシサイクリン 100 pg/mL-1.0 µg/mL という 10000 倍の濃度範囲で濃度依存的に誘導発現タンパク質を検出できる秀逸のものである。^{59,60)}

2-2. 市販品の 1/10000 の価格で実施できる遺伝子導入法の開発 遺伝子機能解析には、興味の対象となる遺伝子の発現 (gene expression) と発現抑制 (gene knockout や gene knockdown)、改変遺伝子発現、そして遺伝子欠損-遺伝子回復実験 (gene knockout-rescue) や遺伝子ノックダウン-遺伝子回復実験 (gene knockdown-rescue) などの遺伝子導入操作実験を頻繁に行う必要がある。そこで、筆者らは遺伝子導入が市販試薬の 1 万分の 1 の価格で実行できる方法を開発した。⁶¹⁾ 重要なポイントは遺伝子導入試薬 polyethylenimine を強酸条件下で溶解保存することによって半永久的に再現性よく遺伝子導入することができるようになったことである。したがって、遺伝子導入実験は研究費の制約を全く受けず無制限回数遂行することが可能となり、大学院生のみならず学部生でも容易に、しかも高効率で遺伝子導入ができるため、初学者にも遺伝子導入実験を楽しみながら習得することができる。また、米国特許 US8507270 B2、米国特許 US9249417 B2 及び日本国特許第 5697123 号を取得した。

2-3. 遺伝子安定ノックダウン細胞株と遺伝子レスキュー細胞株の作製 前述のように、遺伝子機能を解析するには、「興味ある遺伝子だけを随意的に発現及び発現抑制させる」ことが肝要である。そのために、knockout 細胞株を利用するか、あるいは、small interfering RNA (siRNA) を遺伝子導入して標的 mRNA を破壊し標的遺伝子の発現抑制が行われている。筆者らは、siRNA だけでなく、short hairpin RNA (shRNA) をコードする DNA

プラスミドを利用して、一過性発現のみならず、恒常的遺伝子ノックダウン細胞株を樹立し解析を行い、さらに、そのノックダウン細胞株にノックダウンされた野生型遺伝子 (あるいは変異遺伝子) を恒常的あるいは誘導的発現回復させた細胞株 (knockdown-rescue) を樹立して、遺伝子機能を解析する手法を確立した。knockdown 細胞株の樹立と knockdown-rescue 実験系は遺伝子機能を確定させるのに大きな威力を発揮した。⁶²⁻⁷³⁾

2-4. チロシン脱リン酸化酵素に対する強力な阻害法の開発 チロシンリン酸化反応はチロシンリン酸化とチロシン脱リン酸化による可逆反応で制御される (Fig. 1)。そして、ヒトにはチロシン脱リン酸化酵素が 107 種類存在することが知られている。⁴⁷⁾ 豊富に存在するチロシン脱リン酸化酵素活性のため、これまで、特に核内でのチロシンリン酸化が容易には検出されなかったものと思われる。すなわち、核内では極めて強いチロシン脱リン酸化活性によって、リン酸化基質タンパク質が速やかに脱リン酸化され、まるでスイッチ ON/OFF を素早く繰り返すように、迅速なチロシンリン酸化と迅速なチロシン脱リン酸化が核内シグナル制御に係わっているものと考えられる。細胞可溶化・ウエスタンブロット/免疫沈降解析・細胞免疫染色の際には、チロシン脱リン酸化を阻害することが必須である。強力なチロシン脱リン酸化酵素阻害剤として、オルトバナジン酸ナトリウム (sodium orthovanadate; Na_3VO_4) とペルオキシバナジン酸ナトリウム (sodium peroxovanadate; $\text{Na}_3\text{VO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$) が使われている。⁷⁴⁾ オルトバナジン酸イオンはリン酸イオンと類縁構造を持つので、チロシン脱リン酸化のみならず、リン酸化セリン/トレオニンの脱リン酸化も阻害すると考えられている。しかしながら、これまでは、このバナジン酸系試薬よりも優秀なチロシン脱リン酸化酵素特異的な阻害剤は知られていない。

オルトバナジン酸ナトリウムは可逆的な阻害作用を持ち、ペルオキシバナジン酸ナトリウムは不可逆的な阻害作用を持つと言われている。そして、ペルオキシバナジン酸ナトリウムはオルトバナジン酸ナトリウムよりも一層強力な阻害作用を持つが、逆に阻害作用の失活も非常に早い。また、ペルオキシバナジン酸ナトリウム生成時にカタラーゼを添加しても分解不十分な H_2O_2 が残存し、 H_2O_2 のタンパク質

に対する直接酸化作用が気になる。筆者はオルトバナジン酸ナトリウムの使用を第一選択として、細胞可溶化・免疫染色・ウエスタンブロット・免疫沈降の操作中にリン酸化チロシンが加水分解され難いように工夫した。

バナジン酸系イオンは還元剤や EDTA に晒されると失活する⁷⁴⁾ので、チロシン脱リン酸化酵素活性阻害作用を最大限に発揮させる条件を見つける必要があった。筆者らは、試行錯誤の結果として、下記に述べる事柄 (i)–(vii) のように細心の注意を払うことにより、オルトバナジン酸ナトリウムを用いて世界最強のチロシン脱リン酸化阻害を実現することに成功した^{40,41,62,63,70,72,75–78)}ので、以下にエッセンス^{70,72)}を説明する。

(i) オルトバナジン酸ナトリウムによるチロシン脱リン酸化酵素の阻害は可逆性なので、オルトバナジン酸ナトリウムが失活すると、チロシン脱リン酸化酵素活性が復活する。したがって、オルトバナジン酸ナトリウム水溶液を通常の 10 倍濃度の 10 mM で使用する。

(ii) 10 mM オルトバナジン酸ナトリウム水溶液は強アルカリ性なので、pH 未調整 HEPES [4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; unbuffered HEPES] を 10 mM 加えて中性 pH を担保する。中性及び EDTA 存在下では、オルトバナジン酸ナトリウムの阻害活性が急速に失活するので、使用直前に 4°C にて調製する。なお、酸性条件では、無色から橙色/黄色に着色して不活化されるので注意を要する。

(iii) チロシン脱リン酸化を軽減させるために、免疫沈降は 4°C で 3 時間以内とする。

(iv) Laemmli SDS-電気泳動サンプルバッファーで加熱してもチロシン脱リン酸化酵素の活性が完全に失活することはない、チロシン脱リン酸化酵素活性が残存する。また、Laemmli SDS-電気泳動サンプルバッファーには還元剤として 2-mercaptoethanol (2ME) が添加されているが、2ME はチロシン脱リン酸化酵素 (SH 酵素) の活性中心システイン残基に反応して脱リン酸化促進作用があることから、タンパク質を溶解した SDS-電気泳動サンプルバッファーにも 10 mM オルトバナジン酸ナトリウムと 10 mM unbuffered HEPES を 4°C にて添加し加熱した後、サンプルを電気泳動直前まで 4°C

にて保存する。

(v) オルトバナジン酸ナトリウムは無機塩にもかかわらず、水溶液は凍結融解によっても失活する。10 mM オルトバナジン酸ナトリウムと 10 mM unbuffered HEPES が添加された可溶化タンパク質を凍結保存し、融解して再使用する際には、凍結サンプルの融解前から新たに 10 mM オルトバナジン酸ナトリウムと 10 mM unbuffered HEPES を添加して、4°C にて注意深く融解し迅速にアッセイに供する。

(vi) チロシンリン酸化タンパク質を免疫染色する際にも、細胞固定液に 10 mM オルトバナジン酸ナトリウムと 10 mM unbuffered HEPES を使用直前に添加する。

(vii) チロシンリン酸化レベルを一層上げる必要がある場合には、細胞培養中に培養液に 10 mM オルトバナジン酸ナトリウムと 10 mM unbuffered HEPES を添加して培養するか、あるいは 10 mM ペルオキソバナジン酸ナトリウムを添加して培養する。

2-5. DNA 構造変化レベルを測る定量法の開発

DNA は核内において、密に凝集する部分（ヘテロクロマチン：遺伝子転写不活性化領域）と疎に広がっている部分（ユークロマチン：遺伝子転写活性化領域）が紋様のように織りなして分布しており、それらのパターンは遺伝子転写状況を反映し、しかも、そのパターンは細胞の活動に呼応して刻々と変化する。⁷⁹⁾そこで、筆者らは「ピクセルイメージング法」と名付けた方法を開発し、細胞固定後の DNA 染色画像を定量的に解析した。⁷⁶⁾すなわち、共焦点レーザー顕微鏡を用いて 0.6 μm の厚みの DNA 蛍光染色画像を得て、1 個の核あたり 6000–10000 個の均等なピクセルに分割し、それぞれのピクセルの蛍光強度を計測し、それらの DNA 蛍光強度の平均値と標準偏差を求める。そして、同一の細胞周期であれば DNA 含量は核 1 個あたりほぼ同一なので、DNA 蛍光強度の平均値はほぼ同程度である。したがって、得られた標準偏差の値が DNA の密と疎の紋様変化（染色体の構造変化）を定量化するよい指標になることを見い出した。⁷⁶⁾

特に、増殖因子によって起こるユークロマチン化が核内 Src 型チロシンリン酸化酵素のチロシンリン酸化酵素活性化に起因することを可視化・定量化し

て、⁷⁶⁾ 4 件の特許（米国特許 US8663947 B2, 米国特許 US9528141 B2, 米国特許 US10072304 B2, 日本国特許第 5733734 号）を取得した。したがって、この方法で DNA の紋様変化を定量することによって、細胞の遺伝子発現変化を推測することができる。特にがん細胞は増殖が盛んで遺伝子発現が活発に行われているので、病理検査等のがん細胞の診断のパラメータの 1 つとして使えるかもしれない。

2-6. 核内タンパク質局在化や細胞機能の定量表示の創出 筆者らは、株化細胞やクローン化細胞のような均一と思われる細胞であっても、純系マウスの個体と同様に、クローン化細胞株には細胞 1 個 1 個に個性があると考えている。細胞内のタンパク質発現や機能発揮を定量する場合、平均値のみならず、細胞 1 個 1 個のバラツキの程度（分散状況）が一目瞭然に分かるようにグラフ化することが肝要である。筆者らは細胞 1 個 1 個の実測値の全検体数をすべてドットでグラフ表示し、標準偏差をバーで示し、あるいは、細胞 1 個あたりの実測値が 2 種類の場合には二次元プロット表示による回帰分析を導入するなど工夫を凝らした。^{76,80)} 筆者らのドット表示でのデータ提示は前例がないということで審査員から激しいクレームが付いてなかなか信用されずにいたが、最終的にはドット表示が認められた。⁷⁶⁾ 筆者らの論文が発表されてからは、世界の多くの論文の細胞データが棒グラフ表示からドット表示に切り替ってきたことに気がついた。個々の細胞データのバラツキ具合を一目瞭然に示すことができる優れたデータ提示方法として、筆者らのドット表示は世界中の細胞生物学分野の研究者達に受け入れてもらえたのであろうと思うと感慨深いものがある。

3. 細胞膜以外での細胞内チロシンリン酸化酵素の検出

チロシンリン酸化はシグナル伝達下流に位置する細胞核では検出できないが核内タンパク質のセリン/トレオニンリン酸化は容易に検出されることなどの理由で、チロシンリン酸化反応はシグナル伝達最上流にある細胞膜や細胞膜直下で起こり、核内ではセリン/トレオニンリン酸化反応に情報変換されると考えられていた。⁴⁸⁻⁵⁰⁾ 確かにセリン/トレオニンリン酸化酵素の中には核内に存在するものが多数あり、核内タンパク質のセリン/トレオニンリン酸化はたくさん検出されているが、核移行シグナル配列

（nuclear localization signal; NLS）を持つ c-Abl チロシンリン酸化酵素以外の 89 種類のチロシンリン酸化酵素は核には存在していないはずであった。しかし、少し説得力に欠けるデータながら、Src 型チロシンリン酸化酵素のメンバーが核内にも存在するという論文が発表されていた。^{81,82)} 筆者は、核内にはチロシン脱リン酸化酵素活性が豊富に存在すると考えていたので、細胞可溶性後に核内でのチロシンリン酸化が容易には検出されなかったものと思われた。すなわち、核内の強いチロシン脱リン酸化活性によって、リン酸化基質タンパク質が速やかに脱リン酸化され、核内ではあたかもスイッチ ON/OFF を素早く繰り返すように、非常に迅速なチロシンリン酸化及びチロシン脱リン酸化が核内シグナル制御に係わるものと考えられた。

まず、筆者らは、Src 型チロシンリン酸化活性を抑制する Chk チロシンリン酸化酵素の過剰発現が多核化を介する細胞分裂異常を起こすことを見出したので、高純度の細胞内小器官を分画・精製したところ、Src 型チロシンリン酸化酵素と Chk チロシンリン酸化酵素のいずれもが細胞膜・核・分裂期染色体・分裂期紡錘糸に存在することを明らかにした。⁷⁵⁾ さらに、Src 型チロシンリン酸化酵素はリソソーム/後期エンドソーム・分泌顆粒/ファゴソーム・ミトコンドリアなどの細胞内小器官の膜にも存在することが分かってきた。⁸³⁻⁸⁷⁾ Src 型チロシンリン酸化酵素の細胞内局在を十分理解できれば、その局在する場所に特異的な基質タンパク質をチロシンリン酸化することによって起こる機能を調べることができるので、細胞内小器官の機能、ひいては生命現象や疾病の研究に極めて重要になるであろう。

4. チロシンリン酸化酵素のパルミチン酸付加数に依存的な細胞内輸送経路の発見

一般に、タンパク質は細胞種に応じた発現パターンを示し、細胞内の適材適所のコンパートメントに局在して、特定のアミノ酸配列がタンパク質-タンパク質複合体形成に係わり機能発揮に重要な役割を持つことが知られているので、筆者らはタンパク質の構造に基づく細胞内局在と特定のアミノ酸に着目した研究を進めてきた。^{30,31,36-43,88-91)}

Src 型チロシンリン酸化酵素は、ヒトでは 8 種類のメンバー（c-Src, Lyn, c-Yes, Fyn, c-Fgr, Hck, Lck, Blk）で構成されている。しかも 32 種類の非

Fig. 3. Localization and Trafficking of Src-family Tyrosine Kinases Depending on the State of Palmitoylation in the SH4 Domain

Src-family tyrosine kinases are co-translationally myristoylated in the cytoplasm. c-Src, a non-palmitoylated Src-family tyrosine kinase, is rapidly exchanged between the plasma membrane and lysosomes/late endosomes. Lyn and c-Yes, mono-palmitoylated Src-family tyrosine kinases, are biosynthetically transported to the plasma membrane *via* the Golgi apparatus along the secretory pathway. Fyn, a dual-palmitoylated Src-family tyrosine kinase, is directly targeted to the plasma membrane.

受容体型チロシンリン酸化酵素のうち、Src 型チロシンリン酸化酵素は 8 種類を占めていることから、Src 型チロシンリン酸化酵素は主要な細胞内チロシンリン酸化反応に係わるものと考えられる。そして、その中でも c-Src, Lyn, c-Yes, Fyn は細胞種にかかわらず普遍的に重複発現することが知られている。⁸⁶⁾ Src 型チロシンリン酸化酵素は細胞質で生合成される非受容体型タンパク質であるにもかかわらず、細胞質で生合成中に N 末端メチオニン残基が除去され、第 2 番目のグリシン残基にミリスチン酸が付加される。さらに N 末端第 3 番目あるいは 3 番目と 6 番目にシステイン残基が存在するとパルミチン酸化され、細胞膜への係留活性が付与される。

筆者らは、免疫蛍光染色法・光退色後蛍光回復法 (fluorescence recovery after photobleaching; FRAP)・細胞分画法・ウェスタンブロット法・遺伝子改変などを駆使して c-Src, Lyn, c-Yes, Fyn の細胞内局在を調べたところ、ゴルジ装置に Lyn が局在することを新たに発見し、細胞質で生合成された Lyn はまずカベオリンとギアンチン (giantin) に富むゴルジ装置膜の細胞質側に係留して、タンパク質分泌経路に乗って細胞膜まで一方方向に順行輸送されることを明らかにした。⁹²⁻⁹⁴⁾ Lyn がゴルジ膜から細胞膜へと輸送されるためには、ゴルジ膜上の acyl-CoA synthetase long-chain family member 3 (ACSL3) が Lyn の酵素活性領域の C-lobe と結合する必要性を明らかにした。⁹⁵⁾ また、c-Yes は Lyn と同様にゴルジ装置を経由する細胞内輸送経路を取ることが分かった。⁷⁷⁾ そして、ゴルジ装置に留まる

Lyn は酸化ストレスにตอบสนองして annexin II をチロシンリン酸化し細胞を保護するのに役立っている可能性を示した。⁹⁶⁾ 一方、Lyn や c-Yes と同じ Src 型チロシンリン酸化酵素メンバーである c-Src は細胞質で生合成後、非常に速く細胞膜とリソソーム/後期エンドソームの間を行ったり来たり循環し、^{97,98)} また Fyn は細胞質で生合成後、主に細胞膜に直接向かうことが分かった。⁷⁷⁾

c-Src, Lyn, c-Yes, Fyn の細胞内輸送経路が大きく異なる理由は、Src 型チロシンリン酸化酵素が細胞質で生合成された後に、細胞膜やオルガネラ内膜に挿入されているパルミチン酸転移酵素によって、それぞれのメンバーの N 末端 SH4 領域に結合するパルミチン酸付加数 (パルミチン酸チオエステル化するシステイン残基の数に対応する) に依存することを見出した。すなわち、c-Src, Lyn, c-Yes, Fyn ともにミリスチン酸が 1 分子ずつ N 末端グリシンにアミド結合するが、パルミチン酸チオエステル結合は、c-Src が 0 個、Lyn と c-Yes は 1 個、Fyn は 2 個と異なっており、パルミチン酸結合数の違いが細胞内輸送経路を制御していることを発見した (Fig. 3)。⁷⁷⁾ したがって、Src 型チロシンリン酸化酵素はメンバー間では構造的類似性が高いにもかかわらず、N 末端領域のパルミチン酸修飾数が細胞内の存在位置を決めるという興味深いものであった。さらに、リソソーム膜上に係留された c-Src が、オートファジーにおけるオートファゴソームとリソソームとの膜融合を促進させる役割を持つことを明らかにした。⁷³⁾

5. Src 型チロシンリン酸化酵素の細胞膜特殊領域での局在と機能

筆者らは、Src 型チロシンリン酸化酵素は細胞膜由来リン脂質の代謝に影響を及ぼすだけでなく、^{99,100} Src 型チロシンリン酸化酵素 Lyn の細胞膜特殊領域への集積と離散に対して細胞間接着や細胞極性が関与することを見出した。^{65,101-103} 具体的には、低分子量 G タンパク質 Cdc42 依存性アクチン皮層キャップ構造（細胞膜上のチロシンリン酸化シグナルのプラットフォームとして働くと考えられている）の形成には、Src 型チロシンリン酸化酵素が重要な役割を果たしている。¹⁰¹ また、細胞の浮遊化は、膜のコレステロール量減少を惹起し Lyn の細胞膜/オルガネラ内膜内での局在移動を引き起し、Lyn のチロシンリン酸化酵素活性を活性化した。その結果、浮遊状態になった細胞の生存を高める作用を発揮した。⁶⁵ さらに、Lyn は極性上皮細胞では細胞膜、非極性状態ではオルガネラ内膜に局在を変化させる。そして、カルシウム依存性の細胞間相互作用の刺激は、Lyn をオルガネラ内膜局在から細胞膜局在に移動させたことから、極性上皮細胞での Lyn の細胞膜局在に重要な役割を果たしていることを示した。^{102,103} また、Lyn は気道平滑筋細胞に発現していることも見出した。¹⁰⁴ Lyn の p56 と p53 の 2 種類の分子量の異なるアイソフォームの発現は、Src 型チロシンリン酸化酵素抑制性 Csk チロシンリン酸化酵素の欠損がん細胞において、ユビキチンリガーゼ Cbl を介する p56 特異的なタンパク分解促進を起こした。¹⁰⁵ さらに、ETS variant transcription factor 6 (ETV6)-Lyn 融合遺伝子が STAT5 シグナルを活性化して骨髄増殖性腫瘍を誘発することが明らかとなった。¹⁰⁶ したがって、Src 型チロシンリン酸化酵素の中でも、特に Lyn の機能は Lyn の周辺環境によっても特異的な影響を受けることが判明した。

6. 核内チロシンリン酸化反応とヒストン修飾を介するエピジェネティックな変化

筆者らは 8 種類のタンパク質 [trophinin, magphinin, activating transcription factor (ATF)-2, ATF-7, Jun dimerization protein (JDP)-2, zinc-finger protein (ZNF) 777, forkhead box protein (Fox) A1, vestigial-like family member 3 (VGLL3)] の核局在と機能について興味を持って研究を進めてい

Fig. 4. Changes in Chromatin Texture

Dynamic nuclear structural changes are frequently observed as changes in chromatin texture during transcription, terminal cell differentiation, senescence, apoptosis, tumorigenesis, cell cycle progression, etc. Changes in chromatin texture reflect chromatin structural changes. A normal nucleus (left) and a nucleus showing increased tyrosine phosphorylation (right) are visualized with DNA staining. Hypo-condensed and hyper-condensed DNA areas are associated with euchromatin and heterochromatin, respectively. Our pixel imaging method (see section 2-5) shows that the levels of chromatin structural changes are represented as individual S.D. values (left: 420) and (right: 925).

た。^{66,68,107-121} チロシンリン酸化酵素側に研究の焦点を当てたところ、核移行シグナル配列を持たない Src 型チロシンリン酸化酵素と Csk 型チロシンリン酸化酵素 Csk と Chk が細胞膜や細胞質のほかに核内にも存在することを見出した。^{75,122-124} また、脂質修飾し損なった Src 型チロシンリン酸化酵素は核に移行し易くなることが分かった。¹²⁴ しかし、核内でのチロシンリン酸化の実態は不明であり、核内チロシンリン酸化を調べるために、チロシン脱リン酸化反応を強力に阻害する方法を開発し（上述の 2-4）、核内チロシンリン酸化の実証実験を行った。⁷⁶ すなわち、細胞をオルトバナジン酸ナトリウムとともに培養し細胞内全体のチロシン脱リン酸化を阻害して核内チロシンリン酸化の有無を調べ、さらに、精製細胞核に ATP を添加して *in situ* でリン酸化反応が進行するかどうかを調べた。どちらも抗リン酸化チロシン抗体を用いて免疫染色を行うと、核内でチロシンリン酸化反応が確かに起きていることが可視化できた。しかも、Src 型チロシンリン酸化酵素阻害剤の添加によりチロシンリン酸化は劇的に抑制されることから、核内のチロシンリン酸化は主に Src 型チロシンリン酸化酵素によって担われていると考えられた。そして、核移行シグナル配列を付加した Src 型チロシンリン酸化酵素は核内タンパク質チロシンリン酸化反応を強く誘導して激しい DNA 構造変化（ユークロマチン化とヘテロクロマチン化）をもたらした（Fig. 4; 2-5 参照）、核移行シ

グナル配列付加 Src 型チロシンリン酸化酵素は多くの核内タンパク質のチロシンリン酸化を誘導することが判明した。逆に Src 型チロシンリン酸化酵素のノックアウトは核内チロシンリン酸化を著しく抑制したので、Src 型チロシンリン酸化酵素を介した核内チロシンリン酸化の程度が、DNA 構造変化の度合いと密接に関連していることが明らかになった。これらの実験によって、核内に Src 型チロシンリン酸化酵素が存在し、核内タンパク質をチロシンリン酸化することで DNA 構造変化に係わることが確定した。⁷⁶⁾

ヒストン修飾に係わる酵素の研究を進めていた¹²⁵⁻¹²⁷⁾ので、核内チロシンリン酸化とエピジェネティック制御との関連を調べたところ、核内 Src 型チロシンリン酸化酵素はヒストン H3 の N 末 4 番目の lysine のトリメチル化 (ヒストン H3K4me3) に富むユークロマチン領域に存在してクロマチン構造変換に係わることを発見した。⁷⁶⁾ また、c-Abl は核移行シグナル配列を元々持っているチロシンリン酸化酵素として細胞質と核内をシャトルリングすることが知られており、核内 c-Abl チロシンリン酸化酵素はヒストン H4 の N 末 16 番目の lysine のアセチル化 (ヒストン H4K16ac) の減弱・ヒストン H3K9me3 の増強・ヒストン H3K4me3 の減弱・ヒストン H3K14ac の減弱を示すヘテロクロマチン化に係わり、がん抑制遺伝子 Ras association domain family 1 isoform A (RASSF1A) 遺伝子の発現抑制を誘導した。⁷⁸⁾ さらに、核内 c-Abl は長くくねった構造を持つ核内アクチン繊維束の形成にも係わることを見出し、この核内アクチン繊維束がクロマチン構造変換、転写調節や DNA 損傷修復などの足場になる可能性を示した。⁶²⁾ また、リガンド結合により受容体型チロシンリン酸化酵素 ErbB4 から遊離した細胞質内のチロシンリン酸化酵素領域 4ICD が核内に移行して核内タンパク質のチロシンリン酸化を起こし、ヒストン H3K9me3 の増強誘導・ヒストン H4K16ac の減弱を示すヘテロクロマチン化及び human telomerase reverse transcriptase (hTERT) 遺伝子の転写を抑制し細胞増殖抑制が誘導され、増殖抑制には核内 α -enolase との結合も関与した。^{128,129)} さらに、受容体型チロシンリン酸化酵素 ALK の選択的スプライシング産物である細胞質内のチロシンリン酸化酵素領域 ALK^{ATI} は核内に移行し、ヒスト

ン H3K9me3 の増強を示すヘテロクロマチン化を起こして RASSF1A の転写を抑制した。¹³⁰⁾ 以上の結果より、核内チロシンリン酸化はクロマチンのエピジェネティック変化を誘導することが判明した。

7. 核内チロシンリン酸化酵素の基質と機能

Src 型チロシンリン酸化酵素 Lyn に核移行シグナル配列 (NLS) を付加した NLS-Lyn は、核内に蓄積して核内タンパク質のチロシンリン酸化を誘導した。⁷⁶⁾ 同様に、c-Abl チロシンリン酸化酵素は元来核移行シグナル配列を持つが、さらに核移行シグナル配列を追加付加した NLS-c-Abl は、核蓄積を強化して核内タンパク質のチロシンリン酸化を誘導した。⁷⁸⁾ NLS-Lyn あるいは NLS-c-Abl によってチロシンリン酸化された核タンパク質を精製しトリプシン消化後に質量分析機を用いて同定を行い、核内チロシンリン酸化タンパク質の候補をリストアップし、以下のように解析を行った。なお、チロシンリン酸化部位の機能解析には、上述の 2-3 に記載したように gene knockdown/knockout-rescue 実験をかならず行い、rescue する遺伝子は野生型 (knockdown の場合には silent mutation を施す) のほかに、同定できたチロシンリン酸化部位のチロシン残基をフェニルアラニン残基に置換したチロシン非リン酸化変異体、及びグルタミン酸残基に置換した擬似リン酸化変異体を用いて確認する。

(i) 核内で様々な転写調節に係わる転写コリプレッサー Krüppel-associated box (KRAB)-associated protein-1 (KAP1) はヘテロクロマチン領域に結合しているが、核内に存在するチロシンリン酸化酵素 c-Src, Lyn, c-Abl, Brk などにより KAP1 の 449 番目、458 番目及び 517 番目のチロシン残基のリン酸化が起こると、KAP1 のヘテロクロマチン領域への結合が阻害されヘテロクロマチン領域から解離した。そして、この 3 ヲ所のチロシンをフェニルアラニンに置換した非リン酸化変異 KAP1 はヘテロクロマチン領域から解離せず、DNA 傷害型抗がん剤処理による細胞周期停止因子 p21 (Cdk inhibitor) 遺伝子の発現を抑制した (Fig. 5)。⁶³⁾ したがって、KAP1 の 3 ヲ所のチロシン残基リン酸化誘導剤を開発できれば、DNA 傷害型抗がん剤と併用して強力ながん細胞増殖停止効果を狙うことができるであろう。(ii) クロマチン凝縮に係わる protein kinase A-anchoring protein 8 (AKAP8) は、核内に存在する

Fig. 5. Tyrosine Phosphorylation of KAP1 by Nucleus-localized Tyrosine Kinases

KAP1 participates in heterochromatin formation by binding to heterochromatin proteins, including heterochromatin protein 1 (HP1). Phosphorylation of KAP1 at Tyr-449, -458, and -517 by nucleus-localized tyrosine kinases, such as c-Src, Lyn, c-Abl, and Brk, inhibits the association of KAP1 and HP1 with heterochromatin, leading to upregulation of the transcription of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 upon DNA damage.

チロシンリン酸化酵素 c-Src, Lyn, 4ICD などにより AKAP8 の 10 ヲ所以上のチロシンがリン酸化され, AKAP8 の染色体や核マトリックスへの結合が解離されクロマチンの構造変化を誘導した.⁶⁹⁾ (iii) 転写コリプレッサー transcriptional intermediary factor 1- γ (TIF1 γ) は核内で転写因子 Smad2/3 を介する transforming growth factor- β (TGF- β) によるシグナル伝達を抑制するが, EGF の EGF 受容体 (EGFR) への結合によって起こる核内 c-Abl の活性化は TIF1 γ の 524 番目, 610 番目, 1048 番目の

チロシン残基をリン酸化し, その結果として, TIF1 γ が Smad2/3 から解離促進を起こし TGF- β シグナルの抑制が解除されて, TGF- β シグナルを介したがん悪性化に係わる上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) の過剰な反応 (激しいがんの浸潤, 転移亢進などに係わる) をもたらした (Fig. 6).⁷²⁾ したがって, TIF1 γ の 3 ヲ所のチロシン残基に対するリン酸化阻害剤が開発できれば, EMT などによるがんの増悪化を阻止することができであろう. (iv) DNA 損傷時に係わる転写因子 JunB は, DNA 傷害型薬剤によって活性化された c-Abl により, 173 番目, 182 番目, 188 番目のチロシン残基がリン酸化され, その結果, JunB-c-Fos 複合体形成が阻害されて細胞周期停止因子 p21 に対する転写抑制が解除され, p21 遺伝子発現が起こり細胞周期は停止した.¹³¹⁾ したがって, JunB を介した細胞増殖停止誘導には, JunB の 3 ヲ所のチロシン残基リン酸化促進剤の開発が望まれよう. (v) パイオニア転写因子 forkhead box protein A1 (FoxA1) は EGF 刺激を介した c-Abl の活性化により複数のチロシン残基がリン酸化され, 特に 429 番目と 464 番目のチロシン残基のリン酸化は FoxA1 のヒストン H3 結合促進を介してエストロゲンの転写活性化による trefoil factor 1 (TFF1) 遺伝子の発現を増強した.¹³²⁾ (vi) TGF- β シグナルに係わる転写因子 Smad3 のコアクティベーター Ski-interacting

Fig. 6. Desuppression of TGF- β Signaling via Nuclear c-Abl-mediated Phosphorylation of TIF1 γ at Tyr-524, -610, and -1048

Binding of TGF- β to its receptor (TGF- β R) activates the transcription factors Smad2/3, thereby inducing the transcription of the TGF- β target genes. (1) Upon stimulation with TGF- β alone, TIF1 γ associates with Smad2/3 to partially repress the transcriptional activity of Smad2/3. (2) Co-stimulation with TGF- β and EGF activates nuclear c-Abl to phosphorylate TIF1 γ at Tyr-524, -610, and -1048, leading to the dissociation of TIF1 γ from Smad2/3 for desuppression of TGF- β signaling. Overreaction of TGF- β signaling causes abnormal epithelial-mesenchymal transition (EMT) associated with malignant transformation of cancer.

protein (Skip) は c-Abl によって 292 番目のチロシン残基がリン酸化されると, Smad3 と Skip との相互作用を促進して TGF- β による Smad3 の転写活性を増強した.¹³³⁾ (vii) ヒストンメチル基転移酵素 histone-lysine *N*-methyltransferase SUV39H1 は核移行した 4ICD によって 297 番目, 303 番目, 308 番目のチロシン残基がリン酸化されると, ヒストン H3K9me3 のレベルを増強させた.⁷¹⁾ (viii) クロマチン凝縮に係わる AKAP8 は核移行した ALK^{AT1} によりチロシンリン酸化され, AKAP8 の染色体や核マトリックスへの結合が解離されてクロマチンの構造変化を誘導した.¹³⁰⁾ (ix) ヘテロクロマチン化に係わるヒストン脱アセチル化酵素 histone deacetylase 1 (HDAC1) は c-Abl によりチロシンリン酸化されるが, HDAC1 以外のタンパク質チロシンリン酸化に依存して, HDAC1 タンパク質のプロテアソーム分解を抑制し, ヘテロクロマチン化誘導増強に係わることが分かった.¹³⁴⁾

以上の結果より, 核内タンパク質のチロシンリン酸化がクロマチンの構造変換と機能調節に密接に係わっている実態が少しずつ明らかになってきたところである. 核内タンパク質のチロシンリン酸化は, その結合パートナーとの解離若しくは結合を促進し, その結果, クロマチンの構造変化をもたらす, 遺伝子発現調節に係わることが分かってきた. すなわち, これまで遺伝子発現調節にはチロシンリン酸化による制御は知られていなかったが, 強力なチロシン脱リン酸化阻害方法 (上述の 2-4) を用いることによって, 転写因子・転写コアクティベーター・転写コリプレッサー・ヒストン修飾酵素などの核内チロシンリン酸化が明瞭に検出されるようになり, 「核内タンパク質のチロシンリン酸化が常時起こっており, その核内チロシンリン酸化が様々な遺伝子発現調節に重要な役割を持つ」ことが明らかになってきた. おそらく, 「核内基質はチロシンリン酸化が起こると直ちに機能を発揮し, 速やかに脱リン酸化されるとその機能は停止する. まるでコンピュータプロセッサがスイッチ ON/OFF を素早く繰り返すように, 迅速なチロシンリン酸化と迅速なチロシン脱リン酸化が核内シグナル制御に重要な働きをしている」と考えられる. 遺伝子発現制御にチロシンリン酸化が関与することが明らかになったので, 様々な核内チロシンリン酸化基質タンパク質を同定

し機能解析してネットワークの全貌を理解することが次の重要な課題になるのであろう. そして, 同定したタンパク質の特定のチロシン残基に対するリン酸化阻害剤や促進剤の開発は優れた抗がん剤を生み出す可能性を秘めている.

8. 分裂期紡錘糸に局在する Src の基質と機能

筆者らは, Src 型チロシンリン酸化酵素などが分裂期紡錘糸に存在していることを見出した.⁷⁵⁾ Src 型チロシンリン酸化酵素は細胞分裂期に活性化することから,¹³⁵⁻¹⁴⁰⁾ 細胞分裂における紡錘糸の機能に対してチロシンリン酸化が深く関与することを示してきた.^{80,141-147)} 実際に, Src 型チロシンリン酸化酵素の基質タンパク質を同定するために, 分裂期細胞に微小管脱重合阻害剤 taxol を処理して紡錘糸を安定化させ, 細胞から分裂期紡錘糸を単離した.^{75,147)} そして, 単離紡錘糸に結合しているチロシンリン酸化タンパク質を精製し質量分析機で同定したところ, 多数のチロシンリン酸化タンパク質が見い出された.¹⁴⁷⁾ その中で, 細胞質分裂に係わる微小管結合/束化タンパク質 protein regulator of cytokinesis 1 (PRC1) 及び動原体/分裂期紡錘糸結合タンパク質 kinastrin/small kinetochore-associated protein (kinastrin/SKAP) という 2 種類の微小管結合タンパク質をピックアップして解析したところ, PRC1 は 464 番目のチロシン残基が Fyn と c-Src によりリン酸化され, kinastrin は 87 番目のチロシン残基が c-Src によりリン酸化された. そして, それらのチロシンリン酸化は PRC1 と kinastrin を紡錘糸から解離させ, 細胞分裂の進行に係わることを見出した (Fig. 7).¹⁴⁷⁾

したがって, 分裂期紡錘糸に結合するチロシンリン酸化タンパク質を同定することにより, 細胞分裂にチロシンリン酸化が重要な働きをしていることを示すことができた. さらに, 同定された紡錘糸結合チロシンリン酸化タンパク質候補の中には, 微小管結合タンパク質やアクチン・中間径フィラメント結合タンパク質などのほかに, RNA 結合タンパク質や RNA 修飾酵素が多数存在したことから, タンパク質非コード RNA (non-coding RNA) により細胞分裂における紡錘糸の機能が制御を受けている可能性が強く示唆される.¹⁴⁷⁾ また, 核内チロシンリン酸化タンパク質同定の際にも, RNA 結合タンパク質や RNA 修飾酵素が見い出された^{62,63)} ので, 核

Fig. 7. Src-mediated Tyrosine Phosphorylation of PRC1 and Kinastrin on the Mitotic Spindle

Kinase-active Fyn, a member of Src-family tyrosine kinases, localizes to the centrosome region in the G_2 and early M phases, including prophase, and does not become detected in these areas between metaphase and anaphase. A large number of tyrosine-phosphorylated proteins are associated with the mitotic spindle and the centrosome region in prophase and prometaphase. In the early M phase, PRC1 and kinastrin are phosphorylated at Tyr-464 and Tyr-87, respectively, and localized in the centrosome region and the mitotic spindle. Then, tyrosine-phosphorylated PRC1 and kinastrin are delocalized from spindle microtubules.

やクロマチンの機能に核内チロシンリン酸化による non-coding RNA を介する制御機構が存在して重要な働きをしているのかもしれない。

9. がん遺伝子産物 v-Src による発がん機構の展開

v-Src は、最初に発見されたがん遺伝子がコードするタンパク質であり、しかも、最初のチロシンリン酸化酵素であり、がん原遺伝子産物 c-Src の抑制性 C 末端領域の欠損による恒常的に高いチロシンリン酸化活性を示して発がん活性を持つ。^{49-52,56,57,148} 筆者らは、上述の (2-1) の方法を用いて v-Src 誘導発現 NIH/3T3 線維芽細胞株を樹立したところ、誘導剤未処理のコントロール条件では単層性増殖が続き、コンフルエント状態（細胞が培養容器の接着面を覆い尽くして細胞同士が単層増殖により密着した状態）になると正常細胞の特徴である接触阻害により細胞増殖停止を起こした。そして、誘導剤添加による誘導剤濃度依存的な v-Src 発現を企てたところ、非常に驚いたことに、コンフルエント状態でなくとも v-Src 発現量と細胞増殖の程度が逆相関して増殖抑制することが判明した。⁵⁹ しかしながら、v-Src 発現細胞の中から、v-Src 発現が停止した細胞が現れ、さらに接触阻害が解除されて重層性に無限増殖するがん細胞が出現してきたので、v-Src による発がん作用には細胞増殖阻害とがん細胞の出現という相反する現象が伴うことが判明した。^{59,149} また、v-Src は染色体ブリッジ（架橋結合した染色体）とラギング染色体（紡錘体の中央に残され両極に移動しない染色体）の生成や mitot-

ic slippage（分裂期 prometaphase から metaphase や anaphase を介さずに細胞周期 G_1 に直接移行する現象）を惹起して多核化細胞を誘導することも判明し、^{59,60,144,149-152} その一因として v-Src のチロシンリン酸化活性によるサイクリン依存性キナーゼ Cdk1 の不活性化によることが考えられた。^{150,152}

そこで、樹立した v-Src 誘導発現 NIH/3T3 細胞株を用いて、v-Src 発現・細胞周期進行・がん化との関連について詳細に調べたところ、v-Src 誘導発現は確かに MAPK/ERK 増殖シグナル経路を活性化したが、同時に細胞周期停止因子 p21 の発現が起り、結果的に細胞周期停止を起こし細胞増殖が抑制された。⁶⁰ さらに、v-Src 誘導発現は染色体異常や DNA 含量の異常を引き起こし、v-Src 誘導発現後 24-36 時間に v-Src と p21 の両者の発現抑制が一部の細胞でみられ、その中のごく少数の細胞は接触阻害が解除されて重層性無限増殖能を獲得したがん細胞になった。⁶⁰ Temin と Rubin の 1958 年の歴史的な論文においても、v-Src をコードするラウス肉種ウイルスの感染実験による細胞がん化の頻度は、筆者らの v-Src 誘導発現 ON/OFF 細胞株（誘導発現率 100%）とほぼ同様に極めて低い頻度であったが、ラウス肉種ウイルス感染細胞の染色体異常や DNA 含量の異常の記載はなかった。¹⁵³ しかしながら、筆者らは、この歴史的な論文を注意深く再読したところ、v-Src により染色体異常が誘起されていると解釈できるデータが提示されていることに気がついた。⁶⁰ 以上から、v-Src 誘導発現は染色体異常を誘起するがその大多数は細胞増殖が停止しア

Fig. 8. A Renewed Model of v-Src-driven Transformation

Normal cells proliferate in a single layer and stop proliferation by contact inhibition. The commonly accepted concept of v-Src-induced transformation is that v-Src expression induces continuous activation of the MAPK/ERK pathway for uncontrollable cell proliferation. In fact, our data demonstrate that v-Src expression not only causes cells round in morphology and activates the MAPK/ERK pathway but also induces the expression of p21 to inhibit cell proliferation. Importantly, v-Src-expressing cells show chromosome abnormalities and only a limited number of the cells gain the ability to exhibit oncogenic transformation possibly through stochastic genome alterations.

ポトーシスなどで細胞死を起こす。しかし、その中でがん化に必要な遺伝子変異を確率論的 (stochastic) に起こした細胞がごく少ない頻度ながら出現してくると考えられる (Fig. 8).⁶⁰⁾

したがって、v-Src によるがん化機構は定説「MAPK/ERK 増殖シグナル伝達経路等の恒常的な活性化による細胞の重層性無限増殖能の獲得が原因」ではなく、「v-Src のチロシンリン酸化活性による stochastic な染色体異常誘発を介した細胞がん化機構」であると考えの方が自然であり、今後 v-Src の基質タンパク質の解明が待たれる。

10. がん細胞の増殖に対する阻害

筆者らは、がん細胞株に対して細胞周期停止やアポトーシス誘導を起こす天然物抽出成分や合成化合物の研究を進めていた。¹⁵⁴⁻¹⁵⁹⁾ ところで、抗腫瘍性抗生物質であるブレオマイシンやアドリマイシンは古くから臨床治療で用いられている DNA 傷害型抗がん剤であり、DNA に損傷を与えてがん細胞を殺傷する。しかしながら、低濃度で用いるとサイクリン依存性キナーゼ Cdk1 量の減少や細胞周期チェックポイントキナーゼ ataxia telangiectasia mutated kinase/ataxia telangiectasia and Rad3-related kinase (ATM/ATR) によるシグナル伝達を介して細胞の染色体多倍性などの染色体異常や細胞老化を起こした。¹⁶⁰⁻¹⁶²⁾ すなわち、低毒性濃度のブレオマイシンは染色体多倍化を引き起こすが、ブレオマイシン刺激早期では ATM/ATR チェックポイントキナーゼを活性化して、ブレオマイシン刺激後期で

は Cdk1 の不活性化とサイクリン B1 の分解誘導により、細胞周期を長期にわたり G₂ で停止させ染色体多倍化化することが明らかになった。さらに、v-Src が DNA 損傷時に発動される細胞周期チェックポイントのシグナル伝達にも係わることを見出した。^{63,64,149,162-170)} また、がん抑制遺伝子 p53 欠損がん細胞に対する遺伝子治療、腫瘍マーカー検索、抗がん剤耐性シグナル、などの研究も進めてきた。¹⁷¹⁻¹⁷⁹⁾ したがって、v-Src による発がん と DNA 傷害型抗がん剤による発がんとの間には、極めて密接な関連が考えられる。

11. おわりに

「夢みて行い考えて祈る」という名言を座右の銘として、筆者は勝った負けたという研究や道筋が既に見えている研究には背を向けて、自分達の実験結果を土台として知的好奇心を満足させながら、自身の感性を信じて突き進んできた。その結果、最近の筆者らの論文では、Introduction の章に筆者らの論文を多数引用して 1 段落を形成できるようになってきた。また、著名な英国人研究者による細胞生物学の最近の総説¹⁸⁰⁾ に、筆者らの Src 型チロシンリン酸化酵素に関する論文が 10 報も引用されていたことから、筆者らの研究がチロシンリン酸化シグナルの分野に大きな影響を与えており、とても嬉しく思っている。

筆者らがチロシンリン酸化酵素の細胞内局在と輸送経路に興味を持ち研究を開始してから、チロシンリン酸化酵素が細胞膜とその直下のみならず核内に

Fig. 9. A New Strategy in Cancer Treatment with Molecularly-targeted Drugs

(1) Current molecularly-targeted drugs for cancer treatment are designed to inhibit the kinase activities of appropriate tyrosine kinases and have achieved remarkable therapeutic results. However, individual tyrosine kinases simultaneously phosphorylate multiple substrate proteins that are located in the upstream signaling pathways: some are associated with tumor oncogenesis, others are with normal cell functions. Thus, these drugs may interfere with normal cell physiology, resulting in severe adverse effects. In addition, given that not a few substrates often overlap with those of other tyrosine kinases, treatment with some type of tyrosine kinase inhibitors can be not effective. (2) Next generation molecularly-targeted drugs should be designed not to interfere with the kinase activities of tyrosine kinases but to block tyrosine phosphorylation of nuclear substrates by virtue of the binding to their tyrosine-containing amino acid sequences. Since chromatin-associated nuclear substrates are located at the most downstream of signal transduction, adverse effects are unlikely to occur.

も存在し、核移行シグナル配列を持つ c-Abl チロシンリン酸化酵素は元より、Src 型チロシンリン酸化酵素のように核移行シグナル配列を有さないチロシンリン酸化酵素でも核内に存在して、ヒストン修飾→クロマチン構造変換→遺伝子発現調節→増殖・分化に係わることを示してきた。また、分裂期紡錘糸の機能にもチロシンリン酸化が関与することも分かってきた。これまで、セリン/トレオニンリン酸化酵素によるクロマチン機能制御が一般通念であったが、筆者らの研究成果はなかなか信じてもらえず、紆余曲折の末に遂に学術雑誌に掲載された。^{75,76)} このことが契機となり、筆者らはクロマチン動態に関するチロシンリン酸化反応の実態と機能について自らの仮説を検証しながら研究を一步一步進めて証明してきた。

抗がん剤の標的となる多くのチロシンリン酸化酵素は細胞膜やその直下にも位置するので、このような分子標的薬 (tyrosine kinase inhibitors, …tinib) によるチロシンリン酸化酵素活性の阻害は、シグナル伝達下流において分枝するすべてのチロシンリン酸化シグナル伝達経路をも遮断して、EGF 受容体

阻害薬による皮膚障害のごとく、たとえ分子標的薬であろうと正常細胞に重篤な副作用を惹起することがある。核内チロシンリン酸化シグナルは、情報伝達経路の上流にある細胞膜直下のチロシンリン酸化シグナルとは異なり、シグナル伝達末端部に位置し分岐経路もほとんどない。したがって、チロシンリン酸化酵素の時空間的な機能解析は、ピンポイントでシグナルを阻害する副作用の少ない薬の創製につながるものと期待される (Fig. 9)。今後、シグナル伝達のエンドポイントに近いクロマチン結合又はクロマチン近傍のチロシンリン酸化基質とシグナル伝達の研究が飛躍的に進むことにより、効果が優れ、副作用の少ない抗がん剤等の創薬も夢ではない時代が到来するかもしれない。

謝辞 筆者が主宰した千葉大学大学院薬学研究院分子細胞生物学研究室では (2000 年 6 月–2020 年 3 月)、最終的に学部 83 名、修士課程 64 名 (含 留学生 3 名)、博士課程 25 名 (含 留学生 1 名) が筆者と共同研究を行い、学士、修士、博士の学位を取得しました。研究室からの発表論文は彼ら大学院

生・学部学生とともに教員 6 名の奮闘と多大な貢献の賜物です。その結果として、千葉大学成績優秀者に係る学長表彰 (3 名)、千葉大学大学院医学薬学府長賞受賞 (3 名)、千葉大学学術研究活動に係る学長表彰・学術研究支援制度に基づく奨学金 (1 名)、学生の学会優秀発表賞受賞 (44 名)、日本学生支援機構奨学金返還免除 (修士 19 名、博士 7 名)、博士課程大学院生支援制度採択 (日本学術振興会特別研究員 DC2 : 5 名、グローバル COE プログラム RA : 7 名、博士課程教育リーディング COE プログラム RA : 2 名、先進マルチキャリア博士人材育成プログラム RA : 1 名、ダブルディグリープログラム : 1 名、千葉大学研究支援プログラム-若手研究助成 A : 1 名)、千葉大学大学院学生等の海外派遣支援プログラム (8 名)、千葉大学なのはなコンペ受賞 (2 名)、井上科学振興財団井上研究奨励賞受賞 (2 名)、上原記念生命科学財団海外留学助成ポストドクトラルフェローシップ獲得 (2 名) 等の成果につながりました。最後になりましたが、総計 152 報 (筆者が責任著者の論文 68 報を含む) を発表することができ、分子細胞生物学研究室配属の皆様のほかに、これまで様々な形で筆者と共同研究を遂行して頂きました皆様を含めた総数 413 名 (国内 327 名と海外 86 名) に深く感謝いたします。

利益相反 開示すべき利益相反はない。

REFERENCES

- 1) Yamaguchi N., Yoshimatsu K., Toyoshima S., Osawa T., *J. Immunol.*, **126**, 2290–2295 (1981).
- 2) Yamaguchi N., Osawa T., *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, **75**, 309–316 (1984).
- 3) Oku N., Yamaguchi N., Yamaguchi N., Shibamoto S., Ito F., Nango M., *J. Biochem.*, **100**, 935–944 (1986).
- 4) Yamaguchi N. E., Yamaguchi N., Shibamoto S., Oku N., Ito F., *Cell Struct. Funct.*, **12**, 23–33 (1987).
- 5) Takatsu K., Kikuchi Y., Takahashi T., Honjo T., Matsumoto M., Harada N., Yamaguchi N., Tominaga A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4234–4238 (1987).
- 6) Harada N., Takahashi T., Matsumoto M., Kinashi T., Ohara J., Kikuchi Y., Koyama N., Severin E., Yaoita Y., Honjo T., Yamaguchi N., Tominaga A., Takatsu K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**, 4581–4585 (1987).
- 7) Takatsu K., Tominaga A., Harada N., Mita S., Matsumoto M., Takahashi T., Kikuchi Y., Yamaguchi N., *Immunol. Rev.*, **102**, 107–135 (1988).
- 8) Yamaguchi N., Takahashi T., Harada N., Takatsu K., *J. Biochem.*, **106**, 837–843 (1989).
- 9) Mita S., Tominaga A., Hitoshi Y., Sakamoto K., Honjo T., Akagi M., Kikuchi Y., Yamaguchi N., Takatsu K., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 2311–2315 (1989).
- 10) Sonoda E., Matsumoto R., Hitoshi Y., Ishii T., Sugimoto M., Araki S., Tominaga A., Yamaguchi N., Takatsu K., *J. Exp. Med.*, **170**, 1415–1420 (1989).
- 11) Matsumoto R., Matsumoto M., Mita S., Hitoshi Y., Ando M., Araki S., Yamaguchi N., Tominaga A., Takatsu K., *Immunology*, **66**, 32–38 (1989).
- 12) Takatsu K., Yamaguchi N., Hitoshi Y., Sonoda E., Mita S., Tominaga A., *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, **54**, 745–751 (1989).
- 13) Takahashi T., Yamaguchi N., Mita S., Yamaguchi Y., Suda T., Tominaga A., Kikuchi Y., Miura Y., Takatsu K., *Mol. Immunol.*, **27**, 911–920 (1990).
- 14) Migita M., Yamaguchi N., Kato S., Mita S., Matsumoto R., Sonoda E., Tsuchiya H., Matsuda I., Tominaga A., Takatsu K., *Microbiol. Immunol.*, **34**, 937–952 (1990).
- 15) Tominaga A., Takahashi T., Kikuchi Y., Mita S., Naomi S., Harada N., Yamaguchi N., Takatsu K., *J. Immunol.*, **144**, 1345–1352 (1990).
- 16) Yamaguchi N., Hitoshi Y., Mita S., Hosoya Y., Murata Y., Kikuchi Y., Tominaga A., Takatsu K., *Int. Immunol.*, **2**, 181–187 (1990).
- 17) Hitoshi Y., Yamaguchi N., Mita S., Sonoda E., Takaki S., Tominaga A., Takatsu K., *J. Immunol.*, **144**, 4218–4225 (1990).
- 18) Takaki S., Tominaga A., Hitoshi Y., Mita S., Sonoda E., Yamaguchi N., Takatsu K., *EMBO J.*, **9**, 4367–4374 (1990).

- 19) Blankenstein T., Li W., Überla K., Qin Z., Tominaga A., Takatsu K., Yamaguchi N., Diamantstein T., *Eur. J. Immunol.*, **20**, 2699–2705 (1990).
- 20) Murata Y., Yamaguchi N., Hitoshi Y., Tominaga A., Takatsu K., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **173**, 1102–1108 (1990).
- 21) Hitoshi Y., Yamaguchi N., Korenaga M., Mita S., Tominaga A., Takatsu K., *Int. Immunol.*, **3**, 135–139 (1991).
- 22) Mita S., Takaki S., Hitoshi Y., Rolink A. G., Tominaga A., Yamaguchi N., Takatsu K., *Int. Immunol.*, **3**, 665–672 (1991).
- 23) Yamaguchi N., Hitoshi Y., Takaki S., Murata Y., Migita M., Kamiya T., Minowada J., Tominaga A., Takatsu K., *Int. Immunol.*, **3**, 889–898 (1991).
- 24) Migita M., Yamaguchi N., Mita S., Higuchi S., Hitoshi Y., Yoshida Y., Tomonaga M., Matsuda I., Tominaga A., Takatsu K., *Cell. Immunol.*, **133**, 484–497 (1991).
- 25) Takaki S., Mita S., Kitamura T., Yonehara S., Yamaguchi N., Tominaga A., Miyajima A., Takatsu K., *EMBO J.*, **10**, 2833–2838 (1991).
- 26) Korenaga M., Hitoshi Y., Yamaguchi N., Sato Y., Takatsu K., Tada I., *Immunology*, **72**, 502–507 (1991).
- 27) Takatsu K., Takaki S., Hitoshi Y., Mita S., Katoh S., Yamaguchi N., Tominaga A., *Ann. NY Acad. Sci.*, **651**, 241–258 (1992).
- 28) Hitoshi Y., Yamaguchi N., Tominaga A., Takatsu K., *Ann. NY Acad. Sci.*, **651**, 261–263 (1992).
- 29) Sonoda E., Hitoshi Y., Yamaguchi N., Ishii T., Tominaga A., Araki S., Takatsu K., *Cell. Immunol.*, **140**, 158–172 (1992).
- 30) Aoki D., Lee N., Yamaguchi N., Dubois C., Fukuda M. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4319–4323 (1992).
- 31) Yamaguchi N., Fukuda M. N., *J. Biol. Chem.*, **270**, 12170–12176 (1995).
- 32) Hamaguchi I., Iwama A., Yamaguchi N., Sakano S., Matsuda Y., Suda T., *Oncogene*, **9**, 3371–3374 (1994).
- 33) Iwama A., Wang M. H., Yamaguchi N., Ohno N., Okano K., Sudo T., Takeya M., Gervais F., Morissette C., Leonard E. J., Suda T., *Blood*, **86**, 3394–3403 (1995).
- 34) Hashiyama M., Iwama A., Ohshiro K., Kurozumi K., Yasunaga K., Shimizu Y., Masuho Y., Matsuda I., Yamaguchi N., Suda T., *Blood*, **87**, 93–101 (1996).
- 35) Hamaguchi I., Yamaguchi N., Suda J., Iwama A., Hirao A., Hashiyama M., Aizawa S., Suda T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **224**, 172–179 (1996).
- 36) Iwama A., Yamaguchi N., Suda T., *EMBO J.*, **15**, 5866–5875 (1996).
- 37) Hirao A., Hamaguchi I., Suda T., Yamaguchi N., *EMBO J.*, **16**, 2342–2351 (1997).
- 38) Sakamoto O., Iwama A., Amitani R., Takehara T., Yamaguchi N., Yamamoto T., Masuyama K., Yamanaka T., Ando M., Suda T., *J. Clin. Invest.*, **99**, 701–709 (1997).
- 39) Hirao A., Huang X. L., Suda T., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **273**, 10004–10010 (1998).
- 40) Tada J., Omine M., Suda T., Yamaguchi N., *Blood*, **93**, 3723–3735 (1999).
- 41) Mera A., Suga M., Ando M., Suda T., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **274**, 15766–15774 (1999).
- 42) El-Shazly A., Yamaguchi N., Masuyama K., Suda T., Ishikawa T., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **264**, 163–170 (1999).
- 43) Mera A., Suga M., Nakayama Y., Ando M., Suda T., Yamaguchi N., *Immunol. Lett.*, **84**, 117–124 (2002).
- 44) Takikawa M., Kikkawa H., Asai T., Yamaguchi N., Ishikawa D., Tanaka M., Ogi-no K., Taki T., Oku N., *FEBS Lett.*, **466**, 381–384 (2000).
- 45) The GENCODE Project: Encyclopaedia of genes and gene variants. “Human Release Statistics - GENCODE”: <https://www.gencodegenes.org/human/stats.html>, cited 7 March, 2021.
- 46) Manning G., Whyte D. B., Martinez R., Hunter T., Sudarsanam S., *Science*, **298**, 1912–1934 (2002).
- 47) Alonso A., Sasin J., Bottini N., Friedberg I., Friedberg I., Osterman A., Godzik A., Hunter T., Dixon J., Mustelin T., *Cell*, **117**, 699–711 (2004).
- 48) Karin M., Hunter T., *Curr. Biol.*, **5**, 747–757 (1995).
- 49) Hunter T., *Cell*, **100**, 113–127 (2000).
- 50) Koch C. A., Anderson D., Moran M. F., Ellis C., Pawson T., *Science*, **252**, 668–674 (1991).

- 51) Blume-Jensen P., Hunter T., *Nature*, **411**, 355–365 (2001).
- 52) Hunter T., *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **353**, 583–605 (1998).
- 53) Vogelstein B., Kinzler K. W., *Trends Genet.*, **9**, 138–141 (1993).
- 54) Hanahan D., Weinberg R. A., *Cell*, **100**, 57–70 (2000).
- 55) Roskoski R. Jr., *Pharmacol. Res.*, **152**, 104609 (2020).
- 56) Eckhart W., Hutchinson M. A., Hunter T., *Cell*, **18**, 925–933 (1979).
- 57) Hunter T., Sefton B. M., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 1311–1315 (1980).
- 58) Kasahara K., Nakayama Y., Sato I., Ikeda K., Hoshino M., Endo T., Yamaguchi N., *J. Cell. Physiol.*, **211**, 220–232 (2007).
- 59) Soeda S., Nakayama Y., Honda T., Aoki A., Tamura N., Abe K., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **319**, 1382–1397 (2013).
- 60) Honda T., Morii M., Nakayama Y., Suzuki K., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *Sci. Rep.*, **8**, 1063 (2018).
- 61) Fukumoto Y., Obata Y., Ishibashi K., Tamura N., Kikuchi I., Aoyama K., Hattori Y., Tsuda K., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Cytotechnology*, **62**, 73–82 (2010).
- 62) Aoyama K., Yuki R., Horiike Y., Kubota S., Yamaguchi N., Morii M., Ishibashi K., Nakayama Y., Kuga T., Hashimoto Y., Tomonaga T., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **319**, 3251–3268 (2013).
- 63) Kubota S., Fukumoto Y., Aoyama K., Ishibashi K., Yuki R., Morinaga T., Honda T., Yamaguchi N., Kuga T., Tomonaga T., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **288**, 17871–17883 (2013).
- 64) Kubota S., Fukumoto Y., Ishibashi K., Soeda S., Kubota S., Yuki R., Nakayama Y., Aoyama K., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **289**, 5730–5746 (2014).
- 65) Morinaga T., Abe K., Nakayama Y., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **289**, 26327–26343 (2014).
- 66) Hasegawa H., Ishibashi K., Kubota S., Yamaguchi C., Yuki R., Nakajo H., Eckner R., Yamaguchi N., Yokoyama K. K., Yamaguchi N., *PLoS One*, **9**, e116048 (2014).
- 67) Morii M., Fukumoto Y., Kubota S., Yamaguchi N., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Cell Biol. Int.*, **39**, 923–932 (2015).
- 68) Yuki R., Aoyama K., Kubota S., Yamaguchi N., Kubota S., Hasegawa H., Morii M., Huang X., Liu K., Williams R., Fukuda M. N., Yamaguchi N., *J. Cell. Biochem.*, **116**, 954–968 (2015).
- 69) Kubota S., Morii M., Yuki R., Yamaguchi N., Yamaguchi H., Aoyama K., Kuga T., Tomonaga T., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **290**, 10891–10904 (2015).
- 70) Morii M., Kubota S., Honda T., Yuki R., Morinaga T., Kuga T., Tomonaga T., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **292**, 1648–1665 (2017).
- 71) Nakajo H., Ishibashi K., Aoyama K., Kubota S., Hasegawa H., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **511**, 765–771 (2019).
- 72) Yuki R., Tatewaki T., Yamaguchi N., Aoyama K., Honda T., Kubota S., Morii M., Manabe I., Kuga T., Tomonaga T., Yamaguchi N., *Oncogene*, **38**, 637–655 (2019).
- 73) Suzuki K., Honda T., Akatsu A., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *Cell. Signal.*, **75**, 109774 (2020).
- 74) Huyer G., Liu S., Kelly J., Moffat J., Payette P., Kennedy B., Tsaprailis G., Gresser M. J., Ramachandran C., *J. Biol. Chem.*, **272**, 843–851 (1997).
- 75) Yamaguchi N., Nakayama Y., Urakami T., Suzuki S., Nakamura T., Suda T., Oku N., *J. Cell Sci.*, **114**, 1631–1641 (2001).
- 76) Takahashi A., Obata Y., Fukumoto Y., Nakayama Y., Kasahara K., Kuga T., Higashiyama Y., Saito T., Yokoyama K. K., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **315**, 1117–1141 (2009).
- 77) Sato I., Obata Y., Kasahara K., Nakayama Y., Fukumoto Y., Yamasaki T., Yokoyama K. K., Saito T., Yamaguchi N., *J. Cell Sci.*, **122**, 965–975 (2009).
- 78) Aoyama K., Fukumoto Y., Ishibashi K., Kubota S., Morinaga T., Horiike Y., Yuki R., Takahashi A., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **317**, 2874–2903 (2011).
- 79) Zink D., Fischer A. H., Nickerson J. A., *Nat.*

- Rev. Cancer*, **4**, 677–687 (2004).
- 80) Kasahara K., Nakayama Y., Nakazato Y., Ikeda K., Kuga T., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **282**, 5327–5339 (2007).
 - 81) Kharbanda S., Saleem A., Yuan Z.-M., Kraeft S., Weichselbaum R., Chen L. B., Kufe D., *Cancer Res.*, **56**, 3617–3621 (1996).
 - 82) Radha V., Nambirajan S., Swarup G., *Eur. J. Biochem.*, **236**, 352–359 (1996).
 - 83) Kaplan K. B., Swedlow J. R., Varmus H. E., Morgan D. O., *J. Cell Biol.*, **118**, 321–333 (1992).
 - 84) Möhn H., Le Cabec V., Fischer S., Maridonneau-Parini I., *Biochem. J.*, **309**, 657–665 (1995).
 - 85) Salvi M., Brunati A. M., Bordin L., La Rocca N., Clari G., Toninello A., *Biochim. Biophys. Acta-Mol. Cell Res.*, **1589**, 181–195 (2002).
 - 86) Brown M. T., Cooper J. A., *Biochim. Biophys. Acta-Rev. Cancer*, **1287**, 121–149 (1996).
 - 87) Thomas S. M., Brugge J. S., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **13**, 513–609 (1997).
 - 88) Nakamura T., Fujisaki Y., Enomoto H., Nakayama Y., Takabe T., Yamaguchi N., Uozumi N., *J. Bacteriol.*, **183**, 5762–5767 (2001).
 - 89) Kikuchi Y., Kakeya T., Nakajima O., Sakai A., Ikeda K., Yamaguchi N., Yamazaki T., Tanamoto K., Matsuda H., Sawada J., Takatori K., *FEBS J.*, **275**, 2965–2976 (2008).
 - 90) Makiyama T., Nakamura H., Nagasaka N., Yamashita H., Honda T., Yamaguchi N., Nishida A., Murayama T., *Traffic*, **16**, 476–492 (2015).
 - 91) Yamaguchi N., Yamaguchi N., *FEBS Lett.*, **589**, 1369–1375 (2015).
 - 92) Kasahara K., Nakayama Y., Ikeda K., Fukushima Y., Matsuda D., Horimoto S., Yamaguchi N., *J. Cell Biol.*, **165**, 641–652 (2004).
 - 93) Ikeda K., Nakayama Y., Ishii M., Obata Y., Kasahara K., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *Biochim. Biophys. Acta-General Subjects*, **1790**, 1345–1352 (2009).
 - 94) Okamoto A., Morinaga T., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 142–146 (2018).
 - 95) Obata Y., Fukumoto Y., Nakayama Y., Kuga T., Dohmae N., Yamaguchi N., *J. Cell Sci.*, **123**, 2649–2662 (2010).
 - 96) Matsuda D., Nakayama Y., Horimoto S., Kuga T., Ikeda K., Kasahara K., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **312**, 1205–1217 (2006).
 - 97) Kasahara K., Nakayama Y., Kihara A., Matsuda D., Ikeda K., Kuga T., Fukumoto Y., Igarashi Y., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **313**, 2651–2666 (2007).
 - 98) Kasahara K., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Cancer Lett.*, **262**, 19–27 (2008).
 - 99) Nabemoto M., Mashimo M., Someya A., Nakamura H., Hirabayashi T., Fujino H., Kaneko M., Okuma Y., Saito T., Yamaguchi N., Murayama T., *Eur. J. Pharmacol.*, **590**, 1–11 (2008).
 - 100) Sasaki H., Toyomura K., Matsuzaki W., Okamoto A., Yamaguchi N., Nakamura H., Murayama T., *Arch. Biochem. Biophys.*, **550–551**, 12–19 (2014).
 - 101) Kuga T., Hoshino M., Nakayama Y., Kasahara K., Ikeda K., Obata Y., Takahashi A., Higashiyama Y., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **314**, 2040–2054 (2008).
 - 102) Morinaga T., Yanase S., Okamoto A., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *Sci. Rep.*, **7**, 493 (2017).
 - 103) Morinaga T., Yamaguchi N., Nakayama Y., Tagawa M., Yamaguchi N., *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 1811 (2018).
 - 104) Pertel T., Zhu D., Panettieri R. A., Yamaguchi N., Emala C. W., Hirshman C. A., *Am. J. Physiol. -Lung Cell. Mol. Physiol.*, **290**, L492–L500 (2006).
 - 105) Kuga T., Yamane Y., Hayashi S., Taniguchi M., Yamaguchi N., Yamagishi N., *Sci. Rep.*, **10**, 7621 (2020).
 - 106) Takeda Y., Nakaseko C., Tanaka H., Takeuchi M., Yui M., Saraya A., Miyagi S., Wang C., Tanaka S., Ohwada C., Sakaida E., Yamaguchi N., Yokote K., Hennighausen L., Iwama A., *Br. J. Haematol.*, **153**, 589–598 (2011).
 - 107) Aoyama J., Nakayama Y., Sugiyama D., Saburi S., Nadano D., Fukuda M. N., Yamaguchi N., *FEBS Lett.*, **579**, 6326–6332 (2005).
 - 108) Sugihara K., Sugiyama D., Byrne J., Wolf D. P., Lowitz K. P., Kobayashi Y., Kabir-Salmanni M., Nadano D., Aoki D., Nozawa S.,

- Nakayama J., Mustelin T., Ruoslahti E., Yamaguchi N., Fukuda M. N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 3799–3804 (2007).
- 109) Aoyama J., Akazawa Y., Kasahara K., Higashiyama Y., Kikuchi I., Fukumoto Y., Saburi S., Nakayama Y., Fukuda M. N., Yamaguchi N., *J. Cell. Biochem.*, **103**, 765–777 (2008).
- 110) Higashiyama Y., Takahashi A., Fukumoto Y., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Cytotechnology*, **60**, 153–159 (2009).
- 111) Yamasaki T., Takahashi A., Pan J., Yamaguchi N., Yokoyama K. K., *J. Biol. Chem.*, **284**, 8567–8581 (2009).
- 112) Nakade K., Pan J., Yamasaki T., Noguchi M., Masuzaki S., Kishikawa S., Murata T., Zhu Z. W., Chen X. Y., Hasegawa H., Yamaguchi N., Tsai E. M., Lee J. N., Yokoyama K. K., *Curr. Top. Biochem. Res.*, **11**, 75–97 (2009).
- 113) Pan J., Nakade K., Huang Y. C., Zhu Z. W., Masuzaki S., Hasegawa H., Murata T., Yoshiki A., Yamaguchi N., Lee C. H., Yang W. C., Tsai E. M., Obata Y., Yokoyama K. K., *Oncogene*, **29**, 6245–6256 (2010).
- 114) Huang Y. C., Hasegawa H., Wang S. W., Ku C. C., Lin Y. C., Chiou S. S., Hou M. F., Wu D. C., Tsai E. M., Saito S., Yamaguchi N., Yokoyama K. K., *BioMed. Res. Int.*, **2011**, 569034 (2011).
- 115) Tanigawa S., Lee C. H., Lin C. S., Ku C. C., Hasegawa H., Qin S., Kawahara A., Korenori Y., Miyamori K., Noguchi M., Lee L. H., Lin Y. C., Lin C. L. S., Nakamura Y., Jin C., Yamaguchi N., Eckner R., Hou D. X., Yokoyama K. K., *Cell Death Dis.*, **4**, e921 (2013).
- 116) Chiou S. S., Wang S. S. W., Wu D. C., Lin Y. C., Kao L. P., Kuo K. K., Wu C. C., Chai C. Y., Lin C. L. S., Lee C. Y., Liao Y. M., Wuputra K., Yang Y. H., Wang S. W., Ku C. C., Nakamura Y., Saito S., Hasegawa H., Yamaguchi N., Miyoshi H., Lin C. S., Eckner R., Yokoyama K. K., *Cancers*, **5**, 959–984 (2013).
- 117) Ku C. C., Hasegawa H., Lin C. S., Tsai M. H., Wuputra K., Eckner R., Yamaguchi N., Yokoyama K. K., *J. Nat. Sci.*, **1**, e74 (2015).
- 118) Anzai E., Hirata K., Shibazaki M., Yamada C., Morii M., Honda T., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1483–1489 (2017).
- 119) Yamaguchi N., Nakayama Y., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **292**, 8136–8148 (2017).
- 120) Hirata K., Takakura Y., Shibazaki M., Morii M., Honda T., Oshima M., Aoyama K., Iwama A., Nakayama Y., Takano H., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *J. Cell. Biochem.*, **120**, 2259–2270 (2019).
- 121) Hori N., Okada K., Takakura Y., Takano H., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **295**, 8798–8807 (2020).
- 122) Nakayama Y., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **304**, 570–581 (2005).
- 123) Nakayama Y., Kawana A., Igarashi A., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **312**, 2252–2263 (2006).
- 124) Ikeda K., Nakayama Y., Togashi Y., Obata Y., Kuga T., Kasahara K., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **314**, 3392–3404 (2008).
- 125) Fujita Y., Yamaguchi A., Hata K., Endo M., Yamaguchi N., Yamashita T., *BMC Cell Biol.*, **10**, 6 (2009).
- 126) Mishima Y., Miyagi S., Saraya A., Negishi M., Endoh M., Endo T. A., Toyoda T., Shingaj J., Katsumoto T., Chiba T., Yamaguchi N., Kitabayashi I., Koseki H., Iwama A., *Blood*, **118**, 2443–2453 (2011).
- 127) Mishima Y., Wang C., Miyagi S., Saraya A., Hosokawa H., Mochizuki-Kashio M., Nakajima-Takagi Y., Koide S., Negishi M., Sashida G., Naito T., Ishikura T., Onodera A., Nakayama T., Tenen D. G., Yamaguchi N., Koseki H., Taniuchi I., Iwama A., *Nat. Commun.*, **5**, 5872 (2014).
- 128) Ishibashi K., Fukumoto Y., Hasegawa H., Abe K., Kubota S., Aoyama K., Kubota S., Nakayama Y., Yamaguchi N., *J. Cell Sci.*, **126**, 625–637 (2013).
- 129) Yamada S., Marutsuka M., Inoue M., Zhang J., Abe S., Ishibashi K., Yamaguchi N., Eto K., *Int. J. Biochem. Mol. Biol.*, **5**, 21–29 (2014).
- 130) Takakura Y., Yamaguchi N., Honda T., Morii M., Yuki R., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1968–1975 (2017).
- 131) Yamaguchi N., Yuki R., Kubota S., Aoyama

- K., Kuga T., Hashimoto Y., Tomonaga T., Yamaguchi N., *Biochem. J.*, **471**, 67–77 (2015).
- 132) Yamaguchi N., Shibasaki M., Yamada C., Anzai E., Morii M., Nakayama Y., Kuga T., Hashimoto Y., Tomonaga T., Yamaguchi N., *J. Cell. Biochem.*, **118**, 1453–1461 (2017).
- 133) Kuki K., Yamaguchi N., Iwasawa S., Takakura Y., Aoyama K., Yuki R., Nakayama Y., Kuga T., Hashimoto Y., Tomonaga T., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **490**, 1045–1051 (2017).
- 134) Aoyama K., Yamaguchi N., Yuki R., Morii M., Kubota S., Hirata K., Abe K., Honda T., Kuga T., Hashimoto Y., Tomonaga T., Yamaguchi N., *Cell Biol. Int.*, **39**, 446–456 (2015).
- 135) Chackalaparampil I., Shalloway D., *Cell*, **52**, 801–810 (1988).
- 136) Roche S., Fumagalli S., Courtneidge S. A., *Science*, **269**, 1567–1569 (1995).
- 137) Tominaga T., Sahai E., Chardin P., McCormick F., Courtneidge S. A., Alberts A. S., *Mol. Cell*, **5**, 13–25 (2000).
- 138) Kuga T., Nakayama Y., Hoshino M., Higashiyama Y., Obata Y., Matsuda D., Kasahara K., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *Arch. Biochem. Biophys.*, **466**, 116–124 (2007).
- 139) Kuga T., Nakayama Y., Iwamatsu A., Fukumoto Y., Yokomori K., Yamaguchi N., *Anal. Biochem.*, **370**, 252–254 (2007).
- 140) Nakayama Y., Matsui Y., Takeda Y., Okamoto M., Abe K., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **287**, 24905–24915 (2012).
- 141) Matsui Y., Nakayama Y., Okamoto M., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *Eur. J. Cell Biol.*, **91**, 413–419 (2012).
- 142) Nakayama Y., Saito Y., Soeda S., Iwamoto E., Ogawa S., Yamagishi N., Kuga T., Yamaguchi N., *J. Cell. Biochem.*, **115**, 763–771 (2014).
- 143) Okamoto M., Nakayama Y., Kakihana A., Yuki R., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *J. Cell. Biochem.*, **117**, 894–903 (2016).
- 144) Honda T., Soeda S., Tsuda K., Yamaguchi C., Aoyama K., Morinaga T., Yuki R., Nakayama Y., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *Sci. Rep.*, **6**, 38751 (2016).
- 145) Iwamoto E., Ueta N., Matsui Y., Kamijo K., Kuga T., Saito Y., Yamaguchi N., Nakayama Y., *J. Cell. Biochem.*, **117**, 1340–1351 (2016).
- 146) Kakae K., Ikeuchi M., Kuga T., Saito Y., Yamaguchi N., Nakayama Y., *Cell. Signal.*, **30**, 19–29 (2017).
- 147) Morii M., Kubota S., Hasegawa C., Takeda Y., Kometani S., Enomoto K., Suzuki T., Yanase S., Sato R., Akatsu A., Hirata K., Honda T., Kuga T., Tomonaga T., Nakayama Y., Yamaguchi N., Yamaguchi N., *Sci. Rep.*, **11**, 2616 (2021).
- 148) Martin G. S., *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **2**, 467–475 (2001).
- 149) Ikeuchi M., Fukumoto Y., Honda T., Kuga T., Saito Y., Yamaguchi N., Nakayama Y., *Int. J. Mol. Sci.*, **17**, 871 (2016).
- 150) Horiuchi M., Kuga T., Saito Y., Nagano M., Adachi J., Tomonaga T., Yamaguchi N., Nakayama Y., *J. Biol. Chem.*, **293**, 15524–15537 (2018).
- 151) Nakayama Y., Soeda S., Ikeuchi M., Kakae K., Yamaguchi N., *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 811 (2017).
- 152) Yuki R., Hagino M., Ueno S., Kuga T., Saito Y., Fukumoto Y., Yamaguchi N., Yamaguchi N., Nakayama Y., *J. Cell. Mol. Med.*, **25**, 1677–1687 (2021).
- 153) Temin H. M., Rubin H., *Virology*, **6**, 669–688 (1958).
- 154) Nakatani S., Naoe A., Yamamoto Y., Yamauchi T., Yamaguchi N., Ishibashi M., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **13**, 2879–2881 (2003).
- 155) Ohtsuki T., Koyano T., Kowithayakorn T., Yamaguchi N., Ishibashi M., *Planta Med.*, **70**, 1170–1173 (2004).
- 156) Ohtsuki T., Koyano T., Kowithayakorn T., Sakai S., Kawahara N., Goda Y., Yamaguchi N., Ishibashi M., *Bioorg. Med. Chem.*, **12**, 3841–3845 (2004).
- 157) Tragulpakseerojn J., Yuki R., Honda T., Morii M., Apirakaramwong A., Yamaguchi N., Pamonsinlapatham P., Yamaguchi N., *Fund. Toxicol. Sci.*, **1**, 143–149 (2014).
- 158) Tragulpakseerojn J., Yamaguchi N., Pamonsinlapatham P., Wetwitayaklung P., Yoneyama T., Ishikawa N., Ishibashi M., Apirakaramwong A., *Trop. J. Pharm. Res.*,

- 16, 371–378 (2017).
- 159) Seira N., Yanagisawa N., Suganami A., Honda T., Wasai M., Regan J. W., Fukushima K., Yamaguchi N., Tamura Y., Arai T., Murayama T., Fujino H., *Biol. Pharm. Bull.*, **40**, 1806–1812 (2017).
- 160) Nakayama Y., Igarashi A., Kikuchi I., Obata Y., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *Exp. Cell Res.*, **315**, 2515–2528 (2009).
- 161) Kikuchi I., Nakayama Y., Morinaga T., Fukumoto Y., Yamaguchi N., *Cell Biol. Int.*, **34**, 645–653 (2010).
- 162) Nakayama Y., Yamaguchi N., *Int. Rev. Cell Mol. Biol.*, **305**, 303–337 (2013).
- 163) Fukumoto Y., Miura T., Morii M., Kubota S., Honda T., Kubota S., Morinaga T., Yamaguchi N., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **450**, 885–890 (2014).
- 164) Fukumoto Y., Kuki K., Morii M., Miura T., Honda T., Ishibashi K., Hasegawa H., Kubota S., Ide Y., Yamaguchi N., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **452**, 542–547 (2014).
- 165) Fukumoto Y., Morii M., Miura T., Kubota S., Ishibashi K., Honda T., Okamoto A., Yamaguchi N., Iwama A., Nakayama Y., Yamaguchi N., *J. Biol. Chem.*, **289**, 12313–12329 (2014).
- 166) Miura T., Fukumoto Y., Morii M., Honda T., Yamaguchi N., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Cell Biol. Int.*, **40**, 16–26 (2016).
- 167) Fukumoto Y., Ikeuchi M., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **477**, 982–987 (2016).
- 168) Fukumoto Y., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **490**, 1147–1153 (2017).
- 169) Fukumoto Y., Takahashi K., Suzuki N., Ogra Y., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **504**, 380–386 (2018).
- 170) Fukumoto Y., Nakayama Y., Yamaguchi N., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **517**, 310–316 (2019).
- 171) Yamaguchi N., *Biol. Pharm. Bull.*, **35**, 1621 (2012).
- 172) Yamanaka M., Tada Y., Kawamura K., Li Q., Okamoto S., Chai K., Yokoi S., Liang M., Fukamachi T., Kobayashi H., Yamaguchi N., Kitamura A., Shimada H., Hiroshima K., Takiguchi Y., Tatsumi K., Tagawa M., *J. Thorac. Oncol.*, **7**, 1850–1857 (2012).
- 173) Kawamura K., Hiroshima K., Suzuki T., Chai K., Yamaguchi N., Shingyoji M., Yusa T., Tada Y., Takiguchi Y., Tatsumi K., Shimada H., Tagawa M., *Am. J. Clin. Pathol.*, **140**, 544–549 (2013).
- 174) Suzuki T., Kawamura K., Li Q., Okamoto S., Tada Y., Tatsumi K., Shimada H., Hiroshima K., Yamaguchi N., Tagawa M., *BMC Cancer*, **14**, 713 (2014).
- 175) Takei Y., Okamoto S., Kawamura K., Jiang Y., Morinaga T., Shingyoji M., Sekine I., Kubo S., Tada Y., Tatsumi K., Shimada H., Hiroshima K., Yamaguchi N., Tagawa M., *Cancer Gene Therapy*, **22**, 445–453 (2015).
- 176) Qin Y., Sekine I., Fan M., Takiguchi Y., Tada T., Shingyoji M., Hanazono M., Yamaguchi N., Tagawa M., *Cancer Cell Int.*, **17**, 120 (2017).
- 177) Morio H., Sun Y., Harada M., Ide H., Shimozato O., Zhou X., Higashi K., Yuki R., Yamaguchi N., Hofbauer J. P., Guttman-Gruber C., Anzai N., Akita H., Chiba K., Furihata T., *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 445–449 (2018).
- 178) Chai K., Ning X., Nguyễn T. T. T., Zhong B., Morinaga T., Li Z., Shingyoji M., Tada Y., Tatsumi K., Shimada H., Hiroshima K., Yamaguchi N., Tagawa M., *Oncotarget*, **9**, 26130–26143 (2018).
- 179) Qin Y., Sekine I., Hanazono M., Morinaga T., Fan M., Takiguchi Y., Tada Y., Shingyoji M., Yamaguchi N., Tagawa M., *Mol. Oncol.*, **13**, 1419–1432 (2019).
- 180) Schoenherr C., Frame M. C., Byron A., *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, **34**, 29–58 (2018).