
総 説

体内時計のバイオロジー

八木田 和 弘*

京都府立医科大学大学院医学研究科神経生理学

Cell-autonomous development and expression of circadian clock function in mammals

Kazuhiro Yagita

*Department of Neuroscience and Cell Biology,
Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science*

抄 録

体内時計は、生体機能に周期性を与える内因性の自律振動体であり、環境周期に同調する性質を持つ。これにより、周期的に変動する環境条件に生体機能を適応させることができる。体内時計は、バクテリアから人に至るまで、地球上のほとんどの生物に備わる普遍的な生命機能の一つであり、それぞれの生物において重要な生理機能との関連が報告されている。体内時計は、広義には様々な周期を刻む機構を含むが、一般的には約1日周期の時計である「概日時計」を指すことが多い。本稿では哺乳類概日時計について概説し、とくに筆者の代表的な研究成果を中心に、体内時計研究の最先端を紹介する。

キーワード：体内時計、サーカディアンリズム、時計遺伝子、ES細胞、リプログラミング。

Abstract

The circadian clock regulates many aspects of physiology and behavior such as sleep-wake cycles, body temperature, liver metabolism, renal activity, various hormonal secretion and cell proliferation. For the long time, it has been believed that the circadian clock oscillator exists only in the neurons of hypothalamic suprachiasmatic nucleus (SCN) where the circadian center of mammals resides. However, recently we have elucidated that even cultured cell lines involve the intrinsic self-sustained oscillating system. In addition, we also discovered that mammalian cellular circadian clock residing in our body developed cell-autonomously during the cellular differentiation process. These mechanisms of mammalian circadian clock may widely correlate with various types of diseases or physiological dysfunctions.

Key Words: Circadian clock, Clock genes, Chronogenesis, ES cells, Reprogramming.

平成23年10月25日受付

*連絡先 八木田和弘 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上ル梶井町465番地

kyagita@koto.kpu-m.ac.jp

開示すべき潜在的利益相反状態はない

はじめに

一生にわたって刻み続ける約 24 時間周期の概日リズムは体内時計（概日時計）によって制御されている。概日時計は、多くの生理機能の時間的統合を担い、哺乳類の測時機構の基盤をなす。概日時計は、生体機能に周期性を与える内因性の自律振動体であり、環境周期に同調する性質を持つ。これにより、周期的に変動する環境条件に生体機能を適応させることができる。体内時計は、バクテリアから人に至るまで、地球上のほとんどの生物に備わる普遍的な生命機能の一つであり、最も普遍的な生命機能の一つである。筆者はこれまで、哺乳類概日時計の分子機構を解析し、1) 線維芽細胞など末梢の細胞にも概日時計が備わっていること、2) 概日時計は、細胞分化と密接に関連して細胞自律性に形成されること、などを発見した。本稿では筆者のこれまでの研究を中心に、体内時計（概日時計）のしくみと医学的意義について述べる¹⁻⁴⁾。

哺乳類概日時計の階層性

哺乳類における概日時計の中核は、視床下部の視交叉上核 (Suprachiasmatic nucleus: SCN) に存在している。SCN は、破壊によって睡眠覚醒や活動といった行動リズムが完全に消失することから、中枢時計と呼ばれる。哺乳類では、長年この SCN のみが概日時計を発振することができる唯一無二の器官であると考えられてきた。しかし、時計遺伝子の発見以降の分子レベルでの研究が進むにつれ、実際はほとんどの臓器や組織に概日時計振動体が備わっており、それぞれの組織において時刻を刻んでいることが分かってきた⁵⁾⁶⁾。さらに、*rat-1* や *NIH3T3* などの細胞株においても、生体の概日時計の振動メカニズムが保存されており、自律性の概日リズムを刻むことが明らかとなった⁷⁾⁸⁾。これらの細胞株は、生体から切り離され長いものでは数十年も培養され続けているにもかかわらず、生体内の時計振動機構がほぼ完全に保たれていることは特筆すべきことである。これらの研究を通

じて、哺乳類の概日時計は、ほとんどの組織において個々の細胞に備わっており、1 細胞レベルで振動を発することができることが証明された。

一方で、SCN を破壊すると行動リズムは消失し、末梢臓器においても臓器レベルでの時計遺伝子発現リズムも消失する。この現象は一見、末梢組織にも概日時計振動体が備わっているという上の記述に矛盾しているように思われる。しかし、実は末梢臓器における個々の細胞の概日時計が脱同調しているために、リズムが消失しているように見えるだけで、1 細胞レベルでは個々の細胞がリズムを刻み続けているのである。

この知見は、哺乳類においては、視交叉上核 (SCN) が全身の末梢組織の概日時計を同調させていることを示しており、それゆえ SCN を中枢時計とし、それ以外の組織細胞の概日時計を末梢時計と総称することになった。つまり、オーケストラに例えると、SCN は指揮者であり、個々の楽器を奏でる末梢時計を調律しているということになる。このように、哺乳類の概日リズムは中枢時計と末梢時計が階層的に協調して制御しているのである (図 1)。

哺乳類概日時計の振動メカニズム

概日時計の振動を生み出すメカニズムの中核は、時計遺伝子と呼ばれる一連の遺伝子群の転写と翻訳を介したフィードバックループであると考えられている。哺乳類では、bHLH 型転写因子である *CLOCK* と *BMAL1* がヘテロ二量体を形成し、*Period (Per)* や *Cryptochrome (Cry)* などネガティブ因子と呼ばれる遺伝子のプロモーター領域にある E-box と呼ばれる CACGTG 配列に結合することで、*Per* や *Cry* などの遺伝子発現を正に調節する⁹⁾¹⁰⁾。発現した *PER* タンパク質は Casein Kinase I ϵ, δ によってリン酸化された後に分解される¹¹⁾。さらに *PER* タンパク質と *CRY* タンパク質は結合することで互いに安定化して核内に蓄積していき、ポジティブ因子 *BMAL1-CLOCK* によって活性化された *Per* および *Cry* 遺伝子の発現を抑制する (図 2)。

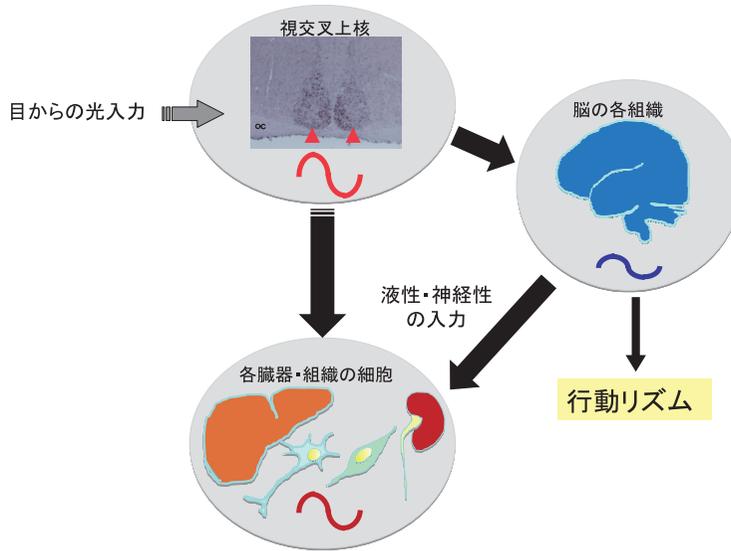


図1 概日リズムの階層性制御機構

概日時計は、中枢である視交叉上核 (SCN) のみならず、全身のほとんどの細胞に存在し、自律振動している。末梢組織の概日時計を視交叉上核の中核時計が、液性あるいは神経性に制御し全身の概日リズムを統合している。

哺乳類概日リズムに必須のコア・フィードバックループ

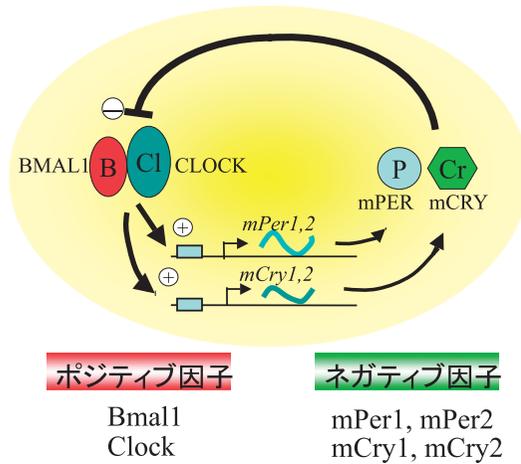


図2 時計遺伝子が構成するフィードバックループ

BMAL1-CLOCK による転写活性が一日のうちで大きく変動するのには理由がある。我々は、BMAL1 および CLOCK タンパク質の C 末端部分には転写活性化に必須のドメインがあるが、このドメインに重なるように抑制因子の CRY

タンパク質が結合し、転写を抑制することで切れの良い転写のオンとオフの制御が可能になることを明らかにした¹²⁾。これらの時計遺伝子を欠失させたマウスでは、概日リズムに異常をきたすことから、このフィードバックループを特

に「コア・ループ」と呼ぶ。他の生物でも、それぞれの時計遺伝子が構成するフィードバックループが概日時計の基本骨格であると考えられている。

さらに、哺乳類では、コアループに加えて、副次的ループが機能している。BMAL1/CLOCKによって転写が活性化される *Rev-erba* 遺伝子と *Rory* 遺伝子の翻訳産物 REV-ERB α タンパク質と ROR γ タンパク質は二量体を形成して *Bmal1* 遺伝子のプロモーター領域に結合し、*Bmal1* 遺伝子の転写を抑制する。また、別の副次的ループとして、同じように BMAL1/CLOCKによって転写が活性化される *Dbp* 遺伝子の翻訳産物 DBPは *Per1* や *Per2* 遺伝子のプロモーター領域に結合してこれらの遺伝子発現を正に制御する。これに対して E4BP4は DBP タンパク質と同じ配列に結合し *Per1* や *Per2* 遺伝子発現を抑制する。これらの副次的ループを構成する遺伝子をノックアウトしても概日リズムは消失することではなく、必須の機構ではないと考えられるが、おそらく概日リズムの安定性に寄与していると考えられている。

近年、シアノバクテリアでは、時計タンパク質 KaiABC のみで 24 時間周期の自己リン酸化反応を生み出すことが示されている¹³⁾。概日時計の様々な性質は全ての生物間で共通の普遍的であることを考えると、哺乳類にもこのような安定した 24 時間を生み出す機構が備わっているのかもしれないが、現在のところ、哺乳類でシアノバクテリアの KaiABC にあたるような正確な 24 時間周期を発振するタンパク質、あるいは化学振動子の存在は証明されていない。しかし、2010 年、イギリスのグループから、哺乳類の赤血球で peoxyredoxin (PRX) の酸化還元反応に約 1 日の周期性が見られ、転写のフィードバックループを介さない振動の存在が報告された¹⁴⁾。ただ、この PRX の酸化還元リズムは不安定であり、周期を決定している安定な化学振動子と考えるには合理性に欠ける部分もある。いずれにしても、いまだ哺乳類の概日時計の発振原理は解明された訳ではなく、今後の更なる研究が待たれるところである。

体内時計の発生と細胞分化との関連

哺乳類の概日リズムの発生は遅い。ヒトでは、生後すぐには睡眠覚醒リズムが見られず、約 2 ヶ月後になってようやく概日リズムが出現する。マウスやラットなどの実験動物でも同様に、出生直前までは遺伝子レベルでも視交叉上核などで概日リズムが見られず、時計の振動体の形成が完了していないことを示している¹⁵⁾。

また、ラットなどの実験動物において妊娠中の母親のストレスや母親の育児放棄などがこの概日リズムに異常を来すなどの実験結果も報告されている。これらの知見は、胎児期には概日時計が完成されておらず、妊娠中や新生児期の様々な環境因子が子の概日時計の形成に影響を与える可能性があることを示している。発達期の概日時計は外界からの影響を受けやすく、成体の概日時計が頑健で安定なことにくらべると、発生発達期のそれは極めて脆弱である。発生発達期の概日時計の形成過程や、可塑性および臨界期の問題は、今後小児発達障害などの観点からも、その研究の重要性は増してくる。

1. ES 細胞の概日時計研究への応用

ほぼ全身の細胞に存在する概日時計がいつどのように成立するのか、また、約 24 時間の周期はどのように形成されていくのか、その過程を詳細に解析することで、概日時計の特徴である非常に安定な周期を示す発振原理を真に理解する事ができる。その理解があつて初めて、概日リズム異常との関連が示唆されている様々な疾患の克服に向けた治療・予防戦略を正しく構築できるのではないだろうか。このような考えのもと、筆者は、多能性幹細胞である embryonic stem cell (ES 細胞) や induced pluripotent stem cell (iPS 細胞) の性質を利用して、幹細胞生物学と概日時計研究を融合した実験系の構築による概日時計振動の再現を試みた。

哺乳類概日時計の中核である視交叉上核では、出生数日前に時計遺伝子の振動が見られるようになる¹⁵⁾。また、精子を形成する生殖細胞や、受精卵から胞胚期頃までの初期胚には概日時計の振動が見られないという報告がある¹⁶⁻¹⁸⁾。

これらのことから、哺乳類概日時計は、胎児期のどこかの時点で振動をはじめののだろうと考えられる。したがって、概日時計が振動し始める過程を詳細に解析すれば、概日時計の成立原理が浮かび上がってくるに違いない。しかし、胚や胎仔を生きのまま細胞レベルで長期間にわたり観察することは技術的に極めて困難であり、概日時計がいつどのように振動し始めるのかを解析することは現時点では不可能と言わざるを得ない。

そこで、筆者らは、ES細胞をモデル系として用い、哺乳類概日時計の成立過程を再現できないかと考えた。まず、時計遺伝子 *Bmal1* および *Dbp* のプロモーターにホタルルシフェラーゼ遺伝子をつないだレポーターを作製し、マウスのES細胞に導入して、概日時計振動の状態を検出できる発光ES細胞株を樹立した。上述のように、初期胚では概日時計の振動が見られないことは報告されているが、ES細胞は不死化した細胞株であり、まずこのES細胞自体に概日時計の振動が見られるかどうかを検討した。樹立した発光ES細胞を観察したところ、体細胞で見られるような時計遺伝子の概日リズムは全く見られず、ES細胞には概日時計はリズム発振装置として機能していないことが明らかとなった¹⁹⁾ (図3)。

2. *In vitro* 細胞分化に伴う概日時計の誘導

前にも述べた通り、ES細胞からマウス個体になりうる。*in vivo*では、ES細胞由来の細胞がマウス胎仔組織内において分化していく過程で、概日時計が形成されていく。しかし、母体内の胚を細胞レベルで長期間連続観察することは非常に困難であり、また、母体内にあることで何らかの同調因子や細胞の周辺環境などが概日時計の成立に影響する可能性が除外しにくい、などの問題がある。これらの問題を回避するため、そして、そもそも受精卵が発生・分化の過程で、個々の細胞自律的に概日時計の振動体を成立させ得るものなのか、という問を明らかにするため、筆者らは、ES細胞の*in vitro*での分化誘導培養による概日時計形成能をみることにした。

ES細胞を*in vitro*で分化誘導するにあたり、筆者らはレチノイン酸を投与する方法を試みた。ES細胞の分化誘導法は様々なものが報告されているが、今回の実験における目的ではできるだけ一斉に同じようなスピードでES細胞を分化させる必要があると考えたためである。ES細胞をレチノイン酸投与によって分化誘導したところ、分化誘導開始後数日間には全く概日時計振動は見られなかった。一週間ほどたったところでも、明瞭なリズムは見られなかったが、さらに分化誘導開始後二週間まで引き続き観察したところ、*Bmal1* プロモーターおよび *Dbp* プロモーターで転写されるルシフェラーゼの発光に、明瞭な概日振動が出現した。顕微鏡を用いた単一細胞レベルでの詳細な解析から、概日時計振動体は個々の細胞において細胞の分化に伴って徐々に形成されることが示唆された¹⁹⁾。

レチノイン酸投与条件では約2週間で概日時計の形成が見られ、これが*in vivo*で見られる胚発生期の概日時計の発生時期とかなり近いものであった。しかし、我々自身の研究によって、常にどのような培養条件でも約2週間で概日時計が形成されるという訳ではなく、培養条件によって細胞の分化スピードが異なることに依存して概日時計の形成までに要する時間はまちまちであることが分かっている。

3. リプログラミングによる概日振動の再消失

細胞の分化と概日時計の形成に相関がある事が示唆されたが、これを確かめるために、分化して概日時計が備わっている細胞をリプログラミングする事で、iPS細胞にしたとき、形成された概日時計はどのような影響を受けるのかを解析した。まず、ES細胞から*in vitro*で神経幹細胞に分化誘導し、同様に概日時計の振動が生じることを確認した¹⁹⁾。その上で、山中らの方法に従って、この神経幹細胞に *Sox2*, *Klf4*, *Oct3/4*, *c-Myc* を導入し、リプログラミングを行った²⁰⁾。ES細胞のマーカーである *Nanog* を強く発現しているiPS細胞の概日リズムを測定してみると、再びES細胞と同様に概日振動が消失していた。さらに、リズムが消失したiPS

概日リズムの発生とリプログラミング

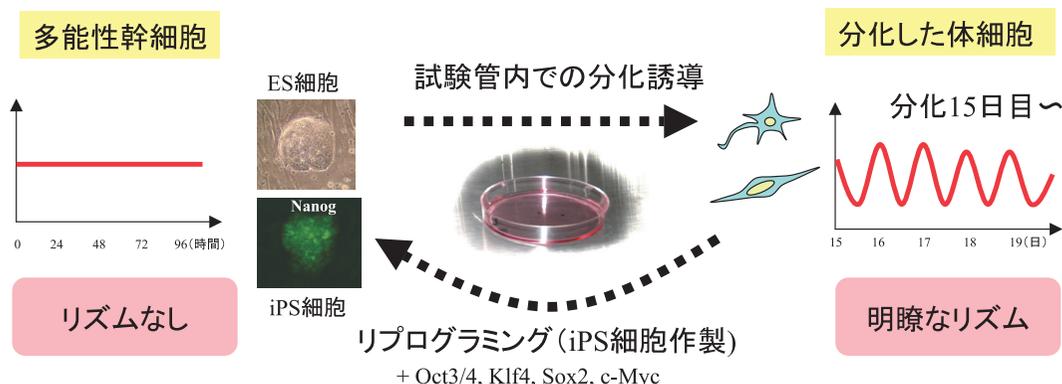


図3 細胞分化・リプログラミングと哺乳類概日時計の発生

ES細胞を*in vitro*で分化誘導すると概日時計の振動体が形成される。時計が形成された細胞をリプログラミングすると概日時計は再び消失する。概日時計の発生は、細胞分化と密接に関連した現象である。

細胞を再度レチノイン酸で分化誘導すると、また明瞭な概日時計の振動が現れた⁵⁾。これらの結果から、概日時計振動体の形成が、細胞の分化というプロセスと密接に関連していることが明らかになった(図3)。

4. 細胞分化と概日時計の関連が示唆すること

万能細胞からの概日時計の構築は、細胞分化と密接に関連することが分かった。しかし、その詳細なメカニズムはほとんど分かっていない。24時間という長い周期を非常に安定に発振し続ける振動現象が、細胞内にどのように構築されていくのか?そのしくみが解明され自在にデザインできた時、生命における測時機構の基盤をなす概日時計を真に理解できたといえるだろう。万能細胞には概日時計が機能していないことを述べたが、ES細胞やiPS細胞のような人工的な万能細胞のみならず、生体においても精祖細胞といった生殖系列の細胞にも概日時計の振動がないことが分かっている。これらの細胞に共通なのは、時間の支配を受けていないことである。つまり、5年前であろうが10年先であろうが、同じ株のES細胞をつかって作製された仔マウスには原則的に違いは見られない。

万能細胞が時間軸を生み出し分化が開始された時から、時間に伴って変化する生体機能の制御に必要な概日時計が構築され始めることは単なる偶然ではないように思う。リプログラミングによる概日時計の再消失は、細胞の分化開始と概日時計の形成が不可分であるということを物語っている。さらに、一部のがん細胞に概日時計の消失あるいは機能不全が見られる理由も、細胞分化と概日時計振動体の不可分性と無関係ではないと考えている。幹細胞生物学や発生工学と時間生物学を融合した新たな研究テーマは、「時間軸」という共通の切り口から思いのほか広い波及効果を生み出す可能性がある。

概日リズムと疾患の関係

哺乳類概日時計の中核は視交叉上核であるが、ほとんどの臓器・組織を構成する細胞や培養細胞株にも自律性の概日時計振動体が備わっている。これらの知見は概日時計が単に睡眠覚醒などの活動リズムを制御しているのみならず、個々の細胞における生理機能の制御にも関わっている可能性を示すものである。

疾患についても、それを裏付けるように、以

前から知られている鬱病や睡眠障害などに加えて、近年、がんなど細胞病ともいえる疾患と概日時計との関連が示唆されている。これらの根底には、概日時計の振動メカニズムと様々な生理機能を制御するメカニズムの間にクロストークがあることを示しており、これを明らかにすることが様々な疾患を理解し、治療や予防を行う上で重要である。

近年の研究で様々な疾患と概日時計との関連が指摘されているが、中でも2007年には「概日リズム障害を伴う交替制勤務」が国連WHOから発がんのリスク因子にあげられたことは特筆すべきことである。シフトワーカーに前立腺がんや乳がんの発症率が有意に高いことや、がん細胞では時計遺伝子発現の異常などの概日時計障害が見られる場合があることなどのエビデンスが報告された。このことは、社会的に見て、労働安全衛生も含めた広い領域において、「がん」と概日時計の相関メカニズムの解明は極めて重要な研究テーマとなっていくことを示している。しかし、その重要性にもかかわらず、現在まで、がんと概日時計の相関メカニズムを解明するための研究は極めて乏しく、その詳細はほとんど分かっていない。その理由として、

概日リズムの制御に階層性が存在するために、階層横断的に解析を行うことが困難であることがあげられる。

このほか、エネルギー代謝については脂質合成や代謝と時計遺伝子 *Bmal1* の関係が分子レベルで詳細に解析され、概日時計とメタボリックシンドロームとの関連が示唆されている。また、ウイルス性肝炎の治療に用いられるインターフェロンは、その副作用として鬱症状が有名であるが、これもインターフェロンによる概日リズムへの影響が関与すると考えられている。

このように、哺乳類概日時計は細胞機能から全身状態に至るまで様々なレベルで生体機能に関与している。概日時計が最も基本的な細胞機能であることを考えると当然とも言えるが、上述の様に、哺乳類概日時計の振動原理が全て理解できている訳ではない。普遍的な生命現象であり、なおかつ我々の健康にも密接に関連している概日時計の基礎的研究はますます重要度を増している。そこから得られた知見をもとにして、概日時計を意識した疾病の治療法や予防法を考えていくことで、より健康の増進に寄与できると考えられる¹⁻⁴⁾。

文 献

- 1) 八木田和弘. 細胞の分化・リプログラミングと概日時計. 細胞工学 2010; 29: 366-377.
- 2) 八木田和弘. 哺乳類の生物時計. 太陽紫外線防御研究委員会. からだと光の辞典. 東京: 朝倉書店, 2010; 293-297.
- 3) 八木田和弘. 万能細胞の生物時計デザイン. 細胞工学 2011; 印刷中.
- 4) 八木田和弘. 細胞分化と体内時計の成立. 医のあゆみ 2011; 印刷中.
- 5) Yamazaki S, Numano R, Abr M, Hida A, Takahashi R, Ueda M, Block GD, Sakai Y, Menaker M, Tei H, et al. Resetting central and peripheral circadian oscillators in transgenic rats. Science 2000; 288: 682-685.
- 6) Yoo S. et al. PERIOD2: LUCIFERASE real-time reporting of circadian dynamics reveals persistent circadian oscillations in mouse peripheral tissues. Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 5539-46.
- 7) Balsalobre A, Damiola F and Schibler U. A serum shock induces circadian gene expression in mammalian tissue culture cells. Cell 1998; 93: 929-937.
- 8) Yagita K, Tamanini F, van der Horst G and Okamura H. Molecular mechanisms of the biological clock in cultured fibroblasts. Science 2001; 292: 278-281.
- 9) Reppert SM and Weaver DR. Coordination of circadian timing in mammals. nature 2002; 418: 935-941.
- 10) Lowrey PL and Takahashi JS. Mammalian circadian biology: elucidating genome-wide levels of temporal organization. Annu Rev Gemonics Hum Genet 2004; 5: 407-441.
- 11) Lowrey PL, Shimomura K, Antoch MP, Yamazaki S, Zemenides PD, Ralph MR, Menaker M and Takahashi JS. 2000. Positional syntenic cloning and functional characterization of the mammalian circadian mutation

- tau. *Science* 2000; 288: 483-492.
- 12) Kiyohara YB, Tagao S, Tamanini F, Morita A, Sugisawa Y, Yasuda M, Yamanaka I, Ueda HR, van der Horst GTJ, Kondo T, and Yagita K. The BMAL1 C terminus regulates the circadian transcription feedback loop. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10074-9.
- 13) Nakajima M, Imai K, Ito H, Nishiwaki T, Murayama Y, Iwasaki H, et al. Reconstruction of circadian oscillation of cyanobacterial KaiC phosphorylation in vitro. *Science* 2005; 308: 414-415.
- 14) O'Neill JS, Reddy AB. Circadian clocks in human red blood cells. *Nature* 2011; 469: 498-503.
- 15) Sumova A, Bendova Z, Sladek M, El-Hennamy R, Laurinova K, Jindrakova Z and Illnerova H. 2006. Setting the biological time in central and peripheral clocks during ontogenesis. *FEBS Lett* 580: 2836-2842.
- 16) Alvarez JD, Chen D, Storer E, Sehgal A. Non-cyclic and developmental stage-specific expression of circadian clock proteins during murine spermatogenesis. *Biol Reprod* 2003; 69: 81-91.
- 17) Morse D, Cermakian N, Brancorsini S, Parvinen M, Sassone-Corsi P. No circadian rhythms in testis: Period1 expression is clock independent and developmentally regulated in the mouse. *Mol Endocrinol* 2003; 17: 141-151.
- 18) Amano T, Matsushita A, Hatanaka Y, Watanabe T, Oishi K, Ishida N, Anzai M, Mitani T, Kato H, Kishigami S, Saeki K, Hosoi Y, Iritani A, Matsumoto K. *Biol Reprod* 2009; 80: 473-483
- 19) Yagita K, Horie K, Koinuma S, Nakamura W, Yamanaka I, Urasaki A, Shigeyoshi Y, Kawakami K, Shimada S, Takeda J, Uchiyama Y. Development of circadian oscillator during differentiation of mouse embryonic stem cell in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 3846-3851.
- 20) Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 2006; 126: 663-676.

著者プロフィール



八木田 和弘 Kazuhiro Yagita

所属・職：京都府立医科大学大学院医学研究科神経生理学・教授

略 歴：1995年3月 京都府立医科大学医学部医学科卒業

1995年4月 研修医（京都府立医科大学部附属病院）第3内科

1997年4月 京都府立医科大学大学院博士課程入学 解剖学第2

2000年5月 京都府立医科大学大学院医学研究科博士課程修了

2000年6月 神戸大学医学部第2解剖学講座助手（岡村均教授）

2002年6月 神戸大学大学院医学系研究科分子脳科学分野講師（同）

2004年3月 名古屋大学大学院理学研究科システム生命科学助教授

2006年11月 大阪大学大学院医学系研究科神経細胞生物学助教授

2010年9月 京都府立医科大学大学院医学研究科神経生理学教授

主な専門分野：環境生理学，時間生物学

主な業績：1. Yagita K, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2010; 107: 3846-3851.

2. Kiyohara YB, et al. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006; 103: 10074-9.

3. Yamamoto Y, Yagita K, et al. *Mol Cell Biol* 2005; 25: 1912-21 (Co-first Author).

4. Yagita K, et al. *EMBO J* 2002; 21: 1301-1314.

5. Yagita K, et al. *Science* 2001; 292: 278-81.

6. Yagita K, et al. *Genes & Dev* 2000; 14: 1353-63.