

10. 脱ニトロ化酵素遺伝子の同定と栄養機能学的発現誘導

辰巳 隆一

九州大学 大学院農学研究院 資源生物科学部門

Key words : 筋幹細胞 (衛星細胞), 活性化因子 HGF, ニトロ化, 脱ニトロ化, 加齢性筋萎縮・再生不全

緒言

加齢に伴い骨格筋の肥大・再生能が減弱し、筋細胞 (細長い巨大な細胞であるため“筋線維”と呼ばれる) が徐々に萎縮することが知られている。また、筋が損傷した場合には再生不全が起こり易く、筋線維が結合組織や脂肪組織に置き換わる現象も見られる (筋機能と柔軟性の低下)。これらの加齢性変化の要因に関してこれまでに、筋細胞老化説、筋幹細胞 (衛星細胞) 数の減少、筋幹細胞に分化するとされる特殊な間質系細胞の減少が報告されているが、研究事例によって実験結果が異なっているなどの不整合性や矛盾が散見される。また、これらの要因 (加齢に伴う諸現象) は列挙できても、なぜ・どのように誘導され徐々に進行するのかは不明である。加齢に伴う遺伝子発現プロファイルの変化なども幾つか指摘されているが、これを誘導する上流因子 (細胞増殖因子を含めた細胞外微小環境 (ニッチ) の変化など) とその作用機構を明らかにすることが強く求められている。従って現時点では、筋の加齢性変化を引き起こす仕組みは不明な点が多く残されており、大きな研究課題である。

一方、本研究代表者はこれまでに、骨格筋の肥大・再生の最初のイベントある「眠れる筋幹細胞 (衛星細胞) の活性化」の分子機構に関して研究を行い、物理刺激を引き金として、細胞外マトリックス (ECM) に結合・保持されている HGF (肝細胞増殖因子) が NO ラジカル依存的に遊離し、これが細胞膜受容体 c-met に結合すると筋幹細胞が活性化するカスケードを明らかにした ([1~4] などを参照)。HGF は現在までに認知されている唯一の活性化因子 (液性因子) である。この研究過程で「活性化抑制機構」の存在を洞察し、これが活性化因子 HGF のチロシン残基側鎖のニトロ化による不活化 (生理活性の消失) であることを見出した。即ち、受容体 c-met との結合部位を構成しているチロシン残基 (Y198、Y250) がペルオキシナイトライト (ONOO⁻: NO ラジカルとスーパーオキシド (O₂⁻) との反応により速やかに生成する高反応性の生体内分子) によってニトロ化されると、c-met に対する結合親和性を失い衛星細胞を活性化する生理機能を失うことや、この現象が加齢に伴い速筋型の IIx、IIa 型筋線維の ECM で顕著に進行・蓄積することなどを見出した。ヒトの骨格筋の加齢性変化の筋線維型選択性とも符合しており、HGF のニトロ化・不活化が加齢性筋萎縮・再生不全の新奇主要因であることを提起した。筋幹細胞の増殖や分化を制御する他の増殖因子 (FGF2、IGF1、TGF-β3) ではニトロ化は認められないことも考え合わせると、HGF のニトロ化・不活化は加齢性筋萎縮・再生不全以外の重要な生理的・病的変化にも関与している可能性がある [5, 6]。

ニトロ化・不活化した HGF からニトロ基を外すことができれば (脱ニトロ化)、HGF の生理活性は蘇り筋本来のホメオスタシス (筋の維持・再生) は回復すると考えられるが (筋の“若返り”)、脱ニトロ化酵素が実在しているかどうかは不明である。HGF の脱ニトロ化は加齢性筋萎縮・再生不全 (フレイルおよびサルコペニアを含めて) を予防・治療する強力な戦略となると期待されるので、脱ニトロ化酵素の同定を含めて発現機構を解明する学術的・社会的意義は極めて大きいと言える。そこで本研究では、脱ニトロ化活性が筋組織で発現しているかを先ず調べた後、その遺伝子 (群) の同定および発現誘導・充進を目的として実験を行った。若齢マウス (3 ヶ月齢) および老齢マウス (24 ヶ月齢) の後肢下腿部筋の PBS 抽出液に同程度の脱ニトロ化活性が認められ、若齢マウスにおいては筋損傷によりその発現レベルが顕著に増加することがわかった。脱ニトロ化活性は熱不耐性であり、分子量約 1 万以上の画分に存在し、筋損傷後 1 日目に発現が大きく上昇することを確認したが、

研究期間内では遺伝子の同定には至らなかった。網羅的解析手法を至適化し脱ニトロ化酵素と発現細胞を同定するよう引き続き注力する。

方 法

1. 筋抽出液の回収

C57BL/6J 雌性若齢マウス（3 ヶ月齢）および老齢マウス（24 ヶ月齢）の後肢下腿部筋を液体窒素下で粉碎した試料に PBS（1 mM EGTA 含有、pH 7.2）を加え攪拌し（10 mL/g 試料）、遠心分離して得られた上澄液を濾過滅菌して筋抽出液（ME）とした。損傷筋の抽出液を回収する場合には、カルディオトキシン（CTX）溶液を筋肉内注射し筋損傷を誘導した後、1 日目および 7 日目に先と同様に筋抽出液を回収した。1 μ M CTX 溶液を注入した場合を軽度の筋損傷（light injury）、10 μ M CTX 溶液の場合を重度の筋損傷（heavy injury）とした。

筋抽出液（軽度の筋損傷後 1 日目に回収）を、分画分子量 1 万の遠心式限外濾過膜を用いて体積を約 1/5 に減じた後、PBS を加え元の体積に戻した。この操作を計 3 回繰り返し、初回の濾液および分子量約 1 万以上の画分を回収した。

2. 筋抽出液の脱ニトロ化活性の評価

PBS に溶解した牛血清アルブミン（BSA）および HGF（キャリアタンパク質不含、R&D Systems 社製）にそれぞれ、対モル比 1 : 4,000 でペルオキシナイトライトを添加し、pH 7.4、37°C で 30 分間保持しニトロ化を誘導した [5, 6]。ニトロ化 BSA およびニトロ化 HGF に上記の筋抽出液を種々の割合で添加し 37°C で 1~5 分間処理した後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて Western blotting（WB）を行った。検出抗体は、HRP 標識抗ニトロチロシン抗体（clone 39B6、sc-32757 HRP）、HRP 標識抗 BSA 抗体（2A3E6、sc-32816 HRP）、および HRP 標識抗 HGF-N 末端領域抗体（H-10、sc-374422 HRP、いずれも Santa Cruz Biotechnology 社製）であり、CanGetSignal solution 1 で 1/2,500 に希釈して使用した。ECL 免疫反応像を FUSION SOLO.7S.EDGE imaging system（Vilber Lourmat 社製）にてデジタル出力した。2 重免疫染色する場合には、転写膜を 50°C のストリッピング溶液（2% SDS、0.8% β ME、62.5 mM Tris-HCl、pH 6.8）で 45 分間振盪した後、第 2 検出抗体でリプロービングした。

ニトロ化 HGF と筋抽出液（筋損傷後 1 日目で回収）を混合した試料を衛星細胞の初代培養系に添加し、BrdU 取り込みアッセイにより BrdU 陽性細胞の割合を測定した（図 4 の上段の模式図参照）。

また、c-met 結合親和性を評価するため、96-well プレートに固相化した c-met に対して上記の HGF 試料を加え、ビオチン化抗 HGF 抗体およびストレプトアビジン-HRP の ABC 法により TMB を基質として比色定量した [5, 6]。

3. HGF のニトロ化抑制活性を持つ機能性成分の探索

HGF に対してニトロ化抑制活性を有すると期待された 2 種の機能性物質（単一成分）を種々の対 HGF モル比で添加した後、ペルオキシナイトライト処理を行った（pH 7.2、37°C）。前項と同様に、WB により HGF のニトロ化レベルを可視化した。また、マウス飲水投与実験を行い（約 50 mg/kg 体重/日）、*in vivo* でのニトロ化抑制効果を検証した（ $n=3$ 個体/区）。即ち、加齢実験の代替として、数日間で筋組織中の HGF のニトロ化を誘導できる方法（詳細は未開示）を採用し、その処置前の 3 日間だけ、上記の単一成分を含む脱イオン水を自由飲水させた後（日平均飲水量を予め計測し、約 50 mg/kg 体重/日の摂取量になるように濃度を調整）、5 日間のニトロ化誘導処置を行った（動物実験承認番号：A20-014 および A22-082）。ふくらはぎの筋群（ヒフク筋、足底筋、ヒラメ筋）の厚さ 15 μ m の凍結切片を、1/100 に希釈した Fluorescein 標識抗ニトロ Y198-HGF 抗体（3A11C6、自作）、HiLyte Fluor 647 標識抗ニトロ Y250-HGF 抗体（6B82C3、自作）、および Alexa Fluor 594 標識抗 HGF-N 末端領域抗体（H-10、sc-374422 AF594、Santa Cruz Biotechnology 社製）でそれぞれ一晩染色した。

KEYENCE BZ-X700 蛍光顕微鏡を用いて撮像した。

4. 脱ニトロ化酵素の網羅的検索

アルゴリズムソフトウェアを用いた大規模高速演算を核とする *in silico* hybridization 法 [7] によって、酵母菌などの原核生物種の報告事例 [8] から抽出した類似活性をもつ遺伝子群をリファレンスとして関連酵素群の候補遺伝子の同定を試みた。得られた候補遺伝子に対して、スパコン環境を活用して、筋幹細胞（衛星細胞）および筋組織に含有される細胞の公開 RNAseq データを用いて発現部位ならびに発現時期の同定を行う予定であった。

結果および考察

1. 筋抽出液の脱ニトロ化活性

脱ニトロ化酵素遺伝子の同定にあたり、脱ニトロ化活性が筋組織（非損傷筋）で発現しているかを先ず調べた。若齢マウス（3ヶ月齢； $n=3$ 個体）の後肢下腿部のふくらはぎ筋群（ヒフク筋、足底筋、ヒラメ筋）の PBS 抽出液を調製し、これをニトロ化 BSA（対モル比 1 : 4,000 のペルオキシナイトで 30 分間、pH 7.4、37°C で処理した BSA）に添加した。筋抽出液の添加量は体積比で 1 : 50 に設定し、37°C で 5 分間保持した。BSA はリコン

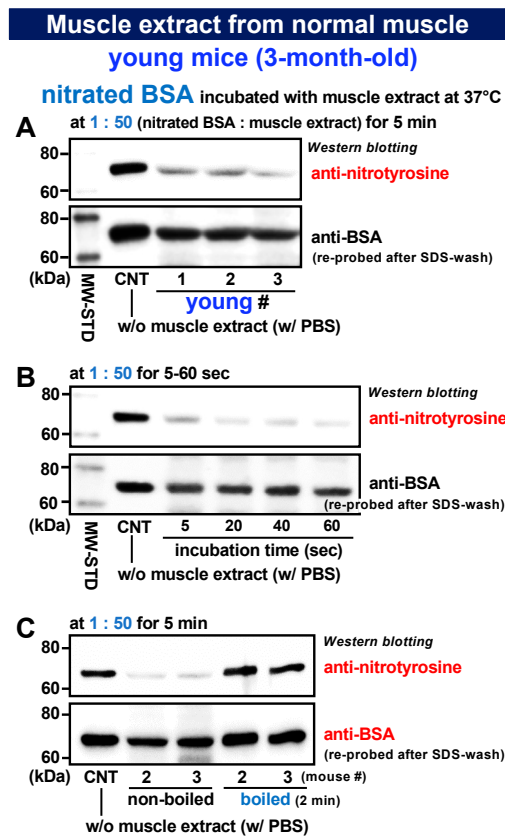


図 1. 筋抽出液の脱ニトロ化活性（若齢マウスの非損傷筋）

- A) ニトロ化 BSA を用いて筋抽出液 ($n=3$ 個体) の脱ニトロ化活性を評価した。
MW-STD: 分子量マーカ、CNT: 対照区 (筋抽出液の代わりに PBS を添加)。
- B) 筋抽出液での処理時間依存性 (5~60 sec)。
- C) 加熱 (2 分間の煮沸) による脱ニトロ化活性の失活 ($n=2$ 個体/区)。

ビナント HGF に比べ極めて安価であるので、チロシン残基の脱ニトロ化活性を調べる本実験には好都合であった。抗ニトロチロシンモノクローナル抗体で ECL-Western blotting (WB) を行い、ニトロ化レベルを可視化した (図 1 パネル A : 転写膜を抗 BSA 抗体でリプロービングし BSA 量をモニターできるので、ニトロ化レベルの変化を精度良く調べる事が可能)。いずれのマウス個体から調製した筋抽出液でも、BSA のニトロ化レベル (ニトロチロシン量) は低下したことから、筋抽出液に脱ニトロ化活性があると考えられた。このことは、筋抽出液処理時間の延長に伴ってニトロ化レベルが低下することや (パネル B)、筋抽出液を加熱処理 (パネル C : 2 分間の煮沸) すると脱ニトロ化活性が消失することからも支持された。従って、若齢マウスの正常筋 (非損傷筋) には脱ニトロ化活性が発現していることが示された。

次に、上記の脱ニトロ化活性を若齢マウス (3 ヶ月齢、 $n=3$ 個体) と老齢マウス (24 ヶ月齢 ; $n=3$ 個体) で比較した (図 2)。老齢マウスの筋抽出液においても、抗ニトロチロシン抗体陽性 BSA バンドの強度の減少が認められ、脱ニトロ化活性の存在を認めた。若齢マウスのそれと比較しても同程度であり、両者の間に明確な差異は観察されなかった (パネル A)。この結果は、ニトロ化 HGF を基質にした場合でも同様であったことから (パネル B)、若齢マウスと老齢マウスの筋組織 (非損傷筋) においては同程度の脱ニトロ化活性が発現していると考えられた。

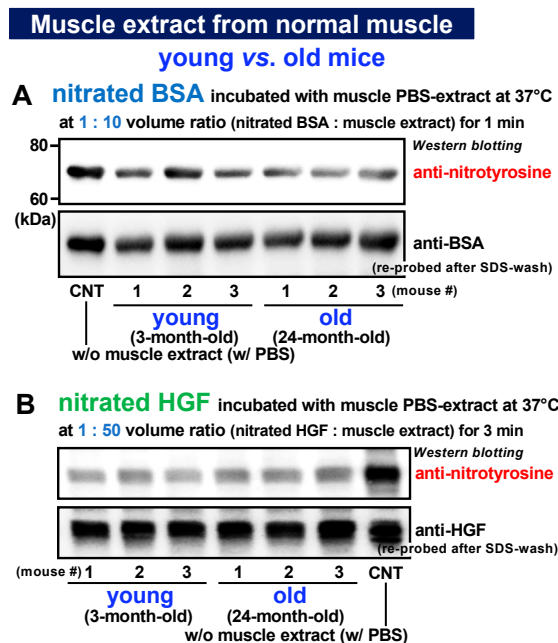


図 2. 筋抽出液の脱ニトロ化活性 (若齢マウスと老齢マウスの非損傷筋の比較)

- A) ニトロ化 BSA を用いて筋抽出液 ($n=3$ 個体) の脱ニトロ化活性を評価した。
 - B) ニトロ化 HGF を用いて筋抽出液 ($n=3$ 個体) の脱ニトロ化活性を評価した。
- CNT、対照区 (筋抽出液の代わりに PBS を添加)。

脱ニトロ化活性レベルが筋損傷によって変化するかを若齢マウスと老齢マウスでそれぞれ調べた結果を図 3 に示す ($n=2\sim3$ 個体/区)。CTX 溶液をふくらはぎ筋群に各々注入し筋損傷を誘導した後、1 日目に筋抽出液を回収し、先と同様にニトロ化 BSA を基質として脱ニトロ化活性を WB により可視化した (BSA 量でノーマライズしたデンストグラムをパネル C に示す)。若齢マウスの損傷筋抽出液をニトロ化 BSA に添加すると、BSA のニトロ化レベルは顕著に低下したことから、筋抽出液に脱ニトロ化活性を認めた。非損傷筋と比較して高い脱ニトロ化活性があり、また、重度の筋損傷 (heavy injury) に比べ軽度の筋損傷 (light injury) で有意に高い脱ニトロ化活性を示した (パネル A、C ; $p<0.05$)。一方、老齢マウスの筋抽出液では、非損傷筋と比較して軽度の筋損傷 (light injury) で脱ニトロ化活性が増加する傾向が認められたが、重度の筋損傷 (heavy injury) では

脱ニトロ化活性に有意な上昇は観察されなかった（パネル B、C）。これらの実験結果から、若齢マウスにおいては筋損傷により脱ニトロ化活性の発現が顕著に増加するのに対し（light injury > heavy injury > 非損傷）、老齢マウスにおいては筋が損傷しても脱ニトロ化活性の発現増加応答は若齢マウス筋に比べて小さく、特に重度の筋損傷（heavy injury）では発現上昇が認められないことがわかった。このことは、加齢に伴い筋再生能が減弱することと符合することは特筆に値する。

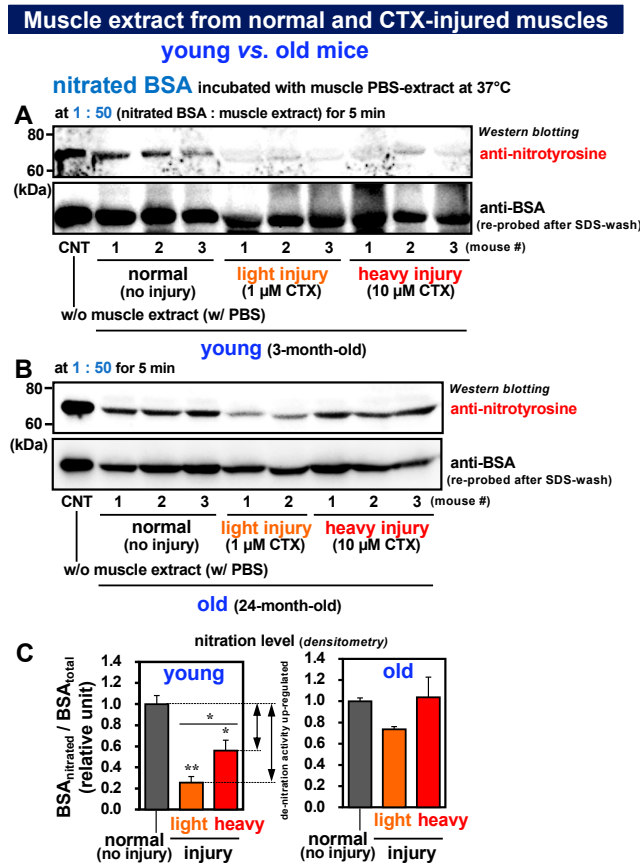


図 3. 筋抽出液の脱ニトロ化活性（若齢マウスと老齢マウスの損傷筋の比較）

A、B) ニトロ化 BSA を用いて若齢マウスの筋抽出液 (A、 $n=3$ 個体) および老齢マウスの筋抽出液 ($n=2\sim3$ 個体) の脱ニトロ化活性を評価した。light injury : $1\mu\text{M}$ CTX の筋肉内注射による軽度の筋損傷、heavy injury : $10\mu\text{M}$ CTX の筋肉内注射による重度の筋損傷。CNT、対照区（筋抽出液の代わりに PBS を添加）。

C) パネル A と B の WB 像のデンストメトリー解析 (BSA 量でノーマライズしたニトロ化 BSA のデンストグラムを、非損傷筋 (gray bar) の値に対する相対値で表した)。

* $p<0.05$ 、** $p<0.01$ で有意差あり。両端矢印の長さが脱ニトロ化活性の大きさを表す。

また、筋損傷後 7 日目 (light injury) に回収した筋抽出液の脱ニトロ化活性は、1 日目のそれと比較して顕著に低いことも観察しており、脱ニトロ化活性を発現・分泌する細胞は未同定ながら、筋損傷後の早期に筋組織に存在する特性を有することが推測された。HGF による衛星細胞の活性化および増殖は筋損傷後直ちに動き出すので、脱ニトロ化活性がこの時期に特に高いことは HGF の生理機能から考えても妥当と考えられる。このことを検証する一助として、脱ニトロ化によって HGF の生理活性（衛星細胞を活性化する活性）が蘇るかどうかを調べた (図 4)。実験系は、代表者がこれまで「衛星細胞の活性化機構」の解明に汎用してきた初代培養系であり、

これに、若齢マウスの筋抽出液（筋損傷後 1 日目で回収）で脱ニトロ化処理した HGF を終濃度 5 ng/ml で添加し、BrdU 取り込みアッセイにて HGF の活性を評価した (bar g)。この処理により、衛星細胞を活性化する HGF の生理活性は陽性コントロール (bar b : リコンビナント HGF 添加区) と同じレベルまで回復することを確認した。ニトロ化 HGF 添加区 (bar e) および 筋抽出液単独添加区 (bar c と d : HGF 無添加) は陰性コントロール区 (bar a) と同程度の値を示したことは、本実験系が適切な評価系であることを示している。また、非損傷筋の抽出液で脱ニトロ化処理すると HGF の生理活性は中程度まで回復することもわかり (bar f)、このことは非損傷筋抽出液の脱ニトロ化活性が上記の損傷筋抽出液よりも低いことと符合した。この結果は、老齢マウスの損傷筋抽出液でも同様であり (bar h と i)、筋抽出液（筋損傷後 1 日目で回収）で HGF を脱ニトロ化すると生理活性が蘇るという実験結果の解釈を支持した。

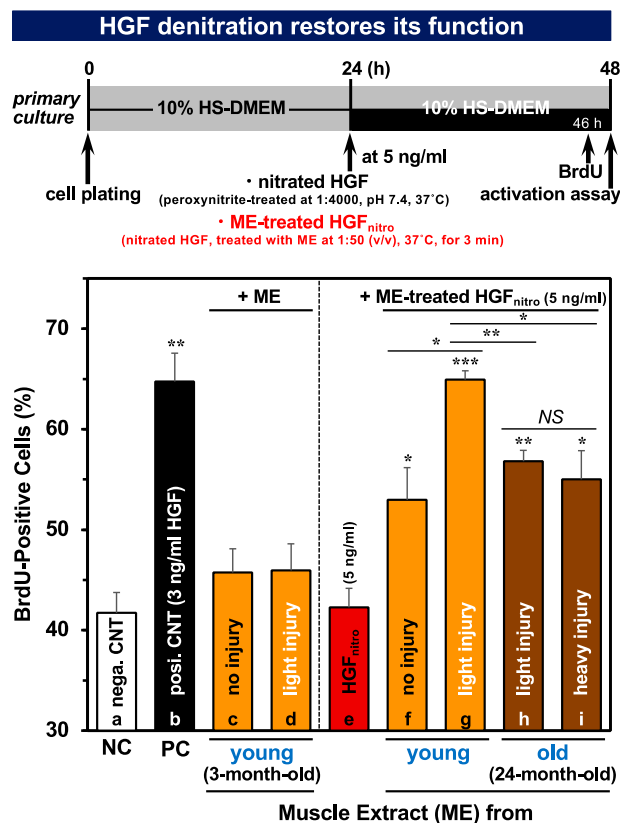


図 4. 筋抽出液 (ME) で脱ニトロ化処理した HGF の生理活性の評価 (若齢マウスと老齢マウスの比較)
 上段: 実験デザインの概要。衛星細胞の初代培養系で HGF の活性化能を BrdU 取り込みアッセイ (BrdU 陽性細胞の割合測定) により評価した。
 下段: 実験結果。bar a (NC) : 陰性コントロール、bar b (PC) : 陽性コントロール (3 ng/ml HGF 添加区)、bar c : 非損傷筋 (若齢マウス) の抽出液添加区 (HGF 非添加)、bar d : 軽度の損傷筋 (若齢マウス) の抽出液添加区 (HGF 非添加)、bar e : ニトロ化 HGF (5 ng/ml)、bar f : ニトロ化 HGF を非損傷筋 (若齢マウス) の抽出液で処理、bar g : ニトロ化 HGF を軽度の筋損傷筋 (若齢マウス) の抽出液で処理、bar h : ニトロ化 HGF を軽度の筋損傷筋 (老齢マウス) の抽出液で処理、bar i : ニトロ化 HGF を重度の筋損傷筋 (老齢マウス) の抽出液で処理。測定結果を mean (%) ± SEM で示した。
 * $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ 、*** $p < 0.001$ で有意差あり。NS: 有意差なし。

2. HGF のニトロ化抑制活性を持つ機能性成分

2種の機能性成分（物質名は非開示）を種々の対 HGF モル比（1：400～1：4,000）でリコンビナント HGF に添加した後、直ちにペルオキシナイトライト処理を行い、前項と同様に WB により HGF のニトロ化レベルを可視化した。いずれの機能性成分も、添加モル比依存的に HGF のニトロ化を抑制することが確認された。抗ニトロチロシン抗体の他に、抗ニトロ Y198-HGF 抗体（3A11C6、自作）および抗ニトロ Y250-HGF 抗体（6B82C3、自作）を検出抗体に使用したことにより、HGF の不活化に関与する Y198、Y250 のニトロ化を抑制できることが明確になった。

次に、上記 2 種の機能性成分のマウス飲水投与実験を行い（約 50 mg/kg 体重/日、 $n=3$ 個体/区）、*in vivo* でのニトロ化抑制効果を検証した。加齢実験は長期間を要するためその代替として、数日間で筋組織中の HGF のニトロ化を誘導できる方法を考案し、その処置前の 3 日間、上記の単一成分を含む水を自由飲水させた後、5 日間のニトロ化誘導処置を行った（ニトロ化誘導中は当該成分を非投与）。ふくらはぎの筋群の凍結切片を、蛍光標識抗ニトロ Y198-HGF、Y250-HGF 抗体および抗 HGF-*N* 末端領域抗体でそれぞれ染色した。ニトロ化誘導により I 型および IIa 型筋線維 ECM の HGF がニトロ化することを確認すると共に（陽性コントロール区）、1 種の機能性成分の飲水投与区では HGF のニトロ化レベルが陰性コントロール区（ニトロ化誘導処置なし）とほぼ同じであることを観察した。本結果は食品機能学的に筋組織中の HGF のニトロ化を抑制できることを示しており、今後は加齢実験での検証を行う予定である。

3. 脱ニトロ化酵素の候補遺伝子に関して（経過報告）

前項 1 の実験から脱ニトロ化活性が筋組織内に実在することが明らかになった。この実験と並行実施した当該遺伝子（群）の網羅的解析の経過を以下に報告する。大規模高速演算を核とする *in silico* hybridization 法 [7] によって脱ニトロ化酵素の遺伝子候補の検索を試みた。類似活性を有する酵素を扱った論文情報が極めて少ない状況であったが、酵母菌などの原核生物種の報告事例 [8] から抽出した遺伝子群をリファレンスとして関連酵素群の候補遺伝子の同定を試行した。その結果、50 を超える候補遺伝子が検索され絞り込み作業が困難となった。文献検索を更に進めリファレンスの数を増やして再度実施することや、別の網羅的解析手法の導入が必要であると考えられた。このため、脱ニトロ化酵素発現を誘導・促進する食品成分の検索は実施できなかったが、前項に記載した通り、HGF のニトロ化抑制活性を持つ単一成分 1 種を見出すことができた。これに併せて、脱ニトロ化酵素の発現を誘導する機能性成分を見出すことができれば、HGF のニトロ化の進行・蓄積を抑制する効果は更に大きくなると考えられた。

加齢に伴う酸化ストレスの増加と生理的・病的変化（疾病）との関連性が以前より指摘されている。酸化反応に分類されるタンパク質のニトロ化がアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患、アテローム性動脈硬化症、悪性腫瘍などの多くの加齢関連疾病と関係があることが示唆されている。原因タンパク質のニトロ化（生理活性の消失・不活化、稀に亢進）が疾病の発症や増悪に深く関与していると考えられる。HGF も含め原因タンパク質のニトロ化を解除できれば（脱ニトロ化）、加齢性筋萎縮・再生不全を含めて上記の加齢関連疾患の予防は勿論、積極的な治療が可能になると予想される。従前の「酸化ストレスの軽減」から「酸化ストレスで失活あるいは変性した機能を蘇えらせる」に方向性を変革し、老化した生体機能を“リセットする（若返り）”という新奇コンセプトを提起できると期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、九州大学大学院農学研究院動物・海洋生物科学講座の Alaa Elgaabari*、宮本純里、関 美弓、田中咲帆、圖師歌歩乃、前野岳大、松吉祐児、水野谷航、澤野祥子、鈴木貴弘、中村真子、および同大学院医学研究院外科学講座整形外科学分野（整形外科・リハビリテーション科）の桑門 想である。

(*JSPS 海外特別研究員、Faculty of Veterinary Medicine, Kafrelsheikh University, Kafrelsheikh, Egypt)

文 献

- 1) Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol.* 1998. Feb 1;194(1):114-28. PMID: 9473336. DOI: 10.1006/dbio.1997.8803.
- 2) Tatsumi R, Hattori A, Ikeuchi Y, Anderson JE, Allen RE. Release of hepatocyte growth factor from mechanical stretched skeletal muscle satellite cells and the role of pH and nitric oxide. *Mol Biol Cell.* 2002 Aug;13(8):2909-18. PMID:12181355. DOI: 10.1091/mbc.E02-01-0062.
- 3) Tatsumi R, Liu X, Pulido A, Morales M, Sakata T, Dail S, Hattori A, Ikeuchi Y, Allen RE. Satellite cell activation in stretched skeletal muscle and the role of nitric oxide and hepatocyte growth factor. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2006 Jun;290(6):C1487-94. PMID: 16684931. DOI: 10.1152/ajpcell.00513.2005.
- 4) Tatsumi R, Wuollet AL, Tabata K, Nishimura S, Tabata S, Mizunoya M, Ikeuchi Y, Allen RE. A role for calcium-calmodulin in regulating nitric oxide production during skeletal muscle satellite cell activation. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2009 Apr;296(4):C922-9. Epub 2009 Jan 21. PMID: 19158401. DOI: 10.1152/ajpcell.00471.2008.
- 5) Elgaabari A, Imatomi N, Kido H, Seki M, Tanaka S, Matsuyoshi M, Nakashima T, Sawano S, Mizunoya W, Suzuki T, Nakamura M, Anderson JE, Tatsumi R. A pilot study on nitration/dysfunction of NK1 segment of myogenic stem cell activator HGF. *Biochem Biophys Rep.* 2022 Jun 11;31:101295. PMID: 35721345. DOI: 10.1016/j.bbrep.2022.101295.
- 6) Elgaabari A, Imatomi N, Kido H, Nakashima T, Okuda S, Manabe Y, Sawano S, Mizunoya W, Kaneko R, Tanaka S, Maeno T, Matsuyoshi Y, Seki M, Kuwakado S, Zushi K, Daneshvar N, Nakamura M, Suzuki T, Sunagawa K, Anderson JE, Allen RE, Tatsumi R. Age-related nitration/dysfunction of myogenic stem cell activator HGF. *Aging Cell.* 2024 Feb;23(2):e14041. Epub 2023 Nov 20. PMID: 37985931. DOI: 10.1111/accel.14041. Additional Cover of the journal issue (Feb. issue, 2024). DOI: 10.1111/accel.14117.
- 7) Ueda J, Harada A, Urahama T, Machida S, Maehara K, Hada M, Makino Y, Nogami J, Horikoshi N, Osakabe A, Taguchi H, Tanaka H, Tachiwana H, Yao T, Yamada M, Iwamoto T, Isotani A, Ikawa M, Tachibana T, Okada Y, Kimura H, Ohkawa Y, Kurumizaka H, Yamagata K. Testis-specific histone variant *H3t* gene is essential for entry into spermatogenesis. *Cell Rep.* 2017 Jan 17;18(3):593-600. PMID: 28099840. DOI: 10.1016/j.celrep.2016.12.065.
- 8) Kuypers MMM, Marchant HK, Kartal B. The microbial nitrogen-cycling network. *Nat Rev Microbiol.* 2018 May;16(5):263-76. Epub 2018 Feb 5. PMID: 29398704. DOI: 10.1038/nrmicro.2018.9.