

平成 26 年度 博士論文

DNA マイクロアレイによるマウス赤白血病細胞の
分化に関連する遺伝子のスクリーニングと
その機能解析

指導教員 薬学博士 村上 康文

東京理科大学大学院 基礎工学研究科 生物工学専攻

佐々木 仁

目次

第 1 章	要旨	2-5
第 2 章	序論	6-8
第 3 章	材料と方法	9-16
第 4 章	結果	17-20
第 5 章	考察	21-24
図		25-36
表		37-44
謝辞		45
著作権		46
参考文献		47-55

第1章 要旨

赤血球分化は、多くの因子と多段階のプロセスによって複雑に制御されている。巨核球/赤芽球前駆細胞から分化した前赤芽球は、エリスロポエチン（EPO）により刺激され、赤芽球に成長し、最終的に赤血球となる。EPOによる刺激は、赤血球分化を特異的に制御する転写因子GATA1を活性化し、グリコホリンA、EPO受容体、ヘモグロビンなどの赤血球特異的な遺伝子の発現を誘導する。一方で、GATA1は、*Myc* と *Myb* の発現を抑制している。このように、赤血球分化は、EPOによる刺激と、分化特異的な転写因子GATA1を中心とする転写制御によりなされている。

他にも赤血球分化を制御する因子として、Friend leukemia integration 1 (FLI1)がある。FLI1は、マウス赤白血病（MEL）細胞で初めて同定され、赤白血病を誘発する役割を持っていることが知られている。FLI1は正常な血球細胞でも発現し、赤血球分化を抑制している。一方で、FLI1は、巨核球の分化を促進する。近年、microRNA-145がFLI1の機能を抑制し、巨核球と赤血球分化に影響することが示された。このように、従来考えられたサイトカインや転写因子による分化制御に加え、新たな制御因子の存在が示唆されたことなどから、分化の全体像を解明するには更なる解析が必要であると考えられる。

赤血球分化の研究において、MEL細胞やヒト赤白血病K562（K562）細胞は広く用いられている細胞である。MEL細胞は、フレンドウイルスを感染させたマウスから単離され、未熟な赤芽球の特徴を保持していることから赤芽球分化の研究に多彩なモデルを提供してきた。この細胞は、ジメチルスルホキシド（DMSO）、ヘキサメチレンビスアセトアミド（HMBA）、トリコスタチンA（TSA）などの薬剤で、ヘモグロビンを強く発現する赤芽球様細胞へ分化を誘導できる。K562細胞は、慢性骨髄性白血病の患者から単離され、酪酸ナトリウムやヘミンにより赤血球分化が誘導できる。MEL細胞やK562細胞は、がん細胞でありながら、正常な赤血球に似た細胞分化を誘導できることから、赤血球分化の研究において、有用なモデルである。

細胞分化など多くの遺伝子が関与する生命現象を理解するうえで、一度に多数の遺伝子の発現を解析できるDNAマイクロアレイは強力なツールである。当研究室においても、NIA mouse 15k及び7.4k cDNAクローンセットを用いて計22,000のcDNAからなるDNAマイクロアレイを開発した。

本研究において、赤血球分化を制御する新たな遺伝子を同定することを目的に、

DNAマイクロアレイを用いて、ヘモグロビン産生と赤血球分化に関連する遺伝子のスクリーニングを行った。高分化及び低分化MEL細胞を単離し、3種類の薬剤で分化誘導を行った際の発現プロファイルと比較した。高分化MEL細胞において、共通して発現が抑制された遺伝子について、分化抑制遺伝子の候補として、MEL細胞に過剰発現させヘモグロビン産生の抑制を解析した。その結果、過剰発現することで分化抑制効果が示された $\alpha 1,6$ フコース転移酵素（FUT8）について、MEL細胞とK562細胞におけるヘモグロビン産生と分化抑制に対する機能解析を行った。

初めに、DNAマイクロアレイを用いて、分化に関連して発現変動する遺伝子を解析した。DNAマイクロアレイ実験に先立ち、細胞のリクローニングを行うことにより、高分化と低分化MEL細胞を単離した。これらの細胞に1.0% DMSO、3.0 mM HMBA、15 nM TSAを添加し、ベンジジン染色によりヘモグロビンを発現する細胞の割合を評価した結果、高分化MEL細胞では多くの細胞で分化誘導が認められたが、低分化MEL細胞ではほとんど認められなかった。細胞増殖に違いは認められなかった。DNAマイクロアレイを用いて、3種類の薬剤による分化誘導時の高分化と低分化MEL細胞の遺伝子発現プロファイルと比較した。分化誘導6、12、24、36時間後の遺伝子発現比を比較し、いずれかの時間において3種の薬剤で共通に1.5倍以上または0.66倍以下で有意に発現が異なった遺伝子をそれぞれ発現誘導遺伝子、発現抑制遺伝子として定義した。高分化MEL細胞では、赤血球分化のマーカであるヘモグロビン遺伝子が強く誘導されていた。

発現抑制遺伝子について、過剰発現実験によりヘモグロビン産生への関与を調べた。高分化MEL細胞において強く発現が抑制され、cDNAクローンのアノテーションが付いていた7個の遺伝子について、分化抑制遺伝子の候補として選択した。これらの遺伝子をレトロウィルスベクターにより高分化MEL細胞に導入し、過剰発現株を作製した。過剰発現株に1.5% DMSOを添加し、4日後にヘモグロビン陽性率を測定した。その結果、*Fut8*を導入した細胞株において、空ベクターを導入した細胞株に比べ、有意にヘモグロビン陽性細胞の割合が低かった。*Fut8*がMEL細胞の分化を抑制していることが示唆された。その他の遺伝子については、有意な分化抑制効果は認められなかった。

別のDNAマイクロアレイ実験により、高分化MEL細胞を薬剤で分化誘導した際の*Fut8*及びその他の分化関連遺伝子の発現プロファイルを解析した。薬剤による分化誘導前後の遺伝子発現プロファイルを比較した結果、*Fut8*の発現は、1.5% DMSO、

5.0 mM HMBA、30 nM TSAによる処理の後、急激に抑制されていた。これは、既知の赤血球分化抑制因子である *Myc* や *Myb* の発現変動とよく相関した。一方で、ヘモグロビン遺伝子は上昇していた。*Gata1* の発現変動は認められなかった。

MYCとMYBがFUT8の発現に与える影響を調べた。MEL細胞において *Myc* と *Myb* の過剰発現細胞を作製し、*Fut8*/FUT8の発現をRT-PCRとウエスタンブロッティングにより測定した結果、通常のMEL細胞や空ベクター導入細胞に比べ発現が上昇した。この結果、FUT8の発現は、MYCやMYBにより正に制御されていることが示唆された。

ヘモグロビン産生の抑制がFUT8の固有の機能であることを調べるために、他の *Fut* ファミリー遺伝子について、ヘモグロビン産生を抑制するか確認した。その結果、いずれの *Fut* ファミリー遺伝子においても、有意な分化抑制効果は認められなかった。FUT8のみがヘモグロビン産生の抑制に関与するフコース転移酵素であることが示唆された。

FUT8の機能ドメインに変異を導入することで、分化抑制効果が解消されるかどうか検証した。FUT8の酵素活性に重要であると報告されている基質結合部位とフレキシブルループに変異を入れたFUT8 (RRM及びFLM) 発現コンストラクトを構築し、過剰発現株を作製した。その結果、どちらにおいても、ヘモグロビン産生抑制の効果が解消された。FUT8によるコアフコシル化活性がヘモグロビン産生の抑制に関与していることが強く示唆された。

次に、FUT8が種を超えてヒトにおいても、ヘモグロビン産生の抑制に関与しているかどうか、ヒトK562細胞を用いて検証した。K562細胞にヒト *FUT8*、基質結合部位に変異を入れた *FUT8* (RRM) を導入し、過剰発現株を作製した。これらの細胞に100 μ Mヘミンを添加し、4日後のヘモグロビン陽性率を測定した結果、K562細胞においても、FUT8を過剰発現することでヘモグロビン産生の抑制効果が認められ、変異型 (RRM) では、分化抑制効果が認められなかった。以上の結果から、FUT8はヒト細胞においても赤血球のヘモグロビン産生の抑制に関与していることが示唆された。

最後に、K562細胞において、shRNAを用いてFUT8の発現を抑制させることで、どのような影響を与えるかを調べた。K562細胞に一過的にshRNAを導入し、FUT8の発現を抑制した細胞では、ネガティブコントロールshRNAを導入した細胞に比べ、多くの細胞がヘモグロビン陽性を示した。さらに、赤芽球段階における分化マーカーであるトランスフェリン受容体 (CD71) とグリコホリンAを用いてフローサイトメトリー解析を行った結果、FUT8の発現を抑制した細胞においてCD71/グリコホリンA陽性細

胞の割合の増加が認められた。この2つのマーカーを共発現する細胞の割合の上昇から、FUT8はヘモグロビン産生だけでなく、赤芽球分化を制御することが示唆された。

DNA マイクロアレイは一度に多くの遺伝子発現を解析できるため、細胞分化などの多くの遺伝子が制御する生命現象を理解するために強力なツールである。しかしながら、薬剤添加時のストレスや細胞増殖などに応答し変動するノイズの遺伝子発現変動も検出してしまうことがある。本研究では、細胞分化の表現型のみ異なる高分化と低分化の MEL 細胞の発現変動を比較することでこれらのノイズを補正した。さらに、3種類の薬剤で共通に変動する遺伝子に焦点することで効率的な候補遺伝子の選択を試みた。選択された候補遺伝子の過剰発現実験により、新たなヘモグロビン産生の抑制因子として FUT8 を同定した。FUT8 によるコアフコシル化はマウス及びヒトにおいて、ヘモグロビン産生と赤血球分化を制御することが明らかとなった。これまでの赤血球分化研究においては、GATA1 やエリスロポエチンを始めとする多くの転写制御因子やサイトカインが関与することが示されていたが、本研究により、これらに加え糖鎖修飾の重要性が明らかとなった。

第2章 序論

赤血球分化は、多くの因子と多段階のプロセスによって複雑に制御されている(1)。図1に示すように巨核球/赤芽球前駆細胞から分化した CFU-E (Colony forming unit-erythroid) は、エリスロポエチン (EPO) により刺激され、赤芽球に成長し、最終的に赤血球となる (2-4)。この段階において、トランスフェリン受容体 (CD71)、グリコホリン A、ヘモグロビンなどの分化マーカーを発現する。図2に示すように EPO の EPO 受容体への結合は、受容体の二量体化と構造変化、受容体関連タンパク質チロシンキナーゼ Janus-kinase 2 (JAK2) のリン酸化と活性化を誘導し、EPO 受容体をリン酸化、シグナル伝達を開始される (5, 6)。EPO による刺激は、GATA 結合タンパク質 1 (GATA1) をリン酸化し、活性化することが報告されている (7)。転写因子 GATA1 は、巨核球/赤芽球前駆細胞で高発現し、赤血球分化を特異的に制御する因子の1つとして知られている。GATA1 は、グリコホリン A、EPO 受容体、ヘモグロビンなどの赤血球特異的な遺伝子の発現を誘導する (8)。GATA1 欠損マウスは、前赤芽球段階での赤血球成熟停止と赤血球前駆体のアポトーシスにより赤血球形成不全になる (9)。ETS ファミリーの PU.1 も造血特異的な転写因子で、骨髄系とリンパ系への分化を促進する (10)。一方で、PU.1 は GATA1 と相互作用し、GATA1 を介した転写活性を抑制することで、赤血球分化を抑制することが知られている (11)。Erythroid kruppel like factor (EKLF/KLF1) は、赤血球産生に必須な因子である (12)。EKLF/KLF1 は KLF2 と共に *c-Myc* (*Myc*) のプロモーターに結合し、発現を制御している (13)。そして、分化の最終期でみられる *Myc* の発現抑制は赤血球成熟に必要である (14)。GATA1 は、赤血球分化において、*Myc* と *c-Myb* (*Myb*) の発現を抑制している (15, 16)。このように、赤血球産生は、エリスロポエチンによる刺激と、分化特異的な転写因子 GATA1 を中心とする転写制御によりなされている。

他にも赤血球分化を制御する因子として、Friend leukemia integration 1 (FLI1) をあげることができる。FLI1 は、ETS ファミリーの転写因子で、マウス赤白血病 (Murine erythroleukemia, MEL) 細胞で初めて同定され、赤白血病を誘発する役割を持っていることが知られている (17)。FLI1 は正常な血球細胞でも発現し、赤血球分化を抑制している (18)。一方で FLI1 は、巨核球の分化を促進する (19)。FLI1 と EKLF/KLF1 は共に GATA1 と結合し、機能的に拮抗することで、巨核球または赤血球のプロモーターを活性化し、巨核球/赤芽球前駆細胞から巨核球または赤血球への分化の選択に関

与している (20)。近年の研究で、microRNA-145 (miR-145) が FLI1 の機能を抑制し、巨核球と赤血球分化に影響することが示された (21)。このように、従来考えられたサイトカイン、サイトカイン受容体、転写因子による分化制御に加え、新たな制御因子の存在が示唆されたことなどから、分化の全体像を解明するには更なる解析が必要であると考えられる。

赤血球分化の研究において、MEL 細胞やヒト赤白血病 K562 (K562) 細胞は広く用いられている細胞である。MEL 細胞は、フレンドウイルスを感染させたマウスから単離され、未熟な赤芽球の特徴を保持していることから赤芽球分化や、白血病の発症メカニズムの研究に多彩なモデルを提供してきた (22)。この細胞は、ジメチルスルホキシド (DMSO)、ヘキサメチレンビスアセトアミド (HMBA)、トリコスタチン A (TSA) などの薬剤で、ヘモグロビンを強く発現する赤芽球様細胞へ分化を誘導できることが知られている (23-25)。これらの薬剤が引き金となってヘモグロビン合成と赤血球特異的タンパク合成が行われる (24)。MEL 細胞の分化において、*Myc* や *Myb* の発現は減少し、これらの遺伝子を過剰発現させると MEL 細胞の細胞分化を阻害する (26, 27)。また、DMSO による赤血球の分化誘導において耐性を示す MEL 細胞株を単離し、赤血球分化の研究に用いられている (28, 29)。K562 細胞は、慢性骨髄性白血病の患者から単離され、酪酸ナトリウムやヘミンにより赤血球分化が誘導できる (30-32)。K562 細胞はヘミンにより分化誘導することで、CD71 及びグリコホリン A 陽性の細胞の割合が増加する (33)。赤芽球の分化において、CD71 の発現はプレ前赤芽球以降の赤芽球において高いレベルを示し、グリコホリン A の発現は、CD71 より遅く前赤芽球から好塩基性正赤芽球への変化に相関して上昇する (34)。MEL 細胞や K562 細胞は、がん細胞でありながら、正常な赤血球に似た細胞分化を誘導できることから、赤血球分化の研究においては、有用なモデルである。

細胞分化など多くの遺伝子が関与する生命現象を理解するうえで、一度に多数の遺伝子の発現を解析できる DNA マイクロアレイは強力なツールである (35)。近年、DNA マイクロアレイ技術は急速に進歩し、その有用性はさらに高まった。実際に、DNA マイクロアレイを用いて、筋細胞 (36-40)、骨芽細胞 (41-45)、神経細胞 (46, 47)、網膜芽細胞 (48)、脂肪細胞 (49, 50)、巨核球 (51)、T 細胞 (52)、白血病細胞 (53, 54) など様々な細胞の分化に関する研究が行われている。当研究室においても、多くの遺伝子発現解析研究を行うために、DNA マイクロアレイの開発を行った。NIA mouse 15k cDNA クローンセット (55-56) 及び NIA mouse 7.4k cDNA クローンセッ

ト (57) を用いて計 22,000 の cDNA からなる DNA マイクロアレイを作成した。これらの cDNA は、マウスの着床前の胚、胚生 7.5 日目の胚と胚外組織、胚生 12.5 日目のメスの性腺/中腎、新生仔の卵巣、初期胚、幹細胞に由来するクローンであり、細胞分化や発生の研究に適している。

本研究において、赤血球分化を制御する新たな遺伝子を同定することを目的に、DNA マイクロアレイを用いて、ヘモグロビン産生と赤血球分化に関連する遺伝子のスクリーニングを行った。高分化 MEL 細胞と低分化 MEL 細胞を単離し、3 種類の薬剤で分化誘導を行った際の発現プロファイルを比較した。分化過程で高分化 MEL 細胞において、共通して発現が抑制された遺伝子について、分化抑制遺伝子の候補として、MEL 細胞に過剰発現させヘモグロビン産生の抑制を解析した。その結果、過剰発現することで分化抑制効果が示された α 1,6 フコース転移酵素(FUT8)について、MEL 細胞と K562 細胞におけるヘモグロビン産生と分化抑制に関する機能解析を行った。

第3章 材料と方法

1) 細胞培養

MEL 細胞（細胞株名：T-3-C1-2-0.fl, 58）と K562 細胞は RPMI1640 培地（日水製薬）に 10%のウシ胎仔血清（Sigma-Aldrich）を添加した培地で、37°C、5% CO₂ で培養した。これらの細胞株は理化学研究所バイオリソースセンター（茨城）より提供された。高分化及び低分化 MEL 細胞は元の MEL 細胞のリクローニングにより得た。ヘモグロビン陽性に分化した細胞の確認は、ベンジジン染色液（染色液：3,3-ジメトキシベンジジン溶液（水；194 ml、酢酸；6 ml、3,3-ジメトキシベンジジン（ICN Biomedicals）；1.3 g）と 33%過酸化水素水を 10：1 で混合したもの）と等量の細胞培養液を混合し、緑色に染色されたベンジジン陽性の細胞の割合を、血球計算盤を用いて計測することにより行った。

PLAT-E 細胞（59）細胞及び PLAT-A 細胞は、DMEM（日水製薬）に 10%のウシ胎仔血清（Sigma-Aldrich）を添加した培地で、37°C、5% CO₂ で培養した。これらの細胞株は北村俊雄先生（東京大学）より提供された。

2) マイクロアレイの作製

DNA マイクロアレイは、NIA mouse 15k 及び 7.4k cDNA クローンセットを利用して作製した。使用したクローンセットは米国国立老化研究所（National Institute on Aging）で作製され、理化学研究所バイオリソースセンター（茨城）より提供された。

96 穴プレートに保存された cDNA クローンを保持する大腸菌のグリセロールストックから 5 µl を、96 穴深底プレート（Corning）に分注した 0.1 mg/ml の Ampicillin を含む 1.2 ml の 2×YT 培地に植菌し、37°C、20 時間、200 rpm で振とう培養した。培養したクローンからのプラスミド DNA の抽出は、Biomek2000 robotic workstation（BECKMAN COULTER）上で、Wizard SV 96 Plasmid DNA Purification System（Promega）を用いて行った。抽出されたプラスミド DNA は 1%のアガロースゲル（Sigma）で電気泳動を行い、確認を行った。PCR 反応は 10 ng の抽出されたプラスミド DNA を鋳型に、10 µl の PCR 10×buffer、0.2 mM dNTPs、0.5 µM のプライマー（5'-CCAGTCACGACGTTGTAAAACGAC-3'; 5'-GTGTGGAATTGTGAGCGGATAACAA-3'）と 2.5 unit の *Taq* polymerase（Promega）を含む、100 µl の溶液中で、Peltier Thermal Cycler（MJ Research）を用いて、

Initial denaturation 95°C 1 分; 40 サイクルの denaturation 94°C 45 秒、 annealing 69°C 45 秒, extension 72°C 3 分; final extension 72°C 3 分という条件で反応を行った。PCR 産物は、96 穴 V 底プレート (Corning) に移し、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウムと等量のイソプロピルアルコールを加え、-20°C に数時間静置した後、3000 rpm で 60 分遠心し、沈殿を得た。沈殿は 70%のエタノールで洗浄し、乾燥させた後、21 μ l の滅菌水に再懸濁した。精製された PCR 産物は 1%のアガロースゲルで電気泳動を行い、確認を行った。得られた PCR 産物は、Biomek2000 robotic workstation (BEKUMAN COULTER) を用いて 20 μ l の 50% DMSO 溶液に再懸濁した後、各々 10 μ l を 40 枚の 384 穴プレートに移した。その後 MicroGrid II (BioRobotics) を用いて GAPS II Coated Slides (Corning) にスポットした。スポット後、スポットティングされた面を沸騰した蒸留水の蒸気に 5 秒あて、再水和した直後に 100°C のホットプレートにのせ、蒸気のあとが消えるまで、5 秒から 10 秒加熱した。最後に、UV クロスリンク機を用い、200 mJ / cm² の UV を照射した。

3) 分化誘導と細胞の回収

高分化及び低分化 MEL 細胞の発現プロファイルの比較では、150 mm ディッシュで約 80%コンフルエントまで培養した細胞を、約 2.0×10^5 cells / ml になるように 150 mm ディッシュに希釈して播種し、それぞれ 1.0% DMSO、3.0 mM HMBA、15 nM TSA を添加し、培養 6、12、24 及び 36 時間後に細胞を回収した。回収した細胞は Phosphate buffered saline (PBS) で一回洗浄した後、ペレットを液体窒素で凍結し、-80°C で凍結保存した。

高分化 MEL 細胞の発現プロファイルの比較では、MEL 細胞を 150 mm ディッシュで約 80%コンフルエントまで培養し、一部を分化誘導直前のサンプルとして回収し、残りの細胞を約 2.0×10^5 cells / ml になるように 150 mm ディッシュに希釈して播種し、1.5% DMSO、5.0 mM HMBA、30 nM TSA を添加し培養 1、6、12、24 および 36 時間後に細胞を回収した。回収した細胞は PBS で一回洗浄した後、ペレットを液体窒素で凍結し、-80°C で凍結保存した。

4) RNA 抽出とターゲット DNA の調製

MEL 細胞からの total RNA の抽出は、RNeasy mini kit (QIAGEN) を使用して行った。抽出された total RNA の収量は Spectrophotometer DU 640 (BECKMAN) を

用いて 260 nm の吸光度測定値から計算した。ターゲット DNA の調製は total RNA 20 µg を鋳型に、SuperScript Indirect cDNA Labeling System (Invitrogen) を使用して行った。それは、SuperScript III RT を用いた逆転写反応の際に、アミノ修飾された dNTPs を添加し、アミノ修飾された cDNA を合成し、S.N.A.P.カラム (Invitrogen) とエタノール沈殿により cDNA を精製した後、Cy3 Mono-Reactive Dye Pack (Amersham Biosciences) または、Cy5 Mono-Reactive Dye Pack (Amersham Biosciences) とカップリング反応を行い、cDNA を Cy3 または、Cy5 で蛍光標識した。標識された cDNA は MinElute Spin Columns (QIAGEN) を用いて精製した。

5) マイクロアレイへのハイブリダイゼーションとデータの解析

ハイブリダイゼーションの直前にマイクロアレイを、5×SSC、0.1% SDS、0.1% BSA 溶液中で 50°C、60 分間プレハイブリダイゼーションし、その後、MiliQ で素早く洗浄し、イソプロピルアルコールでリンスを行った。最後に遠心により水分を飛ばした。Cy3 と Cy5 で標識した cDNA を混合し、蒸留水で全量を 26.65 µl に調製し、9.75 µl の 20×SSC (終濃度 5×SSC) と 1.3 µl の 50 mg / ml アセチル化 BSA (Invitrogen) (終濃度 1.67 mg / ml) を加え、95°C で 5 分間インキュベートした後、氷上で冷却した。その後、1.3 µl の 10% SDS (終濃度 0.33%) を加えて混合し、ハイブリダイゼーション溶液とした。マイクロアレイに 24×60 mm の Gap cover glass (MATSUNAMI) を被せ、ハイブリダイゼーション溶液 38 µl を隙間から注入した後、ハイブリダイゼーションカセット (TeleChem) に設置した。ハイブリダイゼーションカセットの溝に 15 µl の滅菌水を入れた後に螺旋を締めて密封した。ハイブリダイゼーション反応は 50°C、overnight (14 時間) で行った。反応後、マイクロアレイをカセットから取り出して Wash Station (TeleChem) にセットし、500 ml の 2×SSC-0.1% SDS 溶液で 42°C、5 分間攪拌しながら洗浄した後、0.1×SSC-0.1% SDS 溶液で 10 分間、室温の攪拌洗浄を行い、次に 0.1×SSC 溶液で 2 分間攪拌洗浄を二回行った。最後に、0.01×SSC でリンスし、遠心により水分を飛ばした。マイクロアレイのスキャニングは共焦点レーザースキャナーである ScanArray 5000 (PerkinElmer Life Sciences) を使用した。マイクロアレイのデータ解析は、マルチカラーマイクロアレイ解析ソフト QuantArray (PerkinElmer Life Sciences) を用いて画像データより蛍光シグナルの強度を数値化した。定量方法はシグナルとバックグラウンドのエリアを限定し、任意のデータ範囲を数値化する Fixed Circle 法を採用した。以降の数値化された蛍光シグ

ナルデータの解析は、表計算ソフト Excel (Microsoft) と遺伝子発現解析ソフト GeneSpring 6.0 (Silicon Genetics) を用いて行った。各アレイにおける Cy3、Cy5 間の蛍光シグナルの差は、LOWESS Normalization 法により補正を行った。マイクロアレイ 1 比較における発現比は、4 回の繰り返し実験 (2 回は蛍光色素を入れ替えたもの) より得られた発現比の平均値から算出した。

6) 候補遺伝子のレトロウィルスベクターへのクローニング

MEL 細胞または K562 細胞から RNeasy mini kit を用いて抽出した total RNA 5.0 μg を鋳型に SuperScript II (Invitrogen) を用いて First-Strand cDNA を合成した。両末端に任意の制限酵素サイトと、開始コドンの上流に Kozak 配列を付加した候補遺伝子特異的なプライマーを設計し (表 1)、合成された First-Strand cDNA を鋳型に KOD Plus (TOYOBO) を用いて PCR により候補遺伝子の増幅を行った。PCR により増幅された候補遺伝子の DNA 断片はイソプロピルアルコール沈殿で精製した後、任意の制限酵素 (表 1) で処理し、Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) で精製した。そして、同じ制限酵素で処理をし、同様に精製した pMXs-CMVp-IRES-EGFP ベクター (pMXs-IRES-EGFP (60) ベクターの 5' LTR の上流を CMV プロモーターのエンハンサー配列に置き換えて作成したもの、pMXs-IRES-EGFP ベクターは北村俊雄先生から提供された) にクローニングを行った。

7) 遺伝子導入、過剰発現株の作製と表現型の解析

前日に 6-well プレートに 1.0×10^6 cells / 2 ml で播種したパッケージング (PLAT-E または PLAT-A) 細胞に候補遺伝子をクローニングしたベクター 5.0 μg を、リポフェクトアミン 2000 (Invitrogen) を用いてトランスフェクションした。トランスフェクション 16 時間後に培地を DMEM (10% FCS を含む) から RPMI1640 培地 (10% FCS を含む) に交換した。トランスフェクション 48 時間後にウィルスを含む培養上清を回収し、1800 rpm、4°C、5 分間遠心し、この遠心上清で、前日に 1.0×10^5 cells / ml でまいておいた対数増殖期の MEL 細胞または K562 細胞を培養し、ウィルスに感染させた。このとき、ポリブレンを終濃度 0.08~4 μg / ml で添加した。細胞をウィルスに曝露した状態で 72 時間培養した後、FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて EGFP 陽性細胞の割合を計測し、感染の確認を行った。その後、96-well プレートを用いた限界希釈法 (400 cells / 4 \times 96well) による細胞のクローニングを行った。

約 10 日後に細胞を 24-well プレートにスケールアップし、細胞が十分量に増殖した後、FACSCalibur を用いて EGFP 陽性細胞の選択を行った。そして、EGFP 陽性細胞に 1.5% DMSO で分化を誘導し、72 時間後にベンジジン染色により分化した細胞の割合を算出し、同様にコントロールベクターを導入した細胞株を比較に用いて、t 検定により分化抑制効果を評価した。

8) 部位特異的突然変異誘発

マウス *Fut8* 及びヒト *FUT8* への部位特異的突然変異誘発は、Splicing by Overlap Extension (SOE) PCR によって行った。用いたプライマー配列は、表 2 に示した。その他の手順は、6)及び 7)に示した方法と同様に行った。

9) ウェスタンブロッティング (過剰発現実験の確認用)

回収した細胞は、Lysis Buffer (15 mM Tris-HCl pH7.5、120 mM NaCl、25 mM KCl、2 mM EDTA、0.5% TritonX-100、0.2 mM DTT、0.5 mM PMSF、10 µg Complete Protease Inhibitor cocktail; Roche) により溶解し、超音波処理 (Ultrasonic Disruptor UD-201; TOMY) により細胞破碎後、4°C、15000 rpm で 10 分間遠心分離 (Allegra6R centrifuge GH-3.8; GH-3.8A rotor; Beckman) し、その上清を回収した。回収したタンパク質濃度は、Bradford 法を用いて Bio-Rad protein assay (Bio-Rad) により決定した。50 µg のタンパク質を SDS Sample Buffer (1 M Tris-HCl pH6.8、10% SDS、glycerol、bromophenol blue) により変性後、10%ポリアクリルアミドゲルを用いて SDS-PAGE により分離した。その後、Transfer buffer (25 mM Tris、192 mM glycine、20% Methanol) により、PVDF メンブレン (Bio-Rad) に転写した。転写後のメンブレンは、5% Skim milk (BD)、0.05% tween-20 (Atras Chem) を含む PBS (PBS-T) により室温で 90 分間ブロッキング反応を実施し、同様の PBS-T 5% Skim milk により 200 倍希釈した Goat anti-FucT-VIII antibody (S-17) (catalog no. sc-34629; Santa Cruz Biotechnology) または 5000 倍希釈した Mouse anti-GAPDH antibody (clone 6C5) (catalog no. AM4300; Ambion) との反応を 4°C で 16 時間行った。その後、PBS-T により 4 回洗浄後、PBS-T 5% Skim milk により 2000 倍希釈した HRP-conjugated rabbit anti-goat antibody (catalog no. 61-1620; Zymed Laboratories Inc.) または、10000 倍希釈した HRP-conjugated goat anti-mouse antibody (catalog no. 62-6520; Zymed Laboratories Inc.) との反応を室温で 90 分間行った。その後 PBS-

T、PBS により洗浄後、Immobilon Western Detection Reagents (Millipore) により酵素基質反応させ、LAS1000 (FujiFilm) により目的タンパク質の検出を行った。データの処理、解析には Image gauge (FujiFilm) を用いた。

10) ウェスタンブロッティング (ノックダウン実験の確認用)

回収された細胞は、Lysis Buffer を用いて溶解し、TOMY ULTRASONIC DISRUPTOR UD-201 を用いた超音波処理による細胞破碎後、4°C、15000rpm、10分 で遠心分離し (Beckman Allegra™ 6R Centrifuge GH-3.8, GH-3.8A)、その上清を回収した。回収したタンパク質濃度は Bradford 法を用いて Bio-Rad protein assay により決定した。そして 200 µg のタンパク質を等量の 2×SDS sample buffer (0.1 M Tris-HCl (pH 6.8)、4% SDS、20% Glycerol、1 M DTT、0.004% Bromophenol blue) で変性後、95°C で 5 分処理し、氷上に 5 分静置後、10% ポリアクリルアミドゲルを用いた SDS-PAGE により泳動した。その後、Methanol に浸した後 Transfer buffer (+) (100 mM Tris、192 mM Glycine、10% Methanol) 50 ml に浸した PVDF メンブレン (Bio-Rad) と、Transfer buffer (+) 50 ml と Transfer buffer (-) (100 mM Tris、192 mM Glycine、20% SDS) 50 ml に浸したブロッティング用ろ紙 (アトー) でゲルを挟み、TRANS-BLOT SD SEMI-DRY TRANSFER CELL (BIO-RAD) で 12 V、1 時間転写した。転写後、5% Skim milk (BD)、0.05% tween-20 (Atras Chem) を含む PBS-T 5% Skim milk 5 ml により、1.5 時間室温でブロッキング反応を行った。そして、5 ml の PBS-T 5% Skim milk を用いて 100 倍希釈した Goat anti-FucT-VIII antibody (s-17) または、2000 倍希釈した Mouse anti-GAPDH antibody (clone 6C5) との反応を 4°C で一晩行った。その後 50 ml PBS-T で 4 回洗浄し、5 ml PBS-T 5% Skim milk により 1000 倍希釈した HRP-conjugated rabbit anti-goat antibody または、2000 倍希釈した HRP-conjugated goat anti-mouse antibody との反応を 1.5 時間、室温で行った。その後 50 ml の PBS-T で 4 回、PBS で 1 回洗浄した。FUT8 においては、Supersignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo SCIENTIFIC) により抗体基質反応を行い、LAS-3000 (FUJIFILM) により検出した。GAPDH においては、FUT8 を検出した PVDF メンブレンを、Stripping buffer 5 ml (0.1 M 2-mercaptoethanol (SIGMA)、2% SDS、0.06 M Tris-HCl (pH 6.8)) を用いて 50°C で 30 分振とうし、50 ml PBS-T で 2 回洗浄した。ブロッキングと抗体との反応操作は前に記述した通りである。ECL Western Detection Reagents により抗体

基質反応を行い、LAS-3000 により検出した。

1 1) RT-PCR

MEL 及び K562 細胞から total RNA を RNeasy Mini Kit により抽出した。total RNA からの cDNA の合成は SuperScript III reverse transcriptase を用いて行った。PCR は GoTaq Flexi DNA polymerase (Promega) を用いて行った。RT-PCR に使用したプライマー配列は表 3 に示した。

1 2) *FUT8* short hairpin RNA (shRNA) の一過性導入

FUT8 の shRNA は siDirect (<http://sidirect2.rnai.jp/>) を使用して行った。配列は表 4 に示した。piGENE hU6 puro vector (iGENE Therapeutics) を *Bsp*MI で制限酵素処理し、BAP 処理により脱リン酸化した。5 μ l の合成フォワードオリゴヌクレオチド (100 μ M) と 5 μ l の合成リバーズオリゴヌクレオチド (100 μ M) を 40 μ l の 150 mM NaCl に添加し、95°C で 5 分間の熱処理で変性させ、37°C で 1 時間冷やすことにより、アニーリング反応を行った。アニーリングにより 2 本鎖を形成したオリゴヌクレオチドは T4 polynucleotide kinase (Takara) で末端をリン酸化し、制限酵素処理したベクターへのライゲーションに使用した。そして個々の RNAi コンストラクトの hU6 プロモーターと shRNA を含む断片を *Eco*RI と *Bam*HI で制限酵素処理し、同じ制限酵素で処理した piGENE TM U6 Rep vector (iGENE Therapeutics) とライゲーション反応を行った。この piGENE TM U6 Rep vector は EBNA1 遺伝子と OriP 配列を含んでいる。ネガティブコントロールベクターには、piGENE U6 Rep T7STOP vector (iGENE Therapeutics) を用いた。これらのベクターは、Bio-Rad Gene Pulser II (Bio-Rad) を使用してエレクトロポレーションにより K562 細胞に導入した。形質転換させた細胞は、2 μ g/mL ピューロマイシン (Sigma-Aldrich) で 2 週間培養した。

1 3) フローサイトメトリー解析

ネガティブコントロールと *FUT8* 発現抑制細胞をそれぞれ 1800 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し (Beckman AllegraTM 6R Centrifuge GH3.8, GH-3.8A)、上清を除いた。そして Staining Buffer (1% FBS (SIGMA) を含む PBS) 10 ml を加え、1800 rpm、4°C で 5 分間遠心分離し、上清を取り除き、Staining Buffer で細胞を懸濁した。その

後 5.0×10^5 cells ずつ分注し、1800 rpm、4°Cで 5 分間遠心分離し上清を取り除き、Staining Buffer で 1666 倍希釈した Anti-Human CD235a (Glycophorin A) FITC (11-9987、eBioscience) を加えた。そして、遮光状態、4°Cで 30 分間静置し、Staining Buffer を 1 ml 加え、1800 rpm、4°Cで 5 分間遠心分離した。その後、上清を取り除き、Staining Buffer で 50 倍希釈した Anti-Human CD71 (Transferrin receptor) PE (12-0719、eBioscience) を加えた。そして、遮光状態、4°Cで 30 min 静置し、Staining Buffer を 1 ml 加え、1800 rpm、4°Cで 5 分間遠心分離した。この遠心分離を 3 回繰り返す、Staining Buffer を 0.3 ml 加え、FACS Calibur を用いて Glycophorin A と CD71 の発現変動を、それぞれ FL1-H チャンネルと FL2-H チャンネルで解析した。

第4章 結果

1) DNAマイクロアレイを用いた高分化と低分化MEL細胞の発現プロファイルの比較

最初に、DNAマイクロアレイを用いて、分化に関連して発現変動する遺伝子を解析した。マイクロアレイによる発現プロファイル比較に先立ち、MEL細胞のリクローニングを行うことにより、高分化と低分化MEL細胞を単離した。これらの細胞に1.0% DMSO、3.0 mM HMBA、15 nM TSAを添加し、ベンジジン染色によりヘモグロビンを発現する細胞の割合を評価した結果、高分化MEL細胞では、多くの細胞で分化誘導が認められたが、低分化MEL細胞ではほとんど認められなかった（図3A）。通常の分化誘導実験で使用する薬剤濃度（1.5% DMSO、5.0 mM HMBA、30 nM TSA）では、低分化MEL細胞において増殖への影響が認められたため、各薬剤の濃度を減らして実験を行った。この濃度においては、両細胞で細胞増殖に違いは認められなかった（図3B）。次に、NIA Mouse 15k及び7.4k cDNAクローンセットから作製したDNAマイクロアレイを用いて、1.0% DMSO、3.0 mM HMBA、15 nM TSAによる分化誘導6、12、24、36時間後の高分化と低分化MEL細胞の遺伝子発現プロファイルを比較した。マイクロアレイの実験結果は、National Center for Biotechnology InformationのGene Expression Omnibus（accession numbers GSE40754）（www.ncbi.nlm.nih.gov）にアーカイブへ登録した。本実験においては、1.5倍以上または0.66倍以下に発現が変動した遺伝子をそれぞれ発現誘導遺伝子、発現抑制遺伝子として定義した。次に高分化MEL細胞において、いずれかの時間で3種の薬剤で共通して有意に（ $p < 0.05$ ）発現誘導あるいは抑制された遺伝子を分化関連遺伝子の候補として選択した（表5）。高分化MEL細胞では、赤血球分化のマーカーであるヘモグロビン遺伝子（*Hba-a1*）やトランスフェリン受容体（*Trfr*）が強く誘導されていた。いずれかの時間で変動が認められた遺伝子を選択したのは、全ての分化関連遺伝子は継続的に誘導あるいは抑制されているとは考えていないからである。例えば、MEL細胞において、*Myc* のmRNAはDMSO添加による分化誘導後2-12時間で減少するが18時間後には添加前と同じ状態に戻るということが知られている（61）。

2) *Fut8* 過剰発現はMEL細胞におけるヘモグロビン産生を抑制する

過剰発現実験により発現抑制が認められた遺伝子について、ヘモグロビン産生への

関与を調べた。高分化MEL細胞において強く発現が抑制され、cDNAクローンのアノテーションがされていた *Idi1*、*Plek*、*Fut8*、*Rnpc2*、*Cst3*、*Gstt3*、*Spn* について、分化抑制遺伝子の候補として選択した。これらの遺伝子をレトロウィルスベクター (pMXs-CMVp-IRES-EGFP) を用いて、高分化MEL細胞に導入、過剰発現株を作製した。過剰発現株に1.5% DMSOを添加し、4日後にヘモグロビン陽性率を測定した。その結果、*Fut8* を導入した細胞株において、ヘモグロビン陽性細胞の割合は、 $33.4 \pm 9.2\%$ (平均±標準偏差) と、空ベクターを導入した細胞株の $74.4 \pm 10.5\%$ に比べ、有意に ($p < 0.01$) 低かった (図4A)。*Fut8* 過剰発現細胞株と空ベクターを導入した細胞株の増殖は変わらなかった (図4B)。*Fut8* 過剰発現によるヘモグロビン産生の抑制は、細胞の生存によるものではないことが考えられ、*Fut8* が MEL 細胞の分化を抑制していることが示唆された。その他の遺伝子については、有意な分化抑制効果は認められなかった (データは示さない)。

3) *Fut8* 発現はMEL 細胞の分化において抑制されている

次に別のマイクロアレイ実験により、高分化MEL細胞を薬剤で分化誘導した際の *Fut8* 及びその他の分化関連遺伝子の発現プロファイルを解析した。マイクロアレイの実験結果は、National Center for Biotechnology InformationのGene Expression Omnibus (accession numbers GSE43849) (www.ncbi.nlm.nih.gov) にアーカイブへ登録した。図5に代表的な赤血球分化に関連する遺伝子と *Fut8* のcDNAクローンの発現プロファイルを示した。*Fut8* の発現比 (薬剤処理後/薬剤処理前) は、1.5% DMSO、5.0 mM HMBA、30 nM TSAによる処理後6時間において、それぞれ0.32、0.38、0.46と急激に抑制されていた。これは、既知の赤血球分化抑制因子である *Myc* や *Myb* の発現変動とよく相関した。一方で、ヘモグロビン遺伝子 (*Hba-a1*、*Hbb-y/Hbb-b1*) の発現比は処理後36時間において、3.66 (DMSO)、6.63 (HMBA)、21.49 (TSA) と上昇していた。特にヘモグロビン遺伝子の発現は、DMSOやHMBAよりTSAで処理した場合に処理後24時間において9.42と、上昇が早かった。同じ条件において、*Fut8* の発現はTSA処理後に6-12時間に0.46-0.57と減少し、24時間では1.09と処理前と同じレベルまで戻った。これらのデータは、分化誘導の早期に一時的に *Fut8* の発現が減少することがヘモグロビン産生に重要であり、継続的に *Fut8* が抑制されていることは必ずしも必要ないことを示唆している。*Gata1* の発現変動は認められなかった。

4) *Myc*と*Myb*の過剰発現はFUT8の発現を上昇させる

MYCとMYBがFUT8の発現に与える影響を調べた。MEL細胞において*Myc*と*Myb*の過剰発現細胞を作製し、FUT8の発現をRT-PCRとウエスタンブロッティングにより測定した結果、FUT8の発現は、通常のMEL細胞や空ベクター導入細胞に比べ上昇した(図6A及びB)。この結果、FUT8の発現は、MYCやMYBにより正に制御されていることが示唆された。

5) *Fut8*は*Fut*遺伝子ファミリーの中で唯一ヘモグロビン産生を抑制する

ヘモグロビン産生の抑制がFUT8の固有の機能であることを調べるために、他の*Fut* family遺伝子について、ヘモグロビン産生を抑制するかを解析した。*Fut1*、*Fut2*、*Fut4*、*Fut7*、*Fut9*、*Fut11*、*Pofut1*、*Pofut2*の遺伝子を同じベクターに導入し、*Fut8*と同様の方法により高分化MEL細胞でEGFPの発現を指標に過剰発現株を作製した。各遺伝子について、複数の過剰発現株に1.5% DMSOを添加し、4日後のヘモグロビン陽性細胞率を測定した。その結果、いずれの過剰発現細胞株でも空ベクターを導入した細胞株と比べ、統計的に有意な分化抑制効果は認められなかった(図7)。このことから、FUT8のみがヘモグロビン産生の抑制に関与するフコース転移酵素であることが示唆された。

6) FUT8が持つコアフコシル化活性はヘモグロビン産生の抑制に必須である

FUT8の機能ドメインに変異を導入することで、過剰発現による分化抑制効果が解消されるかどうか検証した。FUT8にはSH3ドメイン、SH3結合ドメイン、基質結合ドメイン、フレキシブルループが存在する。Arg-365とArg-366は基質の結合に必須であると報告されている(62)。また、Asp-368とLys-369を含むフレキシブルループが酵素活性に重要であると報告されている(63)。そこで、基質結合部位に変異を入れたFUT8(R365A/R366A, RRM)と、フレキシブルループに変異を入れたFUT8(D368A/K369A/V370A/G371A/T372A, FLM)発現コンストラクトを構築し、これらのMEL細胞における過剰発現株を作製した(図8A)。ウエスタンブロットを行った結果、いずれの細胞株においても、変異型FUT8の発現が認められた(図8B)が、RRM、FLMのどちらにおいても、ヘモグロビン産生抑制の効果は認められなかった(図8C)。これらの結果から、FUT8によるコアフコシル化活性が赤血球の分化制御に関与していることが強く示唆された。

7) FUT8の過剰発現は、K562細胞の分化を抑制する

次に、FUT8が種を超えてヒトにおいても、ヘモグロビン産生の抑制に関与しているかどうか、ヒト慢性骨髄性白血病患者由来のK562細胞を用いて検証した。K562細胞に空ベクター、通常のヒトFUT8、基質結合部位に変異を入れたFUT8 (RRM) を導入し、過剰発現株を作製した。ウエスタンブロッティングによりこれらのタンパク質の過剰発現を確認した (図9A)。これらの細胞に100 μ M ヘミンを添加し、4日後のヘモグロビン陽性率を測定した。その結果、K562細胞においても、FUT8を過剰発現することでヘモグロビン産生の抑制効果が認められ、RRM過剰発現では、分化抑制効果が認められなかった (図9B)。以上の結果から、FUT8はヒト細胞においても赤血球のヘモグロビン産生の抑制に関与していることが示唆された。

8) K562細胞におけるshRNAによるFUT8の発現抑制はヘモグロビン産生と分化を促進する

最後に、K562細胞において、shRNAを用いてFUT8の発現を抑制させることで、どのような影響を与えるかを調べた。3種類のFUT8に対するshRNA (sh1、sh2、sh3) を設計し、K562細胞に一過的に導入した。導入後2週間薬剤選択マーカーであるピューロマイシン存在下で培養した後、RT-PCRとウエスタンブロッティングによりFUT8のmRNAとタンパク質の発現を評価した結果、発現の減少が認められた (図10A及びB)。FUT8の発現を抑制した細胞では、ヘモグロビン陽性の割合が、ネガティブコントロールshRNAを導入した細胞 ($16.8 \pm 3.6\%$) に比べ、 $53.8 \pm 4.4\%$ (sh1)、 $54.3 \pm 3.3\%$ (sh2)、 $79.2 \pm 11.1\%$ (sh3) と高い値を示した (図10C)。shRNAの導入は高分化率を示したsh3導入細胞を除き、細胞増殖に影響しなかった (図8D)。さらに、赤芽球段階における分化マーカーであるグリコホリンAとCD71を用いてフローサイトメトリー解析を行った。その結果、FUT8の発現を抑制した細胞においてCD71及びグリコホリンA陽性細胞の割合が63% (sh1)、64% (sh2)、87% (sh3) とネガティブコントロールshRNAを導入した細胞 (40%) に比べて増加が認められた (図8E)。この2つのマーカーを共発現する細胞の割合の上昇から、FUT8はヘモグロビン産生だけでなく、前赤芽球から好塩基性赤芽球や多染性赤芽球への分化を制御することを示唆された。

第5章 考察

DNA マイクロアレイは、一度に多数の遺伝子発現変動を解析可能であるため、細胞分化のように多くの遺伝子が関連する現象の理解には有用である。一方で、モデル細胞を用いたスクリーニングでは、分化関連遺伝子の他に、薬剤の添加や培養条件の変化により、薬剤添加ストレスへの応答や細胞増殖などに関わる遺伝子の発現変動も検出してしまうという欠点があった。本研究では、同じ濃度の薬剤で処理した際に、増殖能は同じだが、分化能のみが異なる高分化 MEL 細胞と低分化 MEL 細胞を用いて、遺伝子の発現を比較することでこれらの欠点を補った。さらに、3 種類の薬剤で共通する遺伝子に絞り込みを行うことで、より効率的に細胞分化に関連する遺伝子の選択を試みた。

次に、過剰発現系を用いた機能獲得による評価を行った。その結果、*Fut8* を過剰発現することで、MEL 細胞のヘモグロビン産生が抑制され、同様の現象はヒト *FUT8* 及びヒト K562 細胞でも示された。

Fut8 は、フコース転移酵素ファミリーに属する遺伝子である。フコース転移酵素ファミリーは、真核生物において、発生、受精、細胞接着、炎症作用、癌浸潤などを含む多様の生物学的、もしくは病的過程において関与する (64)。マウスに存在するフコース転移酵素ファミリーには、大きく分けて 2 種類存在する。1 つ目のグループは、アスパラギン残基に付加する N 結合型である。マウスに存在する N 結合型は α 1-2 結合の *FUT1*、*FUT2* と、 α 1-3 または α 1-4 結合の *FUT3*、*FUT5*、 α 1-3 結合の *FUT4*、*FUT6*、*FUT7*、*FUT9*、*FUT10*、*FUT11* と、 α 1-6 結合の *FUT8* が存在する。もう 1 つのグループは、セリン及びスレオニン残基に付加する O 結合型が存在する。マウスに存在する O 結合型は、*POFUT1*、*POFUT2* の 2 種類が存在する。本研究において、*FUT8* のみがヘモグロビン産生を抑制したことから、*FUT8* の持つコアフコシル化活性がヘモグロビン産生と細胞分化に重要な役割を持つことが示唆された。これは、*FUT8* がコアとなるアスパラギン結合糖鎖にフコースを転移する唯一の酵素であるためである。

コアフコシル化活性がヘモグロビン産生に直接的な影響を与えるかを評価するため、コアフコシル化の活性ドメインである基質結合部位とフレキシブルループに変異を導入した *FUT8* の過剰発現実験を行った。その結果、MEL 細胞におけるヘモグロビン産生抑制効果の解消が示された。加えて、同様の現象論は、K562 細胞においても確認さ

れた。これらの知見は、ヘモグロビン産生と赤血球分化において、コアフコシル化の制御が必須であることを初めて報告したものである。その他の組織の発生においては、FUT8 によるシグナル伝達受容体へのコアフコシル化活性が受容体の機能を調節することが知られている。しかしながら、これまでの *Fut8* ノックアウトマウスを用いた研究において、赤血球分化の表現型に関する報告はなく、FUT8 が分化に対して負の制御を行っているということは知られていなかった。*Fut8* ノックアウトマウスは、Transforming Growth Factor β 1 (TGF- β) 受容体、Epidermal Growth Factor (EGF) 受容体や Platelet-Derived Growth Factor (PDGF) 受容体におけるコアフコシル化が生じないため、肺胞壁の破壊や肺胞腔の拡張といった肺気腫様の症状を示し、7割が生後3日以内に死に至り、生き残ったマウスも著しい成長障害に陥る事が報告されている(65, 66)。B細胞分化において、 α 4 β 1 Integrin と血管細胞接着分子 (Vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) が FUT8 の標的タンパク質となりタンパク質間相互作用を示すことで、プロ B 細胞からプレ B 細胞への分化を正に制御することが知られている(67)。受容体のコアフコシル化は標的タンパク質との結合親和性を上昇させ、シグナル伝達を制御(増強)することが考えられる(66)。以上のことから、赤血球系の細胞分化に、EPO 受容体以外のシグナル伝達受容体が関与し、そのコアフコシル化の有無が分化に重要な役割を持っているのかもしれない。今後は、赤血球分化における FUT8 の標的タンパク質の同定を行うことでその機構が明らかになることが期待される。

TGF- β 受容体が赤血球分化における FUT8 の標的タンパク質の候補の一つではないかと考えている。この受容体は、既にコアフコシル化されることが知られており(65)、TGF- β は K562 細胞やその他のヒト赤白血病細胞においてヘモグロビン産生を誘導することが知られている(68, 69)。もう一つの候補としては、アクチビン受容体が考えられる。FUT8 をノックダウンしたマウスにおいて、アクチビン受容体のコアフコシル化が減少している(70)。アクチビン受容体 II A 及び B のリガンド (Growth differentiation factor 11, GDF11) は、赤血球成熟を阻害することが報告されている(71, 72)。受容体への GDF11 の結合は SMAD2 をリン酸化し、シグナル伝達経路を活性化することで赤芽球の成熟を阻害している。GDF11 を細胞に添加した際に、発現上昇した TGF- β スーパーファミリー標的遺伝子の中には、既に赤血球分化にかかわることが知られている *Myc*、*Id1*、*Atf4*、*Pdfigfa* が含まれていた。MEL 細胞に分化誘導した際に、*Myc*、*Atf4* は発現減少が認められた(表 6)ことから、同様のシグナル伝

達経路が動いているのかもしれない。また、GDF11 を受容体/IgG11 Fc 融合タンパクで捕捉することで貧血を改善できることが報告されている。GDF11 は赤血球分化の後期のステージで赤血球成熟を阻害しており、FUT8 過剰発現によるヘモグロビン産生の抑制と同じ時期に、同様に阻害的に働いていることから、GDF11 とアクチビン受容体によるシグナル伝達に FUT8 も関与している可能性が考えられる。

K562 細胞における shRNA を用いた発現抑制実験より、ヘモグロビン産生と赤血球分化においては FUT8 の発現が抑制されることが重要であることが示唆された。マイクロアレイの結果からも、*Fut8* の発現は、高分化 MEL 細胞で顕著に低下している。本研究結果から、*Fut8* は MYC と MYB の下流で制御されていることが示唆された。この 2 つの因子は赤血球分化を制御する転写因子として知られている (13-16, 26, 27)。ヒト *FUT8* のプロモーター配列には、bHLH や TATA-box の他に赤血球分化に関与する MYB や GATA1 の結合配列を有していることが知られている (73)。また、近年 GATA1 が制御する因子を探索した研究により、GATA1 誘導時に *Fut8* の発現低下が観察されている (74)。一方で、GATA1 をノックダウンした巨核球の遺伝子発現プロファイル (図 1 1 A) では、*Fut8* の発現上昇が認められる (75, GEO accession number GDS1245)。これらの結果は、*Fut8* は GATA1 の下流でも発現抑制されることを示唆している。さらに、PU.1 をノックダウンした造血幹細胞の遺伝子発現プロファイル (図 1 1 B) では、*Fut8* の発現減少が認められる (76, GEO accession number GDS2411)。骨髄系やリンパ系への分化を促進する転写因子 PU.1 により正に発現制御されている可能性も考えられる。

また、FUT8 の酵素活性は、巨核球分化に伴い上昇することが知られている (77)。これは本研究において発見した FUT8 が、前赤芽球から好塩基性赤芽球や多染性赤芽球への分化を抑制していることを示すデータとは逆の現象である。FUT8 は、赤血球分化を抑制し、巨核球分化を活性化する FLI1 と同じように、巨核球/赤芽球前駆細胞から巨核球または赤血球への分化の選択に関与している可能性が示唆される。

生体組織及びがん細胞における *FUT8* の遺伝子発現プロファイルを BioGPS (<http://biogps.org>) で調べた (図 1 2)。全ての組織及びがん細胞の平均発現値より 3 倍以上強く発現していた組織は、平滑筋細胞、小腸、前頭葉前部皮質、脊髄、視床下部、B リンパ芽球、CD19 陽性 B 細胞であった。比較的、脳や神経系、リンパ系の組織において多く発現していることが示唆された。CD71 陽性赤芽球では他組織の平均と比べると、その発現は半分程度であり、低いことがわかった。また、白血病細胞にお

いても平均より低値を示し、発現プロファイルからがんとの関連は見いだせていない。

DNA マイクロアレイは一度に多くの遺伝子発現を解析できるため、細胞分化などの多くの遺伝子が制御する生命現象を理解するために強力なツールである。しかしながら、薬剤添加時のストレスや細胞増殖などに応答し変動するノイズの遺伝子発現変動も検出してしまうことがある。本研究では、細胞分化の表現型のみ異なる高分化と低分化の MEL 細胞の発現変動を比較することでこれらのノイズを補正した。さらに、3種類の薬剤で共通に変動する遺伝子に焦点することで効率的な候補遺伝子の選択を試みた。選択された候補遺伝子の過剰発現実験により、新たなヘモグロビン産生の抑制因子として FUT8 を同定した。FUT8 によるコアフコシル化はマウス及びヒトにおいて、ヘモグロビン産生と赤血球分化を制御することが明らかとなった。これまでの赤血球分化研究においては、GATA1 やエリスロポエチンを始めとする多くの転写制御因子やサイトカインが関与することが示されていたが、本研究により、これらに加え糖鎖修飾の重要性が明らかとなった。

図

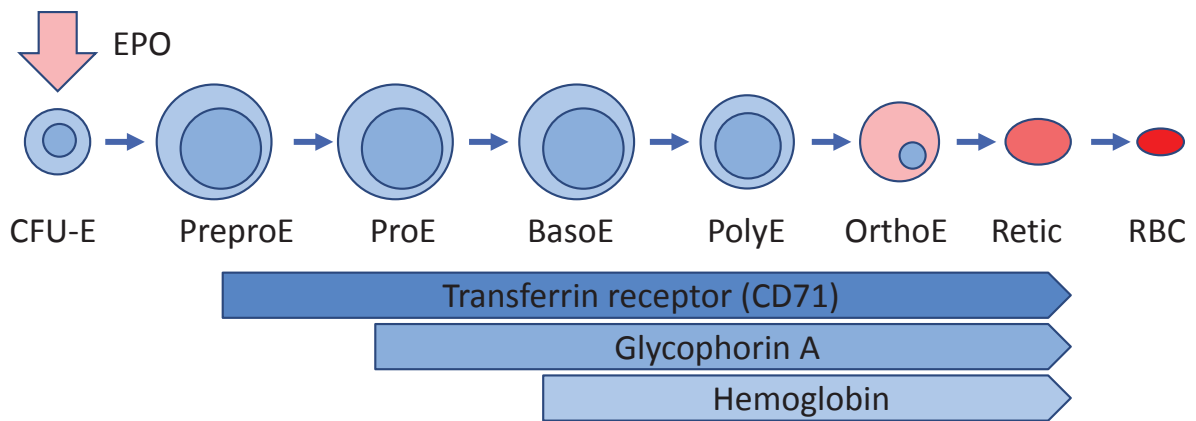


図 1 赤血球の分化と成熟

PreproE, preproerythroblast, プレ前赤芽球; ProE, proerythroblast, 前赤芽球; BasoE, basophilic erythroblast, 好塩基性赤芽球; PolyE, polychromatophilic erythroblast, 多染赤芽球; OrthoE, orthochromatophilic erythroblast, 正染性赤芽球; Retic, reticulocyte, 網(状)赤血球; RBC, red blood cell, 赤血球

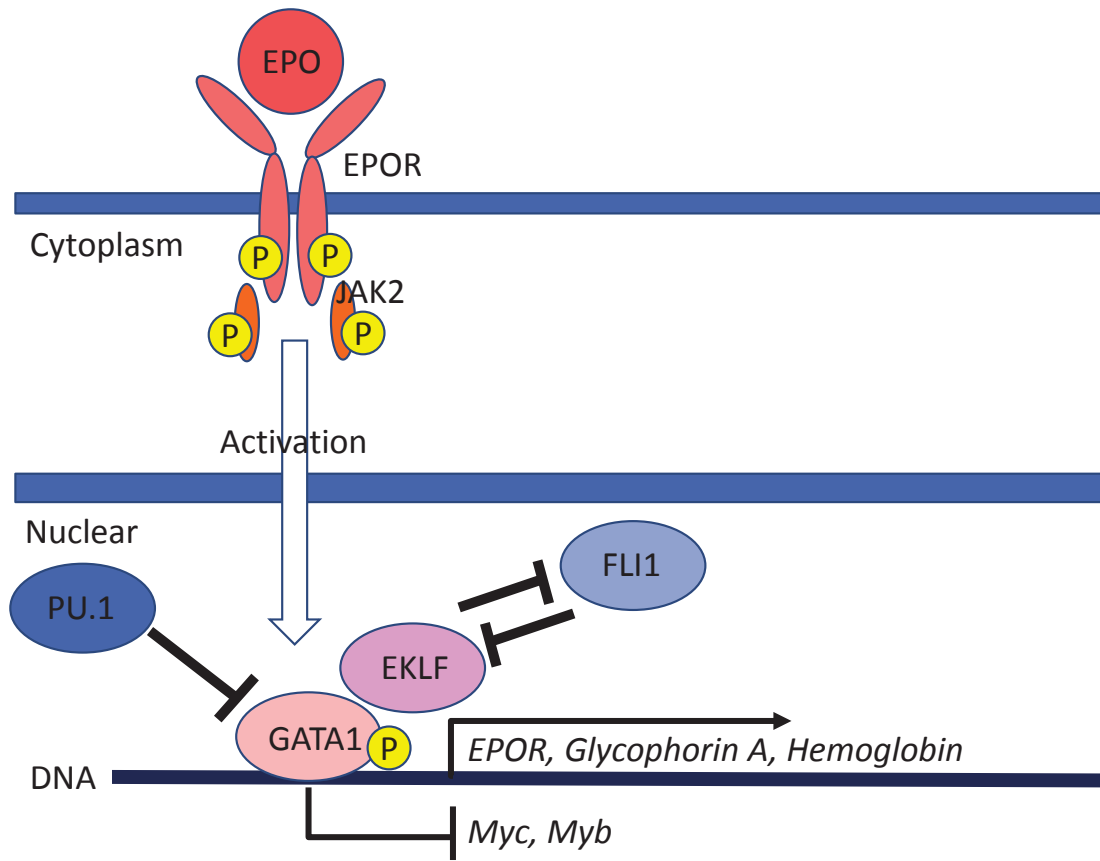


図 2 EPO 刺激による GATA1 の活性化と転写制御

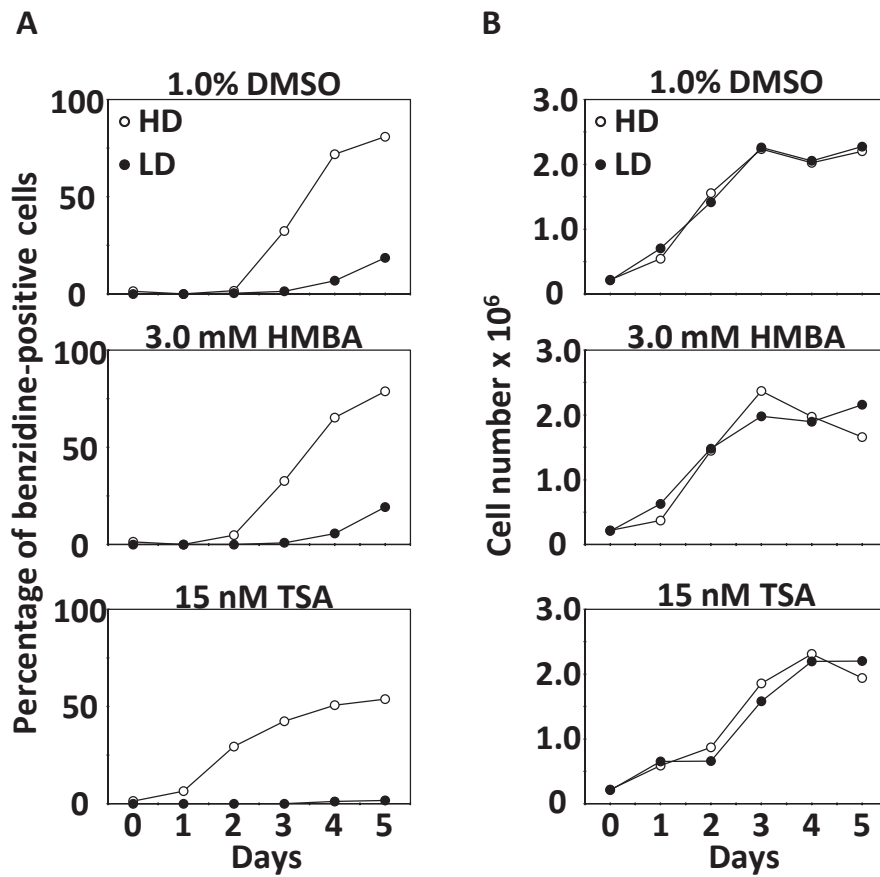


図 3 1.0% DMSO、3.0 mM HMBA、15 nM TSA で処理した高分化 (HD) 及び低分化 (LD) MEL 細胞におけるヘモグロビン陽性割合と細胞増殖

A : ベンジジン染色により測定したヘモグロビン陽性細胞の割合。

B : 培養液 1 mL あたりの細胞数。

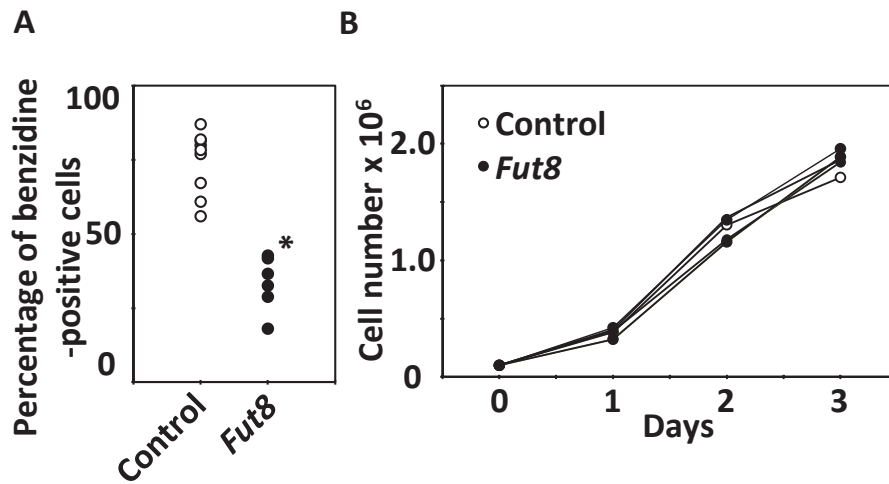


図4 *Fut8*を過剰発現した MEL 細胞におけるヘモグロビン陽性割合と細胞増殖

A: 1.5% DMSO 処理 4 日後の空ベクター (Control) 及び *Fut8* 過剰発現細胞におけるヘモグロビン陽性細胞の割合。9 クローンのコントロールと 6 クローンの *Fut8* 過剰発現細胞について調べた。アスタリスク (*) は、統計的に有意な差 ($p < 0.01$) を示している。

B: DMSO 処理無しで培養した培養液 1 mL あたりの細胞数。1 クローンのコントロールと 5 クローンの *Fut8* 過剰発現細胞について調べた。

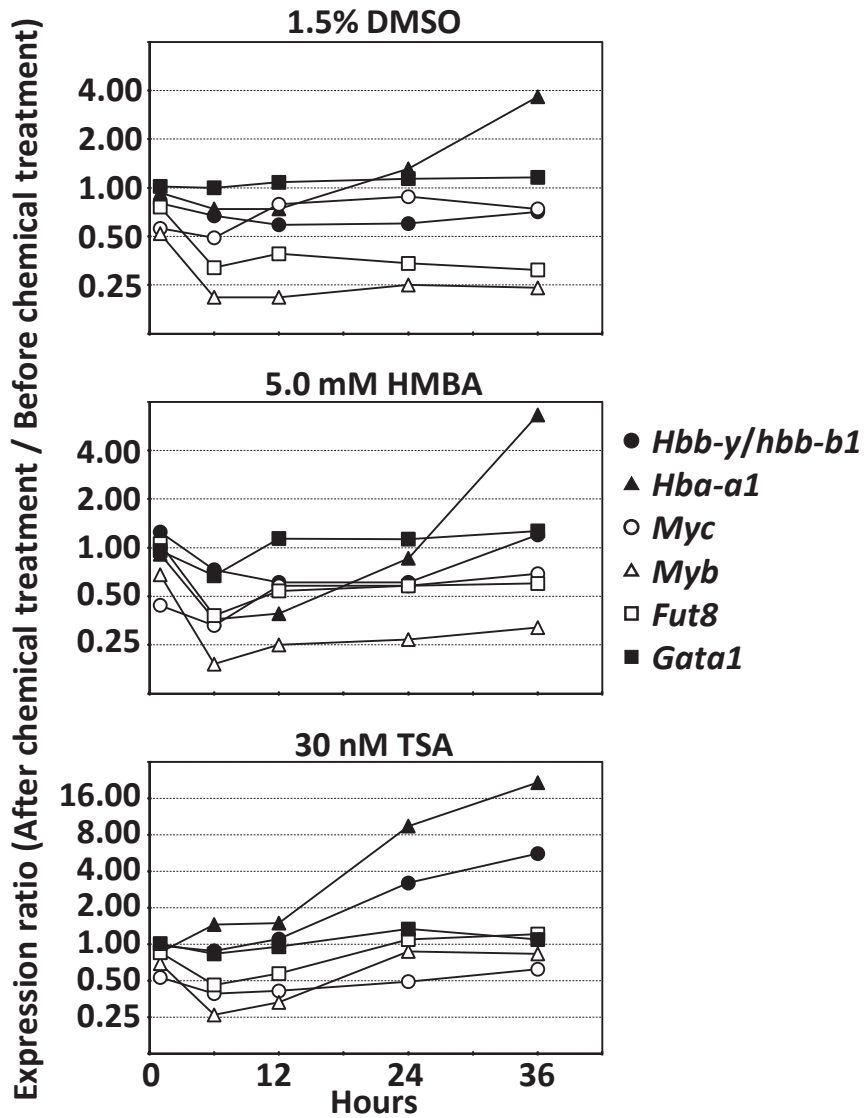


図 5 高分化 MEL 細胞を 1.5% DMSO、5.0 mM HMBA、30 nM TSA で分化誘導した際の *Fut8* とその他の赤血球分化に関連している遺伝子の発現プロファイル
発現比は 4 回のマイクロアレイ実験の平均値。

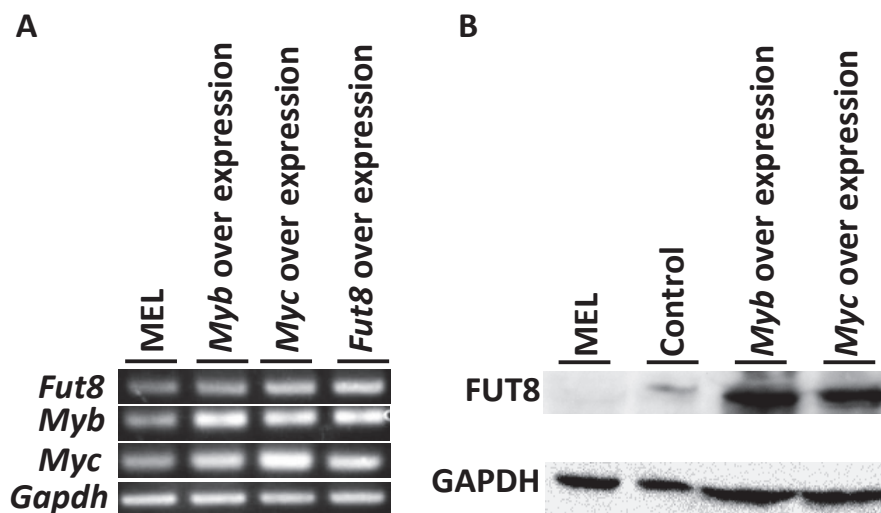


図 6 *Myb* と *Myc* が *FUT8* 発現に与える影響

A : MEL 細胞における *Fut8*、*Myb*、*Myc* 過剰発現の RT-PCR 解析。

B : *Myb*、*Myc* 過剰発現 MEL 細胞における *FUT8* のウエスタンブロッティング解析。

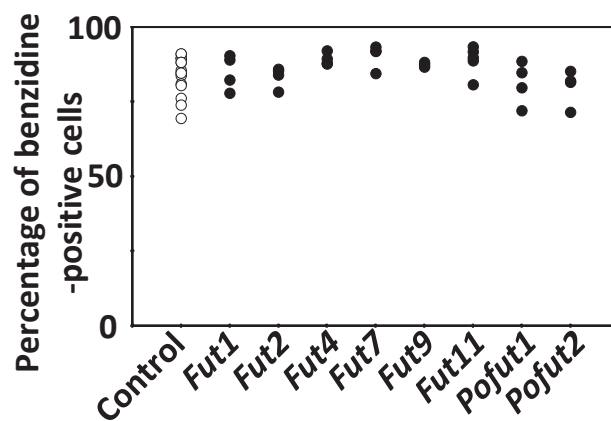


図 7 *Fut* ファミリー遺伝子を過剰発現した MEL 細胞におけるヘモグロビン陽性割合

1.5% DMSO 処理 4 日後の空ベクター (Control) 及び *Fut* ファミリー遺伝子過剰発現細胞におけるヘモグロビン陽性細胞の割合。12 クローンのコントロール、4 クローンの *Fut1*、4 クローンの *Fut2*、4 クローンの *Fut4*、4 クローンの *Fut7*、3 クローンの *Fut9*、5 クローンの *Fut11*、4 クローンの *Pofut1* と 4 クローンの *Pofut2* 過剰発現細胞について調べた。

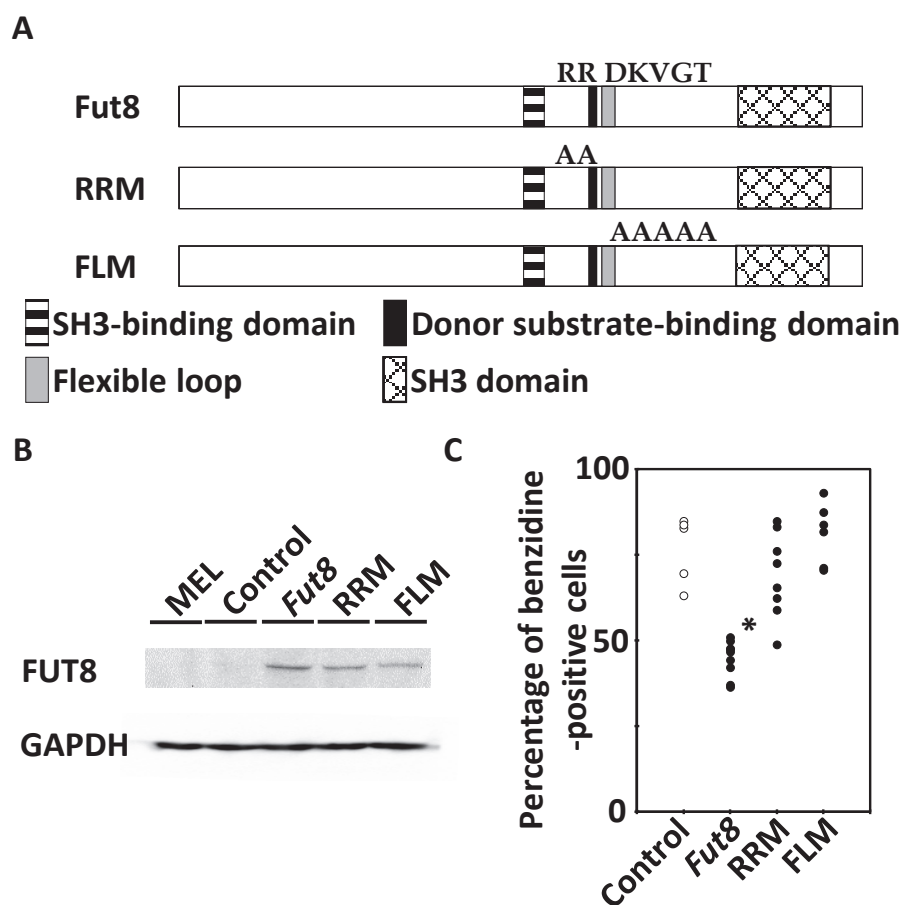


図 8 変異を導入した *Fut8* 過剰発現 MEL 細胞におけるヘモグロビン陽性割合

A: 変異を導入した FUT8 のコンストラクト。RRM: R365A/R366A に変異を導入した FUT8。FLM: フレキシブルループに (D368A/K369A/V370A/G371A/T372A) に変異を導入した FUT8。

B: FUT8 と変異を導入した FUT8 過剰発現細胞のウェスタンブロッティング解析

C: 1.5% DMSO 処理 4 日後の空ベクター (Control)、*Fut8* 及び変異を導入した *Fut8* 過剰発現細胞におけるヘモグロビン陽性細胞の割合。4 クローンのコントロールと 9 クローンの *Fut8*、9 クローンの RRM、6 クローンの FLM 過剰発現細胞について調べた。アスタリスク (*) は、統計的に有意な差 ($p < 0.01$) を示している。

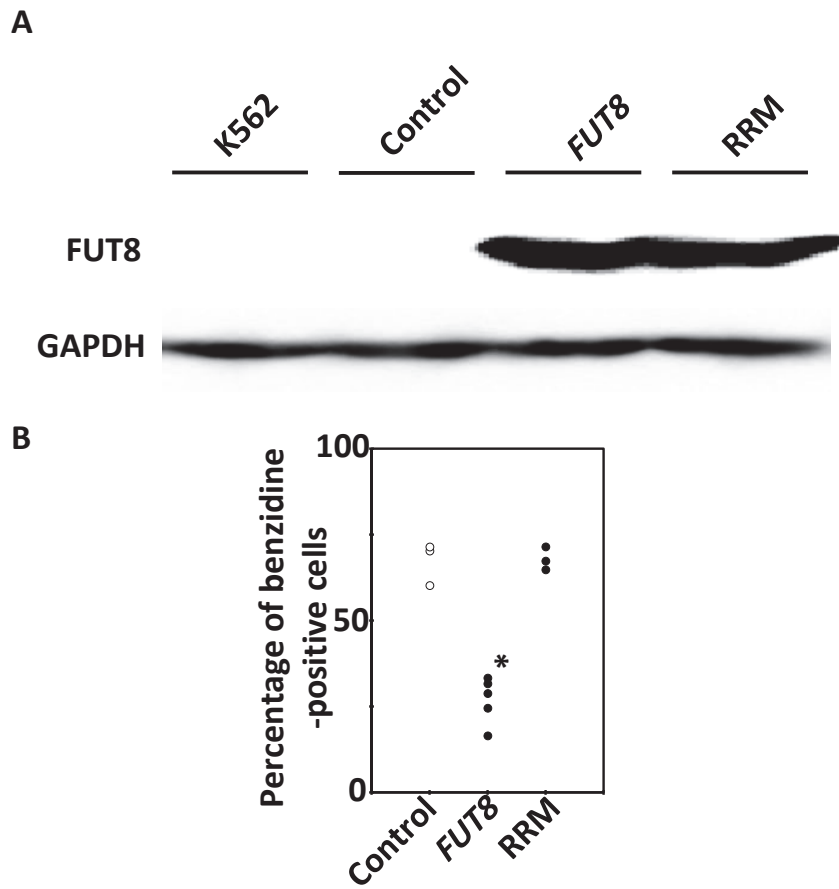


図 9 変異を導入した *FUT8* 過剰発現 K562 細胞におけるヘモグロビン陽性割合

A : *FUT8* と変異を導入した *FUT8* 過剰発現細胞のウェスタンブロッティング解析

B : 100 μ M ヘミン処理 4 日後の空ベクター (Control)、*FUT8* 及び変異を導入した *FUT8* 過剰発現細胞におけるヘモグロビン陽性細胞の割合。3 クローンのコントロールと 5 クローンの *FUT8*、3 クローンの RRM 過剰発現細胞について調べた。アスタリスク (*) は、統計的に有意な差 ($p < 0.01$) を示している。

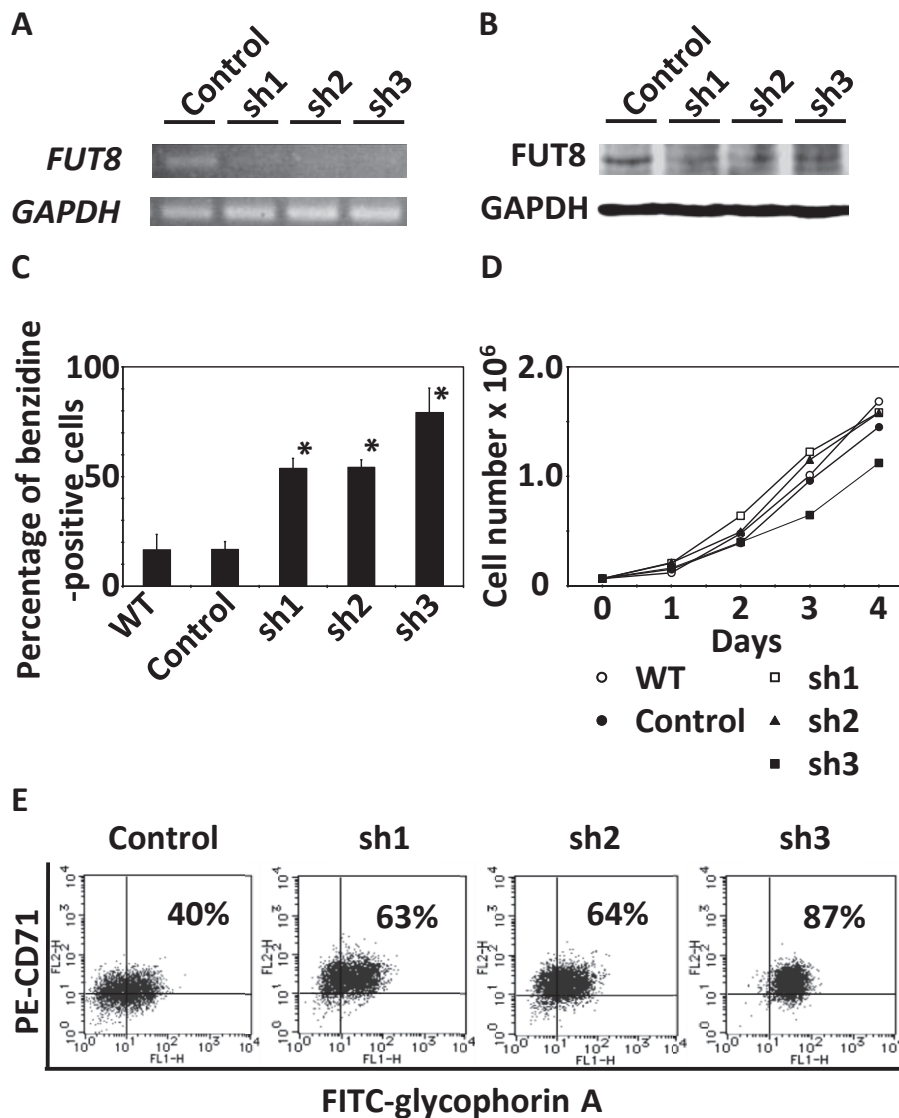


図 10 K562 細胞における shRNA による *FUT8* ノックダウン

ネガティブコントロール shRNA (Control)、shRNA (sh1、sh2、sh3) はエレクトロポレーションにより K562 細胞に導入した。各コンストラクトが導入された細胞は形質転換後 2 週間、ピューロマイシンで選択し、形質転換していない K562 細胞 (WT) と共に解析に使用した。

A: *FUT8* 発現の RT-PCR 解析。

B: *FUT8* 発現のウエスタンブロッティング解析。

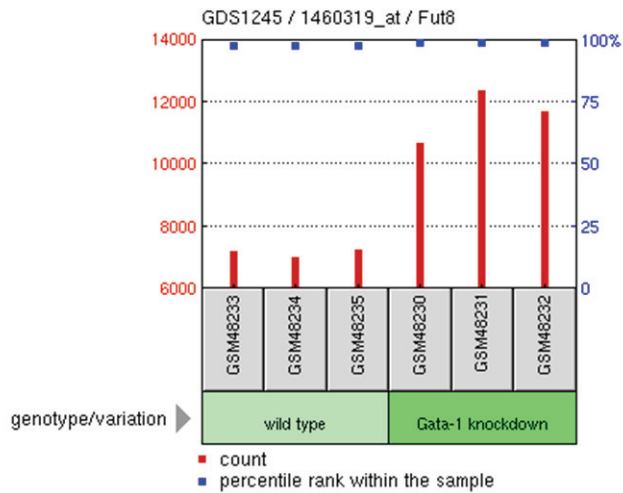
C: ヘモグロビン陽性細胞の割合。平均値と標準偏差は 3 回の実験から算出した。アスタリスク (*) は、統計的に有意な差 ($p < 0.01$) を示している。

D: 培養液 1 mL あたりの細胞数。

E: CD71 とグリコホリン A のフローサイトメトリー解析。

A

Profile	GDS1245 / 1460319_at / Fut8
Title	GATA-1 knockdown effect on megakaryocytes
Organism	Mus musculus

**B**

Profile	GDS2411 / 1460319_at / Fut8
Title	Transcription factor PU.1 knockdown effect on hematopoietic stem cells
Organism	Mus musculus

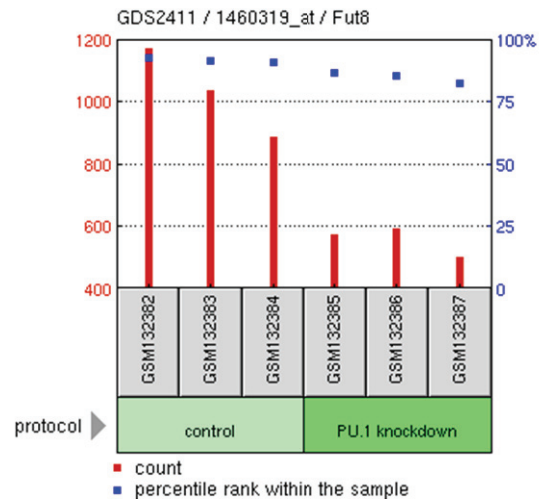


図 1 1 GATA1 及び PU.1 ノックダウン細胞における *Fut8* 発現プロファイル

A : GATA1 ノックダウン巨核球の GEO profile

B : PU.1 ノックダウン造血幹細胞の GEO profile

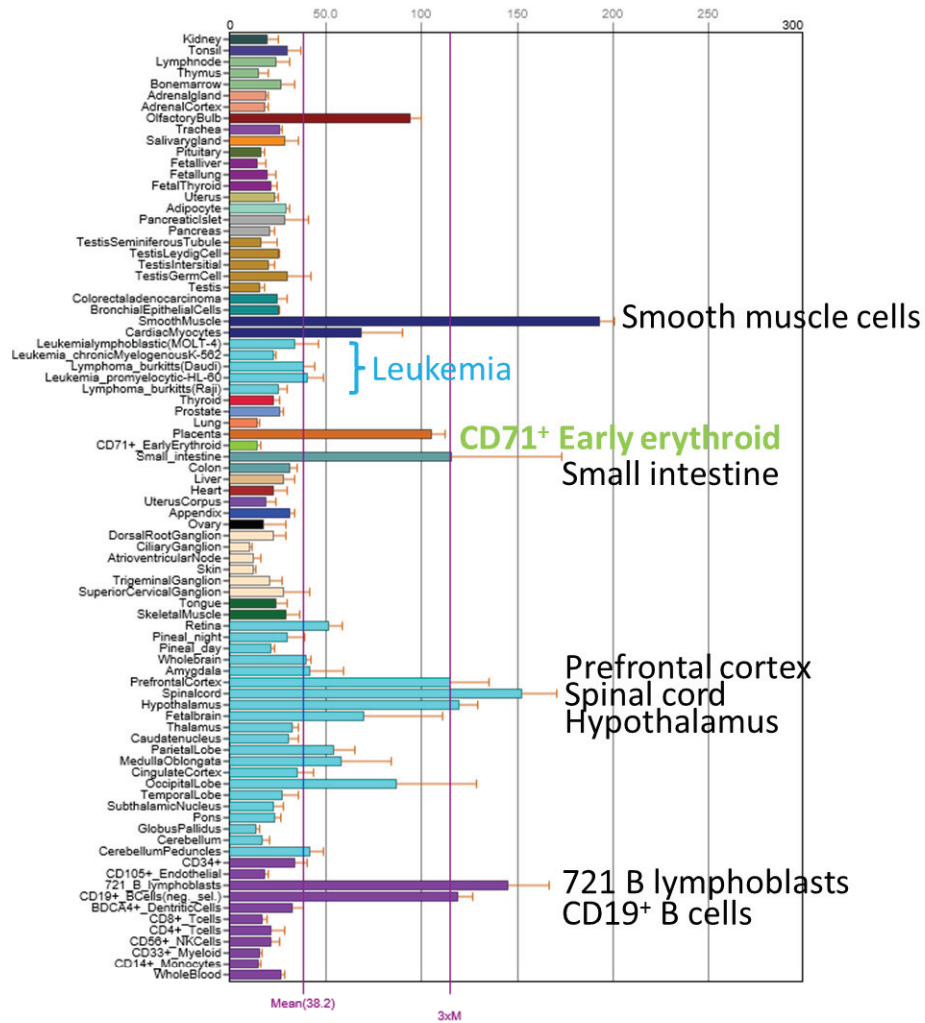


図 1 2 組織及びがん細胞における *FUT8* 発現プロファイル

表

表 1 候補遺伝子のクローニングに用いたプライマー配列と制限酵素

Gene name	Primer	Restriction enzymes
<i>Idi1</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGCCTGAAATAAATACCAGCC-3'	<i>EcoR</i> I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGTCACAATCTATGTATTTTCTCATG-3'	<i>Xho</i> I
<i>Plek</i>	Forward, 5'-AAACTCGAGGCCACCATGGAACCAAAGCGGATCAG-3'	<i>Xho</i> I
	Reverse, 5'-AAAAAAAAGCGGCCGCTCATTTCCAGTCCGTGAGG-3'	<i>Not</i> I
<i>Fut8</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGCGGGCATGGACTGGTT-3'	<i>EcoR</i> I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGCTATTTTTTCAGCTTCAGGATATG-3'	<i>Xho</i> I
<i>Rnpc2</i>	Forward, 5'-AAACTCGAGGCCACCATGGCAGACGATATTGATATTG-3'	<i>Xho</i> I
	Reverse, 5'-AAAAAAAAGCGGCCGCTCATCGTCTACTTGGAACCAG-3'	<i>Not</i> I
<i>Cst3</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGGCCAGCCCGCTGCGCT-3'	<i>EcoR</i> I
	Reverse, 5'-AACTCGAGTTAGGCATTTTTGCAGCTGAATTT-3'	<i>Xho</i> I
<i>Gstt3</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGGGTCTGGAGCTCTACCT-3'	<i>EcoR</i> I
	Reverse, 5'-AAAAAAAAGCGGCCGCTCAGTGTAACAAACACTGCACA-3'	<i>Not</i> I
<i>Spn</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGGCCTTGACCTTCTCC-3'	<i>EcoR</i> I
	Reverse, 5'-AAAAAAAAGCGGCCGCTCATAGAGATTGAGGTGCGG-3'	<i>Not</i> I
<i>Myc</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCTGGATTTTCCTTTGGGCGTTG-3'	<i>EcoR</i> I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGATTATGCACCAGAGTTTCGAAG-3'	<i>Xho</i> I
<i>Myb</i>	Forward, 5'-AAACTCGAGGCCACCATGGCCCGGAGACCCCGACAC-3'	<i>Xho</i> I
	Reverse, 5'-AAAGCGGCCGCTCACATGACCAGAGTTCGAGC-3'	<i>Not</i> I

表 1 候補遺伝子のクローニングに用いたプライマー配列と制限酵素 (続き)

Gene name	Primer	Restriction enzymes
<i>Fut1</i>	Forward, 5'-AAACTCGAGGCCACCATGTGGACTCCCAGCCGGA-3'	<i>Xho</i> I
	Reverse, 5'-AAAAAAAAGCGGCCGCTCAGACCAATCTAAAAAGACTG-3'	<i>Not</i> I
<i>Fut2</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGGCGAGTGCCAGGTAC-3'	<i>Eco</i> R I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGTTAGTGCTTAAGGAGTGGGG-3'	<i>Xho</i> I
<i>Fut4</i>	Forward, 5'-GGGAATTCGCCACCATGGCTCCGGCCCGCAA-3'	<i>Eco</i> R I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGTCATCGCTGGAACCAGTCTG-3'	<i>Xho</i> I
<i>Fut7</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGAATTGTATTGGGTACCAC-3'	<i>Eco</i> R I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGTCAAGCCTGGAACCAGCTTT-3'	<i>Xho</i> I
<i>Fut9</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGACATCAACATCCAAAGGC-3'	<i>Eco</i> R I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGTTAATTCAAAAACCATTTCTCTAA-3'	<i>Xho</i> I
<i>Fut11</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGGCTGCTCGCTGTACCG-3'	<i>Eco</i> R I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGTTAGAGATTTTTATTCCGTTTCAT-3'	<i>Xho</i> I
<i>Pofut1</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGGGCGCCGCGGTGG-3'	<i>Eco</i> R I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGTCAAATTCATCCCGAAGCTGG-3'	<i>Xho</i> I
<i>Pofut2</i>	Forward, 5'-AAACTCGAGGCCACCATGGCGGCGCTCAGCGTC-3'	<i>Xho</i> I
	Reverse, 5'-AAAAAAAAGCGGCCGCTCAGTACGCAATCTTCCAGTG-3'	<i>Not</i> I
<i>FUT8</i>	Forward, 5'-AAGAATTCGCCACCATGCGGCCATGGACTGGTT-3'	<i>Eco</i> R I
	Reverse, 5'-AAACTCGAGTTATTTCTCAGCCTCAGGATAT-3'	<i>Xho</i> I

表 2 *Fut8*/*FUT8* の SOE-PCR に用いたプライマー配列

Name	Primer
<i>Fut8</i>	Forward, 5'-GTCCATGTCGCAGCCACAGACAAAGTGGGAACAGAAGCGCC-3'
RRM	Reverse, 5'-TGTCTGTGGCTGCGACATGGACTCCAATAACTGGATGTTTGAAG-3'
<i>Fut8</i>	Forward, 5'-ACAGCCGCAGCGGCAGCAGAAGCAGCCTTCCACCC-3'
FLM	Reverse, 5'-TTCTGCTGCCGCTGCGGCTGTGCGTCTGACATGGACT-3'
<i>FUT8</i>	Forward, 5'-GTCCATGTCGCAGCCACAGACAAAGTGGGAACAGAAGCTGCC-3'
RRM	Reverse, 5'-TGTCTGTGGCTGCGACATGGACTCCAATAACTGGATGTTTGAAG-3'

表 3 RT-PCR 解析に用いたプライマー配列

Gene name	Primer
<i>Fut8</i>	Forward, 5'-CTTCAAACATCCAGTTATTGGA-3'
	Reverse, 5'-CACTTGCATTCTGCGTGCG-3'
<i>Myb</i>	Forward, 5'-AATATCCCTATTACCACATCGC-3'
	Reverse, 5'-TCCAGCTCCTTTATTGCTTTT-3'
<i>Myc</i>	Forward, 5'-CGTGACCAGATCCCTGAATTG-3'
	Reverse, 5'-GTGCTCGTCTGCTTGAATGG-3'
<i>Gapdh</i>	Forward, 5'-AACGACCCCTTCATTGAC-3'
	Reverse, 5'-TCCACGACATACTCAGCAC-3'
<i>FUT8</i>	Forward, 5'-GCTTCAAACATCCAGTTATTGG-3'
	Reverse, 5'-GTCCACTTGCATTCTGCGTG-3'
<i>GAPDH</i>	Forward, 5'-TCATTGACCTCAACTACATGG-3'
	Reverse, 5'-GACGTACTCAGCGCCAGC-3'

表 4 shRNA 配列

shRNA name	Sequence
sh1	Forward oligonucleotide,
	5'-CACCGAATACTTATCTTGGGATCTGTGTGCTGTCCAGATTCCAAGATGAGTGTTCTTTTTT-3'
	Reverse oligonucleotide,
	5'-GCATAAAAAAGAACAACACTCATCTTGGAACTCTGGACAGCACACAGATCCCAAGATAAGTATTC-3'
sh2	Forward oligonucleotide,
	5'-CACCGTCTCGGAATTGGTGTATGCTGTGTGCTGTCCAGCATAGCGCCAATTCTGAGATTTTT-3'
	Reverse oligonucleotide,
	5'-GCATAAAAAATCTCAGAATTGGCGCTATGCTGGACAGCACACAGCATAACACCAATTCGAGAC-3'
sh3	Forward oligonucleotide,
	5'-CACCGGATTGCATAATTGATACAGTGTGCTGTCCTGTATCGATTGTGCAGTCCTTTTTT-3'
	Reverse oligonucleotide,
	5'-GCATAAAAAAGGACTGCACAATCGATACAGGACAGCACACTGTATCAATTATGCAATCC-3'

表 5 発現誘導遺伝子、発現抑制遺伝子のリスト

Clone name	Gene symbol	Expression ratio (HD MEL cells / LD MEL cells)											
		DMSO				HMBA				TSA			
		6 h	12 h	24 h	36 h	6 h	12 h	24 h	36 h	6 h	12 h	24 h	36 h
H3038C06	<i>Zfp951</i>	0.48	0.38	0.39	0.24	0.42	0.53	0.42	0.25	0.62	0.64	0.48	0.45
H3078E08	unknown	0.49	0.39	0.43	0.26	0.47	0.53	0.44	0.26	0.60	0.64	0.50	0.43
H3049A07	<i>G430049J08Rik</i>	0.53	0.48	0.47	0.33	0.46	0.50	0.41	0.26	0.64	0.63	0.38	0.35
H4070E06	unknown	0.50	0.44	0.36	0.22	0.48	0.54	0.43	0.21	0.58	0.64	0.52	0.59
H3062A11	<i>Clip2</i>	0.59	0.46	0.51	0.33	0.45	0.51	0.47	0.29	0.76	0.69	0.46	0.41
H4016D11	unknown	0.59	0.55	0.46	0.34	0.55	0.61	0.49	0.27	0.60	0.59	0.46	0.49
H3061H10	<i>Tmem123</i>	0.66	0.62	0.73	0.48	0.47	0.61	0.45	0.27	0.67	0.61	0.44	0.36
H3104H09	<i>Spc24</i>	0.60	0.50	0.51	0.48	0.49	0.56	0.55	0.35	0.64	0.70	0.54	0.50
H3073G11	<i>Rtp3</i>	0.62	0.58	0.63	0.39	0.49	0.66	0.48	0.28	0.77	0.63	0.48	0.51
H3078A01	<i>G430049J08Rik</i>	0.62	0.56	0.68	0.38	0.56	0.58	0.53	0.28	0.66	0.65	0.53	0.56
H3046C10	<i>Idi1</i>	0.68	0.56	0.95	0.61	0.50	0.57	0.80	0.61	0.50	0.49	0.53	0.56
H4046D12	<i>Plek</i>	0.59	0.58	0.84	0.63	0.52	0.46	0.76	0.44	0.53	0.57	0.68	0.86
H3037D02	<i>G430049J08Rik</i>	0.74	0.90	0.62	0.62	0.75	0.60	0.55	0.45	0.66	0.66	0.49	0.51
H3078G11	<i>Drd3</i>	0.76	0.85	0.94	0.58	0.63	0.66	0.59	0.32	0.75	0.68	0.49	0.54
H4019B10	<i>Fut8</i>	0.78	0.65	0.81	0.37	0.63	0.58	0.62	0.31	0.60	0.66	0.87	0.95
H3078G10	<i>Rtp3</i>	0.78	0.79	0.81	0.59	0.68	0.75	0.72	0.31	0.69	0.72	0.57	0.56
H4073E05	<i>Rnpc2</i>	0.72	0.77	0.89	0.66	0.46	0.71	0.85	0.57	0.72	0.93	0.55	0.48
H3033F11	<i>Cst3</i>	0.65	0.83	0.80	0.60	0.63	0.65	0.66	0.65	0.65	0.73	0.75	0.78
H4040B02	<i>Gstt3</i>	0.76	0.90	1.18	0.47	0.80	0.70	0.67	0.48	0.98	0.66	0.59	0.59
H3138C09	<i>Rnf128</i>	0.91	0.69	0.78	0.62	0.84	0.66	1.02	0.75	0.96	1.03	0.74	0.62
H3032F06	<i>Hbb-y/Hbb-b1</i>	0.61	0.69	0.79	0.92	0.57	0.68	1.14	1.54	0.62	0.60	0.69	0.96
H4003H10	<i>Spn</i>	0.80	0.82	1.14	0.62	0.88	0.90	1.00	0.66	0.65	0.64	0.84	0.98
H3113C01	<i>Hbb-y/Hbb-b1</i>	0.69	0.59	0.87	1.07	0.68	0.75	1.39	1.59	0.60	0.68	0.86	0.96

表 5 発現誘導遺伝子、発現抑制遺伝子のリスト (続き)

Clone name	Gene symbol	Expression ratio (HD MEL cells / LD MEL cells)											
		DMSO				HMBA				TSA			
		6 h	12 h	24 h	36 h	6 h	12 h	24 h	36 h	6 h	12 h	24 h	36 h
H3119H11	<i>Wdfy3</i>	0.83	0.84	2.03	0.83	1.03	0.94	0.77	0.64	0.59	0.74	0.69	0.81
H4020E10	<i>Il4ra</i>	0.95	0.89	0.90	0.60	1.06	1.00	1.00	0.54	0.88	1.17	1.33	1.66
H3028F05	<i>Odc1</i>	1.06	1.13	1.51	1.17	0.92	1.30	1.09	1.59	0.99	1.01	1.24	1.76
H4062C02	<i>Mcm4</i>	0.92	1.09	1.57	1.13	1.04	1.08	1.44	1.50	1.04	1.15	1.50	1.67
H3024H12	<i>Hspa8</i>	0.93	1.06	1.59	1.19	0.87	1.08	1.67	1.37	0.95	1.09	1.48	2.02
H4006F09	<i>Hat1</i>	1.12	0.94	1.68	1.27	1.08	1.12	1.69	1.38	1.01	1.55	1.30	1.61
H3006C07	unknown	1.23	1.24	1.50	1.16	1.24	1.65	1.37	1.57	0.96	1.06	1.39	1.80
H4003E09	<i>Car2</i>	1.05	1.15	1.63	1.34	1.01	1.08	1.82	1.65	0.87	0.90	1.79	2.19
H3130A05	<i>Psmd2</i>	1.26	1.20	1.67	1.44	1.19	1.17	1.85	1.50	1.27	1.11	1.48	2.10
H3018A08	<i>Cct8</i>	1.40	1.30	1.75	1.40	1.24	1.52	1.89	1.49	1.37	1.42	1.34	1.69
H4034F12	<i>Fbxo45</i>	1.33	1.28	2.14	1.21	1.22	1.43	1.65	1.30	1.30	1.63	1.39	2.09
H3093D05	<i>Trfr</i>	1.26	1.42	1.77	1.51	1.30	1.28	1.72	2.06	1.23	1.17	1.62	1.68
H3123F09	<i>Guf1</i>	0.98	1.12	0.96	1.60	1.25	1.11	1.23	2.41	0.93	1.00	1.59	4.07
H3122H09	<i>Hba-a1</i>	0.97	1.19	1.10	1.69	1.21	1.07	1.37	2.85	1.13	1.01	1.44	3.50
H3126A10	<i>Hba-a1</i>	1.03	1.13	1.06	1.59	1.11	1.10	1.36	2.93	1.21	1.09	1.51	3.55
H3026B04	<i>Ppat</i>	1.84	1.49	1.81	1.65	1.37	1.47	1.78	1.76	1.21	1.65	1.22	1.63
H3126G09	<i>Hba-a1</i>	1.00	1.08	1.05	2.13	1.18	0.95	1.35	3.39	1.05	1.06	1.34	3.65
H3125H07	<i>Hba-a1</i>	0.97	1.08	1.11	1.99	1.23	1.15	1.55	3.45	0.90	1.10	1.62	3.78
H3121B01	<i>Hba-a1</i>	1.04	1.23	1.31	2.05	1.43	1.11	1.63	3.81	1.06	1.08	1.68	3.97
H3124F12	unknown	0.99	0.99	1.25	1.64	1.26	1.07	1.42	4.07	1.29	1.17	1.79	4.58
H3122H11	<i>Hba-a1</i>	1.02	1.20	1.29	2.03	1.25	1.30	1.40	4.25	1.17	1.03	1.85	4.27
H3045A12	<i>Hba-a1</i>	1.03	1.16	1.59	2.09	1.43	1.16	1.81	4.45	1.19	1.31	2.30	5.50
H3123A01	<i>Hba-a1</i>	1.06	1.40	1.90	2.73	1.25	1.32	2.27	5.18	1.35	1.01	1.64	4.09
H3083F09	<i>Phtf1, Rsbn1</i>	1.10	1.09	1.58	1.87	1.47	1.16	2.16	4.91	1.20	1.47	2.47	5.70
H3123E05	<i>Hba-a1</i>	1.34	1.30	1.90	2.72	1.51	1.49	2.33	5.70	1.42	1.22	2.02	4.85

表 6 MEL 細胞の分化における TGF- β スーパーファミリー標的遺伝子の変動

Clone name	Gene symbol	Expression ratio (After treatment / Before treatment)														
		DMSO					HMBA					TSA				
		1 h	6 h	12 h	24 h	36 h	1 h	6 h	12 h	24 h	36 h	1 h	6 h	12 h	24 h	36 h
H3076D10	<i>Myc</i>	0.60	0.73	0.71	0.85	0.89	0.94	0.48	0.50	0.65	0.71	0.60	0.52	0.47	0.58	0.63
H3003F10	<i>Id1</i>	0.94	0.92	0.97	0.89	0.87	0.93	1.04	0.95	1.28	1.26	0.96	1.19	0.88	0.84	0.95
H3124E06	<i>Atf4</i>	0.45	0.41	0.57	0.54	0.70	0.72	0.37	0.53	0.54	0.63	0.48	0.26	0.25	0.32	0.46
H3146C02	<i>Pdgfa</i>	0.79	0.49	1.22	4.02	0.92	0.89	1.56	1.40	1.01	1.00	0.89	1.00	1.60	1.53	1.44

謝辞

本博士論文執筆にあたりご指導いただいた主査の村上康文先生、副査の田代文夫先生、西山千春先生、堀戸重臣先生、古市貞一先生、秋本和憲先生に感謝申し上げます。この研究を進めるにあたり村上研究室、ゲノム創薬研究センター 構造ゲノム科学部門研究室、株式会社 バイオマトリックス研究所の方々に大変お世話になりました。特に共同研究者であった戸田貴徳さん、布留川透さん、馬渡侑希さん、高江洲里花さん、清水雅士さん、和田諒平さん、研究をご指導いただいた村上康文先生、宇津木孝彦先生、大津正也先生、柏葉脩一郎先生、加藤大先生に厚く御礼申し上げます。

著作権

This research was originally published in The Journal of Biological Chemistry. Hitoshi Sasaki, Takanori Toda, Toru Furukawa, Yuki Mawatari, Rika Takaesu, Masashi Shimizu, Ryohei Wada, Dai Kato, Takahiko Utsugi, Masaya Ohtsu, and Yasufumi Murakami. α -1,6-Fucosyltransferase (FUT8) Inhibits Hemoglobin Production during Differentiation of Murine and K562 Human Erythroleukemia Cells. The Journal of Biological Chemistry. 2013; Vol. 288:16839-16847. © the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.

参考文献

1. Orkin SH, Zon LI. (2008) Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. **132**, 631–644
2. Wu H, Liu X, Jaenisch R, Lodish HF. (1995) Generation of committed erythroid BFU-E and CFU-E progenitors does not require erythropoietin or the erythropoietin receptor. *Cell*. **83**, 59–67
3. Lin CS, Lim SK, D'Agati V, Costantini F. (1996) Differential effects of an erythropoietin receptor gene disruption on primitive and definitive erythropoiesis. *Genes Dev*. **10**, 154–164
4. Kieran MW, Perkins AC, Orkin SH, Zon LI. (1996) Thrombopoietin rescues in vitro erythroid colony formation from mouse embryos lacking the erythropoietin receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 9126–9131
5. Witthuhn BA, Quelle FW, Silvennoinen O, Yi T, Tang B, Miura O, Ihle JN.. (1993) JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin. *Cell*. **74**, 227-236
6. Ghaffari S, Kitidis C, Fleming MD, Neubauer H, Pfeffer K, Lodish HF. (2001) Erythropoiesis in the absence of janus-kinase 2: BCR-ABL induces red cell formation in JAK2(-/-) hematopoietic progenitors. *Blood*. **98**, 2948–2957
7. Zhao W, Kitidis C, Fleming MD, Lodish HF, Ghaffari S. (2006) Erythropoietin stimulates phosphorylation and activation of GATA-1 via the PI3-kinase/AKT signaling pathway. *Blood*. **107**, 907–915
8. Weiss MJ, Orkin SH. (1995) Transcription factor GATA-1 permits survival and maturation of erythroid precursors by preventing apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **92**, 9623-9627
9. Fujiwara Y, Browne CP, Cunniff K, Goff SC, Orkin SH. (1996) Arrested development of embryonic red cell precursors in mouse embryos lacking transcription factor GATA-1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 12355–12358
10. Scott EW, Simon MC, Anastasi J, Singh H. (1994) Requirement of transcription factor PU.1 in the development of multiple hematopoietic lineages. *Science*. **265**,

11. Rekhtman N, Radparvar F, Evans T, Skoultchi AI. (1999) Direct interaction of hematopoietic transcription factors PU.1 and GATA-1: functional antagonism in erythroid cells. *Genes Dev.* **13**, 1398–1411
12. Siatecka M, Bieker JJ. (2011) The multifunctional role of EKLF/KLF1 during erythropoiesis. *Blood.* **118**, 2044–2054
13. Pang CJ, Lemsaddek W, Alhashem YN, Bondzi C, Redmond LC, Ah-Son N, Dumur CI, Archer KJ, Haar JL, Lloyd JA, Trudel M. (2012) Kruppel-Like Factor 1 (KLF1), KLF2, and Myc Control a Regulatory Network Essential for Embryonic Erythropoiesis. *Mol. Cell. Biol.* **32**, 2628–2644
14. Jayapal SR, Lee KL, Ji P, Kaldis P, Lim B, Lodish HF. (2010) Down-regulation of Myc is essential for terminal erythroid maturation. *J. Biol. Chem.* **285**, 40252–40265
15. Rylski M, Welch JJ, Chen YY, Letting DL, Diehl JA, Chodosh LA, Blobel GA, Weiss MJ. (2003) GATA-1-mediated proliferation arrest during erythroid maturation. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 5031–5042
16. Bartůnek P, Králová J, Blendinger G, Dvůrák M, Zenke M. (2003) GATA-1 and c-myc crosstalk during red blood cell differentiation through GATA-1 binding sites in the c-myc promoter. *Oncogene.* **22**, 1927–1935
17. Ben-David Y, Giddens EB, Bernstein A. (1990) Identification and mapping of a common proviral integration site Fli-1 in erythroleukemia cells induced by Friend murine leukemia virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **87**, 1332–1336
18. Athanasiou M, Mavrothalassitis G, Sun-Hoffman L, Blair DG. (2000) FLI-1 is a suppressor of erythroid differentiation in human hematopoietic cells. *Leukemia.* **14**, 439–445
19. Athanasiou M, Clausen PA, Mavrothalassitis GJ, Zhang XK, Watson DK, Blair DG. (1996) Increased expression of the ETS-related transcription factor FLI-1/ERGB correlates with and can induce the megakaryocytic phenotype. *Cell Growth Differ.* **7**, 1525–1534
20. Starck J, Cohet N, Gonnet C, Sarrazin S, Doubeikovskaia Z, Doubeikovski A, Verger A, Duterque-Coquillaud M, Morle F. (2003) Functional cross-antagonism

- between transcription factors FLI-1 and EKLF. *Mol. Cell. Biol.* **23**, 1390–1402
21. Kumar MS, Narla A, Nonami A, Mullally A, Dimitrova N, Ball B, McAuley JR, Poveromo L, Kutok JL, Galili N, Raza A, Attar E, Gilliland DG, Jacks T, Ebert BL. (2011) Coordinate loss of a microRNA and protein-coding gene cooperate in the pathogenesis of 5q- syndrome. *Blood.* **118**, 4666-4673
22. Ney PA, D'Andrea AD. (2000) Friend erythroleukemia revisited. *Blood.* **96**, 3675–3680
23. Friend C, Scher W, Holland JG, Sato T. (1971) Hemoglobin synthesis in murine virus-induced leukemic cells in vitro: stimulation of erythroid differentiation by dimethyl sulfoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **68**, 378–382
24. Marks PA, Sheffery M, Ramsay R, Ikeda K, Rifkind RA. (1987) Induction of transformed cells to terminal differentiation. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **511**, 246–255
25. Yoshida M, Nomura S, Beppu T. (1987) Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.* **47**, 3688–3691
26. Kaneko-Ishino T, Kume TU, Sasaki H, Obinata M, Oishi M. (1988) Effect of c-myc gene expression on early inducible reactions required for erythroid differentiation in vitro. *Mol. Cell. Biol.* **8**, 5545–5548
27. Todokoro K, Watson RJ, Higo H, Amanuma H, Kuramochi S, Yanagisawa H, Ikawa Y. (1988) Down-regulation of c-myb gene expression is a prerequisite for erythropoietin-induced erythroid differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **85**, 8900–8904
28. Fujita H, Yamamoto M, Yamagami T, Hayashi N, Sassa S. (1991) Erythroleukemia differentiation. Distinctive responses of the erythroid-specific and the nonspecific delta-aminolevulinate synthase mRNA. *J. Biol. Chem.* **266**, 17494–17502
29. Fukuda Y, Fujita H, Garbaczewski L, Sassa S. (1994) Regulation of beta-globin mRNA accumulation by heme in dimethyl sulfoxide (DMSO)-sensitive and DMSO-resistant murine erythroleukemia cells. *Blood.* **83**, 1662–1667
30. Lozzio CB, Lozzio BB. (1975) Human chronic myelogenous leukemia cell-line with positive Philadelphia chromosome. *Blood.* **45**, 321–334

31. Andersson LC, Jokinen M, Gahmberg CG. (1979) Induction of erythroid differentiation in the human leukaemia cell line K562. *Nature*. **278**, 364–365
32. Rutherford T, Clegg JB, Higgs DR, Jones RW, Thompson J, Weatherall DJ. (1981) Embryonic erythroid differentiation in the human leukemic cell line K562. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **78**, 348–352
33. Di Pietro R, di Giacomo V, Caravatta L, Sancilio S, Rana RA, Cataldi A. (2007) Cyclic nucleotide response element binding (CREB) protein activation is involved in K562 erythroleukemia cells differentiation. *J. Cell. Biochem.* **100**, 1070–1079
34. Wojda U, Noel P, Miller JL. (2002) Fetal and adult hemoglobin production during adult erythropoiesis: coordinate expression correlates with cell proliferation. *Blood*. **99**, 3005–3013
35. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. (1995) Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* **270**, 467-470
36. Peng CF, Wei Y, Levsky JM, McDonald TV, Childs G, Kitsis RN. (2002) Microarray analysis of global changes in gene expression during cardiac myocyte differentiation. *Physiol. Genomics* **9**, 145-155
37. Delgado I, Huang X, Jones S, Zhang L, Hatcher R, Gao B, Zhang P. (2003) Dynamic gene expression during the onset of myoblast differentiation in vitro. *Genomics* **82**, 109-121
38. Kuningger D, Kuzmickas R, Peng B, Pintar JE, Rotwein P. (2004) Gene discovery by microarray: identification of novel genes induced during growth factor-mediated muscle cell survival and differentiation. *Genomics* **84**, 876-889
39. Spin JM, Nallamshetty S, Tabibiazar R, Ashley EA, King JY, Chen M, Tsao PS, Quertermous T. (2004) Transcriptional profiling of in vitro smooth muscle cell differentiation identifies specific patterns of gene and pathway activation. *Physiol. Genomics* **19**, 292-302
40. Tomczak KK, Marinescu VD, Ramoni MF, Sanoudou D, Montanaro F, Han M, Kunkel LM, Kohane IS, Beggs AH. (2004) Expression profiling and identification of novel genes involved in myogenic differentiation. *FASEB J.* **18**,

41. Vaes BL, Dechering KJ, Feijen A, Hendriks JM, Lefevre C, Mummery CL, Olijve W, van Zoelen EJ, Steegenga WT. (2002) Comprehensive microarray analysis of bone morphogenetic protein 2-induced osteoblast differentiation resulting in the identification of novel markers for bone development. *J. Bone Miner. Res.* **17**, 2106-2118
42. Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, La Pean A, Pan W, Verfaillie CM. (2003) Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **100**, 3305-3310
43. Korchynskiy O, Dechering KJ, Sijbers AM, Olijve W, ten Dijke P. (2003) Gene array analysis of bone morphogenetic protein type I receptor-induced osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **18**, 1177-1185
44. Bourne S, Polak JM, Hughes SP, Buttery LD. (2004) Osteogenic differentiation of mouse embryonic stem cells: differential gene expression analysis by cDNA microarray and purification of osteoblasts by cadherin-11 magnetically activated cell sorting. *Tissue Eng.* **10**, 796-806
45. de Jong DS, Vaes BL, Dechering KJ, Feijen A, Hendriks JM, Wehrens R, Mummery CL, van Zoelen EJ, Olijve W, Steegenga WT. (2004) Identification of novel regulators associated with early-phase osteoblast differentiation. *J. Bone Miner. Res.* **19**, 947-958
46. Freemantle SJ, Kerley JS, Olsen SL, Gross RH, Spinella MJ. (2002) Developmentally-related candidate retinoic acid target genes regulated early during neuronal differentiation of human embryonal carcinoma. *Oncogene* **21**, 2880-2889
47. Yu DH, Lee KH, Lee JY, Kim S, Shin DM, Kim JH, Lee YS, Lee YS, Oh SK, Moon SY, Lee SH, Lee YS. (2004) Changes of gene expression profiles during neuronal differentiation of central nervous system precursors treated with ascorbic acid. *J. Neurosci. Res.* **78**, 29-37
48. Li A, Zhu X, Brown B, Craft CM. (2003) Gene expression networks underlying retinoic acid-induced differentiation of human retinoblastoma cells. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* **44**, 996-1007

49. Burton GR, Guan Y, Nagarajan R, McGehee RE Jr. (2002) Microarray analysis of gene expression during early adipocyte differentiation. *Gene* **293**, 21-31
50. Burton GR, Nagarajan R, Peterson CA, McGehee RE Jr. (2004) Microarray analysis of differentiation-specific gene expression during 3T3-L1 adipogenesis. *Gene* **329**, 167-185
51. Shim MH, Hoover A, Blake N, Drachman JG, Reems JA. (2004) Gene expression profile of primary human CD34+CD38lo cells differentiating along the megakaryocyte lineage. *Exp. Hematol.* **32**, 638-648
52. Lee MS, Hanspers K, Barker CS, Korn AP, McCune JM. (2004) Gene expression profiles during human CD4+ T cell differentiation. *Int. Immunol.* **16**, 1109-1124
53. Lee KH, Chang MY, Ahn JI, Yu DH, Jung SS, Choi JH, Noh YH, Lee YS, Ahn MJ. (2002) Differential gene expression in retinoic acid-induced differentiation of acute promyelocytic leukemia cells, NB4 and HL-60 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 1125-1133
54. 23. Zheng X, Ravatn R, Lin Y, Shih WC, Rabson A, Strair R, Huberman E, Conney A, Chin KV. (2002) Gene expression of TPA induced differentiation in HL-60 cells by DNA microarray analysis. *Nucleic Acids Res.* **30**, 4489-4499
55. Tanaka TS, Jaradat SA, Lim MK, Kargul GJ, Wang X, Grahovac MJ, Pantano S, Sano Y, Piao Y, Nagaraja R, Doi H, Wood WH 3rd, Becker KG, Ko MS. (2000) Genome-wide expression profiling of mid-gestation placenta and embryo using a 15,000 mouse developmental cDNA microarray. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 9127-9132
56. Kargul GJ, Dudekula DB, Qian Y, Lim MK, Jaradat SA, Tanaka TS, Carter MG, Ko MS. (2001) Verification and initial annotation of the NIA mouse 15K cDNA clone set. *Nat. Genet.* **28**, 17-18
57. VanBuren V, Piao Y, Dudekula DB, Qian Y, Carter MG, Martin PR, Stagg CA, Bassey UC, Aiba K, Hamatani T, Kargul GJ, Luo AG, Kelso J, Hide W, Ko MS. (2002) Assembly, verification, and initial annotation of the NIA mouse 7.4K cDNA clone set. *Genome Res.* **12**, 1999-2003
58. Ikawa Y, Aida M, Inoue Y. (1976) Isolation and characterization of high and low differentiation-inducible Friend leukemia lines. *Gann.* **67**, 767-770

59. Morita S, Kojima T, Kitamura T. (2000) Plat-E: an efficient and stable system for transient packaging of retroviruses. *Gene Ther.* **7**, 1063–1066
60. Nosaka T, Kawashima T, Misawa K, Ikuta K, Mui AL, Kitamura T. (1999) STAT5 as a molecular regulator of proliferation, differentiation and apoptosis in hematopoietic cells. *EMBO J.* **18**, 4754–4765
61. Lachman HM, Skoultchi AI. (1984) Expression of c-myc changes during differentiation of mouse erythroleukaemia cells. *Nature.* **310**, 592-594
62. Takahashi T, Ikeda Y, Tateishi A, Yamaguchi Y, Ishikawa M, Taniguchi N. (2000) A sequence motif involved in the donor substrate binding by alpha1,6-fucosyltransferase: the role of the conserved arginine residues. *Glycobiology.* **10**, 503–510
63. Ihara H, Ikeda Y, Toma S, Wang X, Suzuki T, Gu J, Miyoshi E, Tsukihara T, Honke K, Matsumoto A, Nakagawa A, Taniguchi N. (2007) Crystal structure of mammalian alpha1,6-fucosyltransferase, FUT8. *Glycobiology.* **17**, 455–466
64. Ma B, Simala-Grant JL, Taylor DE. (2006) Fucosylation in prokaryotes and eukaryotes. *Glycobiology.* **16**, 158–184
65. Wang X, Inoue S, Gu J, Miyoshi E, Noda K, Li W, Mizuno-Horikawa Y, Nakano M, Asahi M, Takahashi M, Uozumi N, Ihara S, Lee SH, Ikeda Y, Yamaguchi Y, Aze Y, Tomiyama Y, Fujii J, Suzuki K, Kondo A, Shapiro SD, Lopez-Otin C, Kuwaki T, Okabe M, Honke K, Taniguchi N. (2005) Dysregulation of TGF-beta1 receptor activation leads to abnormal lung development and emphysema-like phenotype in core fucose-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 15791–15796
66. Wang X, Gu J, Ihara H, Miyoshi E, Honke K, Taniguchi N. (2006) Core fucosylation regulates epidermal growth factor receptor-mediated intracellular signaling. *J. Biol. Chem.* **281**, 2572–2577
67. Li W, Ishihara K, Yokota T, Nakagawa T, Koyama N, Jin J, Mizuno-Horikawa Y, Wang X, Miyoshi E, Taniguchi N, Kondo A. (2008) Reduced alpha4beta1 integrin/VCAM-1 interactions lead to impaired pre-B cell repopulation in alpha 1,6-fucosyltransferase deficient mice. *Glycobiology.* **18**, 114–124
68. Burger PE, Dowdle EB, Lukey PT, Wilson EL. (1994) Basic fibroblast growth

- factor antagonizes transforming growth factor beta-mediated erythroid differentiation in K562 cells. *Blood*. **83**, 1808-1812
69. Kaneko K, Furuyama K, Aburatani H, Shibahara S. (2009) Hypoxia induces erythroid-specific 5-aminolevulinate synthase expression in human erythroid cells through transforming growth factor-beta signaling. *FEBS J*. **276**, 1370-1382
70. Gu W, Fukuda T, Isaji T, Hashimoto H, Wang Y, Gu J. (2013) α 1,6-Fucosylation regulates neurite formation via the activin/phospho-Smad2 pathway in PC12 cells: the implicated dual effects of Fut8 for TGF- β /activin-mediated signaling. *FASEB J*. **27**, 3947-3958
71. Dussiot M, Maciel TT, Fricot A, Chartier C, Negre O, Veiga J, Grapton D, Paubelle E, Payen E, Beuzard Y, Leboulch P, Ribeil JA, Arlet JB, Coté F, Courtois G, Ginzburg YZ, Daniel TO, Chopra R, Sung V, Hermine O, Moura IC. (2014) An activin receptor IIA ligand trap corrects ineffective erythropoiesis in β -thalassemia. *Nat Med*. **20**, 398-407
72. Suragani RN, Cadena SM, Cawley SM, Sako D, Mitchell D, Li R, Davies MV, Alexander MJ, Devine M, Loveday KS, Underwood KW, Grinberg AV, Quisel JD, Chopra R, Pearsall RS, Seehra J, Kumar R. Transforming growth factor- β superfamily ligand trap ACE-536 corrects anemia by promoting late-stage erythropoiesis. (2014) *Nat Med*. **20**, 408-414
73. Yamaguchi Y, Ikeda Y, Takahashi T, Ihara H, Tanaka T, Sasho C, Uozumi N, Yanagidani S, Inoue S, Fujii J, Taniguchi N. (2000) Genomic structure and promoter analysis of the human alpha1, 6-fucosyltransferase gene (FUT8). *Glycobiology*. **10**, 637-643
74. Welch JJ, Watts JA, Vakoc CR, Yao Y, Wang H, Hardison RC, Blobel GA, Chodosh LA, Weiss MJ. (2004) Global regulation of erythroid gene expression by transcription factor GATA-1. *Blood*. **104**, 3136-3147
75. Muntean AG, Crispino JD. (2005) Differential requirements for the activation domain and FOG-interaction surface of GATA-1 in megakaryocyte gene expression and development. *Blood*. **106**, 1223-31
76. Ulrich Steidl, Frank Rosenbauer, Roel G W Verhaak, Xuesong Gu, Alexander

Ebralidze, Hasan H Otu, Steffen Klippel, Christian Steidl, Ingmar Bruns, Daniel B Costa, Katharina Wagner, Manuel Aivado, Guido Kobbe, Peter J M Valk, Emmanuelle Passegué, Towia A Libermann, Ruud Delwel and Daniel G Tenen. (2006) Essential role of Jun family transcription factors in PU.1 knockdown-induced leukemic stem cells. *Nature Genetics*. **38**, 1269-1277

77. Bany-Łaszewicz U, Kamińska J, Klimczak-Jajor E, Kościelak J. (2004) The activity of alpha1,6-fucosyltransferase during human megakaryocytic differentiation. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **9**, 145–152