

氏名（本籍）	ささき ひとし 佐々木 仁（千葉県）
学位の種類	博士（工学）
学位記番号	甲第882号
学位授与の日付	平成27年3月20日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	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

論文審査委員 （主査）教授 村上 康文
教授 田代 文夫 教授 西山 千春
准教授 堀戸 重臣 教授 古市 貞一
准教授 秋本 和憲

論文内容の要旨

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を比較した。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ー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イ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*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。

論文審査の結果の要旨

本論文は、赤血球分化の分子機構に関する知見をまとめたものである。以下に各章の要旨を示す。

【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。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調節されている。

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が、申請者はゲノム科学的手法によりこの課題に挑戦した。

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。一方、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。

本研究においては、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を示された 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対する機能解析を行った。

【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

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ーであるヘモグロビン遺伝子が強く誘導されていた。

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

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。

3) *Fut8* 発現は MEL 細胞の分化において抑制されている

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。

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* / 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。

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* 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。

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、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。

7) FUT8 の過剰発現は、ヒト 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 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。

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。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。

【結論】

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。

本論文は上記の成果をまとめたものである。これらの成果は、独創性の高いものであり、赤血球の分化過程における FUT8 の重要性を世界で初めて体系的に示したものである。したがって、本論文は、博士(工学)の学位論文として十分価値あるものと審査委員会は判断した。