エリスロポエチンの組織特異的発現調節の発見と応用生化学的研究[†]

(2001 年度農芸化学奨励賞受賞)

増 田 誠 司

(京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻)

Key words: erythropoietin; tissue-specific regulation; low oxygen tension

酸素はミトコンドリアによる ATP 産生に必須である。脳や心筋の機能はミトコンドリアによる ATP 産生に依存し、このような組織の機能に依存して生命を維持する動物にとっては、酸素供給の低下は直ちに生命を重大な危機にさらすことになる。酸素供給はわれわれの生命の維持に直接かかわる過程であり、酸素供給を支配する赤血球造血過程とその産生制御に関する研究は、重要課題として取り上げられてきた。その結果、赤血球造血の主要な制御因子はエリスロポエチン (Epo) であり、腎臓で生合成され、その合成は酸素により制御されていることが示された。酸素供給の低下を感知すると、Epo 遺伝子の転写が活性化される。Epo のノックアウトマウスは赤血球形成不全により胎生 14 日あたりで死亡する。したがって Epo は赤血球の産生量を制御する必須の因子である。このように Epo は赤血球造血系にのみ作用するのであって、他の組織の機能にはほとんど関係していないと考えられてきた。すなわち赤血球造血系における Epo の機能があまりにも鮮やかであったために、他の組織に生理作用があるとは考えられていなかった。筆者は、新たに脳・子宮・卵管に Epo 生合成部位を見いだすとともに、これらの部位における Epo の新しい生理機能を解析し、組織特異的な Epo 遺伝子発現制御を発見した。また Epo 遺伝子が低酸素に応答するメカニズムを利用して、低酸素に応答して目的有用タンパク質生産を行う発現ベクターを構築し、新規の動物細胞発原系の開発を行った。これらの研究成果を中心に概説する。

1. エリスロポエチンの生合成の制御と生理機能

(1) 腎臓

赤血球の形成量は、Epo によって支配されている。Epo の存在は約 100 年前から推定されていたが、体内の存在量が極めて微量のために、Epo cDNA がクローニング精製されたのは 1985 年のことである^(1~3)。その後、1989 年に Epo 受容体がクローニングされ⁽⁴⁾、Epo およびその受容体の分子細胞学的解析が本格化した。Epo は胎児では肝臓、成体では腎臓で生合成され、エンドクライン様式にて血流中を運ばれ、骨髓に存在する赤血球前駆細胞に作用して赤血球の分化・増殖を促進する^(5~13)。腎臓における Epo 産生細胞は、近位尿管近傍にある間質細胞であるとされている⁽¹⁴⁾。腎臓における Epo 産生細胞が疾患により死んでしまう腎性貧血の患者に組換え型 Epo を投与すると劇的に効果がある。Epo の発現は、食餌タンパク質やレチノイン酸によっても調節されているが^(15~17)、主要な制御因子は酸素である。すなわち、高地に登ったり、出血などによって末梢への酸素供給が低下すると、腎臓の Epo 産生細胞がこれを感じて Epo の発現を誘導する。低酸素による Epo の誘導は、転写の促進ならびに mRNA の安定化の相乗的な効果である⁽¹⁸⁾ (図 1)。このうち mRNA の安定化については、知見に乏しく研究が進展していなかったが、p38α のノックアウトマウスが、Epo の mRNA の安定化の制御不全によって胎生致死になることが報告され⁽¹⁹⁾、その重要性が確定している。

一方、転写の促進のメカニズムは詳しく解析されている^(20, 21) (図 2)。腎臓由来の細胞ではないが、ヒト肝ガン由来の Hep3B 細胞は酸素濃度に応じて Epo を生産する。この細胞を用いて低酸素に応答するメカニズムが解析された。その結果、Epo 遺伝子の 3' 側に低酸素に応答する領域 (低酸素エンハンサー) が存在す

[†] Discovery of Tissue-specific Regulation of Erythropoietin Expression and Applied Biochemical Study
Seiji MASUDA (Division of Integrated Life Science,
Graduate School of Biostudies, Kyoto University)

図1 低酸素による Epo 遺伝子発現の促進のメカニズム

図2 酸素による Epo 遺伝子の転写の促進のメカニズム

ることが判明した。この領域は三つの重要な部分からなっている。最も5'側は転写因子 Hypoxia-Inducible Factor-1 (HIF-1) 結合領域である^(22~24)。後にも述べるが HIF-1 は、Epo 遺伝子に限らず、低酸素によって遺伝子発現が促進される遺伝子群の応答に普遍的かつ中心的な役割をする重要な因子である^(25~28)。HIF-1 は、HIF-1 α と HIF-1 β の二つのサブユニットから形成されている⁽²⁹⁾。HIF-1 β は、Aryl Hydrocarbon Nuclear Translocator (ARNT) と同じであり、酸素濃度に関係なく発現している。一方、HIF-1 α は、酸素濃度によってタンパク質のレベルで発現が制御されている⁽³⁰⁾。低酸素圧では、HIF-1 α は安定化され、HIF-1 β と会合して低酸素応答遺伝子の

転写を促進する。一方常酸素圧では、速やかにユビキチン化されてプロテアソームで分解を受ける⁽³¹⁾。HIF-1 α のユビキチン化には von Hippel Lindau protein (VHL) が関わっている^(32,33)。また、HIF-1 α の中心部に酸素濃度感知領域が存在し⁽³⁴⁾、そのなかのプロリン残基のヒドロキシル化がユビキチン付加の制御を行っている^(35~37)。現在、このプロリン残基のヒドロキシル化酵素が、細胞の酸素センサーの正体ではないかと考えられている。Epo 遺伝子の低酸素による応答に HIF-1 は必須であるが、それだけでは十分ではなく第2の領域が必要である⁽³⁸⁾。この領域に結合する因子は同定されていないが、この領域に変異を入れると低酸素応答性が失われることから必須の領域である。3'側には Hepatocyte Nuclear Factor 4 (HNF-4) 結合領域が存在する⁽³⁹⁾。HNF-4 はステロイドホルモン受容体スーパーファミリーに属する転写因子であり、主として肝臓で発現する。HNF-4 は、それ自体で低酸素応答性に必要な因子ではないが、HIF-1 を介した遺伝子発現を増幅する機能をもつ。胎児期の Epo 生合成は肝臓で行われるので、HNF-4 は胎児の肝臓での Epo の生合成に必須であると考えられている。一方、腎臓において HNF-4 の存在が低酸素応答に必要であるかについては証明されていない。しかし、HNF-4 の発現が肝臓および腎臓に局在しており、Epo の発現部位とも一致することから、腎臓における Epo の発現にも重要な機能をもつ可能性が指摘されている。

(2) 脳

Epo の作用を仲介するレセプターは、赤血球系の細胞にしか発現しないと考えられてきた。しかし、新たに中枢神経系において Epo が生理機能をもつことを示した^(40~42)。すなわち、放射性同位元素で標識した Epo が、神経細胞のモデル細胞として用いられている PC12 細胞や神経細胞腫の SN6 細胞に特異的に結合すること、血球細胞系で発現しているのと同じ Epo 受容体 mRNA が PC12 細胞でも発現していること、免疫沈降実験にて Epo 受容体が検出されること、Epo を添加すると細胞内 Ca 濃度が一過性に上昇し、細胞内のモノアミン含量が増加することから機能的な Epo 受容体が発現していることを見いだした⁽⁴³⁾。さらに脳の切片を用いた染色により海馬や大脳皮質に Epo 受容体の存在を明らかにした^(44,45)。また海外の研究室からも、脳における Epo の結合領域を解析し、

図3 虚血による海馬CA1領域の神経細胞死

A: 砂ネズミに可溶性Epo受容体を脳側室内に連続投与しながら虚血(2.5分間)処理を行った後、7日目の海馬神経細胞死をTUNEL染色で検出。B: 可溶性Epo受容体の代わりに生理食塩水を投与したコントロール。C: 投与した可溶性Epo受容体の濃度と細胞死を起こした神経細胞の数の関係。可溶性Epo受容体を脳室内投与すると緩やかな虚血でも神経細胞死が生じる。

われわれの結果を支持する結果が報告されている⁽⁴⁶⁾。腎臓で生産されるEpoは血流を介して赤血球前駆細胞に作用するが、脳には毛細血管内皮細胞を中心として血液脳関門が存在し、血流中の物質を選択的に脳実質内に取り込んでいる。したがって、血液中のEpoが流入する可能性は極めて低いと考えられた。そこで、脳実質内でEpo産生細胞を検索したところ、グリア細胞の1種のアストロサイトがEpoを産生することを見いだした^(47, 48)。アストロサイトによるEpoの生産は、腎臓と同じく低酸素によって誘導される。また、インスリンやInsulin like Growth Factor 1, 2によってもEpoの発現は促進される⁽⁴⁹⁾。最近、神経細胞でもEpoの生合成が行われ酸素濃度に応じてEpoが発現するとの報告もある⁽⁵⁰⁾。したがって、Epoは脳内で

は、パラクラインあるいはオートクライン様式で作用していると考えられる。

中枢神経系を構成する神経細胞のうち海馬CA1や大脳皮質の一部の神経細胞は、虚血に対して非常に脆弱である。これらの神経細胞は10分の虚血により容易に遅発性の神経細胞死を起こして死滅する⁽⁵¹⁾。特に海馬は記憶にとって重要な働きをする部位であるので、CA1領域の神経細胞が死ぬと学習記憶が低下する。これは受動的回避実験や迷路実験などを通して定量的に解析することができる。Epoが低酸素によって誘導されることから中枢神経系における生理機能は虚血性の神経細胞死の防止ではないかと仮説を立て、砂ネズミを用いてEpoの効果を解析した。あらかじめEpoを脳質内にミニポンプを用いて注入しておく、海馬CA1神経細胞が半分程度死滅する虚血(3分)を付加した場合でも、神経細胞死は起こらず、また学習記憶も低下しなかった⁽⁵²⁾。すなわちEpoは虚血に伴う神経細胞死を防止することができることを示した。さらに、脳内のEpoが生理的に機能しているとすれば、その機能を阻害すれば神経細胞死が起こりやすくなるはずである。そこでEpoと結合しEpoの機能を阻害する可溶性Epo受容体⁽⁵³⁾を脳質内に注入した。すると神経細胞死が起こらないマイルドな虚血(2.5分)でも神経細胞死が起きた⁽⁵²⁾(図3)。すなわち、生理的に脳内に存在するEpoが神経細胞死の防止に機能していることを証明した。筆者らの成果を受けて^(52, 54)、昨年から今年にかけてEpoの神経細胞死防止に関する論文が幾つかのグループによって報告された⁽⁵⁵⁻⁵⁹⁾。いずれも虚血における神経細胞死をEpoが防止できることを報告している。その中で、Epoを筆者らのように脳質内に投与するのではなく静脈投与している点が注目される。また、Epoを非常に高濃度投与(5000 U/kg)すると脳内毛細血管を通じてEpoが脳実質内に移行することを示している⁽⁵⁶⁾。正常な血中Epo濃度は10~20 mU/mLであるので、この結果から直ちにEpoが、生理的に毛細血管を介して実質内に移行できることを示すものではない。しかし、Epoの静脈内投与によって、虚血による神経細胞死を軽減することができるという知見は、臨床において重要な発見である。現在は動物での研究段階であるが、今後ヒトへの臨床応用を目指してよりいっそうの進展が望まれる。

図4 NO 発生剤による神経細胞死のEpo による保護
Glu: グルタミン酸, SNP: NO 発生剤, Me-TC:
NO 合成酵素阻害剤

Epo の神経細胞死の防止のメカニズムを解析するためには、*in vitro* でEpo の機能を観察することが効果的である。胎児海馬神経細胞を1週間ほど培養するとNMDA型のグルタミン酸受容体を発現し、グルタミン酸に対して感受性をもつようになる^(60, 61)。グルタミン酸は、中枢神経系では興奮性の神経伝達物質として用いられているが、虚血になるといったん放出されたグルタミン酸の回収ができなくなりいつまでも神経細胞を刺激し続ける。この結果、神経細胞は興奮し続け、細胞内一酸化窒素(NO)の増加に伴うラジカル反応によって細胞死を迎えると考えられている。このように初代培養海馬神経細胞は、虚血による神経細胞死のモデルとして重用されている。この系にEpoを添加するとグルタミン酸による細胞死を保護できる^(45, 62)。グルタミン酸の代わりにNO発生剤を添加しても神経細胞死は生じる⁽⁵²⁾。すなわちグルタミン酸による神経細胞死はNO毒性を介している。このときEpoを添加しておくとNO発生剤による神経細胞死を防止することができる(図4)。したがってEpoによるグルタミン酸による神経細胞死防止活性は、NO毒性を解除することであることがわかった。Epoの神経細胞死を防止できるメカニズムを解析できれば、より効果的な虚血による神経細胞死の治療法の開発が期待される。

(3) 雌性生殖器官

血管内皮細胞は、血液細胞と同じ幹細胞から分化と

表1 可溶型Epo受容体の投与による子宮内膜層の発達阻害

	注 入		
	生理食塩水	可溶型Epo受容体	可溶型Epo受容体(変性済)
領域比 (内膜層/筋層)	2.03±0.13	1.35±0.24*	1.81±0.45
相対比	1	0.66	0.89

* $p < 0.05$

増殖を経て成熟細胞へと至る。したがって内皮細胞と血液細胞には多くの共通抗原を発現している⁽⁶³⁾。Epo受容体は、血管内皮細胞にも発現していることが報告されていたが、共通の幹細胞より由来したことによるのか、それともより積極的な生理的意義をもつのかについては不明であった。血管内皮細胞の増殖が起こる生理的な状態は、雌性生殖器官の再生や胎児の発生・発達段階である⁽⁶⁴⁾。そこで子宮血管新生の過程を追跡してEpoの血管新生における生理的意義に着手した。性周期の間期に可溶型Epo受容体を投与しEpoの機能を阻害すると、発情期における子宮内膜層の肥厚が阻害された⁽⁶⁵⁾(表1)。このとき血管内皮細胞は増加していなかった。性周期の移行に伴う子宮内膜層の増殖は、卵巣から分泌される女性ホルモンのエストロゲンが支配している。そこで卵巣摘出マウスを作製し、エストロゲンを枯渇させたマウスにEpoを投与すると、エストロゲンを投与した場合と同様に、血管形成や子宮内膜の肥厚が観察された。しかし血管形成や子宮内膜の肥厚の程度は十分にみられるものの、エストロゲンに比べると少し弱いものであった⁽⁶⁵⁾。この原因について解析した結果、後述するようにEpoは、エストロゲンの下流に位置し、エストロゲンの作用をほかに因子と共同して仲介し、血管形成を介して子宮内膜層の肥厚に寄与するという生理機能をもつことを示した。

血管形成に作用するEpoの由来について、腎臓で生合成され血流中を流れているEpoによるとは考えにくい。なぜならば、血管内皮細胞に発現しているEpo受容体のEpoに対する親和力は赤血球前駆細胞に発現しているEpo受容体⁽⁶⁶⁾に比べて約100倍低いからである⁽⁶⁷⁾。したがって血流中のEpo濃度では血管内皮細胞のEpo受容体を活性化することは困難である。また、前述のようにEpoの効果は、性周期を支

配するエストロゲンには及ばない。したがって子宮内にエストロゲン依存性の Epo 生合成部位があり、エストロゲンの刺激に応じて Epo が子宮組織で生合成されると考えた。そこでこの仮説を証明するために卵巣摘出マウスを用いた。卵巣摘出マウスにエストロゲンを投与すると一過性の Epo の生合成が観察された⁽⁶⁵⁾。これより子宮において血管形成に作用する Epo は子宮組織内で生合成され、その発現はエストロゲンによって誘導されることを証明した。卵巣や子宮ガンのヌードマウスへの移植実験において、可溶型受容体や抗 Epo 抗体を添加して Epo のシグナルを阻害すると、これらのガン細胞の増殖を阻害できる⁽⁶⁸⁾。今後の進展が期待される。

子宮以外にも、卵管で Epo の発現を見いだしており、その発現はエストロゲンで誘導される⁽⁶⁹⁾。生理機能については今後の課題であるが、Epo で処理した精子は、しない精子に比べて受精能が上がると報告されていること⁽⁷⁰⁾、卵管は受精の場所であることから、卵管における Epo の生理機能が、卵と精子の受精能を制御する可能性がある。

2. Epo の組織特異的発現調節

Epo は、腎臓、脳、子宮、卵管において発現しており、その発現の制御は組織によって異なっていることを述べてきた。そこで、個体内での経時的な Epo 遺伝子の発現の変化や複数の刺激の共同作用について解析を進めた。卵巣摘出マウスを作製し、このマウスを常酸素 21% 酸素圧で飼育するコントロール群、7% の低酸素暴露群、エストロゲン投与群、両刺激群の四つに分けた。なお 7% 酸素圧は、だいたいエベレストの頂上での酸素分圧と同じである。マウスより各組織を経時的に取り出して、Epo mRNA の発現量を測定した。動物を低酸素に暴露すると、腎および脳の Epo 遺伝子発現は著しく (30 倍) 誘導された⁽⁷¹⁾ (図 6A, B)。ところが、腎 Epo mRNA は低酸素が持続していても 8 時間以内に低下したが、脳 Epo mRNA は低酸素環境下である限り高レベルが維持されることを発見した。この組織特異的発現制御の違いは各組織で生産される Epo の機能を良く反映する。すなわち、赤血球の過剰生産は、多血を招き生体にとって有害であるので腎 Epo 遺伝子発現にはフィードバック調節が作動するが、脳では神経細胞死を防止するために低酸素状態が続く限り Epo の高生産が持続されると考えられた。

1) E₂投与・21%O₂群, 2) 7%O₂群, 3) E₂投与・7%O₂群

図5 低酸素およびエストロゲンの Epo mRNA 発現に及ぼす効果を調べた実験の模式図

図6 Epo mRNA の発現における低酸素 (○) とエストロゲン (■) および両刺激 (●) の効果

A: 腎臓, B: 大脳, C: 子宮, D: 卵管における Epo mRNA の発現の時間経過。各組織の常酸素圧時の Epo mRNA 量を 1 とした

表2 Epo の組織特異的発現の制御と生理機能

生合成部位	生合成の刺激		生理機能
	低酸素	エストロゲン	
腎臓	+++ (一過性)	—	赤血球形成
脳	+++ (持続性)	—	神経細胞死保護
子宮	+ ^a	+++ (一過性)	血管形成
卵管	++ (一過性)	++ (一過性)	?

^a エストロゲンの存在化

ついで子宮における Epo 発現の制御について解析した。その結果、腎臓や脳での Epo の発現は低酸素で顕著に誘導されるにもかかわらず、子宮における Epo の発現は全く誘導されなかった。一方、エストロゲンを投与すると一過性に Epo の発現が強く誘導された⁽⁷¹⁾ (図 6C)。またエストロゲンと低酸素刺激を組み

合わせると Epo の誘導が増強された (図 6D)。一方、卵管においては、Epo は低酸素単独刺激においても一過性に誘導された⁽⁶⁹⁾。また、エストロゲン添加でも誘導され、さらに両刺激では相乗的な効果がみられた。このように、子宮内膜系や卵管の Epo の発現誘導は、造血系および神経系とは全く異なる制御を受けていることを示した (表 2)。また子宮や卵管における Epo 発現は、腎臓で生産される Epo に比べて微量であり、子宮や卵管で性周期に伴って生産される Epo が赤血球の生産に影響しないよう発現量が制御されていた。

3. 低酸素エンハンサーを利用した動物細胞による有用タンパク質生産系の開発

エリスロポエチン (Epo) 遺伝子は低酸素により発現が著しく誘導される代表的な遺伝子であり、Epo 遺伝子を用いて最初に低酸素に应答するメカニズムが明らかにされた。低酸素刺激によって発現の誘導される遺伝子は Epo のほかにも多く存在し、解糖系酵素の幾つかも低酸素に应答する。したがって酸素に対する遺伝子発現の誘導というすべての細胞がもつ基本的細胞応答を利用すれば、新たな有用物質生産系を開発することができる。

動物細胞によるタンパク質生産系の大きな問題点の一つは酸素供給である。他の栄養素は比較的簡単に添加できるが、酸素は溶解性が低いため連続的に供給する必要がある。動物細胞は攪拌などせん断力に対して脆弱であり、多くの改良がなされたとはいえ酸素供給は常に細胞損傷を伴うという問題が生じる。そこで低酸素により発現が誘導される遺伝子の発現制御を利用したタンパク質発現系を考案した。まず Epo の低酸素エンハンサーと種々のプロモーターとを組み合わせて、低酸素状態での遺伝子発現誘導を検討した。サイトメガロウイルス (CMV) やタンパク質合成伸長因子 (EF-1) などの遺伝子のプロモーターと組み合わせても、エンハンサーは機能した^(72, 73)。しかし、誘導率という点においては、さらに改良の余地があると考えた。

解糖系の乳酸脱水素酵素 A (LDHA) は低酸素に应答する遺伝子であり、プロモーターの上流に存在する負の制御領域を除去すると活性が非常に高い。そこで LDHA のプロモーターとエンハンサーを利用した発現系を構築した⁽⁷⁴⁾ (図 7)。モデルタンパク質には糖鎖の修飾が必須であり、有用タンパク質として医薬品に

図 7 マウス LDHA プロモーターと低酸素エンハンサーの塩基配列および使用した発現ベクターの模式図

図 8 安定 Epo 発現細胞の低酸素圧培養による Epo 生産量の増加

A: 野生型ベクター; (○, ●) WT-3, (△, ▲) WT-12, (□, ■) WT-29. B: 変異型ベクター; (○, ●) MT-34, (△, ▲) MT-42. 白抜きは常酸素圧, 黒塗りは 2% 酸素圧で培養した細胞の培養上清の Epo 生産量を示す。

図 9 Epo の生物活性の比較

21% 酸素圧で培養した細胞より精製した Epo の活性 (○, ●), 2% 酸素圧より精製した Epo の活性 (□, ■). (●, ■): 抗 Epo 抗体を処理した場合

使用されている Epo を用いた⁽⁷⁵⁾。CHO 細胞に一過性に遺伝子を導入 Epo の生合成量を比較した。その結果、この発現系は、常酸素圧での発現量が十分高いだけでなく低酸素にすると発現量が 10 倍に増加することが判明した。転写因子 HIF-1 結合部位に変異を導入した変異型ベクターは、低酸素応答性を示さなかった。ついで Epo 安定発現細胞を取得し、常酸素および

低酸素で生産した Epo の生物活性, 分子量, 糖鎖の付加について解析した. その結果, 低酸素で培養すると Epo の生産量が約 8~10 倍に増加した (図 8). ついで生産された Epo の品質の評価を行い, 低酸素応答エンハンサーを用いた生産系の有効性を証明した. その結果, 低酸素で生産した Epo の *in vitro* および *in vivo* の生物活性 (図 9), 分子量について相違はみられなかった. また Epo タンパク質には 3 カ所の N 結合型糖鎖が存在するが, 糖の組成ならびに糖鎖の多様性に相違はみられなかった. このことより, 低酸素で生合成した Epo は, 上酸素圧で生産した Epo と同等の生物活性をもつことを証明し, 低酸素に应答して有用タンパク質を生産させる方法論が, 有効であることを示した.

本研究は, 京都大学農学部食品工学食品化学講座, 京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻生体情報応答学分野ならびに京都大学大学院生命科学研究科統合生命科学専攻分子応答機構学分野において行われた. ご指導を賜りました佐々木隆造教授をはじめ, 研究に協力いただいたスタッフの方々および卒業生の皆様に感謝いたします. また, 本研究は, 安田佳子先生 (近畿大学), 阪中雅弘先生 (愛媛大学) 上田正次博士 (ワイエスニューテクノロジー研究所), 成田宏史先生 (京都女子大学), 白井義人先生 (九州工業大学), 高畑京也先生 (岡山大学), 小西吉裕先生 (愛媛大学), 津田英資博士 (雪印乳業), 宮村 毅氏 (宝酒造), 土屋輝昌先生 (東京医科歯科大学) のご協力により行われたものであり, ここに深謝の意を表します.

- (1) 佐々木隆造, 増田誠司: エリスロポエチン, 広川タンパク質科学, 第 8 巻, 成長因子 II (林 恭三, 古川昭栄, 編), 広川書店, 1993, pp. 175-182.
- (2) K. Jacobs, C. Shoemaker, R. Rudersdorf, S. D. Neill, R. J. Kaufman, A. Mufson, J. Seehra, S. S. Jones, R. Hewick, E. F. Fritsch, M. Kawakita, T. Shimizu, and T. Miyake: *Nature*, **313**, 806-810 (1985).
- (3) F. K. Lin, S. Suggs, C. H. Lin, J. K. Browne, R. Smalling, J. C. Egrie, K. K. Chen, G. M. Fox, F. Martin, Z. Stabinsky, S. Badrawi, P. H. Lai, and E. Goldwasser: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **82**, 7580-7584 (1985).
- (4) A. D. D'Andrea, H. F. Lodish, and G. G. Wong: *Cell*, **57**, 277-285 (1989).
- (5) 増田誠司, 佐々木隆造: 栄養と健康のライフサイエンス, **4**, 17-22 (1999).
- (6) W. Jelkmann: *Physiol. Rev.*, **72**, 449-489 (1992).
- (7) J. W. Fisher: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **216**, 358-369 (1997).
- (8) K. M. Moritz, G. B. Lim, and E. M. Wintour: *Am. J. Physiol.*, **273**, R1829-R1844 (1997).
- (9) B. L. Ebert and H. F. Bunn: *Blood*, **94**, 1864-1877 (1999).
- (10) H. F. Bunn, J. Gu, L. E. Huang, J. W. Park, and H. Zhu: *J. Exp. Biol.*, **201**, 1197-1201 (1998).
- (11) S. Masuda, M. Nagao, and R. Sasaki: *Int. J. Hematol.*, **70**, 1-6 (1999).
- (12) R. Sasaki, S. Masuda, and M. Nagao: *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **64**, 1775-1793 (2000).
- (13) R. Sasaki, S. Masuda, and M. Nagao: *News Physiol. Sci.*, **16**, 110-113 (2001).
- (14) S. Bachmann, M. Le Hir, and K. U. Eckardt: *J. Histochem. Cytochem.*, **41**, 335-341 (1993).
- (15) M. Okano, H. Ohnota, and R. Sasaki: *J. Nutr.*, **122**, 1376-1383 (1992).
- (16) M. Okano, S. Masuda, H. Narita, S. Masushige, S. Kato, S. Imagawa, and R. Sasaki: *FEBS Lett.*, **349**, 229-233 (1994).
- (17) K. Fujisawa, K. Yagasaki, R. Funabiki, S. Masuda, and R. Sasaki: *Nutr. Res.*, **20**, 685-693 (2000).
- (18) M. A. Goldberg, C. C. Gaut, and H. F. Bunn: *Blood*, **77**, 271-277 (1991).
- (19) K. Tamura, T. Sudo, U. Senftleben, A. M. Dadak, R. Johnson, and M. Karin: *Cell*, **102**, 221-231 (2000).
- (20) 永尾雅哉, 増田誠司, 神戸大朋, 佐々木隆造: 蛋白質・核酸・酵素, **41**, 2522-2531 (1996).
- (21) 増田誠司, 佐々木隆造: *BIO Clinica*, **13**, 1169-1173 (1998).
- (22) A. Madan and P. T. Curtin: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 3928-3932 (1993).
- (23) G. L. Wang and G. L. Semenza: *J. Biol. Chem.*, **270**, 1230-1237 (1995).
- (24) G. L. Wang and G. L. Semenza: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 4304-4308 (1993).
- (25) H. Zhu and H. F. Bunn: *Respir. Physiol.*, **115**, 239-247 (1999).
- (26) G. L. Semenza: *J. Appl. Physiol.*, **88**, 1474-1480 (2000).
- (27) G. L. Semenza: *Pediatr. Res.*, **49**, 614-617 (2001).
- (28) G. L. Semenza: *Curr. Opin. Cell. Biol.*, **13**, 167-171 (2001).
- (29) G. L. Wang, B. H. Jiang, E. A. Rue and G. L. Semenza: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 5510-5514 (1995).
- (30) L. E. Huang, Z. Arany, D. M. Livingston, and H. F. Bunn: *J. Biol. Chem.*, **271**, 32253-32259 (1996).
- (31) S. Salceda and J. Caro: *J. Biol. Chem.*, **272**, 22642-22647 (1997).
- (32) P. H. Maxwell, M. S. Wiesener, G. W. Chang, S. C. Clifford, E. C. Vaux, M. E. Cockman, C. C. Wykoff,

- C. W. Pugh, E. R. Maher, and P. J. Ratcliffe: *Nature*, **399**, 271-275 (1999).
- (33) M. Ohh, C. W. Park, M. Ivan, M. A. Hoffman, T. Y. Kim, L. E. Huang, N. Pavletich, V. Chau, and W. G. Kaelin: *Nat. Cell. Biol.*, **2**, 423-427 (2000).
- (34) L. E. Huang, J. Gu, M. Schau, and H. F. Bunn: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 7987-7992 (1998).
- (35) H. Zhu and H. F. Bunn: *Science*, **292**, 449-451 (2001).
- (36) M. Ivan, K. Kondo, H. Yang, W. Kim, J. Valiando, M. Ohh, A. Salic, J. M. Asara, W. S. Lane, and W. G. Kaelin, Jr.: *Science*, **292**, 464-468 (2001).
- (37) P. Jaakkola, D. R. Mole, Y. M. Tian, M. I. Wilson, J. Gielbert, S. J. Gaskell, A. Kriegsheim, H. F. Hebestreit, M. Mukherji, C. J. Schofield, P. H. Maxwell, C. W. Pugh, and P. J. Ratcliffe: *Science*, **292**, 468-472 (2001).
- (38) G. L. Semenza and G. L. Wang: *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5447-5454 (1992).
- (39) K. L. Blanchard, A. M. Acquaviva, D. L. Galson, and H. F. Bunn: *Mol. Cell. Biol.*, **12**, 5373-5385 (1992).
- (40) 増田誠司, 永尾雅哉, 佐々木隆造: 化学と生物, **33**, 437-446 (1995).
- (41) M. Nagao, S. Masuda, and R. Sasaki: *Cytotechnology*, **18**, 83-91 (1995).
- (42) 増田誠司, 佐々木隆造: 血液フロンティア, **9**, 64-67 (1999).
- (43) S. Masuda, M. Nagao, K. Takahata, Y. Konishi, F. J. Gallyas, T. Tabira, and R. Sasaki: *J. Biol. Chem.*, **268**, 11208-11216 (1993).
- (44) E. Morishita, H. Narita, M. Nishida, N. Kawashima, K. Yamagishi, S. Masuda, M. Nagao, H. Hatta, and R. Sasaki: *Blood*, **88**, 465-471 (1996).
- (45) E. Morishita, S. Masuda, M. Nagao, Y. Yasuda, and R. Sasaki: *Neuroscience*, **76**, 105-116 (1997).
- (46) M. Digicaylioglu, S. Bichet, H. H. Marti, R. H. Wenger, L. A. Rivas, C. Bauer, and M. Gassmann: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **92**, 3717-3720 (1995).
- (47) S. Masuda, M. Okano, K. Yamagishi, M. Nagao, M. Ueda, and R. Sasaki: *J. Biol. Chem.*, **269**, 19488-19493 (1994).
- (48) H. H. Marti, R. H. Wenger, L. A. Rivas, U. Straumann, M. Digicaylioglu, V. Henn, Y. Yonekawa, C. Bauer, and M. Gassmann: *Eur. J. Neurosci.*, **8**, 666-676 (1996).
- (49) S. Masuda, M. Chikuma, and R. Sasaki: *Brain. Res.*, **746**, 63-70 (1997).
- (50) M. Bernaudin, A. Bellail, H. H. Marti, A. Yvon, D. Vivien, I. Duchatelle, E. T. Mackenzie, and E. Petit: *Glia*, **30**, 271-278 (2000).
- (51) T. Kirino: *Brain Res.*, **239**, 57-69 (1982).
- (52) M. Sakanaka, W. T. C., S. Matsuda, S. Morishita, E., Nagao, M., and R. Sasaki: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 4635-4640 (1998).
- (53) M. Nagao, S. Masuda, S. Abe, M. Ueda, and R. Sasaki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **188**, 888-897 (1992).
- (54) Y. Sadamoto, K. Igase, M. Sakanaka, K. Sato, H. Otsuka, S. Sakaki, S. Masuda, and R. Sasaki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 26-32 (1998).
- (55) C. Alafaci, F. Salpietro, G. Grasso, A. Sfacteria, M. Passalacqua, A. Morabito, E. Tripodo, G. Calapai, M. Buemi, and F. Tomasello: *Eur. J. Pharmacol.*, **406**, 219-225 (2000).
- (56) M. L. Brines, P. Ghezzi, S. Keenan, D. de Agnello N. C. Lanerolle, C. Cerami, L. M. Itri, and A. Cerami: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **97**, 10526-10531 (2000).
- (57) M. Buemi, G. Grasso, F. Corica, G. Calapai, F. M. Salpietro, T. Casuscelli, A. Sfacteria, C. Aloisi, C. Alafaci, A. Sturiale, N. Frisina, and F. Tomasello: *Eur. J. Pharmacol.*, **392**, 31-34 (2000).
- (58) G. Calapai, M. C. Marciano, F. Corica, A. Allegra, A. Parisi, N. Frisina, A. P. Caputi, and M. Buemi: *Eur. J. Pharmacol.*, **401**, 349-356 (2000).
- (59) A. L. Siren, M. Fratelli, M. Brines, C. Goemans, S. Casagrande, P. Lewczuk, S. Keenan, C. Gleiter, C. Pasquali, A. Capobianco, T. Mennini, R. Heumann, A. Cerami, H. Ehrenreich, and P. Ghezzi: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **98**, 4044-4049 (2001).
- (60) D. W. Choi: *Neuron*, **1**, 623-634 (1988).
- (61) D. W. Choi and S. M. Rothman: *Annu. Rev. Neurosci.*, **13**, 171-182 (1990).
- (62) S. Masuda, E. Kada, M. Nagao, and R. Sasaki: *Cytotechnology*, **31**, 207-213 (1999).
- (63) A. Bikfalvi and Z. C. Han: *Leukemia*, **8**, 523-529 (1994).
- (64) D. Hanahan and J. Folkman: *Cell*, **86**, 353-364 (1996).
- (65) Y. Yasuda, S. Masuda, M. Chikuma, K. Inoue, M. Nagao, and R. Sasaki: *J. Biol. Chem.*, **273**, 25381-25387 (1998).
- (66) 増田誠司, 佐々木隆造: 生化学, **63**, 28-32 (1991).
- (67) A. Anagnostou, E. S. Lee, N. Kessimian, R. Levinson, and M. Steiner: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **87**, 5978-5982 (1990).
- (68) Y. Yasuda, T. Musha, H. Tanaka, Y. Fujita, H. Fujita, H. Utsumi, T. Matsuo, S. Masuda, M. Nagao, R. Sasaki, and Y. Nakamura: *Br. J. Cancer*, **84**, 836-843 (2001).
- (69) S. Masuda, T. Kobayashi, M. Chikuma, M. Nagao, and R. Sasaki: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **278**, E1038-E1044 (2000).
- (70) Y. Yamamoto, N. Sofkitis, and I. Miyagawa: *Andrologia*, **29**, 141-144 (1997).
- (71) M. Chikuma, S. Masuda, T. Kobayashi, M. Nagao,

- and R. Sasaki: *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **279**, E1242-E1248 (2000).
- (72) S.-K. Moon, S. Takeuchi, S. Kambe, T. Tsuchiya, S. Masuda, M. Nagao, and R. Sasaki: *Cytotechnology*, **25**, 79-88 (1997).
- (73) Y. Shirai, M. Inagaki, M. Yamaguchi, T. Kambe, S. Masuda, and R. Sasaki: *Cytotechnology*, **25**, 71-77 (1997).
- (74) S. Masuda, S. K. Moon, T. Kambe, M. Nagao, and R. Sasaki: *Biotechnol. Bioeng.*, **67**, 157-164 (2000).
- (75) S. Masuda and R. Sasaki: "Erythropoien," in "The Encyclopedia of Bioprocess Technology: Fermentation, Biocatalysis, & Bioseparation," ed. by M. A. D. Flickinger, John Wiley, pp. 1113-1122.
-