

幹細胞におけるデルマタン硫酸の機能

The functions of dermatan sulphate in stem cells.

13D5601 小倉千佳 指導教授名 西原祥子

SYNOPSIS

Mouse embryonic stem cells (mESCs) have self-renewal and pluripotency. Various signals and growth factors maintain undifferentiated state and regulate differentiation of mESCs. Glycosylation is a one of the post-translational modifications. Glycans have various structures and are conjugated to proteins and lipids. Many proteins on the cell surface and secreted proteins are glycosylated and contribute to important biological phenomena. The signal regulation is one of them, in which signal ligands and receptors bind to specific glycan structures. Previously, we and other groups reported that heparan sulphate, one of glycosaminoglycans, contributes to maintenance of undifferentiated state and regulation of mESCs differentiation. It has been shown that chondroitin sulfate is needed for pluripotency and differentiation of mESCs, while keratan sulfate is a known marker of human ESCs / iPSCs. However, the function of dermatan sulphate (DS) in mESCs has not been fully elucidated. Here, we performed (1) induction of neuronal differentiation in mESCs and human neural stem cells adding purified DS and (2) knockdown or overexpression of the *dermatan-4-O-sulfotransferase-1* (*D4ST1*) in mESCs. We revealed that (1) DS promotes neuronal differentiation in both mouse and human stem cells and (2) D4ST1 contributes to the undifferentiated state of mESCs.

Keywords: mouse embryonic stem cells, dermatan sulphate, neuronal differentiation, undifferentiated state

1. 序論

マウスの胚発生では、着床前の胚性 3.5 日に胚盤胞と呼ばれる構造が構築される。胚盤胞の内部細胞塊から樹立された細胞がマウス胚性幹(ES)細胞である(1, 2)。マウス ES 細胞は自己複製能と身体を構成する全ての細胞に分化する能力、すなわち多能性を有している。この二つの性質を維持して増殖することを未分化状態という。マウス ES 細胞の未分化性維持と分化誘導には、様々なシグナルや成長因子が寄与しており、多くの報告が存在する。

糖鎖修飾は、翻訳後修飾の一種である。糖鎖は多様な構造を持ち、タンパク質や脂質に付加されている。細胞表面のタンパク質や分泌されるタンパク質の多くが糖鎖修飾を受けており、多くの重要な生命現象に寄与している。シグナルの制御もその一つで、特定の糖鎖構造にシグナルリガンドや受容体が結合する。

グリコサミノグリライカン(GAG)は、コアタンパク質と結合してプロテオグリカンを形成し、細胞表面や細胞マトリックスに存在する。代表的な GAG には、ヘパラン硫酸(HS)、コンドロイチン硫酸(CS)/デルマタン硫酸(DS)、ケラタン硫酸(KS)がある。HS、CS/DS はコアタンパク質のセリン残基(ser)に四糖から成る橋渡し領域(3-5)が結合した先に、それぞれの特徴的な二糖繰り返し構造を持つ(6)。一方、KS の二糖構造はコアタンパク質に *N* 結合もしくは *O* 結合で結合している。それぞれの二糖繰り返し構造が硫酸化修飾を受け、二糖構造と硫酸化パターンを組み合わせてにより結合できるリガンド分子と受容体が異なる。

これまでに、我々と他のグループは、HS がマウス ES 細胞において、BMP4(Bone morphogenetic protein 4)、Wnt、FGF4(Fibroblast growth factor 4)、Fas シグナルの活性を促進することで未分化性維持と分化誘導を制

御していることを報告している(7-15)。また、マウス ES 細胞の多能性と分化に CS が必要であること(16)や、KS がヒト ES/hiPS 細胞のマーカーであることも報告されている(17-20)。しかし、マウス ES 細胞における DS の機能に関しては未だに不明なままである。

DS では、CS の二糖構造である *N*-アセチルガラクトサミン(GalNAc)とグルクロン酸(GlcA)の GlcA が、Dermatan sulfate epimerase(Dse)(21, 22)と Dermatan sulfate epimerase like(Dsel)(23, 24)によりエピマー化されてイズロン酸(IdoA)になる。その後 Dermatan-4-*O*-sulfotransferase 1(D4ST1)(25)により GalNAc の 4 位に硫酸基が転移され、続いて GalNAc の 6 位もしくは IdoA の 2 位が硫酸化修飾を受ける。

以上の背景を基に、本研究では、これまでにマウス ES 細胞における機能が明かされていない DS の機能を明らかにすることを目的とし、①精製した DS を添加した幹細胞の神経分化実験及び、②マウス ES 細胞において硫酸転移酵素である *D4ST1* のノックダウン実験と過剰発現実験を行った。①では DS がマウス ES 細胞とヒト神経幹細胞の神経分化を促進すること、②では *D4ST1* がマウス ES 細胞の未分化性と自己複製能に寄与することを新規に明らかにした。

2. 方法

2-1. マウス ES 細胞の培養

マウス ES 細胞(R1 株)(26)は、マウス ES 細胞用培地(DMEM(Gibco), 15% ウシ胎児血清(Nichirei Bioscience), 1% ペニシリン/ストレプトマイシン(Gibco), 0.1mM 2-メルカプトエタノール(Gibco), 0.1mM 非必須アミノ酸(Gibco))に 1000U/ml LIF (Leukemia inhibitory factor)(オリエンタル酵母)を添加して培養した。ゼラチンコートしたディッシュ(日本

ジェネティクス)にマウス胎児繊維芽細胞(MEF)を接着させ、その上にマウス ES 細胞を 5×10^5 個となるように播種した。継代と培地交換を 1 日おきに行い、細胞を回収する時は 0.25% トリプシン-EDTA(Gibco)を用いた。MEF は 10 μ g/ml マイトマイシン C(Sigma)処理をして不活性化したものを使用した。

マウス ES 細胞の神経分化誘導時には、まず LIF を除いて低接着ディッシュ(住友ベークライト)で浮遊培養して胚様体(Embryonic body; EB)を形成した。EB 4 日目(EB day4)に 1 μ M レチノイン酸(Sigma)を添加後、EB day6 に 15 μ g/ml ポリ-L-オルニチン(Sigma) / 4 μ g/ml ラミニン(Cornig)コートしたディッシュに接着させて神経分化用培地(DMEM/F-12(Gibco), 1% N2 サプリメント(Gibco), 1% ペニシリン/ストレプトマイシン)を用いて培養した。神経分化誘導中には、1 日おきに培地交換を行い、精製した DS(東京化成工業)は EB day0 から 100 μ g/ml で添加した。

2-2. ヒト神経幹細胞の培養

14 週胎児(男性)の大脳皮質由来初代神経幹細胞(PhoenixSongs Biologicals)を使用した。ポリ-L-オルニチン/ラミニンコートしたディッシュに播種し、ヒト神経幹細胞用培地(DMEM/F-12(Gibco), N2 サプリメント, 0.1% B-27 サプリメント(Gibco))に 10ng/ml bFGF(wako)と 20ng/ml EGF(Epidermal growth factor)(PeproTech)を添加して培養した(27)。

ヒト神経幹細胞の神経分化誘導時には、培地を神経分化用培地(Neurobasal(Gibco), 2% B-27 サプリメント, 0.5mM GlutaMAX(Gibco))に変更し、DS は誘導 0 日目から 10 μ g/ml で添加した。

2-3. トランスフェクション

マウス ES 細胞において、RNA 干渉を利用して *D4ST1* を一過的にノックダウン(KD)するため、pSilencer 3.1-H1 を用いて siRNA 発現ベクターを作製した。用いた siRNA 配列は siDirect(<http://sidirect2.rnai.jp/>)で 2 種類設計した(28)。コントロールには、*EGFP* に対する siRNA 配列を作製した。これらの配列を含むオリゴ DNA をアニーリングして二本鎖にし、pSilencer 3.1-H1 の HindIII 及び BamHI 認識部位間に挿入した。

また、*D4ST1* の過剰発現(O/E)のために pCAGI-Puro(程先生より寄贈)を用いて過剰発現ベクターを作製した。ベクターの作製には pGEM[®]-T Easy Vector Systems(Promega)を使用した(29)。過剰発現実験では、空ベクターをコントロールとした。

トランスフェクションの前日にゼラチンコートした 6cm ディッシュ上にマウス ES 細胞を 1×10^6 個播種し、16 時間後に作製したベクター(4 μ g)を Lipofectamine 2000(Invitrogen)を用いてトランスフェクションした。さらに 24 時間後(TF day1)に 2 μ g/ml ピューロマイシン(Sigma)を培地に添加し、セレクションを開始した。TF day2 に *D4ST1* O/E 細胞、TF day4 に *D4ST1* KD 細胞をそれぞれ回収し、各種解析を行った。

2-4. リアルタイム PCR 解析

TRIzol Reagent(Invitrogen)を用いて回収した細胞から total RNA を抽出し、25ng/ μ l Oligo dT Primer(Invitrogen)、0.5mM dNTPs(Invitrogen)、10units/ μ l Super Script II(Invitrogen)、2units/ μ l RNase OUT(Invitrogen)、10mM DTT(Invitrogen)により逆転写反応を行った。その後、0.1units/ μ l RNase H(Invitrogen)処理をし、cDNA サンプルとした。

作製した cDNA サンプルと Fast Start Universal SYBR Green Master(ROX)(Roche)を各目的遺伝子特異的なプライマーと共に混合し、リアルタイム PCR 反応により各遺伝子の発現量を定量した。PCR 反応、及び解析には QuantStudio 12K Flex リアルタイム PCR シス

テム(Applied Biosystems)を使用した。

遺伝子の絶対定量では、pGEM-T Easy Vector Systems(Promega)を用いて *Dse*, *Dsel*, *D4ST1* を pGEM-T ベクターに挿入したもので検量線を作成し、コピー数を測定した。

2-5. DS/CS 二糖構造解析

マウス ES 細胞の EB day0 と EB day12 をセルスクレーパーで回収し、ペレット状にした。細胞ペレットを超音波破碎後、アクチナーゼ E(科研製薬)を用いてタンパク質を分解した。5% トリクロロ酢酸でタンパク質除去、ジエチルエーテル抽出によってトリクロロ酢酸を除去した後、Amicon Ultra-4(3K)(Merk)を使用して脱塩を行った。さらに、コンドロイチナーゼ(CSase)ABC、CSaseAC-II、CSaseB で DS/CS、CS、DS をそれぞれ消化し、2-aminobenzamide(2AB)で蛍光標識した後、ポリアミンカラム PA-G(YMC)を用いた陰イオン交換 HPLC を行った(30, 31)。二糖構造量は、それぞれのクロマトグラムのピーク面積を測定することで定量した。

2-6. 免疫染色

マウス ES 細胞を神経分化誘導した細胞に対して免疫染色を行う際には、EB day6 にポリ-L-リジンコートされたカバーガラス(Iwaki)上に細胞を播種した。マウス ES 細胞は EB day12、ヒト神経幹細胞は神経分化誘導 7 日目に 4% パラホルムアルデヒド(Wako)/PBS(ニッスイ)で固定し、ブロッキングバッファー(5% BSA(Iwai), 0.3% Triton X-100(Sigma)/PBS)を用いてブロッキング反応を行った。一次抗体反応後に、蛍光ラベルされた二次抗体と核染色色素である Hoechst(Invitrogen)を共に反応させた。観察には LSM700 confocal laser microscope(Carl Zeiss)を使用した。

2-7. ウェスタンブロット解析

細胞を可溶化バッファー(50mM Tris-HCl pH 7.4, 150mM NaCl(Wako), 1% Triton X-100, 5mM EDTA(Sigma), 1mM Na₃VO₄(Sigma), 10mM NaF(Wako), 100mM PMSF(Sigma), 200 μ g/ml Leupeptin(Sigma), 100 μ g/ml Pepstatin A(Sigma), 200 μ g/ml Aprotinin(Sigma), 100 μ g/ml Antipain(Sigma))を用いて可溶化した。タンパク質サンプルを用いて SDS-PAGE を行った後、セミドライ法でタンパク質を PVDF メンブレン(Milipore)に転写した。転写後に、ブロッキングバッファー(1% BSA, 0.1% Tween20(Sigma)/TBS)を用いて室温で 1 時間ブロッキング反応を行った。一次抗体反応後に TBST(0.1% Tween20/TBS)でメンブレンを洗浄し、HRP 標識された二次抗体と反応させた。メンブレンを TBST で再び洗浄後、ECL plus(GE Healthcare)で化学発光させ、X 線フィルムで検出した。

2-8. 細胞遊走アッセイ

ディッシュの中央をポリ-L-オルニチン/ラミニンコートし、ヒト神経幹細胞を播種した。接着後、細胞遊走の足場となる 0.25% マトリゲル(Corning)を加えた神経分化誘導用培地に置き換え、遊走した細胞数をカウントした。DS は誘導 0 日目から 10 μ g/ml で添加した。

2-9. アルカリフォスファターゼ(ALP)染色

マウス ES 細胞をゼラチンコートした 24well プレートに 1.25×10^5 個/well になるように播種し、5 日目に StemTAG[™] Alkaline Phosphatase Staining Kit(Cell Biolabs)を用いて ALP 染色した後、ALP 陽性コロニーをカウントした。

2-10. 細胞増殖アッセイ

TF day4 の *D4ST1* KD マウス ES 細胞をゼラチンコートした 96well プレートに 8×10^3 個/well になるように播種し、24 時間後に生細胞数をカウントした。

3. 結果と考察

3-1. 幹細胞の神経分化における DS の機能

3-1-1. マウス ES 細胞からの EB 形成に伴う DS 合成関連酵素の発現

まず始めに、DS 特異的な合成関連酵素である Dse、Dsel、D4ST1 に着目し、マウス ES 細胞の三胚様分化(内胚葉、中胚葉、外胚葉)を模倣している EB を形成させて、各遺伝子の発現を検討した。リアルタイム PCR 解析の結果、Dsel 及び D4ST1 の発現が EB 形成に伴って増加していることが分かった。特に、神経細胞といった外胚葉分化に対応している EB day12 において D4ST1 の発現が有意に増加していた。D4ST1 がマウス神経前駆細胞の分化に必要であること(32)、Dsel がマウスの脳において発現していること(33)が報告されており、また、EB 形成に伴って発現が増加していることから、Dsel 及び D4ST1 がマウス ES 細胞の神経分化に重要な役割を果たしていると考えられた。

3-1-2. DS 添加によるマウス ES 細胞の神経分化への影響

マウス ES 細胞の神経分化における DS の機能を明らかにするため、マウス ES 細胞を神経分化誘導し、DS 合成関連酵素の発現を検討した。神経分化に伴い、Dsel 及び D4ST1 の発現は増加し、Dse の発現は低下していたことから、神経分化に伴い DS 構造が増加していることが考えられた。そこで、二糖構造解析を行った結果、マウス ES 細胞が神経分化するのに伴って DS 二糖構造、特に GalNAc の 4 位が硫酸化されている構造が有意に増加していた。

次に、マウス ES 細胞の神経分化誘導時に精製された DS を添加した。EB day12 において神経幹細胞マーカーである Nestin、Musashi1、神経前駆細胞マーカーである Pax6 (Paired box 6)、未熟ニューロンマーカーである Mash1、NeuroD1 (Neuronal Differentiation 1)、成熟ニューロンマーカーの β -III-tubulin (Tubulin beta 3 class III)、Map2 (Microtubule associated protein 2) の発現がコントロールと比較して増加していた。この事実より、DS 添加により、マウス ES 細胞の神経分化が促進されたことが示された。

DS がマウス ES 細胞の神経分化においてシグナルに影響を及ぼすかを検討するため、EB day12 においてウエスタンブロット解析を行った。コントロールと比較して、DS 添加により Erk1/2 (Extracellular signal-regulated kinases) と Stat3 (Signal transducer and activator of transcription) は活性化し、 β -catenin と Smad1/5/8 に有意な変化は無く、Smad5 においては活性が低下していた。DS が Erk1/2 と Stat3 を活性化し、Smad5 の活性を抑制することで神経分化を促進したことが考えられた。

3-1-3. DS 添加による神経突起伸長への影響

マウス ES 細胞を神経分化誘導した時の EB の外周と面積を測定したところ、EB のサイズにおいては、DS 添加による変化は観察されなかった。そこで、EB から伸長している神経突起を β -III-tubulin で染色した。EB 一個あたりの長さとお数を測定した結果、DS の添加により増加していた。さらに、神経突起を伸長する Cdk5r1 (Cyclin dependent kinase 5 regulatory subunit 1) と Tau (Microtubule associated protein Tau) の発現が、DS 添加により増加していた。これらの結果により、マウス ES 細胞の神経分化誘導時に DS を添加することで、神経分化と神経突起伸長が促進されることが明らかになった。

3-1-4. DS 添加によるヒト神経幹細胞における神経分化への影響

次に、DS がヒトの神経分化を促進するのかを検討し

た。ヒト神経幹細胞を用いて神経分化を誘導した。ヒト神経幹細胞の神経分化に伴い、DSE、DSEL、D4ST1 の発現が増加していた。また、神経分化が DS 添加により促進されるかを検討するため、神経分化誘導したヒト神経幹細胞を未熟ニューロンマーカーである DCX (Doublecortin) と成熟ニューロンマーカーである β -III-tubulin で染色し、陽性細胞の割合をカウントした結果、DCX と β -III-tubulin 陽性細胞は、DS 添加により増加していた。DS 添加によりヒト神経幹細胞の神経分化が促進されたことが分かった。しかし、ヒト神経幹細胞の神経分化誘導後に神経突起の長さを測定すると、マウス ES 細胞とは異なり、DS 添加による変化は観察されなかった。これらの結果より、DS はヒト神経幹細胞においても神経分化を促進するが、神経突起伸長に対しては影響しないことが明らかになった。

次に細胞遊走を検討した。ヒト神経幹細胞を播種して接着した最初の位置から遊走した細胞の数をカウントすると、DS の添加により細胞遊走が促進されていることが示された。

以上の結果により、DS 添加により、マウス ES 細胞においては神経分化及び神経突起伸長、ヒト神経幹細胞では神経分化と細胞遊走が促進されることが分かった。

3-2. D4ST1 のマウス ES 細胞における未分化性への寄与

3-2-1. D4ST1 のマウス ES 細胞における自己複製能への寄与

マウス ES 細胞において、D4ST1 をノックダウン(KD)し、mRNA レベルでは 30-40%、タンパク質レベルでは約 60% D4ST1 の発現が低下したことを確認した。D4ST1 KD による自己複製能への影響を検討するため、ALP 染色を行ったところ、D4ST1 KD により ALP 陽性コロニーの割合が減少し、自己複製能が低下していた。細胞増殖アッセイでは、D4ST1 KD による変化は観察されなかった。さらに、D4ST1 KD マウス ES 細胞における未分化性を検討すると、D4ST1 KD により未分化マーカーである Oct3/4 (Octamer-binding transcription factor)、Nanog、Sox2 (Spy-box transcription factor 2) の発現が低下し、また、タンパク質レベルでの Nanog の発現低下が確認された。D4ST1 がマウス ES 細胞の未分化性に必要であることが明らかになった。

次に、D4ST1 をマウス ES 細胞において過剰発現(O/E)させ、mRNA レベルでは約 400 倍、タンパク質レベルでは約 1.4 倍、D4ST1 の発現が増加していることを確認した。ALP 染色を行ったところ、D4ST1 KD における結果とは逆に、D4ST1 O/E により ALP 陽性コロニーの割合が増加していた。この結果より、D4ST1 がマウス ES 細胞の自己複製能に寄与していることが分かった。

3-2-2. D4ST1 KD によるマウス ES 細胞の内胚葉への分化

次に、D4ST1 KD マウス ES 細胞において、各種分化マーカーの発現を検討した。コントロールと比較して、D4ST1 KD によりエプิบラストマーカーである Fgf5、Otx2 (Orthodenticle homeobox 2) の発現は低下していた。さらに、D4ST1 KD マウス ES 細胞において、中胚葉マーカーである T、Mixl1 (Mix paired-like homeobox 1) の発現は有意に低下し、また内胚葉マーカーである Sox17 と Cdx2 (Caudal type homeobox 2) の発現は有意に増加していた。外胚葉マーカーである Mash1 の発現は、D4ST1 KD による変化が認められなかった。原始内胚葉マーカーの Gata6 (GATA binding protein 6) は D4ST1 KD により発現が増加していた。これらの結果は、D4ST1 KD により内胚葉及び原始内胚葉への分化が誘導されることを示し、また D4ST1 がマウス ES 細胞の多能性維持に関与することを示唆している。

D4ST1 O/E マウス ES 細胞における *Cdx2* の発現を検討したところ、*D4ST1* KD とは反対に有意に減少していた。*Cdx2* は内胚葉よりもさらに分化の進んだ後腸分化に必要であることが報告されており(34, 35)、*D4ST1* KD 及び *D4ST1* O/E マウス ES 細胞における *Cdx2* の発現の挙動から、*D4ST1* が後腸を含む内胚葉分化を制御している可能性を見出した。

3-2-3. *D4ST1* KD マウス ES 細胞におけるシグナルの変化

D4ST1 KD によるシグナルへの影響を検討するため、ウエスタンブロット解析を行った。神経分化を抑制することでマウス ES 細胞の自己複製能を維持すること(36)、細胞の運命決定に必要であること(37)が報告されている BMP/Smad1/5/8 シグナルの活性は *D4ST1* KD により低下していた。この結果により、*D4ST1* KD マウス ES 細胞において自己複製能が低下したのは BMP シグナルの活性が低下したためであると考えられた。

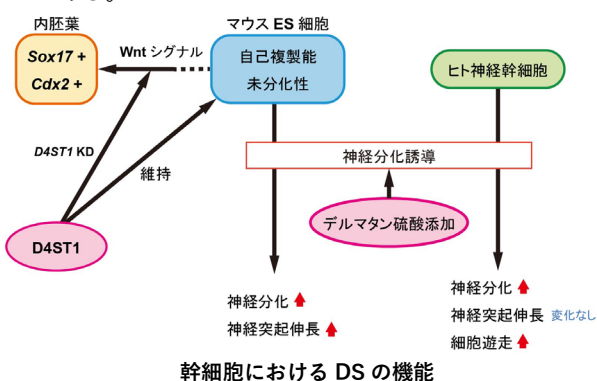
次に、マウスにおける内胚葉分化の誘導(38)、さらにその先の後腸への分化を誘導すること(39)が知られている Wnt/ β -catenin シグナルの活性を検討した。*D4ST1* KD により、Wnt/ β -catenin シグナルの活性は有意に促進されていた。反対に、*D4ST1* O/E により、Wnt/ β -catenin シグナルの活性が有意に低下していた。以上により、*D4ST1* KD による内胚葉分化は、Wnt シグナルの活性化によるものであることが示された。

4. 結論

マウス ES 細胞の神経分化において、DS 添加により①神経分化が促進されること、また②Erk1/2 と Stat3 が活性化され、Smad5 の活性が抑制されたこと、さらに③神経突起伸長が促進されることが分かった。ヒト神経幹細胞においても、DS 添加により①神経分化が促進されること、②細胞遊走が促進されることが明らかになった。

また、マウス ES 細胞における *D4ST1* KD 及び *D4ST1* O/E により、①*D4ST1* がマウス ES 細胞の未分化性と自己複製能に必要であること、②*D4ST1* が Wnt シグナルを介して内胚葉分化とその後の後腸形成を制御していることが示唆された。

本研究の成果は、これまでに報告されていなかった幹細胞における DS の機能について新たな知見を与えるものである。



5. 参考文献

- Evans, M. J., and Kaufman, M. H. (1981) *Nature*.292, 154- 156
- Martin, G. R. (1981) *Proc National Acad Sci*. 78, 7634-7638
- Aubert, J. P., et al. (1976) *Arch Biochem Biophys*. 175, 410-418
- Oegema, T. R., et al. (1984) *J Biol Chem*. 259,

- 1720-1726
- Sugahara, K., et al. (1988) *J Biological Chem*. 263, 10168-74
- Iozzo, R. V., and Murdoch, A. D. (1996) *Faseb J Official Publ Fed Am Soc Exp Biology*. 10, 598- 614
- Sasaki, N., et al. (2008) *J Biol Chem*. 283, 3594- 3606
- Sasaki, N., et al. (2009) *Plos One*. 4, e8262
- Hirano, K., et al. (2012) *Plos One*. 7, e43440
- Hirano, K., et al. (2013) *Biochem Bioph Res Co*. 430, 1175-1181
- Johnson, C. E., et al. (2007) *Stem Cells*. 25, 2389-2389
- Kraushaar, D. C., et al. (2012) *J Biol Chem*. 287, 22691-22700
- Kraushaar, D. C., et al. (2010) *J Biol Chem*. 285, 5907-5916
- Lanner, F., et al. (2010) *Stem Cells*. 28, 191-200
- Fico, A., et al. (2012) *Stem Cells*. 30, 1863-1874
- Izumikawa, T., et al. (2014) *Sci Rep*. 4, 3701
- Kawabe, K., et al. (2013) *Glycobiology*. 23, 322-336
- Pera, M. F., et al. (1988) *Differentiation*. 39, 139-149
- Adewumi, O., et al. (2007) *Nat Biotechnol*. 25, 803-816
- Andrews, P. W., et al. (1984) *Hybridoma*. 3, 347-361
- Malmström, A., and Fransson, L. A. (1975) *J Biological Chem*. 250, 3419- 25
- Maccarana, M., et al. (2006) *J Biol Chem*. 281, 11560-11568
- Malmström, A. (1984) *J Biological Chem*. 259, 161-5
- Pacheco, B., et al. (2009) *J Biol Chem*. 284, 9788-9795
- Evers, M. R., et al. (2001) *J Biol Chem*. 276, 36344-36353
- Nagy, A., et al. (1993) *Proc National Acad Sci*. 90, 8424-8428
- Hirano, K., and Namihira, M. (2016) *Stem Cells*. 34, 1872-1882
- Ui - Tei, K., et al. (2004) *Nucleic Acids Res*. 32, 936-948
- Kamiyama, S., et al. (2006) *J Biol Chem*. 281, 10945-10953
- Kinoshita, A., and Sugahara, K. (1999) *Anal Biochem*. 269, 367-378
- Mizumoto, S., and Sugahara, K. (2012) *Methods Mol. Biol*. 836, 99-115
- Bian, S., et al. (2011) *J Cell Sci*. 124, 4051-4063
- Akatsu, C., et al. (2011) *Glycobiology*. 21, 565-574
- Beck, F., et al. (1995) *Dev Dynam*. 204, 219-227
- Sherwood, R. I., et al. (2007) *Dev Biol*. 304, 541-555
- Ying, Q. L., et al. (2003) *Cell*. 115, 281-292
- Li, Z., et al. (2012) *Cell Stem Cell*. 10, 171-182
- Zhong, W., et al. (2017) *Romanian J Morphol Embryology Revue Roumaine De Morphol Et Embryologie*. 58, 527-535
- Engert, S., et al. (2013) *Development*. 140, 3128-3138