

# フィブロネクチン基質におけるエンビジンタンパク質による 細胞の接着伸展の亢進

市原 啓子\*<sup>1)</sup>

エンビジンは細胞表面の1型膜貫通型糖タンパク質で、タンパク質の構造的な特徴から免疫グロブリンスーパーファミリーに属する。エンビジンは、モノカルボン酸輸送体2タンパク質 (MCT 2) の協働因子と考えられているが、機能に関しては不明な点が多い。本論文では、エンビジンの生理機能を明らかにする目的で、エンビジンの cDNA に myc タグと His タグを連結した発現ベクターを作成し、ヒト培養細胞である HEK293T 細胞で強制発現させた。

エンビジン遺伝子を細胞に導入し、48時間後にウェスタンブロット解析を行なったところ、エンビジンタンパク質は抗エンビジン抗体および抗ペンタ His 抗体によって検出できた。細胞接着アッセイは、ベクターのみを導入した HEK-293T 細胞 (HEK) をコントロールとし、エンビジン発現ベクター導入によりエンビジンタンパク質を発現する HEK-293T 細胞 (HEK-Em) を使って行なった。フィブロネクチンをコートした基質上に細胞を2時間まき込み、接着細胞および伸展細胞の数を計測した。接着細胞数に対する伸展細胞数は、HEK-Em は HEK の2倍となった。この結果から、エンビジンは細胞接着において基質への接着だけでなく細胞の伸展につながるシグナル伝達に関与する可能性が示唆された。

キーワード：エンビジン、細胞接着、伸展、フィブロネクチン

## 1. はじめに

エンビジンは、村松らのグループによって1990年に同定された細胞表面の1回膜貫通型糖タンパク質である<sup>1)</sup>。タンパク質の構造的な特徴からイムノグロブリン (Ig) スーパーファミリーに分類され、ほ乳類から魚類までの脊椎動物で遺伝子が同定されている。マウスでは発生初期に発現が高く、カルシウムイオン依存的に細胞の基質への接着が亢進すること<sup>2)</sup>、エンビジンとファミリーを形成するペイジジンと共にモノカルボン酸トランスポーター MCT と複合体を形成すること<sup>3)</sup>が報告されている。近年、肝臓での幹細胞のニッチ分子として機能すること<sup>4)</sup>、膵臓がんにおいては発現の上昇、上皮-間充織の転移に関係すること<sup>5)</sup>が報告され、細胞表面において他の細胞

表面タンパク質と複合体を形成し細胞の機能を調節することが示唆されている。International Mouse Phenotyping Consortium database ([www.mousephenotype.org/](http://www.mousephenotype.org/))<sup>6)</sup>では、エンビジンノックアウトマウスはホモ接合体が誕生するものの、心臓や肝臓で形態異常が発生すると記載されている。しかしながら、エンビジンがこのような異常を引き起こす仕組みについては解明されておらず、依然としてエンビジンの生体内での作用機序については不明な点が多い。

本研究では、エンビジンの機能を明らかにする目的で、マウスエンビジン組換えタンパク質をヒト培養細胞において強制発現させる系を作成した。さらに、エンビジンを発現させた細胞を用い、フィブロネクチンをコートした基質上での細胞の接着と伸展に対する効果を調べた。その結果、エンビジン発現細胞では、伸展細胞数がコントロールと比較して2倍になること

\* 1) 愛知学院大学心身科学部健康栄養学科  
(連絡先) 〒470-0195 愛知県日進市岩崎町阿良池12 E-mail: kichi@dpc.agu.ac.jp

がわかった。エンビジンが細胞接着において基質への接着だけでなく細胞の伸展につながるシグナル伝達に関与する可能性が示唆された。

## II. 材料と方法

### 1. 発現ベクターの作成

マウスエンビジン (GenBank, NM\_010330) の cDNA を鋳型とし、2つのプライマー、EmbF07Hd 5'-AAAGCTTGCCATGCGCTCGCACACTGGCCTG A-3' および EmbR999Xb 5'-TCGATTTCTAGACTA TCTGCAGAGTCAGTTTTTC-3' で PCR 反応を行った。増幅した DNA 断片をアガロースゲルで精製し、制限酵素 *Hind* III と *Xba* I 処理をおこなった。この断片を *Hind* III と *Xba* I とで切断した pcDNA3.1-myc-His ベクター (Invitrogen) にライゲーションを行い、大腸菌を形質転換し、エンビジン発現ベクター pEmbMycHis を得た。発現ベクターの cDNA および cDNA とベクターの連結部分は、DNA シーケンサー ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems) で塩基配列を確認した。さらに、発現ベクターを産生する大腸菌を大量培養し、プラスミド精製カラム (Qiagen) で純度の高いプラスミド DNA を得た。

### 2. 細胞培養とトランスフェクション

ヒト培養細胞 HEK293T 細胞株は、poly-D-Lysine (PDL, Sigma-Aldrich) をコートした培養皿を用い、10% ウシ胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) で継代した。プラスミド DNA の細胞へのトランスフェクションは、PDL コートした 60 mm 径培養皿に  $1.0 \times 10^6$  細胞を播種し、リポフェクトアミン 2000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて行った。トランスフェクションの 48 時間後にウェスタンブロットでエンビジタンパク質の発現を調べた。細胞接着アッセイには、トランスフェクション後 72 時間の細胞を用いた。

### 3. ウェスタンブロットティング

トランスフェクトした細胞をリン酸緩衝塩液 (PBS) で洗浄後、プロテアーゼインヒビターミックス (1.0mM AEBSF, 0.80  $\mu$ M Aprotinin, 15  $\mu$ M E-64, 20  $\mu$ M Leupeptin hemisulfate, 50  $\mu$ M Bestatin, 10  $\mu$ M Pepstatin A, Nacalai tesque) を

添加した可溶性バッファー (0.6% CHAPS, 0.1% sodium deoxycholate, 10mM Hepes -NaOH pH 7.2, 150mM NaCl) を加え、4°C で 30 分間振とうしてタンパク質の抽出を行った。スクレーパーで可溶化物を集め、15000rpm、4°C で 10 分間遠心し上清を得た。この上清に含まれるタンパク質を、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) で分離し、PVDF 膜 (Immobilon-P, Millipore) に転写した<sup>7)</sup>。ボンソー染色でタンパク質の転写像を確認した後、5% スキムミルクを含む TBS-T バッファー (20 mM Tris-Cl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.1% Tween20) でブロッキングし、抗 Penta-His 抗体 (1:1000、マウスモノクローン抗体、Qiagen) または抗エンビジン抗体 Em51 (ウサギポリクローン抗体、自作)<sup>8)</sup> と反応させた。TBS-T で洗浄後、二次抗体として HRP 標識抗マウス IgG 抗体 (1:6000, ヤギポリクローン抗体、Jackson ImmunoResearch) または HRP 標識抗ウサギ IgG 抗体 (1:6000, ヤギポリクローン抗体、Jackson ImmunoResearch) と反応させた。洗浄後、ECL Prime (GE ヘルスケア) と反応させ、得られた化学発光のシグナルをライトキャプチャー II (ATTO) で検出した。

### 4. 細胞接着アッセイ

基質となるヒト血漿フィブロネクチン<sup>9)</sup> は PBS で希釈し、マルチウェルプレート (Falcon 1147, BD Biosciences 社) の各ウェル (2 cm<sup>2</sup>) に 0.40ml 入れ、2 時間室温で放置した。滅菌水で各ウェルを 3 回洗浄した後、1% ウシ血清アルブミンを含む PBS で、30 分間 37°C でブロッキングした。細胞をトリプシン-1 mM EDTA 処理で解離し、ダイズトリプシンインヒビターを含む DMEM で洗浄した後、DMEM に懸濁した。1 ウェルあたり  $3 \times 10^5$  個でまきこみ、37°C、5% CO<sub>2</sub> で 2 時間培養した<sup>10)</sup>。PBS で洗浄し、未接着の細胞をウェルから除いた後、4% 中性緩衝ホルマリンで細胞を固定した。また各ウェルをランダムに 5 箇所以上写真撮影し、接着細胞の数と伸展細胞の数をカウントした。接着細胞数に対する伸展細胞の割合を求め、得られた平均値に有為な差があるかどうかを student の t 検定で調べた。

## III. 結果

### 1. HEK293T 細胞におけるマウスエンビジタンパク質の発現

マウスエンビジン cDNA を組み込んだ発現ベク

ターを、HEK293T細胞にトランスフェクションし、48時間後に細胞を可溶化し、ウェスタンブロッティングを行った(図1)。抗エンビジン抗体(anti-Emb)を用いた結果から、HEK293T細胞は、内在性のエンビジンがわずかに発現しているが、トランスフェクションした細胞での組換えエンビジンの発現量が非常に大きいことがわかった。また、組換えタンパク質にはヒスチジンタグが付加されているため、抗Penta-His タグ抗体(anti-His)で検出することができた。内在性のエンビジンと同様、組換えエンビジンは66 kDaのバンドとして認められた。

## 2. エンビジン発現細胞における細胞接着の亢進

トランスフェクションした72時間後に細胞を解離し、フィブロネクチンを0.5  $\mu\text{g/ml}$  または1.0  $\mu\text{g/ml}$  でコーティングした基質上にまきこみ、2時間培養した(図2A)。フィブロネクチンの濃度が高いほど、接着する細胞の数が多くなった。また、接着し突起を伸展させた細胞数も増加していた。接着した細胞数および突起を伸ばした伸展細胞の数を数え、接着した細胞における突起伸展細胞の割合を調べた(図2B)。コントロールのHEK293T細胞(HEK)では、接着した細胞のうち、伸展した細胞の割合は、フィブロン

クチンの濃度が0.5と1.0の時それぞれ8.1%と12.0%だった。一方、エンビジン発現細胞(HEK-Em)では、伸展した細胞の割合は、フィブロネクチンの濃度が0.5と1.0の時それぞれ19.2%と23.8%だった。(図2B)。エンビジンを発現させた細胞では、同じ濃度のフィブロネクチン基質上で、0.5でも1.0でも、約2倍の細胞で突起の伸展が起こったことがわかった。この伸展細胞の割合に関して、t検定をおこなったところ  $p < 0.01$  で有意な差が認められた。

## IV. 考察

本研究の結果、エンビジンを強制発現させた細胞では、接着面のフィブロネクチン基質に対して接着伸展する細胞の数が有意に増加していることが明らかとなった。HEK293T細胞のエンビジンタンパク質の産生量はわずかである。したがって、フィブロネクチン基質への接着や伸展の効果は、エンビジンを強制発現させたことによると考えられる。

細胞がフィブロネクチン基質に結合する際の受容体はインテグリンである<sup>11) 12)</sup>。エンビジンのファミリータンパク質であるベイシジンは、細胞膜表面でインテ

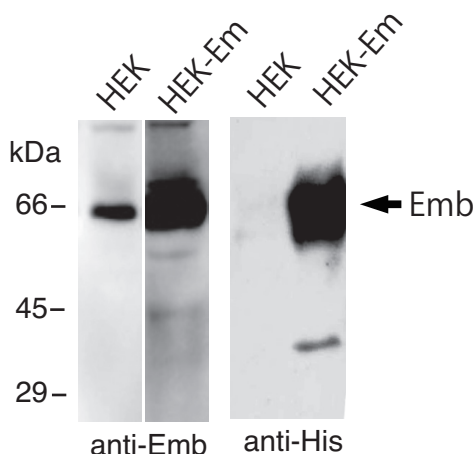


図1 HEK293T細胞におけるエンビジンタンパク質の強制発現

HEK293T(HEK)細胞にマウスエンビジン発現ベクターをトランスフェクトし、エンビジンタンパク質を発現する細胞(HEK-Em)を作成した。抗エンビジン抗体(anti-Emb)および抗penta-His抗体(anti-His)でウェスタンブロットを行ったところ、エンビジンタンパク質(矢印)を検出することができた。

グリンと複合体を形成することでインテグリンの作用を補助することが知られている<sup>13)</sup>。また、マウスL細胞においてエンビジンを強制発現させるとフィブロネクチン基質への接着が亢進することが報告されている<sup>2)</sup>。しかしながら、エンビジンの突起の伸展に対する効果については記述がない。本研究では、エンビジンの発現が接着の亢進のみならず、伸展も亢進するということを明らかにした。これは、エンビジンがイン

テグリンと協働して、接着後の細胞内への情報伝達に関与する可能性を示唆するものである。エンビジンの機能として、細胞膜上でインテグリンとその複合体と協働して伸展を促進する可能性や、エンビジンの細胞内部位に何らかのタンパク質が結合してインテグリンを活性化する可能性などが考えられる。エンビジンを介した細胞の伸展について、より詳細な細胞内情報伝達の仕組みの解明が求められる。

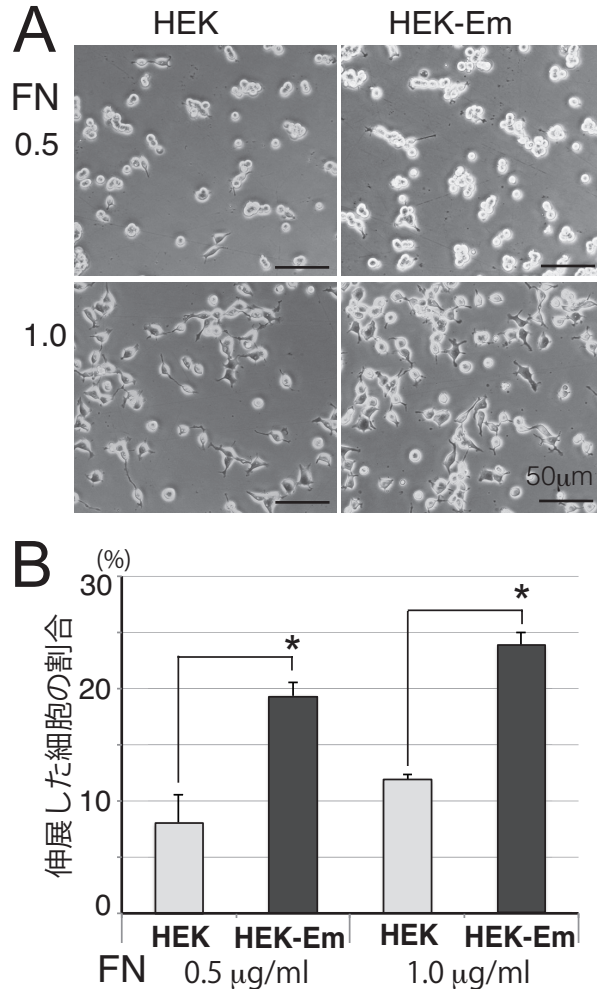


図2 エンビジン発現細胞のフィブロネクチン (FN) 基質への接着

A. コントロール細胞 (HEK) とエンビジン発現細胞 (HEK-Em) を FN をコーティングした基質上で2時間培養し、位相差顕微鏡で観察した。B. 接着した細胞と接着伸展した細胞の数を調べ、接着細胞数に対して突起をもち伸展している細胞の割合を調べた。同じ FN の濃度では、エンビジン発現細胞の方で、伸展細胞の割合が大きくなることがわかった。\*は、 $p < 0.01$  で有意差があることを示す。

## 謝辞

DNA シーケンサーの使用に際して、愛知学院大学歯学部吉村文信教授の協力と支援をうけたことに深く謝意を表します。

## 文献

- 1) Huang RP, Ozawa M, Kadomatsu K, Muramatsu T. (1990) Differentiation. **45**, 76–83. Developmentally regulated expression of embigin, a member of the immunoglobulin superfamily found in embryonal carcinoma cells.
- 2) Huang RP, Ozawa M, Kadomatsu K, Muramatsu T. (1993) Dev Biol. **155**, 307–14. Embigin, a member of the immunoglobulin superfamily expressed in embryonic cells, enhances cell-substratum adhesion.
- 3) Wilson MC, Meredith D, Fox JE, Manoharan C, Davies AJ, Halestrap AP. (2005) J Biol Chem. **280**, 27213–21. Basigin (CD147) is the target for organomercurial inhibition of monocarboxylate transporter isoforms 1 and 4: the ancillary protein for the insensitive MCT2 is EMBIGIN (gp70) .
- 4) Silberstein L, Goncalves KA, Kharchenko PV, Turcotte R, Kfoury Y, Mercier F, Baryawno N, Severe N, Bachand J, Spence JA, Papazian A, Lee D, Chitteti BR, Srour EF, Hoggatt J, Tate T, Celso CL, Ono N, Nutt S, Heino J, Sipila K, Shioda T, Osawa M, Lin CP, Hu GF, Scadden DT. (2016) Cell Stem Cell **19**: 530–543. Proximity-Based Differential Single-Cell Analysis of the Niche to Identify Stem/Progenitor Cell Regulators.
- 5) Jung DE, Kim JM, Kim C, Song SY. (2016) Mol Carcing **55**: 633-45. Embigin is overexpressed in pancreatic ductal adenocarcinoma and regulates cell motility through epithelial to mesenchymal transition via the TGF-beta pathway.
- 6) Koscielny G, Yaikhom G, Iyer V, Meehan TF, Morgan H, Aienza-Herrero J, Blake A, Chen CK, Easty R, Di Fenza A, Fiegel T, Griffiths M, Horne A, Karp NA, Kurbatova N, Mason JC, Matthews P, Oakley DJ, Qazi A, Regnart J, Retha A, Santos LA, Sneddon DJ, Warren J, Westerberg H, Wilson RJ, Melvin DG, Smedley D, Brown SD, Flicek P, Skarnes WC, Mallon AM, Parkinson H. (2014) Nucleic Acids Res. **42** (Database issue) : D802–809. The International Mouse Phenotyping Consortium Web Portal, a unified point of access for knockout mice and related phenotyping data.
- 7) Ichihara-Tanaka K, Oohira A, Rumsby M, Muramatsu T. (2006) J Biol Chem. **281**, 30857–64. Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells.
- 8) 市原啓子 (2014) 心身科学 **6**:119–124. プレビパチルス発現系によるエンビジン組換えタンパク質の発現と精製
- 9) Ichihara-Tanaka K, Titani K, Sekiguchi K. (1995) J Cell Sci. **108**: 907-915. Role of the carboxyl-terminal Fib2 domain in fibronectin matrix assembly.
- 10) Maeda T, Oyama R, Ichihara-Tanaka K, Kimizuka F, Kato I, Titani K, Sekiguchi K. (1989) J. Biol Chem **264**: 15165–68. A Novel Cell Adhesive Protein Engineered by Insertion of the Arg-Gly-Asp-Ser Tetrapeptide.
- 11) Geiger B and Yamada K (2011) Cold Spring Harb Perspect Biol 2011: **3**: a005033. Molecular Architecture and function of matrix adhesions.
- 12) Huttenlocher A, Horwitz A. (2011) Cold Spring Harb Perspect Biol 2011: **3**: a005074. Integrins in cell migration.
- 13) Muramatsu T. (2016) J Biochem **159**:481–490. Basigin (CD147) , a multifunctional transmembrane glycoprotein with various binding partners.

(平成29年12月26日受理)

## Cell attachment and elongation on the fibronectin substratum are enforced by the embigin expression.

Keiko ICHIHARA-TANAKA

### **Abstract**

Embigin is a cell surface transmembrane protein, which is classified as the immunoglobulin superfamily. Embigin is thought to be the cofactor of monocarboxylate transporter 2, but its function is not fully understood yet. In this paper, to study the physiological roles of embigin, the expression vector containing mouse embigin cDNA with myc and His tag sequences was constructed, and introduced into the human HEK293T cells.

Embigin protein was successfully expressed at 48 hours after the transfection, and detected by the western blotting with either anti-embigin antibody or anti-penta-His antibody. Then cell attachment assay was performed using control HEK293T (HEK) cells and the transiently embigin expressing HEK293T (HEK-Em) cells. After two hours incubation on the fibronectin coating substrate, both HEK and HEK-Em cells were attached and elongated. I counted the number of attached cells and the elongated cells, and calculated the ratio of the numbers of elongated cells to the number of the attached cells. The ratios on the fibronectin substrata were approximately 2 times higher at HEK-Em cells than HEK cells. This result shows that expression of embigin protein enhance both cell attachment and elongation.

Keywords : embigin, cell attachment, elongation, fibronectin