

マウス胎児期におけるエンビジンの発現

市原 啓子*¹⁾

エンビジンは、GP70とも称される細胞表面の1回膜貫通型糖タンパク質である。エンビジンはマウスの発生中期で発現が高く成体での発現は限定的とされる。エンビジンが肝臓の幹細胞のニッチ分子として機能することやエンビジンの発現が亢進したすい臓がん細胞では細胞増殖や転移にエンビジンが関与することから、細胞間の微小環境の形成に関与する可能性が示唆されている。しかしながら、エンビジンの生体内での役割については不明な点が多い。

筆者は、マウス胎児においてエンビジンの免疫組織染色を行ってきた。発生中期では脳、心臓、肝臓で染色が認められる。それらの臓器でのエンビジンの発現量を比較するため、マウスの10.5日胚の脳、11.5日胚と15.5日胚からそれぞれ脳、心臓、肝臓について、定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (qPCR) で調べた。さらに、同じ時期のエンビジンタンパク質をウェスタンブロット法で発現量を確認することにした。エンビジンは脳と心臓では発生に伴って減少する傾向が認められた。エンビジンは主として66 kDa タンパク質として検出された。肝臓では、66 kDa タンパク質のほかに大きなサイズのスメアなバンドとして検出された。肝臓では脳や心臓とは異なる修飾が付加されていると考えられる。肝臓の発生や胎児期の機能におけるエンビジンの役割について今後の研究が期待される。

キーワード：エンビジン、定量的PCR、ウェスタンブロット、マウス発生

1. はじめに

エンビジンは、GP70とも称される細胞表面の1回膜貫通型糖タンパク質である¹⁻³⁾。エンビジンはマウスの発生中期で発現が高く成体での発現は限定的とされる^{4,5)}。エンビジンは、ファミリータンパク質であるペイシジンとともにモノカルボン酸輸送体と複合体を形成するとされるが^{6,7)}エンビジンの機能については不明な点が多い。エンビジンは筋肉が損傷した時に新たな神経筋接合部位で発現する遺伝子のひとつであり⁸⁾、肝臓での幹細胞のニッチ分子として機能すること⁹⁾、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¹⁰⁾から、細胞増殖や細胞分化に伴う微小環境の形成に関与する可能性が示唆されている。しかしながら、ノックアウトマウスでの異常については報告がなく、エンビ

ジンの生体内での役割については不明な点が多い。

筆者は、エンビジンのマウスの発生における役割を明らかにする目的でエンビジンの免疫組織染色を行ってきた。エンビジンは10.5日胚の心臓や脳で発現が認められ、15.5日胚では肝臓も免疫染色される(未発表データ)が、発現量の大小については染色像から比較することは難しい。本研究では免疫染色される脳、心臓、肝臓について、エンビジンのmRNAの発現量を定量的ポリメラーゼ連鎖反応(qPCR)で調べることにした。さらに、同じ時期のエンビジンタンパク質をウェスタンブロット法で発現量を確認することにした。エンビジンは脳と心臓では発生に伴って減少する傾向が認められた。肝臓では、66 kDa タンパク質のほかに大きなサイズのスメアなバンドとして検出された。肝臓の発生とエンビジンの機能について今後の研究が期待される。

*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

II. 材料と方法

1. 材料

本実験ではICR系統の妊娠マウス (SLC) を購入し使用した。頸椎脱臼によりマウスを屠殺し、胎児組織を採取した。

2. RNA抽出と定量的ポリメラーゼ連鎖反応

採取した組織は50 mgあたり 0.5 mlのIsogen II (ニッポンジーン) を加え、24ゲージ注射針をつけたシリンジまたはポリトロンホモジナイザーを用いて組織を破碎し均一化した。すぐに解析を行わない場合には試料を破碎した後 -80°C で保存した。破碎した試料には0.2 mlのリボヌクレアーゼ (RNase) フリー水を加えて激しく攪拌し、室温で15分間放置した。その後、 $12000 \times g$ で 20°C 、10分間遠心した。上清を新しいチューブに移し、等量のイソプロパノールを加えて転倒混和し、室温で10分間放置した。さらに、 $12000 \times g$ で 20°C 、10分間遠心し、沈殿を得た。この沈殿をRNaseフリー水に溶解し、エタノールと3 M 酢酸ナトリウム pH5.0を加えて得られた沈殿をRNA試料とした。ホルマリンゲル電気泳動を行い¹¹⁾、18Sと28Sのバンドを確認するとともに、260 nmでの吸光度を測定することによって濃度を測定した。

逆転写反応は、0.5 μg のRNAに対してReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡) を用い、用法に従い 37°C 、15分間反応させcDNAを得た。このcDNAを鋳型とし、THUNDERBIRD Probe qPCR/ RT Set III (東洋紡) を用いて、定量的PCRを行なった¹²⁾。鋳型は各時期の各臓器について4つずつ作成し反応を行なった。使用したプライマーの配列は、エンビジンプライマー For: 5'-TGGGC AACACCTTAACCAGTCA -3', Rev: 5'-CCCAC GTAAGCGATCAACGA -3'、ベシジンプライマー For: 5'-TAGGCATCGTGGCTGAGGTC -3' Rev:5'-CTTGTCATTCATGTGAGTTCCACTG -3'、ベータアクチン For: 5'-CATCCGTAAAGACCTCTATGCCAAC -3', Rev:5'-ATGGAGCCACCGATCCACA -3'である。また、PCRはサーマルサイクラーDice (タカラバイオ) を用い、反応条件は (95°C 、30秒) \times 1回 \rightarrow (95°C 、5秒 \rightarrow 60°C 、30秒) \times 40回 \rightarrow 95°C 15秒 \rightarrow 60°C 30秒 \rightarrow 95°C 15秒で行なった。その結果は、Thermal Cycler Dice Real Time System IIソフトウェアで解析した。

3. ウェスタンブロット法

胎児組織を、プロテアーゼインヒビターミックス (1.0 mM AEBSF、0.80 μM Aprotinin、15 μM E-64、20 μM Leupeptin hemisulfate、50 μM Bestatin、10 μM Pepstatin A、Nacalai tesque) を添加した可溶化バッファー (0.6 % CHAPS、0.1 % sodium deoxycholate、10 mM Hepes -NaOH pH 7.2、150 mM NaCl) を加えガラスホモジナイザーですり潰し、 4°C で30分間振とうしてタンパク質の抽出を行った。 15000 rpm 、 4°C で10分間遠心し上清を得た。この上清のタンパク質濃度をBCAタンパク質定量キットで定量し、SDS-PAGEサンプルバッファーを加えて100 μg /100 μl の泳動用試料を作成した。1レーンあたり10 μg のタンパク質を用い、10 % アクリルアミドゲルで電気泳動を行い、ゲル内のタンパク質をPVDF膜 (Immobilon-P, Merckmillipore) に転写した¹³⁾。ポ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、抗エンビジン抗体 C20 (1:2000、ウサギポリクローン抗体、Sigma) または抗 β -アクチン抗体 (1:500、ウサギポリクローン抗体、Gene Tex) と反応させた。TBS-Tで洗浄後、二次抗体として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、画像を保存した。各バンドの発光強度はCSアナライザー (ATTO) で測定した。

III. 結果

1. 定量的PCRによるエンビジンの発現解析

ウェスタンブロットの結果を確かめるために、定量的PCRを行なった。胎齢10.5日マウスの脳におけるエンビジンと β -アクチンの発現を基準として胎齢11.5日マウスと胎齢15.5日マウスの脳、肝臓、心臓について相対的なmRNAの発現量を調べた (図1)。エンビジンの発現は、胎齢11.5日では、肝臓が最も大きく心臓、脳の順に少なかった。胎齢15.5日でも同様に肝臓での発現が心臓や脳に比べて高かった。脳では胎齢10.5日より胎齢15.5日で減少した。心臓では胎齢11.5日より胎齢15.5日の方がエンビジンの発現が少なかった。肝臓は、10.5日胚の脳よりも11.5

日胚と 15.5 日胚の両方でエンビジンの発現量が高くなっていた。

2. ウェスタンブロットによるエンビジンの検出

マウス胎児から脳、肝臓、心臓を採取し、エンビジンの発現を抗エンビジン抗体によるウェスタンブロットで調べた。代表的なウェスタンブロットの像を示す。11.5 日胚では、脳・肝臓・心臓のすべてで 66 kDa のエンビジンのバンドが認められた (図 2 A、矢印)。さらに、脳と肝臓では分子量の大きい側に淡いス

マなバンドが観察され、心臓では 66 kDa バンドを中心に上下に淡いバンドが認められた。これらの淡いバンドは糖タンパク質に負電荷をもつ糖鎖が付加している時にみられるものである。15.5 日胚においてもエンビジンは 66 kDa のバンドとして検出された (図 2 B、矢印)。脳では 66 kDa より上方にややスミアなバンドとなった。また、肝臓では分子量の大きいサイズのスミアなバンド (図 2 B、アスタリスク) が観察された。胎齢 15.5 日のウェスタンブロットについて、

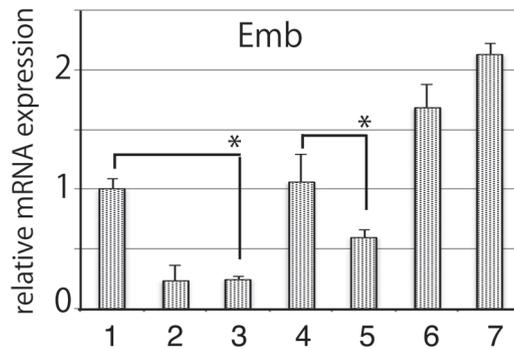


図 1 エンビジン mRNA 発現量の変化
 ベータアクチンを内部標準とし、胎齢 10.5 日のエンビジン mRNA の発現を 1 として、相対的な比を示した。レーン 1. E10.5 脳; 2. E11.5 脳; 3. E15.5 脳; 4. E11.5 心臓; 5. E15.5 心臓; 6. E11.5 肝臓; 7. E15.5 肝臓

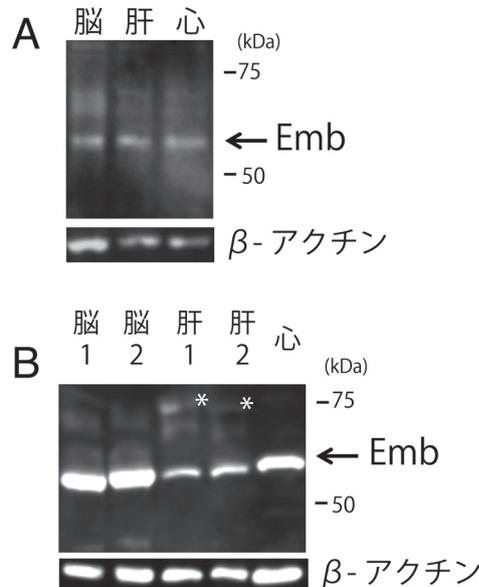


図 2 ウェスタンブロット法によるエンビジンタンパク質の検出
 胎齢 11.5 日マウス (A) と胎齢 15.5 日マウス (B) の脳、肝臓、心臓からタンパク質抽出した。10 % アクリルアミドゲルで分離し、PVDF 膜に転写後、抗エンビジン抗体 C20 または抗 β -アクチン抗体でウェスタンブロットを行なった。矢印はエンビジンの位置、* は肝臓エンビジンの高分子バンドの位置を示す。

β -アクチンとエンビジンのバンドの発光強度を測定し、 β -アクチンを内部標準としてエンビジンの発現量を比較すると、脳1、脳2ではそれぞれ4.60、5.42となり、肝1、肝2ではそれぞれ0.518、0.649、心は1.831となった。これらの結果から、66 kDaのエンビジタンパク質は脳でもっとも多く肝臓で少ないことがわかった。mRNAの発現が肝臓で多いことから、肝臓でのエンビジンは、66 kDaの他に異なる修飾を受けていることが予想された。

IV. 考察

マウスエンビジンの成熟ポリペプチドは296個のアミノ酸からなり約30 kDaの大きさとなる。細胞表面では糖鎖の付加により大きなサイズとなる。本研究ではエンビジンは66 kDaのバンドとして検出された。これは、培養細胞で強制発現させたエンビジンのサイズとも一致する¹⁴⁾。胎齢11.5日では、エンビジンは66 kDaバンドとともにスメアなバンドが検出された。一方、胎齢15.5日では66 kDaのバンドが明瞭に見られ、スメアなバンドは減少した。スメアなバンドは、負電荷の多い糖鎖を持つ糖タンパク質やプロテオグリカンに多く認められる^{13,15)}ことから、エンビジンは胎齢10.5日では負電荷の多い糖鎖を有するポリペプチドが多いこと、脳や心臓では胎齢15.5日までにその割合が減少した、あるいは糖鎖の構造が変化したと推定される。胎齢15.5日での肝臓は、mRNAの量が脳や心臓より多いにもかかわらず66 kDaバンドの強度は最も小さくなった。これは、肝臓のエンビジンでは66 kDaの構造の他にスメアなバンドが多く発現していると考えられる。実際にどのような糖鎖が付加されているかについては、エンビジンを精製して糖鎖の構造を解析する必要があると考えられる。

定量的PCRによって得られたmRNAの量がウェスタンブロットの66kDaのバンドの量と一致しないのは、エンビジンが付加された糖鎖の構造により必ずしも66kDaのサイズにならないことが理由と考えられる。特に、肝臓でスメアなバンドとなるエンビジンが多いことは、エンビジンが胎児期の肝臓の分化や機能に関係することが期待される。

文献

- 1) Ozawa, M., Huang, R., Furukawa, T., and Muramatsu, T. (1988) A Teratocarcinoma Glycoprotein Carrying a Developmentally Regulated Carbohydrate Marker Is a Member of the Immunoglobulin Gene Superfamily. *J Biol Chem.* **263**, 3059–3062
- 2) Huang, R., Ozawa, M., Kadomatsu, K., and Muramatsu, T. (1990) Developmentally regulated expression of embigin, a member of the immunoglobulin superfamily found in embryonal carcinoma cells. *Differentiation* **45**, 76–83.
- 3) Huang, R.-P., Ozawa, M., Kadomatsu, K., and Muramatsu, T. (1993) Embigin, a Member of the Immunoglobulin Superfamily Expressed in Embryonic Cells, Enhances Cell-Substratum Adhesion. *Developmental Biology* **155**, 307–314
- 4) Fan, Q.-W., Kadomatsu, K., Uchimura, K., and Muramatsu, T. (1998) Embigin/ Basigin subgroup of the immunoglobulin superfamily: Different modes of expression during mouse embryogenesis and correlated expression with carbohydrate antigenic markers. *Dev Growth Diff* **40**, 277–286
- 5) Yue, F., Cheng, Y., Breschi, A., Vierstra, J., and et al. (2014) A comparative encyclopedia of DNA elements in the mouse genome. *Nature* **515**, 355–364
- 6) Perez-Escuredo, J., Van Hee, V. F., Sboarina, M., Falces, J., Payen, V. L., Pellerin, L., and Sonveaux, P. (2016) Monocarboxylate transporters in the brain and in cancer. *Biochim Biophys Acta* **1863**, 2481–2497
- 7) Forero-Quintero, L. S., Ames, S., Schneider, H. P., Thyssen, A., Boone, C. D., Andring, J. T., McKenna, R., Casey, J. R., Deitmer, J. W., and Becker, H. M. (2018) Membrane-anchored carbonic anhydrase IV interacts with monocarboxylate transporters via their chaperones CD147 and GP70. *J Biol Chem*
- 8) Lain, E., Carnejac, S., Escher, P., Wilson, M. C., Lomo, T., Gajendran, N., and Brenner, H. R. (2009) A novel role for embigin to promote sprouting of motor nerve terminals at the neuromuscular junction. *J Biol Chem* **284**, 8930–8939
- 9) Silberstein, L., Goncalves, K. A., Kharchenko, P. V., Turcotte, R., Kfoury, Y., Mercier, F., Baryawno, N., Severe, N., Bachand, J., Spencer, J. A., Papazian, A., Lee, D., Chitteti, B. R., Srour, E. F., Hoggatt, J., Tate, T., Lo Celso, C., Ono, N., Nutt, S., Heino, J., Sipila, K., Shioda, T., Osawa, M., Lin, C. P., Hu, G. F., and Scadden, D. T. (2016) Proximity-Based Differential Single-Cell Analysis of the Niche to Identify Stem/Progenitor Cell Regulators. *Cell Stem Cell* **19**, 530–543
- 10) Chao, F., Zhang, J., Zhang, Y., Liu, H., Yang, C., Wang, J., Guo, Y., Wen, X., Zhang, K., Huang, B., Liu, D., and Li, Y.

- (2015) Embigin, regulated by HOXC8, plays a suppressive role in breast tumorigenesis. *Oncotarget* **6**, 23496
- 11) Ichihara-Tanaka, K., Titani, K., and Sekiguchi, K. (1990) Recombinant Carboxyl-terminal Fibrin-binding Domain of Human Fibronectin Expressed in Mouse L Cells *J. Biol. Chem.* **265**, 401–407
- 12) Ichihara-Tanaka, K., Kadomatsu, K., and Kishida, S. (2017) Temporally and Spatially Regulated Expression of the Linker Histone H1fx During Mouse Development. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* **65**, 513–530
- 13) Ichihara-Tanaka, K., Oohira, A., Rumsby, M., and Muramatsu, T. (2006) Neuroglycan C is a novel midkine receptor involved in process elongation of oligodendroglial precursor-like cells. *J Biol Chem* **281**, 30857–30864
- 14) 市原啓子 . (2018) 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 心身科学 **11**, 85-90
- 15) Muramatsu, T. (2000) Protein-bound carbohydrates on cell-surface as targets of recognition: An Odyssey in understanding them Takashi Muramatsu. *Glycoconjugate Journal* **17**, 577–595

(平成30年12月25日受理)

Expression patterns of embigin at mid-gestation stages of mouse development.

Keiko ICHIHARA-TANAKA

Abstract

Embigin is a cell surface transmembrane protein called GP70, which is classified as the immunoglobulin superfamily. Embigin is known to be the cofactor of monocarboxylate transporter 2. Recently embigin was found to promote cell growth and metastasis in some cancer tissues, but its function is not fully understood yet.

In this paper, to evaluate the gene expression of embigin at brain, heart and liver in the mid-gestation stages of mouse development, the quantitative polymerase chain reaction method was adopted. Furthermore embigin protein expression was examined by western blotting. Gene expression of embigin was reduced at brain and heart, and slightly increased at liver from E10.5 to E15.5. Embigin protein was detected as 66-kDa protein at brain, heart and liver at all the stages studied. Expression patterns of 66-kDa protein at brain and heart were consistent with the expression level of mRNA. At liver the 66-kDa protein level was low as compared to brain and heart at E15.5, but heterogeneous larger bands were observed. Thus embigin expressed at embryonic liver may have different post-translational modification from brain and heart. These results suggest that embigin may have some roles at liver development and function at embryonic stage.

Keywords : embigin, quantitative PCR, western blotting, mouse, development