

研究ノート

カイコ体液中に存在する細胞増殖抑制ならびに
脂肪蓄積促進活性因子に関する研究安達 健朗^{1,2)*}, 黒川 健児^{2)*}, 関水 和久¹⁾¹⁾東京大学大学院 薬学系研究科、²⁾長崎国際大学 薬学部 薬学科、*連絡対応著者)Identification and Characterization of a Growth Inhibitory- and Lipid
Accumulating-factor from Silkworm HemolymphTatsuo ADACHI^{1,2)*}, Kenji KUROKAWA^{2)*} and Kazuhisa SEKIMIZU¹⁾¹⁾Graduate School of Pharmaceutical Sciences, The University of Tokyo,²⁾Dept. of Pharmacy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki International University,

*Corresponding author)

Summary

Silkworm hemolymph induced both the cessation of growth and an increase in neutral lipids storage in the silkworm-derived cell line, BmN4. In this study, we identified a responsible blood factor showing growth-inhibitory and lipid-accumulating activity. We subjected the silkworm hemolymph to successive column chromatographies and measured the growth-inhibitory activity of each fraction. The final purified fraction showed the highest specific activity and a single band of 15 kDa protein on SDS-PAGE. The amino acid sequence revealed that the 15 kDa protein was *Bombyx mori* Niemann-Pick disease type C2 (BmNPC2) protein. A recombinant BmNPC2 protein exhibited growth-inhibitory activity comparable with the final purified fraction, indicating that this protein is responsible for the activity of silkworm hemolymph. Moreover, the recombinant BmNPC2 protein induced an increase in triglyceride storage in BmN4 cells. These results indicate that BmNPC2 protein regulates both cell growth and lipid metabolism in silkworm.

Key words

Bombyx mori, growth inhibitor, lipid metabolism

要 旨

カイコ (*Bombyx mori*) の幼虫体液中にはカイコ由来培養細胞の増殖を抑制する活性があることを見出した。また、カイコ体液によって増殖を阻害された細胞中には脂肪滴の形成が認められた。本研究ではこれらの細胞増殖抑制および脂肪蓄積促進活性の実体となるカイコ体液因子の解明を行った。カイコ体液を出発材料として、細胞増殖抑制活性を指標にタンパク質の精製を行った。6段階の精製過程の後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動において単一バンドを示す画分を得た。アミノ酸配列解析の結果、このタンパク質はカイコ Niemann-Pick disease type C2 (BmNPC2) タンパク質であると同定された。リコンビナント BmNPC2 タンパク質は細胞増殖抑制活性を示したことから BmNPC2 タンパク質がカイコ体液中の細胞増殖抑制活性の実体であることが示唆された。さらに、リコンビナント BmNPC2 タンパク質をカイコ培養細胞に添加することによって、細胞内トリグリセリド量の増大が認められた。以上の結果は、BmNPC2 タンパク質がカイコにおいて細胞増殖と脂質代謝を制御する体液性因子であることを示唆している。

キーワード

カイコ、増殖抑制因子、脂肪代謝

はじめに

細胞の増殖は個体の発生段階および環境条件によって正または負に調節されている。この制御機構が破綻すると、細胞の無秩序な増殖をきたし良性腫瘍やがんを発症する。細胞におけるエネルギー代謝は、増殖と同様に個体の発生段階および環境条件によって厳密に制御されている。細胞の増殖と代謝は体液中に存在するホルモンによって共役されている。代表的な例としてインスリンがあげられる。インスリンは血糖値の増大に伴って膵臓β細胞から放出されるホルモンであり、グリコーゲンや脂肪の合成といった同化反応を促進する。インスリンにはタンパク質の合成促進および分解抑制作用もあり、細胞の増殖を促進する活性があることが知られている。つまりインスリンは個体のエネルギー状態が高い時、すなわち良く摂食が行われている時に分泌され、個体の成長を促進し、余剰な栄養を蓄積させる作用があると考えられる。これらの作用を組織レベルで協調させるためにホルモンが用いられていることは合目的である。以上の観点から著者らは、細胞の増殖や代謝を制御する体液性因子を解明することはがんや代謝疾患の成因を理解し、治療法の確立につながると思えその解明に着手した。

昆虫はマウスなどの哺乳動物にくらべてライフサイクルが短く、コストが小さいことから多くの個体を実験に用いる可能であり、新規因子の探索に有効である。昆虫は体液などのサンプルを大量に集めること、および生理活性を試験する個体を大量に用いることが可能であるという点から生理活性を指標とした体液性因子の探索に有効である。代表的な例としてはカイコを用いた脱皮ホルモンの同定、同じくカイコを用いたインスリン様ペプチドであるボンビキシンの同定などがあげられる^{1,2)}。昆虫由来の培養細胞も多数樹立されており、生理活性を評価する対象として用いられる。この培養細胞を利用による生理活性物質の同定の例として Insect derived growth factor や Imaginal disc growth

factor の同定が挙げられる^{3,4)}。以上の観点から、昆虫の体液から細胞の増殖や代謝を制御する体液性因子を探索することが可能であると考えられる。

近年、カイコ由来培養細胞である BmN4 細胞に対して、ステロイド系抗炎症剤であるデキサメタゾンを添加した時、細胞増殖が抑制されることが報告された⁵⁾。デキサメタゾンは、マウス 3T3-L1 細胞を繊維芽細胞から脂肪細胞へ分化させる際に、インスリンとイソブチルメチルキサンチンと共に分化誘導ホルモンとして用いられる。BmN4 細胞に対するデキサメタゾン処理によって、細胞内に Oil red O 染色によって陽性となる小胞の形成が促進されたことから BmN4 細胞の脂肪蓄積が促進されたと考えられる⁵⁾。また、マウスにおける脂肪細胞の分化マーカー遺伝子 *adipocyte protein 2/fatty acid binding protein 4 (aP2/Fabp4)* のカイコにおけるホモログ *BmFABP1* の発現量も BmN4 細胞において上昇していた。これらの点から、BmN4 細胞は昆虫における脂肪蓄積細胞のモデルとなることが提案されている⁵⁾。さらに先行研究において、カイコの卵抽出物を添加することによって BmN4 細胞の細胞増殖が抑制され、脂肪蓄積が促進することが示されている⁵⁾。したがって、カイコの個体中には細胞の増殖を抑制する因子と脂肪蓄積を促進する因子が存在する、あるいはその両方の活性を有する因子が存在すると推定される。また、これらの処理は細胞の培養液に対する添加によって達成されることから、体液性因子であると著者らは考えた。先行研究においてはこの因子の実態が何であるかは明らかにされていない。また、BmN4 細胞に対するインスリンまたはイソブチルメチルキサンチンの単独添加によってはこれらの現象は誘導されないことから、インスリンとは異なる作用機構によって脂肪蓄積を促進する因子であると想定される。加えて、インスリンは細胞増殖に対して促進的に働くという点から考えてもインスリンとは作用が異なる。以上の点から、著者らはカイコ体

液中に細胞増殖を抑制する因子、ならびに脂肪蓄積を促進する因子が存在するという仮説を立て、この検証を試みた。なお本論文は文献6)で発表した結果の一部を引用し、新たに書き起こしたものである。

材料と方法

カイコは愛媛蚕種株式会社より購入し、5齢幼虫まで人工飼料を用いて飼育した。5齢幼虫の腹肢を切断することによって体液を回収した。カイコから株化された培養細胞 BmN4 は TC-100 培地 (Applichem) に 10% 牛胎児血清 (Hyclone) を添加した培地を用い、27°C において培養した。得られた体液を 60°C 30 分加熱処理した後、BmN4 細胞に添加する実験を行った。細胞内のトリグリセリド量は総脂質を Bligh-Dyer 法によって抽出した後、トリグリセリド E テストワコー (Wako) を用いて測定した。細胞増殖は [³H] チミジン取込みアッセイによって評価した⁶⁾。RNA の抽出、cDNA の調製、定量的 RT-PCR、ならびに *BmFABPI* に対するプライマーは既報の方法^{5,6)} に準じた。また、*BmNPC2* の RT-PCR プ

ライマーは Forward: 5'cgcggaagggtttctttcgactt3'、Reverse: 5'ggccggtcttgagcttagttg3' を用いた。

結 果

1. カイコ体液による BmN4 細胞の増殖の抑制および脂肪蓄積の促進

著者らはカイコ体液中に細胞増殖抑制因子が存在するという本研究の仮説を検証するために、カイコ体液を添加した培地を用いて BmN4 細胞の培養を行った。カイコの体液を 5% あるいは 10% 添加した培地を用いて BmN4 細胞を培養し、経時的に細胞数を計測したところ、対象とした PBS 添加群と比べて細胞数が小さかった (図 1)。このカイコ体液による細胞増殖の抑制はカイコ体液をプロテアーゼ処理することによって失われたことから、細胞増殖抑制活性の実態はタンパク質であると著者らは推定した。先行研究において、デキサメタゾンまたはカイコ卵抽出物の添加によって BmN4 細胞の増殖の抑制と脂肪蓄積の促進が同時に誘導されることから、カイコの体液中の添加によっても脂肪蓄積の促進が誘導されるのではないかと考えこれを検証した。カイコ体液を 10% 添加して 2 日間培養した BmN4 細胞を Oil Red O 染色に供したところ、対象とした生理食塩水添加群と比べて Oil Red O 陽性の小胞の形成が促進されていた (図 2)。また、同様に 2 日間処理した細

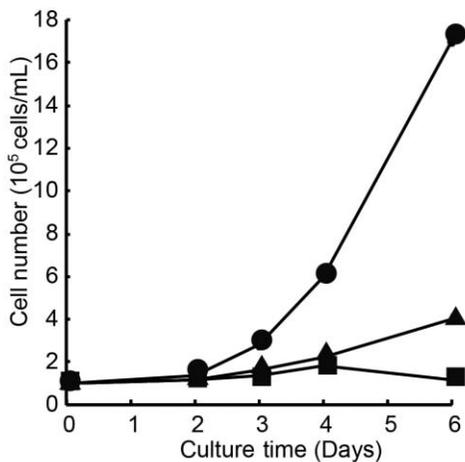
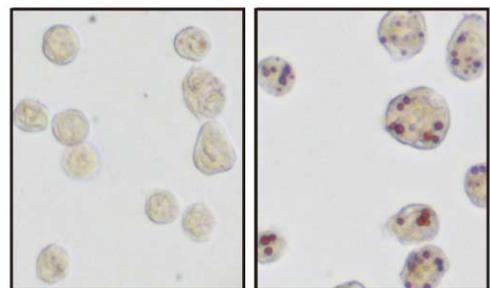


図 1 カイコ体液による BmN4 細胞の増殖抑制

カイコ体液を 0% (●)、5% (▲)、10% (■) 添加した培地を用いて BmN4 細胞を培養し、血球計算盤を用いて経時的に細胞数を計測した。図は独立に行われた 2 回の実験のうち代表的な例を示す。文献 6) より改変。



生理食塩水 カイコ体液

図 2 カイコ体液による脂肪滴の形成促進

カイコ体液または生理食塩水を 10% 添加した培地を用いて BmN4 細胞を 2 日間培養し、Oil Red O 染色を行った。文献 6) より改変。

胞から総脂質画分を調製し、酵素定量法によってトリグリセリドの量を定量した。その後、細胞数で除することによって細胞あたりのトリグリセリド量を計算したところ、カイコ体液の添加によって細胞のトリグリセリド蓄積量が増大していることが分かった。さらに、先行研究によってデキサメタゾン処理によって誘導することが見いだされている *BmFABP1* の発現上昇がカイコ体液によっても誘導されるか否かを検証した。カイコ体液を10%添加し2日間培養した BmN4 細胞から RNA を抽出し、逆転写反応によって cDNA を調製した後、定量的 RT-PCR によって *BmFABP1* の発現量を測定した。その結果、対象とした生理食塩水添加群に比べてカイコ体液添加群の方が *BmFABP1* の発現量が大きかった (図3)。以上の結果は、カイコ体液中に BmN4 細胞の増殖を抑制する因子、および脂肪蓄積を促進する因子が存在することが示唆している。

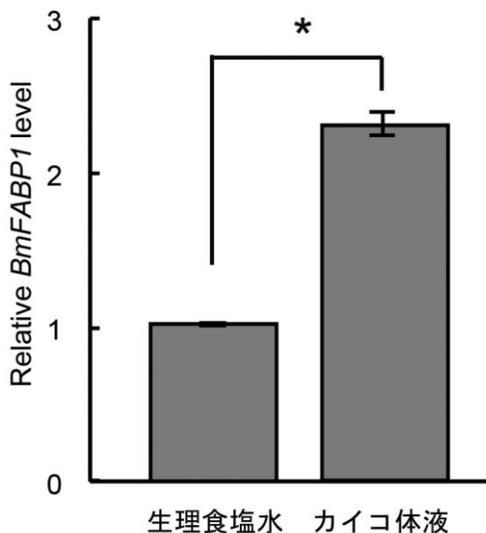


図3 カイコ体液による *BmFABP1* の発現誘導

カイコ体液または生理食塩水を10%添加した培地を用いて BmN4 細胞を2日間培養し、定量的 RT-PCR 法によって *GAPDH* を内部標準とした相対的な *BmFABP1* の mRNA 量を定量した。データは平均値±標準誤差 ($n=3$) を示す。*; $p<0.05$ 。文献6)より改変。

2. 細胞増殖抑制因子の精製

次に著者らは、カイコ体液中に存在する細胞増殖抑制因子の同定を試みた。まず、カイコ体液による細胞増殖抑制を細胞数計測よりも短い時間で、かつ定量性に優れる手法として $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みアッセイに着目した。カイコ体液を培地に添加し、24時間後の BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み量を測定した。その結果、カイコ体液の用量依存的に BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みが抑制された (図4)。さらに、この $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み抑制活性が、プロテアーゼ感受性であるか否かを検討した。その結果、カイコ体液中の BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み抑制活性は、細胞数計測の結果と同様にプロテアーゼ処理によって失われたことから、この活性の実体はタンパク質であると考えられた。著者らは BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みを30%抑制する活性を1Unit と定義し、カイコ体液から比活性の上昇を指標とした精製を試みた。カイコ体液中の $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み抑制活性の比活

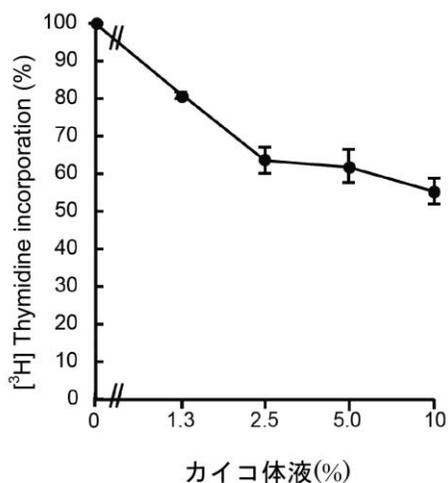


図4 カイコ体液による BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みの抑制

カイコ体液を0, 1.3, 2.5, 5, 10%添加して BmN4 細胞を24時間培養し、 $[^3\text{H}]$ チミジンを加えてさらに6時間培養した後、細胞の10%トリクロロ酢酸不溶性画分中の放射活性を測定した。データは平均値±標準誤差 ($n=3$) を示す。文献6)より改変。

表1 カイコ体液中の細胞増殖抑制因子の精製

Fraction	Total activity (Unit)	Protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)	Purification (fold)
I. Hemolymph	3,500	2,100	1.7	100	1
II. Ammonium Sulfate	2,600	1,600	1.6	74	0.9
III. Heparin Toyopearl	660	58	11	19	6.5
IV. Butyl Toyopearl	320	8.6	37	9.1	22
V. Mono S	500	2.5	200	14	120
VI. Superose12	850	1.8	470	24	280

BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みを30%抑制する活性を 1Unit と定義した。各精製段階のタンパク質量を Bradford 法によって測定し、比活性を求めた。

性は、硫酸沈殿、Heparin Toyopearl、Butyl Toyopearl、Mono S、Superose12 カラムクロマトグラフィーにより上昇した(表1)。Mono S カラムクロマトグラフィーのフラクションを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したところ分子量 15kDa のタンパク質のバンド強度と BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み抑制活性の挙動の一致していた(図5 上段)。Superose12 ゲルろ過カラムクロマトグラフィーのフラクションにおいてタンパク質量と BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み抑制活性の挙動の一致が見られた(図5 上段)。また、活性を有するフラクションを SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析したところ分子量 15kDa のタンパク質の単一バンドが見出された(図5 下段)。これらの結果から著者らは、カイコ体液中の BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込

み抑制因子を精製することができたと判断した。

SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって分離された 15kDa のタンパク質をトリプシン消化し、逆相 HPLC を用いて分離した後、エドマン分解法によってアミノ酸配列を決定することによって、内部アミノ酸配列を解析した。その結果、カイコ Promoting Protein として報告されているタンパク質の部分配列と一致した。Promoting Protein はカイコ培養細胞に対するウイルス感染を促進するタンパク質として報告されている⁷⁾。また、Promoting Protein はヒトの Niemann-Pick disease type C2 (NPC2) タンパク質のカイコホモログである⁸⁾。以降は Promoting Protein/BmNPC2 タンパク質を BmNPC2 タンパク質と記載する。著者らは、BmNPC2 タンパク質が最終精製画分中の細胞増殖抑制因子の実体であるか否かを検証するために、BmNPC2 タンパク質のリコンビナントタンパク質の作出を試みた。BmNPC2 タンパク質の C 末端に 6×His-tag を融合させた cDNA をウイルスベクターに組み込み発現ベクターとした。作成されたウイルスベクターを、昆虫のリコンビナントタンパク質発現細胞として用いられる Sf9 細胞に感染させ、培養した。得られた培養上清をコバルトイオンによるアフィニティカラムクロマトグラフィーにより精製し、リコンビナント BmNPC2 タンパク質画分とした。リコンビナント BmNPC2 タンパク質は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の CBB 染

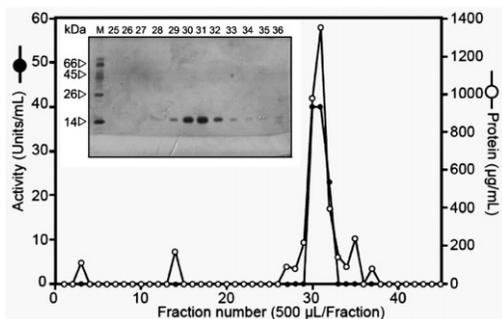


図5 Superose12 カラムクロマトグラフィー

Superose12 のクロマトグラムおよび SDS-PAGE による解析結果を示す。文献 6) より改変。

色によって単一バンドを示した。得られたリコンビナント NPC2 タンパク質を培地に添加することによって BmN4 細胞の $[^3\text{H}]$ チミジン取り込みが抑制された。また、その比活性はカイコ幼虫体液から得た最終精製画分の60%程度であった。さらに、リコンビナントタンパク質画分を添加した培地を用いて BmN4 細胞を2日間培養した結果、細胞増殖が抑制されていた(図6)。これらの結果から著者らは、カイコ体液中に存在する BmN4 細胞の増殖抑制因子の実体は BmNPC2 であると結論した。

3. BmNPC2 タンパク質による BmN4 細胞の脂肪蓄積の促進

BmNPC2 タンパク質がカイコ体液中の細胞増殖抑制活性の実体である結論した一方で、カイコ体液を BmN4 細胞に添加した時に見られたトリグリセリド蓄積の促進因子の実体は明らかではない。デキサメタゾン処理によって BmN4 細胞の増殖抑制と脂肪蓄積の促進が同時に達成されること、および NPC2 遺伝子のノックダウンによりヒト脂肪細胞においてトリグリセリド

蓄積が減弱することから⁹⁾、著者らは BmNPC2 タンパク質によって BmN4 細胞の脂肪蓄積が促進されるのではないかと考えこの検証に着手した。BmNPC2 タンパク質を添加して2日間培養した BmN4 細胞を Oil Red O 染色に供したところ、対象としたバッファー添加群と比べて Oil Red O 陽性の小胞の形成が促進されていた(図7)。また、同様に2日間処理した細胞から総脂質画分を調製し、酵素定量法によってトリグリセリドの量を定量した。その結果、BmNPC2 タンパク質の添加によって細胞のトリグリセリド蓄積量が増大していることが分かった。さらに、カイコ体液によってみられた BmN4 細胞における *BmFABP1* の発現量が上昇するかどうかを検討したところ、BmNPC2 タンパク質の用量依存的にこの遺伝子の発現量の増大が認められた。以上の結果は、BmNPC2 タンパク質によって BmN4 細胞の脂肪蓄積が促進されることを示唆している。したがって、BmNPC2 タンパク質はカイコ体液中の細胞増殖抑制活性と脂肪蓄積促進活性の双方に寄与していると結論した。

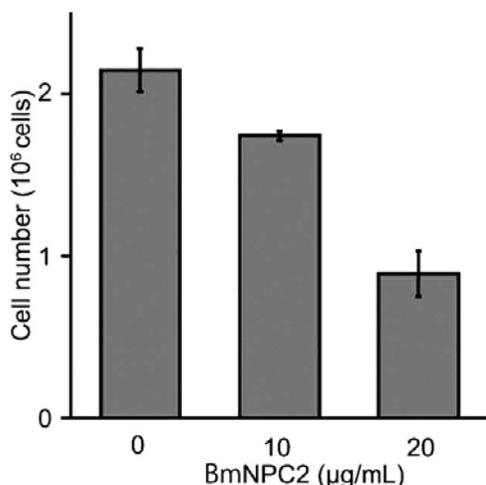


図6 BmNPC2 による細胞増殖の抑制

リコンビナント BmNPC2 タンパク質を添加した培地を用いて、BmN4 細胞を2日間培養し、血球計算版を用いて細胞数を計測した。データは平均値±標準誤差 (n=3) を示す。文献6)より改変。

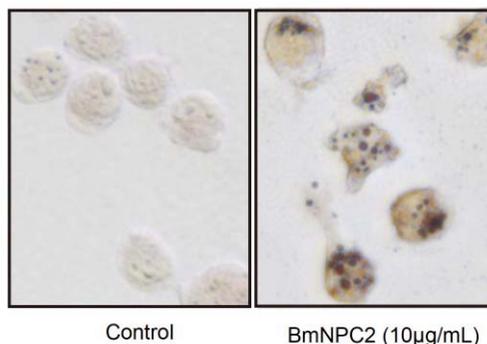


図7 BmNPC2 による脂肪滴の形成促進

BmNPC2 タンパク質またはバッファ (Control) を添加した培地で BmN4 細胞を2日間培養し、Oil Red O 染色を行った。文献6)より改変。

4. BmNPC2 タンパク質によるカイコ脂肪体における脂肪蓄積の促進

次に著者らは、BmNPC2 タンパク質がカイコ個体においてトリグリセリド蓄積に寄与するの否かについて検討した。まず、NPC2 タンパク質が産生される組織を知るために、5 齢 4 日目カイコ幼虫から脂肪体、腸管、唾液腺、絹糸腺、マルピーギ管を摘出し、定量的 RT-PCR 法によって BmNPC2 タンパク質の mRNA 量を測定した。その結果、他の組織に比べて脂肪体における BmNPC2 タンパク質の発現量が顕著に大きいことが分かった (図 8)。脂肪体は、昆虫において脂肪組織と肝臓の機能を果たすと考えられている。常に摂食しているカイコは最終齢である 5 週齢幼虫に脱皮した後、一週間程度で蛹化のため繭を作る。このとき、5 週齢幼虫初期から蛹化にかけて単調増加的に脂肪体に脂肪を蓄積する。通常飼育している 5 週齢カイコの脂肪体を経時的に摘出し、BmNPC2 タンパク質の mRNA 量を定量した結果、5 週齢 2 日目から 4 日目にかけて BmNPC2 タンパク質の mRNA 量が増大していた。この結果は、BmNPC2 タンパク質がカイコ脂肪体の脂肪蓄積を促進するという著者らの仮説と矛盾しない

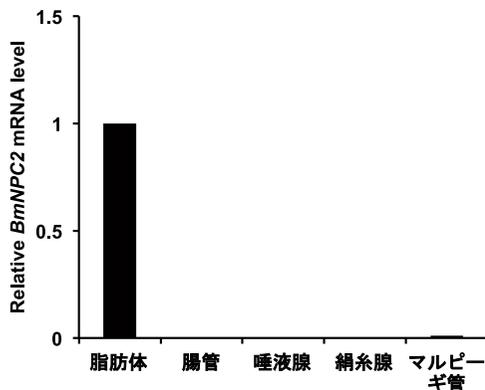


図 8 カイコ組織における BmNPC2 の発現解析

5 週齢 4 日目カイコ幼虫を解剖し、脂肪体、腸管、唾液腺、絹糸腺、マルピーギ管を摘出した。それぞれの組織から RNA 画分を調製、cDNA を作成後、定量的 RT-PCR 法により *Rpl* を内部標準とした BmNPC2 の mRNA 量を定量した。図は脂肪体における mRNA 量を 1 とした相対的な発現量を示す。

結果である。さらに、5 週齢 2 日目からカイコに対する給餌を中止し、2 日間飢餓状態にするという飢餓条件を与えた。そして、毎日人工飼料を与え続けた場合と、飢餓条件を与えた場合とで BmNPC2 タンパク質の mRNA 量を定量した。その結果、飢餓条件を与えたカイコ脂肪体における BmNPC2 タンパク質 mRNA の発現量は飼料を与え続けた場合と比べて約 2.5 倍大きかった (図 9)。また、飢餓条件を加えた後、2 日間人工飼料あるいは 10% グルコース餌を与えたカイコの脂肪体では、飢餓直後と比べて BmNPC2 タンパク質の mRNA レベルが約 40% に減弱していた。これらの結果は、BmNPC2 タンパク質が飢餓ストレス時に発現誘導されることを示している。

次に、BmNPC2 タンパク質が脂肪体における脂肪蓄積を促進するの否かを検証した。カイコ体液内にリコンビナント BmNPC2 タンパク質を注射してカイコを飼育した後、脂肪体を摘出しトリグリセリド量を定量した。その結果、BmNPC2 タンパク質を注射したカイコの脂肪

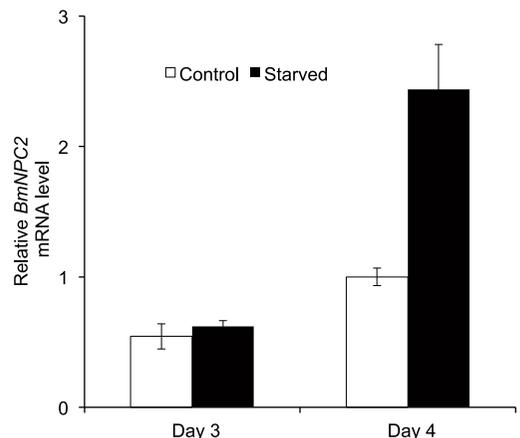


図 9 飢餓条件による BmNPC2 の発現誘導

5 週齢 2 日目からカイコに対する給餌を中止し、2 日間飢餓状態にするという飢餓条件を与えた群 (Starved)、および毎日人工飼料を与え続けた群 (Control) から脂肪体を摘出し、定量的 RT-PCR 法により *Rpl* を内部標準とした BmNPC2 の mRNA 量を定量した。データは 5 週齢 4 日目の Control 群の平均値を 1 とし平均値 ± 標準誤差 ($n=3$) を示す。

体においてトリグリセリド蓄積量の上昇が認められた(図10左)。さらに、内因性の BmNPC2 タンパク質がカイコ脂肪体における脂肪蓄積に寄与するか否かの検証を試みた。リコンビナント BmNPC2 タンパク質をウサギに免疫し、BmNPC2 タンパク質に対する抗血清を作出した。得られた抗血清の力価および特異性をウエスタンブロッティングにより評価したところ、抗血清は 1 ng の BmNPC2 タンパク質を検出することができ、カイコ体液から分子量 15kDa のタンパク質を単一バンドとして検出した。この抗血清を注射したカイコから脂肪体を摘出し、トリグリセリド量を定量したところ、トリグリセリド蓄積量の減弱が見られた(図10右)。これらの結果から、BmNPC2 タンパク質はカイコ個体においても脂肪細胞の分化誘導に寄与することが示唆される。

考 察

BmN4 細胞は昆虫における脂肪蓄積細胞の分化モデルとして応用できることが提唱されている。これは、哺乳動物細胞の分化誘導刺激によって脂肪蓄積が促進されることに加えて、細胞増殖が抑制されること、脂肪酸結合タンパク質をコードする遺伝子 *BmFABP1* の発現が誘導されることを根拠としている⁵⁾。脂肪蓄積の促進、細胞増殖の抑制、脂肪酸結合タンパク質の発現上昇はマウス脂肪細胞分化モデルである 3T3-L1 細胞において観察される特徴である。すなわち、脂肪細胞における脂肪蓄積という機能は、細胞増殖とトレードオフの関係にあると推察される。本研究において著者らが見いだした、BmNPC2 タンパク質が BmN4 細胞の増殖抑制とトリグリセリド蓄積促進の両方を誘導するという結果はこの概念と一致するものである。ここから著者らは、BmNPC2 タンパク質は脂肪細胞の分化に関与していると考えに至った。増殖抑制

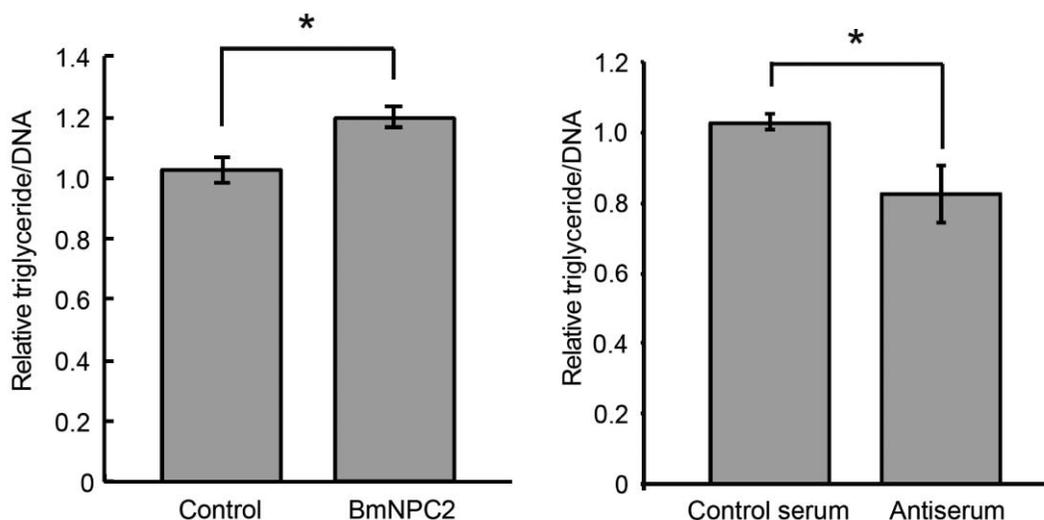


図10 BmNPC2 または抗 BmNPC2 タンパク質抗血清によるカイコ脂肪体におけるトリグリセリド蓄積の変化

(左図) 5 週齢 2 日目カイコ幼虫に対してのリコンビナント BmNPC2 タンパク質、または Buffer (Control 群) を 50 μ L 注射し 24 時間後、脂肪体を摘出した。破碎した脂肪体から Blich-Dyer 法により総脂質画分を調製しトリグリセリド量を定量した。また、フェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール法によって DNA 画分を調製し A_{260} の吸光度を用いて定量した。トリグリセリド量を DNA 量で除した値を非注射群の値を 1 とし平均値 \pm 標準誤差 ($n=4$) を示す。

(右図) 5 週齢 2 日目カイコ幼虫に抗 BmNPC2 タンパク質血清あるいは通常ウサギ血清を注射し、72 時間後に脂肪体を摘出した。同様の方法により相対的なトリグリセリド蓄積量を算出した。データは平均値 \pm 標準誤差 ($n=8$) を示す。*; $p < 0.05$ 。文献 6) より改変。

と機能発現の他に、細胞の形態変化も細胞分化の指標とされる事がある。BmN4 細胞は球形の弱附着性細胞であるが、著者らはカイコ体液を添加した BmN4 細胞の一部が伸展する形態変化を起こすことを見いだしている。加えて、光学顕微鏡にて十分観察可能な小胞の形成が起っていた。また、この形態変化は精製の途中段階のすべての活性画分においても観察された。これらの結果も、BmNPC2 タンパク質による細胞分化誘導という仮説を支持するものである。Niemann-Pick disease は神経変性疾患として知られている。NPC2 タンパク質はヒトおよびマウスにおいてユビキタスに発現しているが、グリア細胞、肝臓細胞、血球細胞、脂肪細胞などにおいて発現が高い。NPC2 タンパク質によるこれらの細胞や組織における増殖分化の制御という観点から NPC 疾患の病体の解明に迫ることができると著者らは考えている。また、特に脂肪細胞、脂肪組織の増殖分化における NPC2 タンパク質の機能がカイコ個体、およびマウスにおいて明らかにされることにより肥満などの代謝疾患の病体の理解につながると考えられる。

参考文献

- 1) Butenandt A, Karlson P. Über die Isolierung eines Metamorphose-Hormone der Insekten in kristallisierter Form. *Zeitschrift für Naturforschung*. 1954; 96: 389-91.
- 2) Nagasawa H, Kataoka H, Hori Y, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Guo F, Zhong XC, Mizoguchi A, Fujishita M, Takahashi S, Ohnishi E, Ishizaki H. Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from *Bombyx mori*. *Gen Comp Endocrinol*. 1984 Jan; 53(1): 143-52.
- 3) Homma K, Matsushita T, Natori S. Purification, characterization, and cDNA cloning of a novel growth factor from the conditioned medium of NIH-Sape-4, an embryonic cell line of *Sarcophaga peregrina* (flesh fly). *J Biol Chem*. 1996 Jun 7; 271(23): 13770-5.
- 4) Kawamura K, Shibata T, Saget O, Peel D, Bryant PJ. A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development*. 1999 Jan; 126(2): 211-9.
- 5) Akiduki G, Imanishi S. Establishment of a lipid accumulation model in an insect cell line. *Arch Insect Biochem Physiol*. 2007 Nov; 66(3): 109-21.
- 6) Adachi T, Ishii K, Matsumoto Y, Hayashi Y, Hamamoto H, Sekimizu K. Niemann-Pick disease type C2 protein induces triglyceride accumulation in silkworm and mammalian cell lines. *Biochem J*. 2014 Apr 1; 459(1): 137-47.
- 7) Kanaya T, Kobayashi J. Purification and characterization of an insect haemolymph protein promoting in vitro replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J Gen Virol*. 2000 Apr; 81(Pt 4): 1135-41.
- 8) Berger AC, Vanderford TH, Gernert KM, Nichols JW, Faundez V, Corbett AH. *Saccharomyces cerevisiae* Npc2p is a functionally conserved homologue of the human Niemann-Pick disease type C2 protein, hNPC2. *Eukaryot Cell*. 2005 Nov; 4(11): 1851-62.
- 9) Csepegi C, Jiang M, Frolov A. Somatic cell plasticity and Niemann-pick type C2 protein: adipocyte differentiation and function. *J Biol Chem*. 2010 Sep 24; 285(39): 30347-54.