

博士論文

論文題目 Niemann-Pick disease type C2タンパク質による
細胞増殖抑制ならびに脂肪蓄積促進機構の解明

氏 名 安達 健朗

目次

目次	2
序論	3
本論	
第一章	
第一節 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因子の同定	
緒言	11
結果	13
考察	33
材料と方法	34
第二節 カイコ BmN4 細胞を用いた NPC2 タンパク質による脂肪蓄積促進機構の解明	
緒言	39
結果	42
考察	64
材料と方法	66
第二章 マウス 3T3-L1 細胞を用いた NPC2 タンパク質による脂肪蓄積促進機構の解析	
緒言	69
結果	71
考察	91
材料と方法	94
第三章 マウス FM3A 細胞を用いた NPC2 タンパク質による細胞増殖抑制機構の解析	
緒言	98
結果	99
考察	115
材料と方法	117
総括	119
文献	122
謝辞	127

序論

1. 「生命とは何か」と問うこと

「生命とは何か」という問いは、およそ有史以来から続く謎である。いつ如何なる時代においても人類の好奇心の中心の一つに存在する疑問である。はじめに、なぜこのような疑問が生じるのかについて考察したい。すべての生物は利己的であるという前提を導入しよう。言い換えれば、いかなる生物もその性質において自ら、ないし種が存続する指向性を持つ、という前提である。もちろんそれぞれの生物種に生存するためという意味を設定するのは適切ではない。そのためにはその生物「種」にインタビューして確認する必要がある。ここで利己的であるとするのは次のような観点から見かけ上利己的であるという理由による。生物の進化は多様性の許容と環境要因による淘汰によるならば、現存するある生物の性質は特定の環境下において淘汰されないものである。すなわち生存に適した性質を有するということになる。このプロセスがあたかも自身に有利な性質を選択して獲得するように解釈することができるため、生物は利己的であるという前提をおいた。生物は利己的な存在であるという概念は、個体の一生というより短い期間においても当てはめることが可能である。つまり、個体の行動はその個体が存在する生物集団の存続のために作用していると考えて見かけ上問題がない。ここで、なぜヒトは「生命とは何か」という疑問を持つのかという問題について考える。上記の前提によれば、それがヒトの生存にとって有利だったからであるということになる。「知る」という行為は未知に対する防衛行為であると私は考える。すなわち未知の現象、未知の存在からの生命の危機を防ぐ、あるいはより効果的な生存方法を探索するという精神が生命に対する知的好奇心の源泉なのではないだろうか。そしてそのような思索から宗教が成立し、生命とは何か、人間とはいかなる存在かを説いた宗教が人々の信仰を集め、人間社会の基軸となったのではないかと推察する。前近代に至るまでの「生命とは何かという」問いかけの意義は推測の域を出ないが、近代に入るとより直接的で実践的な効用を持つ「医学」が発展し、この問いかけにもっともらしい正当性が付加されることになる。この段階では「ヒトとは何か」という意味合いが強い。以上が、人類がなぜ「生命とは何か」と考えるかについての所見である。

2. 生命科学を研究する意義

次に、我々は生命とは何かを追求すべきか否かについて論ずる。生命科学研究を推進すべきか否かと言い換えることができる。生命科学研究は短いスパンでみれば、医学、医療の発展に寄与するという人類に対する直接的な貢献が考えられる。もう少し幅を広げて、自然科学全体について考察する。現代社会において自然科学研究は社会的活動の一環であり、現在未来にわたって人類の幸福に資さないものは一般的に認められないと私は考えている。人類の幸福とは「安心感、安定感、非不安定状態である」と私は考えている。人が社会的な存在である以上、所属するコミュニティの安定度合いが個々人の幸せに強く影響を与えるだろう。ではコミュニティが幸せになるためには何が必要か。避けるべき事象は、外部からの攻撃、内部に生じた不和、構成員の減少などによるコミュニティの不安定化、または破綻である。この避けるべき事態を回避する方法の一つとして前述した宗教が貢献していたのではないだろうか。宗教の役割はコミュニティにおける共通理解、教訓、行動の指針を提示することある。そしてその正しさは神、教典、偶像などの崇拝によって担保されてきた。しかし、様々な観察の中からこの宗教の不完全性が明らかになることがしばしば起きた。コペルニクスの地動説がもっとも代表的であろう。現代において天動説を信じる者がどれほどいるだろうか。この争いにおいて地動説が勝利をおさめたのは、「すべての観測が地動説によってよく説明できる」という事態が起きたからである。人間が観測、観察をいかに重要としているかがうかがわれる。これは人間が認識の大部分を視覚情報に依存している生物だからである。例えば、神が実際に目に見える存在であれば、人々の宗教への信頼はやすやすとは失われないだろう。そこで視覚情報に特化した新しい宗教（に類するもの）として、自然科学が多くの信仰を集めることとなった。今日に至っては、「科学的に証明されている」「科学的な根拠がある」などの文言は、あたかもそれが絶対の真実であるかのように受け止められる。この妥当性についてはここでは言及しない。転じて、自然科学は現代に生きる人、またはコミュニティにとっての共通理解、行動の指針を提示する強力な概念となっている。したがって自然科学の正当性を評価しつつ、さらに発展させる事は、人間社会の幸福に資するところである。そして、生命科学もその一環としてやはり推進すべきであると私は考える。

3. 生命科学における薬学領域の位置づけ

自然科学研究はいわば問題解決の連続である。問題解決はさらに問題の設定と解決の2つのプロセスに分けることができる。問題設定のプロセスが特に困難である。ここでいう問題とは言うまでもなく解決可能なという修飾が付随する。したがって適切な問題設定がなされれば解決は可能である。博士号取得者はこの問題設定能力が求められ、すなわち研究主宰者に求められる能力であると私は考えている。自然科学研究における問題とは、新規性があり、かつ重要である課題を指す。言い換えればこれまで誰も知らなかった、と同時に自然科学の発展に寄与する知見を得ることが課題である。この問題を設定するためには既存の研究の知識に充実し、研究の将来の姿を見据えることが必要である。生命科学研究のアプローチとして医歯薬学領域の他に、理学領域、農学領域などと形式的には分類できる。これらの領域が分け隔てなく協調的に生命科学研究を推進することが理想であるが、それぞれの分野で専門性を発揮することが逆説的に円滑な融合研究につながると私は考えている。そこで、生命科学研究における医歯薬学領域の立ち位置を考察したい。医歯薬学領域では病気や疾患の存在が問題設定における指針の一つになる。世の中に存在する様々な疾患にはその背景にある生命現象が存在し、その理解が十分ではないものに関して社会的な問題を引き起こすことが多い。つまり、我々の理解が不十分であり、かつ重要な課題というヒントはここから得ることができる。これが生命科学における医歯薬学領域のアプローチ方法である。薬学領域ではさらに創薬を念頭において研究の将来を予想することが求められる。薬は医療行為の中でも非侵襲的であり、剤型によっては安価であることから比較的広範囲の人々を対象にとることができる。薬学領域から生命科学にアプローチする科学者はこの創薬への貢献を期待されていると私は考えている。以上が、生命科学研究における、特に問題設定の点から見た薬学領域の立ち位置である。

4. 生命科学研究の方法論

次に、問題を解決する手法について述べる。科学的な問題の解決とは、より実際的にはその問題に対して有効な仮説の提示、ならびに検証である。有効な仮説であるか否かは、ある生命現象をよりよく説明するかという点、ならびにその仮説に基づいて次の問題設定と解決が進展するかという点において評価される。以下では、前者を評価することを仮説の検証と呼び、これについて論ずる。仮説の検証手法は現在の生命科学研究では生化学、遺伝学、構造生物学、細胞生物学、生理学等に代表的に分類される。もちろんこれらに変わる新しい手法は日々開発されつつあるが、その手法の妥当性はやはり一旦これらの手法によって評価されるべきであるから今は問題にしない。ある生命現象をよりよく説明する仮説であるか否かは、必要性和十分性の評価による。例えば、ある表現型（生命現象）をある遺伝子が支配するという仮説を検証する時、その遺伝子を欠失させた個体が、対照となる個体に比べてその表現型を欠く時、その遺伝子はその表現型に必要であると推定する、という検証が行われる。ただし、この推論自体の妥当性はこのプロセスの中では担保されない。これはいわゆる遺伝学という分野で扱われる前提であるに過ぎない。同様にそれぞれの研究手法においてドグマのようなものが存在する。我々は、その前提の上に推論を重ねているということに常に留意しなければならないだろう。各研究手法においてドグマとその限界が存在するため、複数の研究手法を組み合わせる仮説の検証を行うのが一般的である。研究手法の妥当性について次に問題となるのは、どのようなモデルを用いるかという点である。モデルにも適応できる限界がある。本論文では、カイコ *Bombyx mori* と培養細胞をモデルとした。前者は動物の生理モデル、後者は体液因子に曝された局所組織のモデルである。まず、前者を動物の生理モデルとして用いる妥当性を考察する。動物は発生におけるボディープラン、および代謝機構において保存性が高い。ショウジョウバエをモデルとした遺伝学的な研究から動物における初期発生に関わる遺伝子群が数多く同定された。近年では同様に、ショウジョウバエを用いた研究からマウスにおける肥満因子が同定されている(Pospisilik *et al*, 2010)。また、当研究室ではこれまでにカイコが高血糖動物のモデルとして応用できるということを提案している(Matsumoto *et al*, 2011)。これらの点から、昆虫であるカイコをモデル動物として用いることによって動物の発生やエネルギー代謝に与る生理機構を探索することが可能であると私は考えている。研究が可能であるという点に加えて、カイコをモデル動物とした研究には次のような利点があると考えられる。コストの低さ、飼育の簡便さ、倫理的な問題の小ささ、注射などの実験手技の容易

さ、体液の回収の容易さである。特に、ショウジョウバエと比較して考えるならば、カイコは遺伝学的な手法が不十分である一方、体液採取による体液因子の解析の容易さ、注射による生理学実験の容易さが特徴的であると考えられる。私はショウジョウバエを用いた遺伝学的な解析では発見できなかった新しい機能を持つ体液因子をカイコとその培養細胞を用いた生理学的手法によって同定することが可能であると考えカイコを研究対象とした。私が次に着目したのは培養細胞の活用である。細菌や真菌といった単細胞生物は文字通り 1 個の細胞として生きている。一方、動物を始めとする多細胞生物は明らかに多細胞であることに利点を生み出しており、むしろほとんどの場合多細胞の状態でなければ生存することは適わない。ゆえに多細胞生物において、細胞同士が互いにどのように相互作用を及ぼし合っているのかは生命の理解において重要な課題である。そのためには、個体から細胞を独立させて細胞の応答性を観察することが必要不可欠であり、培養細胞が体液因子の研究においても有効な研究材料となりうるだろう。また、薬学領域の立場から考えても、このような体液因子を研究することは重要である。すなわち、このような体液因子を介した細胞同士の相互作用機構は薬の作用点として重要であり、体液因子が細胞に受容されて表現型を示す一連の過程を解明することによって創薬への道が大きく開かれると考えられるからである。したがって私は体液因子の探索および機能解析を行う手法として培養細胞を用いた。

5. 細胞増殖ならびに代謝を制御する体液性因子の探索

本論文において私は、細胞増殖および代謝を制御する新規体液性因子あるいは新規機能の発見を試みた。私が体液性因子を研究する理由は、前述したように多細胞生物の在り方を知るという興味深い対象であるという点と、創薬という観点から有効な知見が得られると考えたためである。次に、細胞増殖と代謝の制御因子を研究する理由を述べる。多細胞生物の細胞は、隣接する場合を除き、細胞外に体液性因子を放出することにより、他の細胞に影響を与える。細胞が他の細胞に与える影響としてもっとも重要な現象の一つとして増殖の制御がある。細胞の無秩序な増殖は組織や器官の機能を損なうため、萎縮あるいは肥大した組織が形成されないよう個体全体に協調した細胞増殖の制御が必要となる。このため細胞外の因子によって細胞増殖を制御することは理にかなっている。一方、個体のエネルギー代謝の恒常性の維持においても体液性因子が重要な役割を果たしている。ここで、細胞の増殖と代謝の関連に言及したい。不死化された培養細胞はおおむねクローナルな増殖を続ける。生体内ではこのような分裂はマイナーでありこれを行うのは幹細胞、リンパ球、そしてがん細胞がよく知られている。これ以外の細胞分裂は娘細胞の性質が変更される。これが細胞分化である。そして細胞の増殖は一定以上分化を経ると停止する。代謝の場として重要な役割を果たす細胞は、例えば肝細胞、脂肪細胞、筋肉細胞などであるがこれらは一般的に終末分化細胞と呼ばれており、積極的な増殖は行っていない。つまり細胞は増殖する段階と、機能を発揮する段階の切り替えを行っていると考えることができる。したがって、細胞の増殖と代謝は密接に関係している。これらを制御する体液性因子を明らかにすることは、組織や器官がどのようにして一定の形に形成され、また代謝機能を発揮するのかをという「生命とは何か」という問いに迫るものであると私は考えている。加えて、このような体液性因子の理解は、現代社会において問題となっているがんや肥満をはじめとする代謝疾患の成因を解明し、治療法の開発につなげる上で必要不可欠である。したがって私は本研究において細胞増殖ならびに代謝を制御する体液性因子の探索ならびに機能解析に着手した。

第一章

第一節

カイク体液中に存在する細胞増殖抑制
ならびに脂肪蓄積促進因子の同定

緒言

細胞の増殖は動物個体の発生段階および栄養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、短期的には怪我や感染症などに付随する炎症に応じて調節される部分もあるが、増殖と同様に個体の発生段階および栄養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ホルモンによって共役されている例が知られている。代表的な例としてインスリンがあげられる(Manning, 2004)。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。以上の観点から私は、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考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。特にショウジョウバエを用いた遺伝学的解析は、単一遺伝子欠損であれば網羅的スクリーニングを行うことが可能である。一方で、遺伝子欠損ライブラリを用いる方法では、発生時に致死になってしまう遺伝子や、遺伝子重複によって類似機能の遺伝子が複数存在する時にはこのスクリーニングに漏れが生じると考えられる。一方で、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も有効である。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(Nagasawa *et al*, 1984)。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(Homma *et al*, 1996; Kawamura *et al*, 1999)。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(Dexamethasone)を添加した時、細胞増殖が抑制されることが報告された(Akiduki & Imanishi, 2007)。デキサメタゾンはマウスにおける脂肪細胞のモデルである 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(Isobutylmethylxanthine)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(Akiduki & Imanishi, 2007)。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(Akiduki & Imanishi, 2007)。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(Akiduki & Imanishi, 2007)。したがって、カイコの個体中には細胞の増殖を抑制する活性を有する因子と脂肪蓄積を促進する活性を有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私は考えた。なお、先行研究においてはこの因子の実体は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、私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。

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

私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 (Figure 1-1)。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体はタンパク質であると私は推定した (Figure 1-2)。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 (Figure 1-3)。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 (Figure 1-4)。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 (Figure 1-5)。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。

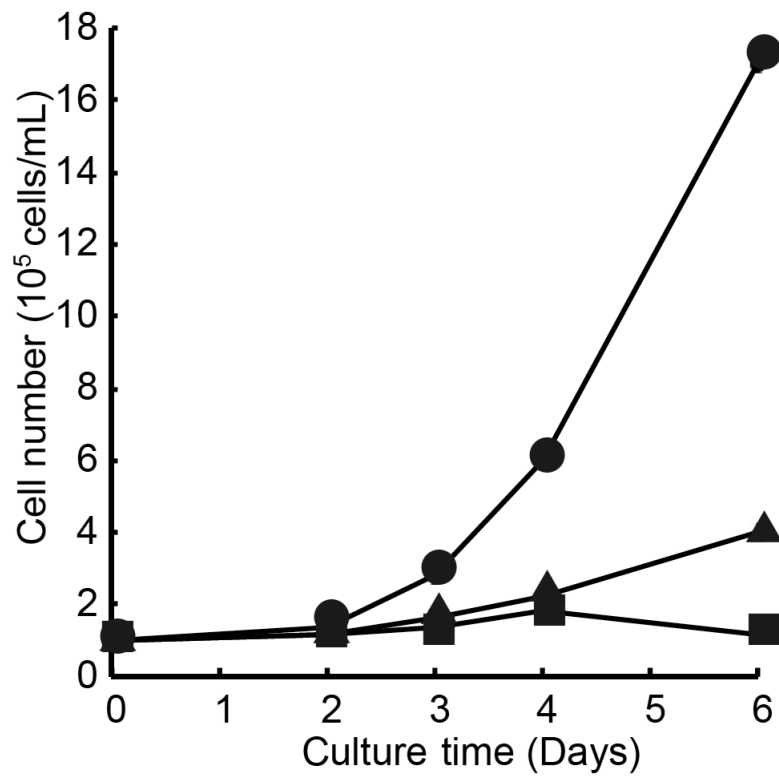


Figure 1-1 カイコ体液による BmN4 細胞の増殖抑制

カイコ体液を 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。●: PBS を 10% 添加した TC-100 10%FBS、▲: PBS を 5%, カイコ体液を 5% 添加した TC-100 10%FBS、■: カイコ体液を 10% 添加した TC-100 10%FBS

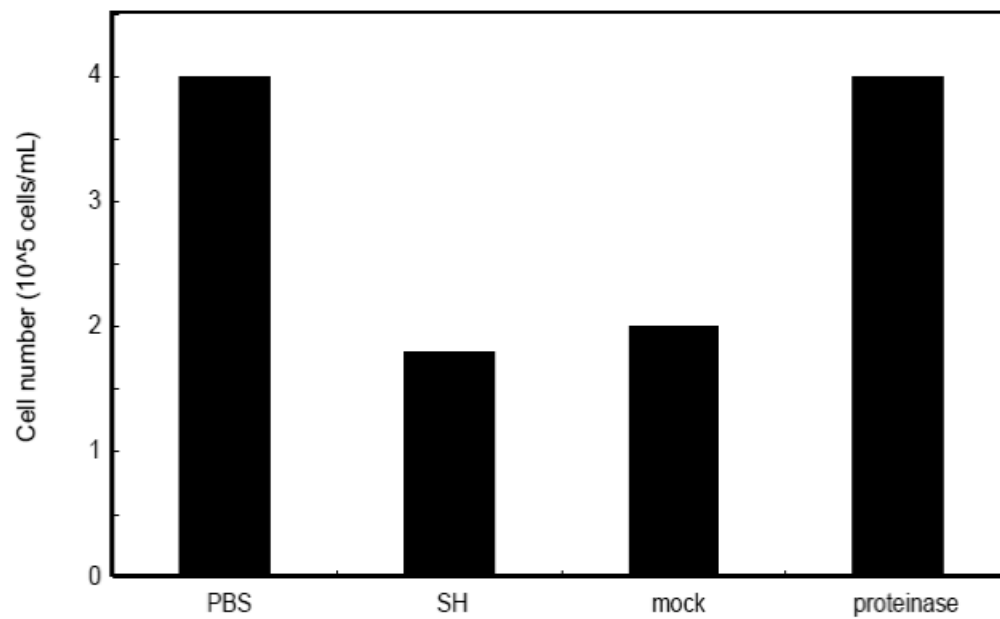
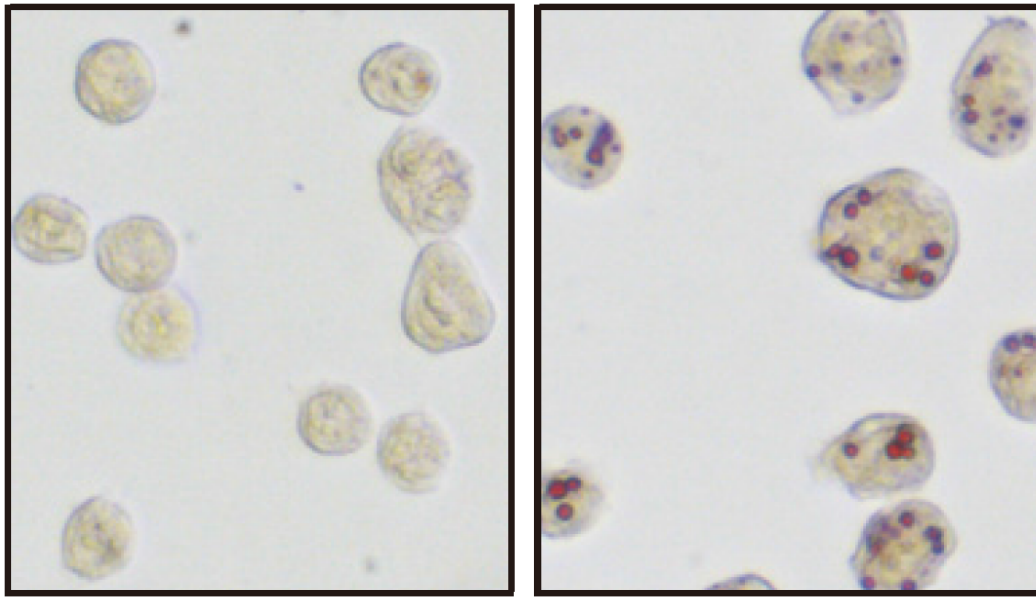


Figure 1-2 プロテアーゼ処理によるカイコ体液の細胞増殖抑制活性の消失

カイコ体液、あるいはプロテアーゼ処理したカイコ体液を 10% 添加した培地を用いて BmN4 細胞を 3 日間培養し、血球計算盤を用いて細胞数を計測した。SH:カイコ体液 mock:37°C 16 時間インキュベートしたカイコ体液、Proteinase:プロテアーゼを加え 37°C 16 時間インキュベートしたカイコ体液



Control

Hemolymph

Figure 1-3 カイコ体液による脂肪滴の形成促進

カイコ体液 (Hemolymph) または生理食塩水 (0.9% NaCl; Control) 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。

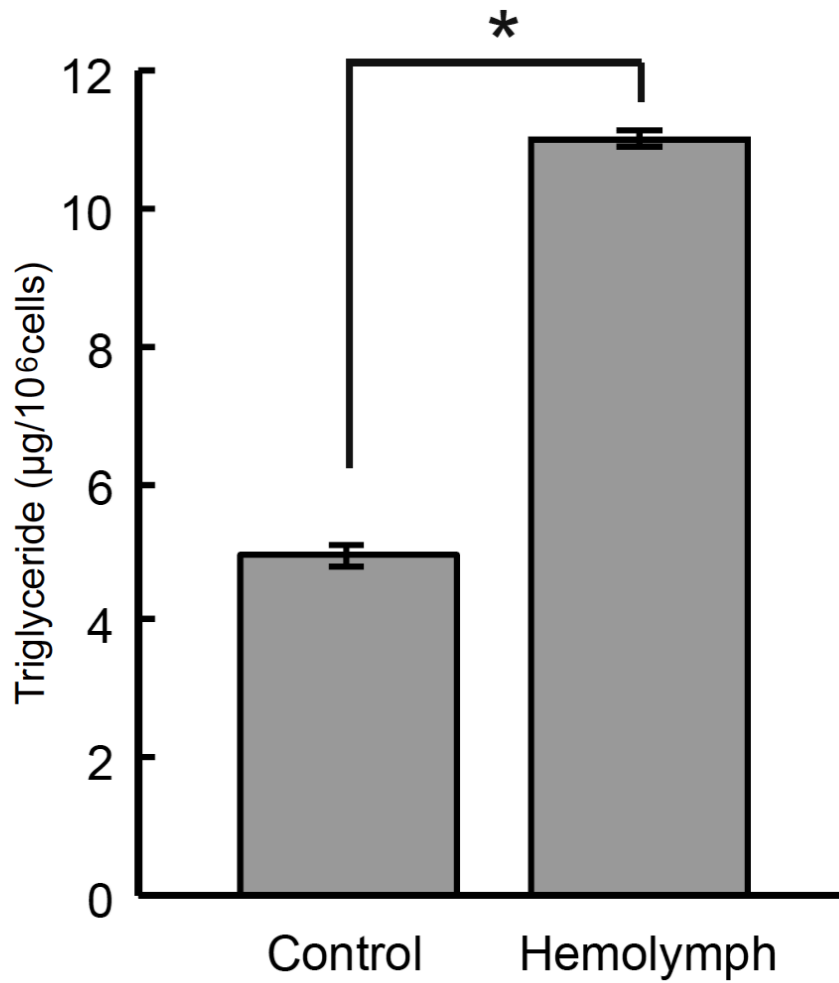


Figure 1-4 カイコ体液によるトリグリセリド蓄積の促進

カイコ体液 (Hemolymph) または生理食塩水 (0.9% NaCl; Control) を 10% 添加した培地を用いて BmN4 細胞を 2 日間培養し、Bligh-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。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。

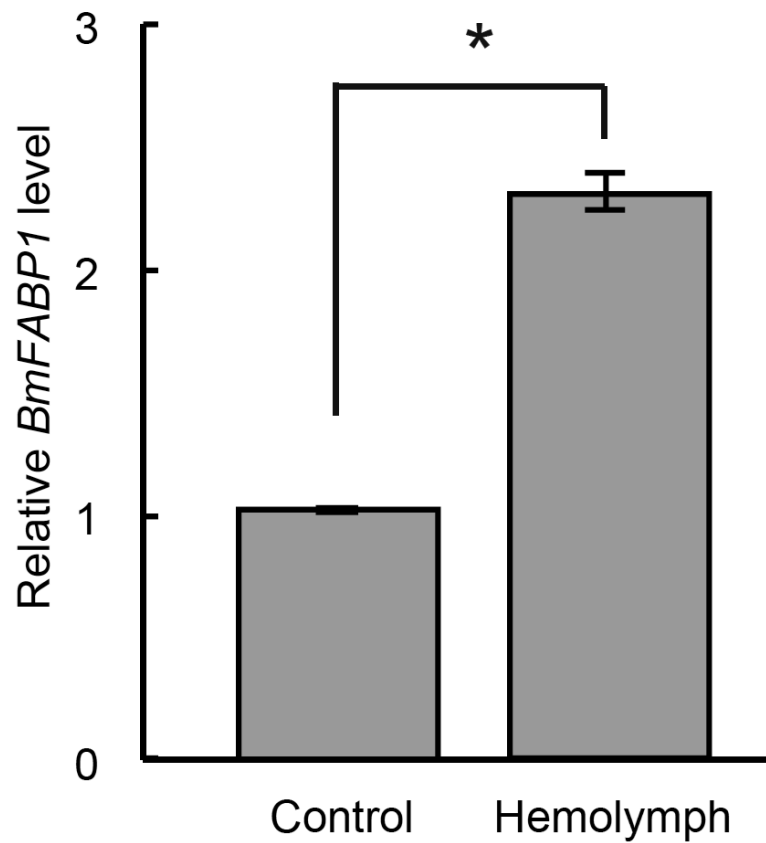


Figure 1-5 カイコ体液による *BmFABP1* の発現誘導

カイコ体液 (hemolymph) または生理食塩水 ((0.9% NaCl; Control)) 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。

*, $p<0.05$ 。

2. 細胞増殖抑制因子の精製

次に私は、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 (Figure 1-6)。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 (Figure 1-7)、この活性の実体はタンパク質であると考えられた。私は 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 1 Unit 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 (Table 1-1)。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 (Figure 1-8)。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 (Figure 1-9)。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 (Figure 1-9)。これらの結果から私は、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 15 kDa 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 (Figure 1-10A)。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(Kanaya & Kobayashi, 2000)。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(Berger *et al*, 2005)。以降は Promoting Protein/カイコ NPC2 タンパク質を BmNPC2 タンパク質と記載する。私は、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金属キレート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 タンパク質はウェスタンブロットによって His-tag が検出されることが確認された (Figure 1-10B)。かつ、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の CBB 染色によって単一バンドを示した (Figure 1-10B)。得られたリコンビナント BmNPC2 タンパク質を培地に添加することによって BmN4 細胞の [³H]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 (Table 1-2)。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 (Figure 1-11)。これらの結果から私は、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。

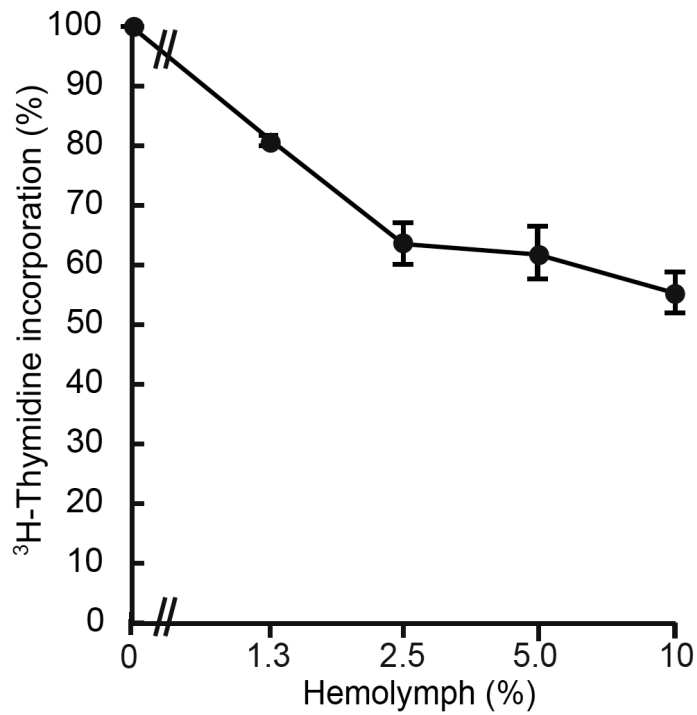


Figure 1-6 カイコ体液による BmN4 細胞の [³H]チミジン取り込みの抑制

カイコ体液(Hemolymph)を 0, 1.3, 2.5, 5, 10%添加して BmN4 細胞を 24 時間培養し、 [³H]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。

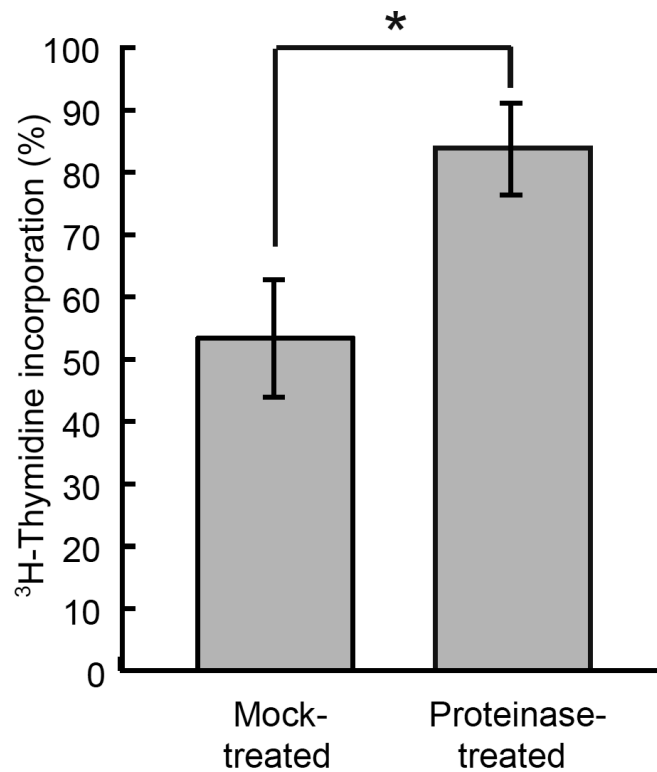


Figure 1-7 Proteinase 処理によるカイコ体液中の^{[3]H}チミジン取り込みの抑制活性の減弱

Proteinase 処理(37°C 16 時間)または偽処理のカイコ体液を 10%添加して BmN4 細胞を 24 時間培養し、^{[3]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。*; $p<0.05$ 。

Table 1-1 カイコ体液中の [^3H]チミジン取り込みの抑制因子の精製

Fraction	Unit	Protein mg	Specific activity U/mg	Recovery %	Purification fold
I. Hemolymph	3500	2100	1.7	100	1
II. Ammonium Sulfate	2600	1600	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 [^3H]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。

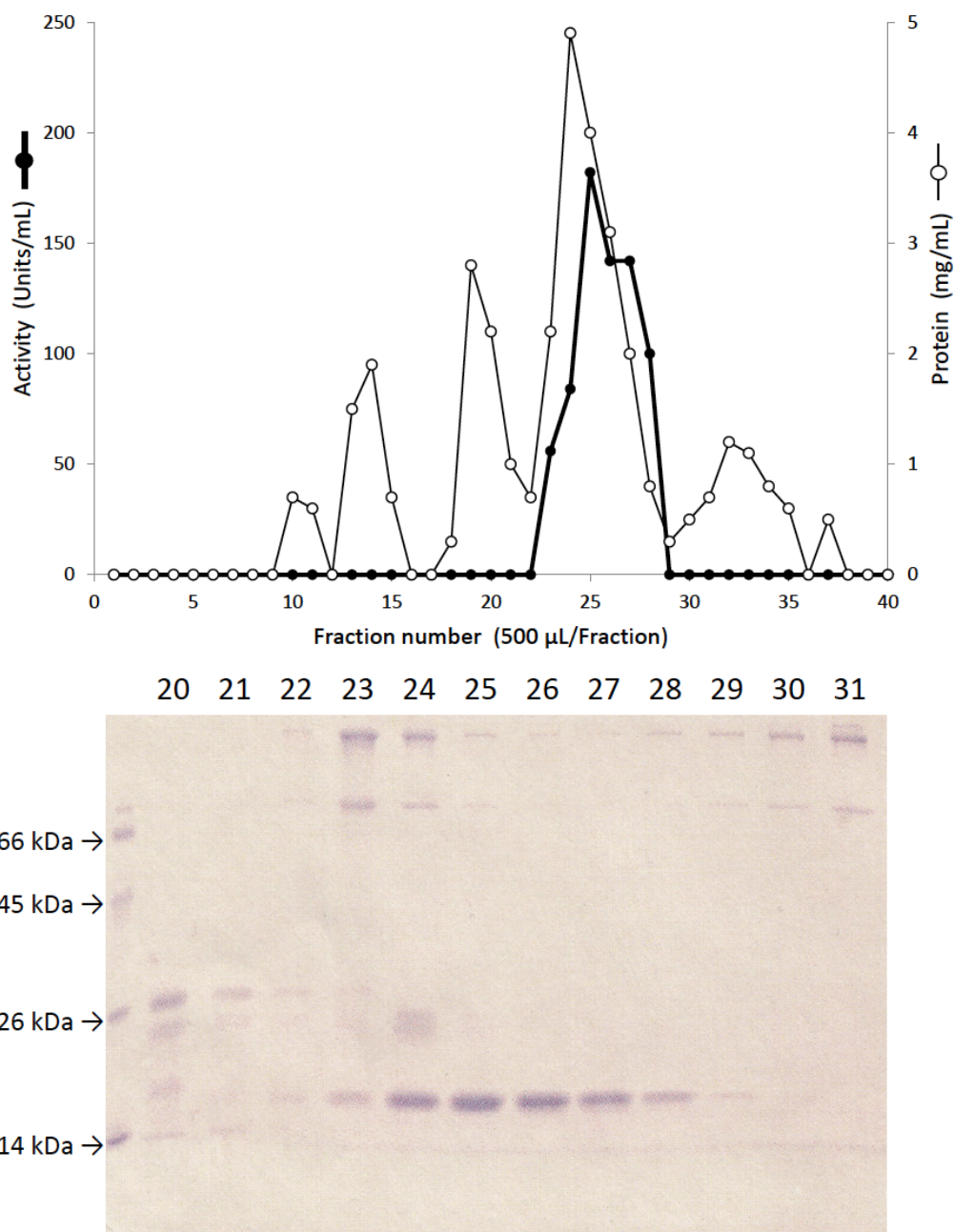


Figure 1-8 Mono S カラムクロマトグラフィー

Butyl Toyopearl 画分を Mono S 陽イオン交換カラムに供し 0 mM ~ 500mM NaCl を用いてグラジエント溶出させたクロマトグラムを示す(上段)。活性を有するフラクションを 15 % SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した(下段)。

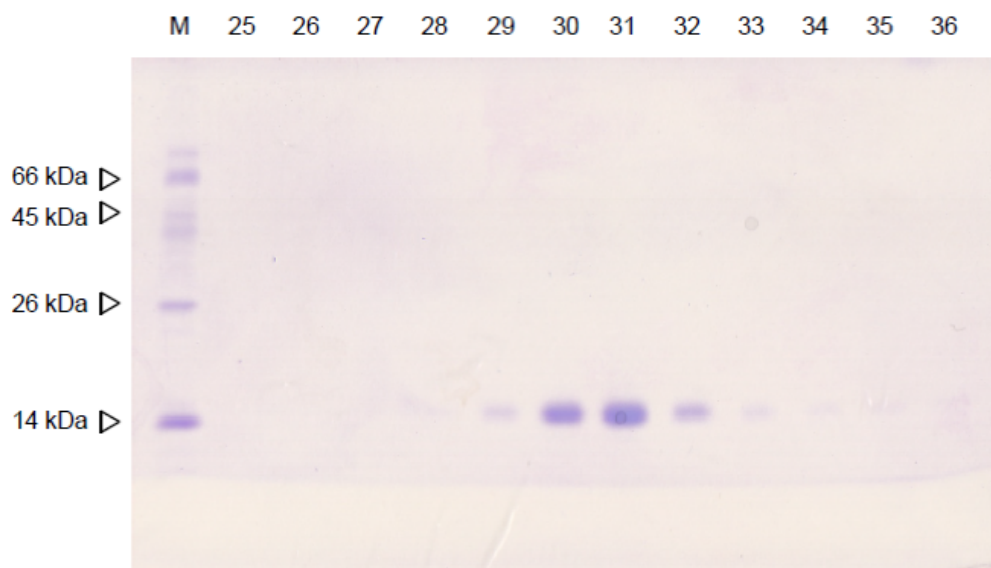
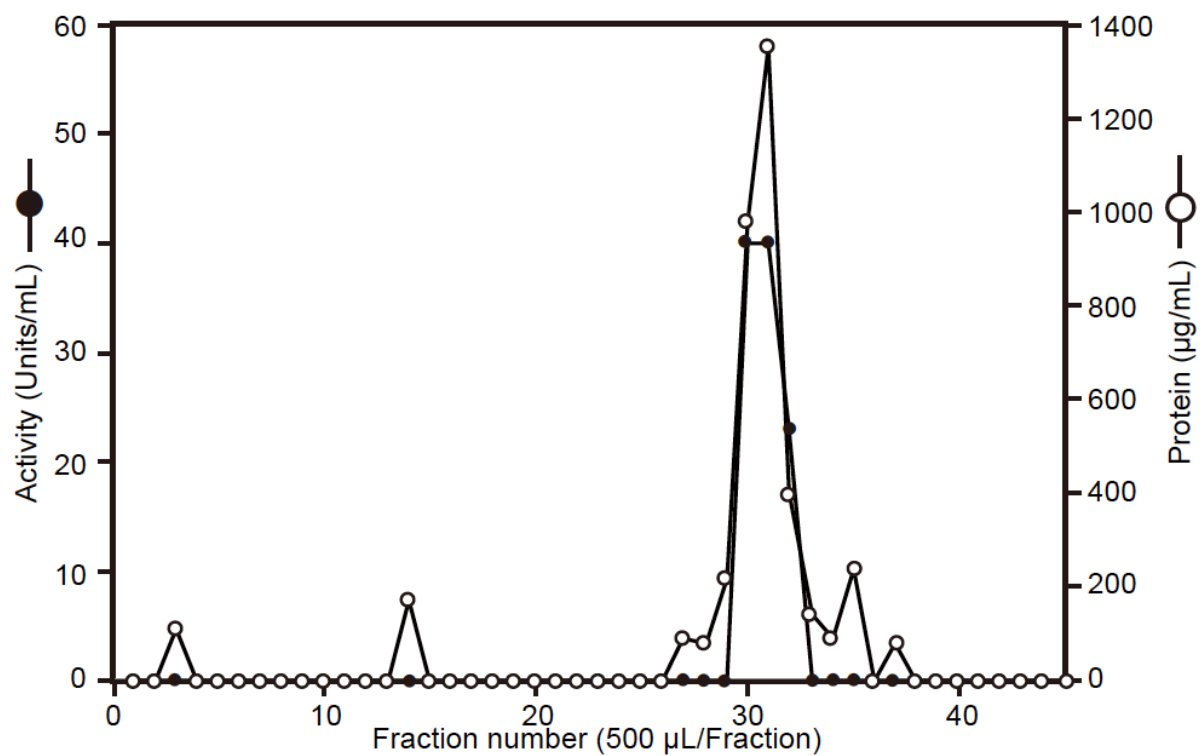


Figure 1-9 Superose 12 カラムクロマトグラフィー

Mono S 画分を Superose 12 ゲルろ過カラムを用いて分析したクロマトグラムを示す(上段)。活性を有するフラクションを 15 % SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって解析した(下段)。

A

MALYSSLLFAAFLGCGLA**EFNVV**
 TTRLCREVDASACTVNEVRIDPC
 VNSRLCHLKKGKNAK**VSFDFT**PQ
 FSTTKLKTGLFGLKNGAEIPFDA
 LYNADACTLTSCPTEAGKTQTLD
 FSLHIGKKLPTGNFEFKWKLWNE
 DNESQMCCYRTNVRLV

B

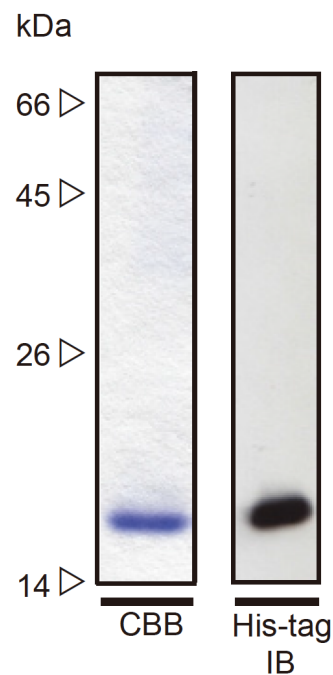


Figure 1-10 リコンビナント BmNPC2 タンパク質の作出

A. BmNPC2 の全アミノ酸配列を示す。黒枠; 本研究によって同定された2つの内部アミノ酸配列。下線部; シグナルペプチド配列。B. 作出したリコンビナントBmNPC2タンパク質をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、CBB染色または抗His-tag抗体を用いたウェスタンブロットにより検出した。

Table 1-2 最終精製画分とリコンビナントタンパク質の比活性の比較

Fraction	Specific activity U/mg
VI. Superose 12	450
Recombinant WT	260
Recombinant F90A	250

カイコ体液から精製した BmNPC2 タンパク質画分と野生型あるいは F90A 変異型リコンビナント BmNPC2 タンパク質画分の BmN4 細胞に対する^{[3]H}チミジン取り込み抑制活性を示す。

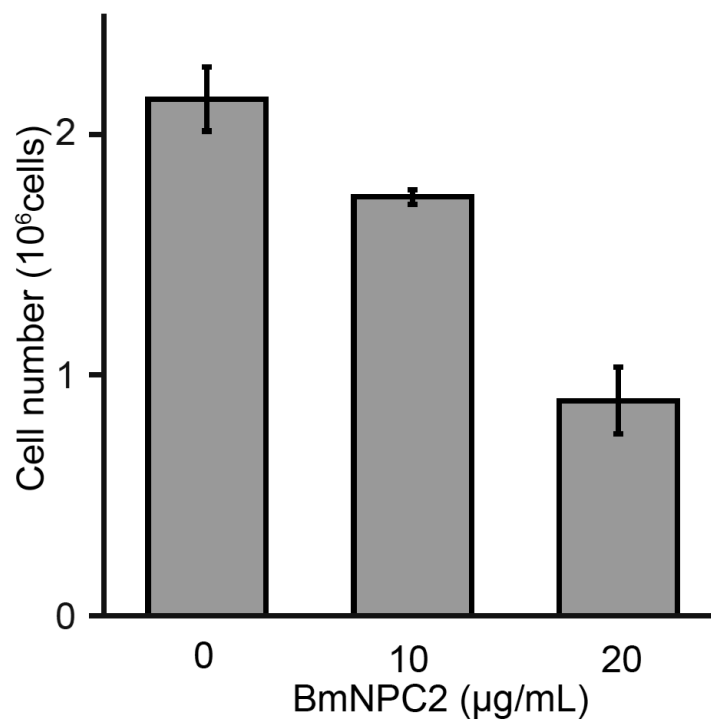
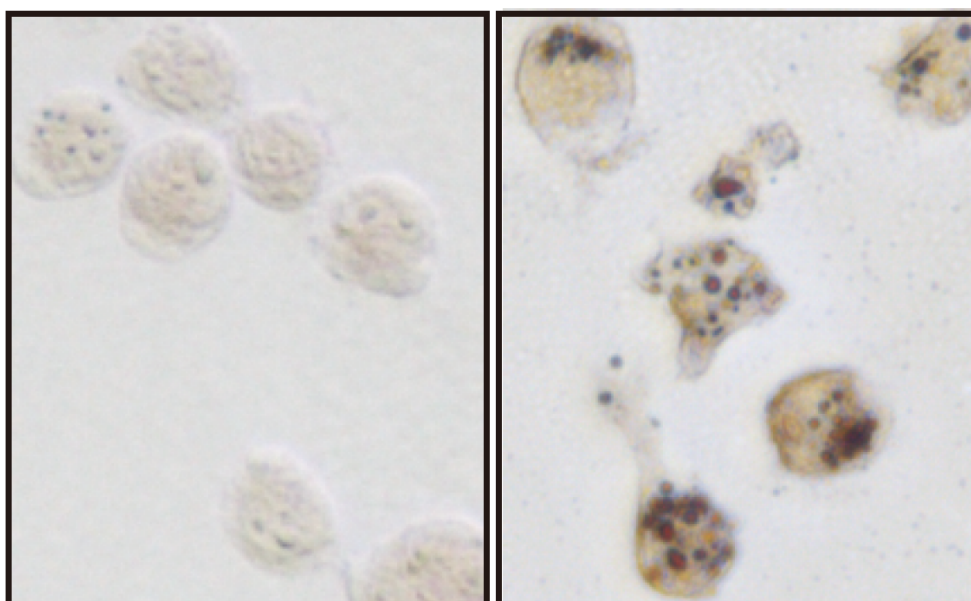


Figure 1-11 リコンビナント BmNPC2 タンパク質による BmN4 細胞の増殖抑制

リコンビナント BmNPC2 タンパク質を添加した培地を用いて、初期細胞数 8×10^5 個の 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 \pm 標準誤差($n=3$)を示す。

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(Csepegi *et al*, 2010)、私は 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 (Figure 1-12)。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 (Figure 1-13)。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否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 (Figure 1-14)。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推定される。



Control

BmNPC2 (10µg/mL)

Figure 1-12 BmNPC2 タンパク質による脂肪滴の形成促進

リコンビナント BmNPC2 タンパク質(10µg/mL)またはバッファ (Control)を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。

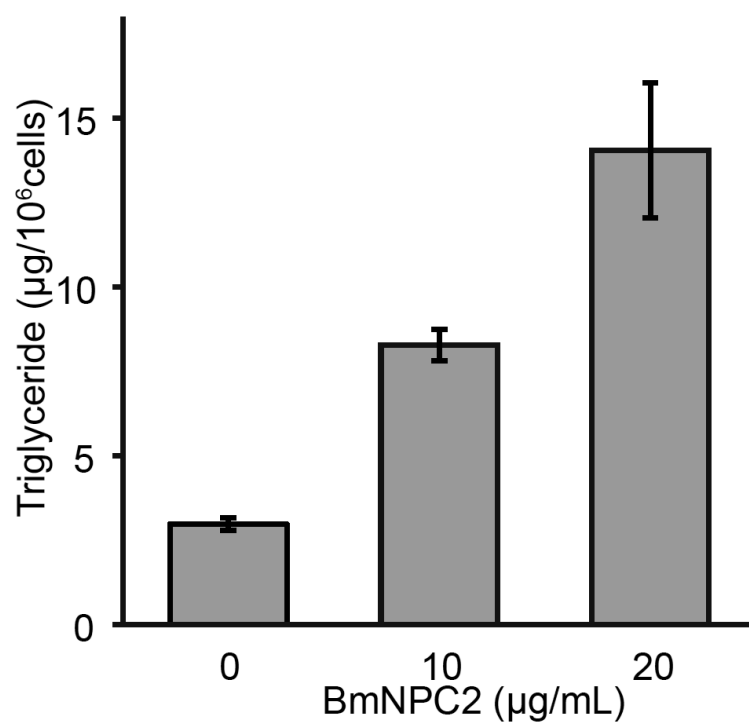


Figure 1-13 BmNPC2 タンパク質による BmN4 細胞におけるトリグリセリド蓄積の促進

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、Bligh-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。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。

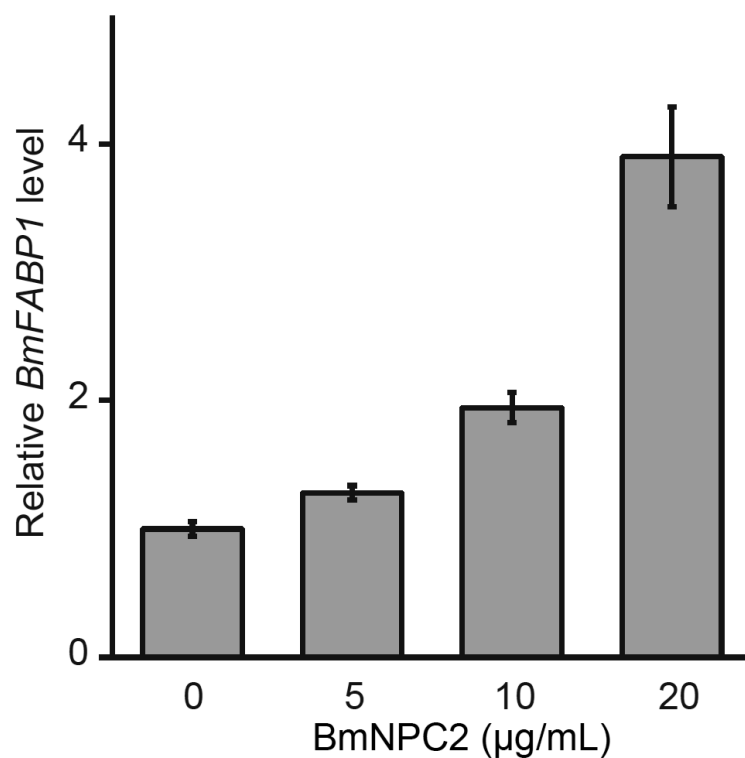


Figure 1-14 BmNPC2 タンパク質による BmN4 細胞における *BmFABP1* の発現誘導

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、定量的 RT-PCR 法によって *Rpl* 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。

考察

第一章第一節において私は、カイコ体液がカイコ培養細胞 BmN4 の増殖を抑制する活性を見だし、その実体が BmNPC2 タンパク質であることを明らかにした。また、カイコ体液は BmN4 細胞におけるトリグリセリド蓄積を促進する活性を有しており、この活性に対しても BmNPC2 タンパク質が寄与していることを明らかにした。

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(Akiduki & Imanishi, 2007)。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。本研究において私が見いだした、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。ここから私は、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 細胞は球形の弱付着性細胞であるが、私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こっていた。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機能の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が、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とともにグリア細胞、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私は考えている。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。

材料と方法

カイコおよびカイコ体液の調製

カイコ(*Bombyx mori*)は Hu・Yo× Tsukuba・Ne 系統の受精卵を愛媛蚕種から購入した。孵化したカイコは 27℃ において人工飼料シルクメイト(日本農産工業株式会社)を与えて飼育した。体液の採取には 5 齢 4 日目まで毎日餌を与え続けたカイコを用いた。5 齢 5 日目あるいは 6 日目のカイコの第 2 腹肢を切断し、体液を氷上の 50 mL 遠心チューブに回収した。回収時にフェニルチオ尿素を 100 μ M となるよう添加した。回収した体液を 8 k×rpm、10 分間遠心し、上清を液体窒素にて凍結した後、使用まで -20℃ に保存した。カイコ幼虫の体液を 60 °C、30 分間インキュベートし、その遠心上清を用いた。この遠心上清画分をカイコ体液と呼ぶ。

培養細胞および継代

培養細胞は当研究室にて継代している BmN4 細胞(Maeda,1989)を用いた。継代する培地には牛胎児血清(FBS)を 10%添加した TC-100 培地を用い、27 °C で培養した。培養細胞は培地交換の際を除き 27 °C のインキュベーターにおいて維持した。サンプルを添加した培地の作成は以下のように行った。TC-100 10% FBS 培地に終濃度 50 μ g/mL ゲンタマイシン、2.5 μ g/mL アンホテリシン B を抗生物質として添加し、培地体積の 10%となるようにサンプルを加えた。サンプル用量が 10% に満たない場合は 0.9% NaCl を用いて培地体積の 10 %にあわせた。

細胞増殖測定

継代している BmN4 細胞をセルスクレイパーによってはがし、血球計算盤とトリパンブルーを用いて生細胞数を計測した。TC-100 10% FBS 培地を用いて生細胞数が 2.0×10^5 cells/mL となるよう希釈し播種した。24 時間後、サンプルを添加した培地に交換した。その後、経時的にセルスクレイパーによって細胞をはがし、血球計算盤を用いて細胞数を測定した。

チミジン取り込みアッセイ

生細胞数が 2.0×10^5 cells/mL となるよう希釈し、24 well plate に 500 μ L ずつまいた。サンプルを含む培地へ置換し、24 時間後に 0.5 μ Ci/well となるよう [3 H]チミジンを加え、さらにその 6 時間後に培地を除去し PBS を用いて 1 回洗浄した。10 mM Tris-HCl pH 8.0、1 mM EDTA、2 % SDS buffer 500 μ L を well に加えて細胞を可溶化し、パスツールピペットを用いて混和した後、氷上の 15 mL 遠心管に回収した。次に 100%トリクロロ酢酸を 55 μ L 遠心管に加え氷上に維持した後、吸引濾過器を用いて不溶画分をグラスフィルターに吸着させた。グラスフィルターは 5 %トリクロロ酢酸、5 g/L ピロリン酸ナトリウムを含むバッファを用いて 2 度洗浄した後、赤外線ランプ下において乾燥させた。乾燥させたフィルターを、4 g/L 2,5-Diphenyloxazole を含むトルエンに沈め、液体シンチレーションカウンターによって放射活性を測定した。0.9% NaCl を培地体積の 10%添加した時の放射活性を 100%として [3 H]チミジン取り込み抑制率を算出した。

プロテアーゼ処理

カイコ体液に対して、50 μ g/mL プロテアーゼ K、100 μ g/mL プロネース E を添加し、37 $^{\circ}$ C においてインキュベートした。16 時間後、15 k \times g で 1 分間遠心し、その上清をプロテアーゼ処理サンプルとした。対照として、カイコ体液に MilliQ を加えてインキュベートしたサンプルを用いた。

[3 H]チミジン取り込み抑制因子の精製および同定

[3 H]チミジン取り込みを 30% 抑制する活性を 1 Unit と定義した。タンパク質量は Bradford 法により牛血清アルブミンを標準として求めた。

カイコ体液に対して 60% 硫酸沈殿を行った。沈殿をバッファ (25 mM HEPES pH 7.2、20%w/v グリセロール) に溶かし、同バッファに対し透析した画分を硫酸沈殿画分(Fr. II)とした。

硫酸沈殿画分をバッファにより平衡化した Heparin Toyopearl カラム (10 mL) に供した。100 mM NaCl を含むバッファを用いて 3 カラム体積分 wash した。続いて 500 mM NaCl を含むバッファを用いてステップワイズ溶出させ、溶出画分を Heparin Toyopearl 画分(Fr. III)とした。

Heparin Toyopearl 画分に対して終濃度 2 M 硫酸アンモニウム、20 % w/v グリセロールとなるよう硫酸アンモニウム水溶液及びグリセロールを加え、2 M 硫酸アンモニウムを含むバ

ッファを用いて平衡化した Butyl Toyopearl カラム (10 mL) に供した。続いて 2 M 硫酸アンモニウムを含むバッファを用いて 2 カラム体積分 wash した。1 M 硫酸アンモニウムを含むバッファを用いてステップワイズ用出させ、溶出画分をバッファに対して透析した。透析後の画分を Butyl Toyopearl 画分(Fr. IV)とした。

Butyl Toyopearl 画分をバッファにより平衡化した Mono S カラム (1 mL) に供した。0 mM ~500 mM NaCl を含むバッファにより 20 カラム体積分グラジエント溶出させた。 $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み抑制活性を有する画分をプールし Mono S 画分(Fr. V)とした。

Mono S 画分を Superose12 カラム (30mL) に供した。 $[^3\text{H}]$ チミジン取り込み抑制活性を有する画分を Superose12 画分(Fr. VI)とした。

15% SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動のゲルから目的のバンドを切り出し、トリプシンによるゲル内消化を行った。続いて消化産物を逆相 HPLC に供し 2 種類のペプチド断片を得た。各ペプチド画分からエドマン分解法によりアミノ酸配列決定を行った。

リコンビナントタンパク質の作出

カイコ脂肪体から BmNPC2 タンパク質の cDNA を Zero Blunt TOPO PCR クローニング キット(Invitrogen)を用いてクローニングした。PCR プライマーは(Kanaya & Kobayashi, 2000)の配列を用いた。その後 Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems (Invitrogen)を用いて C 末端 His-tag 融合 BmNPC2 タンパク質発現ウイルスを作出した。C 末端 His-tag 融合 BmNPC2 タンパク質発現ウイルスを Sf 9 細胞に感染させ、72 時間培養した。得られた培養上清を 25 mM HEPES pH 7.2、100 mM NaCl、10% w/v グリセロールに対して透析し、コバルト金属キレートカラムに供した。25mM HEPES pH7.2、300 mM NaCl、10% w/v グリセロール、10 mM イミダゾール buffer を用いて 10 カラム体積分 wash した後、300 mM イミダゾール buffer を用いてステップワイズ溶出させ溶出画分を得た。得られた画分を 25 mM HEPES pH 7.2、100 mM NaCl、20% w/v グリセロールバッファに対して透析し、リコンビナントタンパク質画分とした。その後、SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、CBB 染色および抗 His-tag 抗体(Santa Cruz H-15)によるウェスタンブロッティングによる検出を行った。ウェスタンブロッティングの試薬は本研究ではすべての章において次のものを用いた。転写膜; PVDF membrane (0.45 μm)(Millipore)、2 次抗体; ロバ由来抗ウサギ IgG 抗体(HRP 標識)(GE healthcare)、化学発光試薬; Western Lightning (PerkinElmer)。

トリグリセリド定量と Oil Red O 染色

生細胞数が 2.0×10^5 cells/mL となるよう希釈した BmN4 細胞を 25 cm² plate に 4 mL ずつまき、24 時間後にサンプルを添加した培地へ交換した。培地交換から 48 時間後、PBS による洗浄を 1 回行い、セルスクレイパーによって細胞をはがして細胞懸濁液を調製した。続いて血球計算盤を用いて細胞数を計測した。同時に Bligh-Dyer 法により脂質画分を抽出し、トリグリセリド E テストワコー(wako)によりトリグリセリドの量を測定した。トリグリセリド/細胞数の比をトリグリセリド蓄積量として算出した。Oil Red O 染色は、10% ホルムアルデヒドを用いて細胞を固定した後、60% 2-プロパノールに溶解した Oil Red O を用いて室温 10 分間固定した。

定量的 RT-PCR

BmN4 細胞懸濁液から RNeasy Mini column RNA 抽出キット(QIAGEN)を用いて total RNA を抽出した。RQ DNase (Promega)によりゲノム DNA を分解後、TaqMan Reverse Transcription Reagents (Applied Biosystems)を用いて cDNA を合成した。

FastStart Universal SYBR Green Master (Rox) (Roche Applied Science) を用いて StepOnePlus (Applied Biosystems) にて real-time polymerase chain reaction を行った。

RT-PCR 用のプライマーの配列は、*BmFABP1* (Akiduki & Imanishi, 2007)、*Rpl* (Wang *et al*, 2009)の配列を用いた。

統計検定

本研究では第三章における生存曲線の検定を除いてすべて Student の t 検定を用いて 5%を有意水準として検定を行った。生存曲線の検定法は第三章に記載する。

第一章

第二節

カイコおよび BmN4 細胞を用いた BmNPC2
タンパク質による脂肪蓄積促進機構の解明

緒言

第一節において、BmNPC2 タンパク質がカイコ培養細胞の細胞増殖抑制ならびに脂肪蓄積促進活性を示すことを明らかにした。第二節ではカイコ個体を用いた BmNPC2 タンパク質の生理学的解析と BmN4 細胞を用いた分子機構の解析を行った。まずカイコの脂肪蓄積における BmNPC2 タンパク質の寄与を検討した。そして、BmN4 細胞を用いてこれまでに NPC2 タンパク質について知られている分子機構がカイコにおいても適応されるか否かについて検討した。

Niemann-Pick disease type C は進行性の神経変性疾患であり、NPC 患者は早期に死亡する(Millat *et al*, 2001)。NPC に変異を持つヒト繊維芽細胞ではコレステロールの異常蓄積が認められる。また NPC 患者では脳および肝臓において糖脂質の以上蓄積が認められる(Millat *et al*, 2001)。NPC の原因遺伝子として *NPC1* と *NPC2* が知られており、それぞれ患者全体の 95%、5%を占める(Millat *et al*, 2001)。NPC1 タンパク質が膜タンパク質であるのに対して、NPC2 タンパク質は可溶性タンパク質であり細胞内ではリソソーム中に局在している。NPC2 タンパク質は細胞外にも分泌されており、精巣分泌液中では主要タンパク質として検出されるほか、血漿中にも検出される(Kirchhoff *et al*, 1996; Liao *et al*, 2013)。酵母、カイコ、マウス、ヒトにおいて現在わかっている NPC2 遺伝子は一つである。一方、ショウジョウバエの *npc2* は遺伝子重複により *npc2a-h* の 8 種類のアイソフォームを有している。ショウジョウバエにおけるそれぞれのアイソフォームの単独欠損個体は表現型が見いだされていないが、*npc2a* および *b* の二重欠損個体は脳において変性が認められ、蛹から成虫への変態が進行せず死に至る(Huang *et al*, 2007)。したがって、NPC2 タンパク質は昆虫において正常な脳の発生と変態に必要であると考えられるが、脂肪蓄積に対する NPC2 タンパク質の寄与は未だ明らかではない。近年、ショウジョウバエを用いて昆虫の脂肪蓄積に関わる遺伝子の網羅的解析が行われたが、*npc2* 遺伝子産物が脂肪蓄積を促進するという結果は得られていない(Pospisilik *et al*, 2010)。これは、ショウジョウバエの *npc2* 遺伝子が複数存在しリダンダントな機能を有しているからであると私は考えた。カイコをはじめとする完全変態昆虫は幼虫期に多量の脂肪を蓄積する。これは成虫組織の成長と絶食状態に耐えるために必要な栄養を蓄積するためであると考えられている。NPC2 タンパク質が昆虫の脂肪蓄積に寄与するか否かが検証されることにより、飢餓や成長に備えたエネルギー蓄積機構の理解が深まると期待される。したがって私は、カイコにおける NPC2 タンパク質が産生される組織を調べ、NPC2 タンパク質の発現解析を試みた。また

リコンビナントタンパク質の注射を行うことによって NPC2 タンパク質のカイコ脂肪蓄積に与える生理学的活性を検証した。

先行研究において、NPC2 タンパク質が細胞に作用する際の分子機構として次のような知見が得られている。NPC2 タンパク質は真核生物間に高度に保存されたコレステロール結合タンパク質である。NPC2 遺伝子変異によりコレステロールの異常蓄積が起きたヒト繊維芽細胞に対して、ヒト NPC2 タンパク質を細胞培養液に添加したとき、このコレステロールの蓄積がキャンセルされることが示されている(Naureckiene *et al*, 2000)。また、NPC2 タンパク質は細胞外に分泌されること、細胞外から取り込まれることの両方が起こる。この細胞外からの NPC2 タンパク質の取り込みはマンノース 6 リン酸の添加によって阻害されることから、マンノース 6 リン酸受容体との結合を介した取り込みであると推定される(Willenborg *et al*, 2005)。これらの知見から、NPC2 タンパク質はコレステロールのキャリアとして機能することにより細胞のコレステロール量を調節すると考えられている。一方で近年、NPC2 タンパク質のコレステロール結合能非依存的な活性も報告されている。生化学的解析から、ヒト NPC2 タンパク質においてコレステロール結合を失わせるアミノ酸置換が報告されている(Ko *et al*, 2003)。このような変異を導入した NPC2 タンパク質によっても血球細胞の分化を調節する(Heo *et al*, 2006)、あるいは胆汁へのコレステロール排出を促進する(Yamanashi *et al*, 2011)という活性が失われないことが報告されている。したがって、NPC2 タンパク質がコレステロールの輸送機能以外に、増殖因子やサイトカインのような細胞外の情報伝達分子として機能することが示唆されている。血球細胞の分化調節における NPC2 の機能がマンノース 6 リン酸によって阻害されることから、この分化調節活性もマンノース 6 リン酸感受性経路である(Heo *et al*, 2006)。しかしながら、ホルモンとしての NPC2 の下流でシグナルを伝える分子機構は不明である。以上の観点から私は、本研究によって新しく見いだした BmNPC2 タンパク質の細胞増殖抑制活性ならびにトリグリセリド蓄積促進活性の作用機構を調べるために、本活性がコレステロール結合依存的であるか否か、マンノース 6 リン酸感受性であるか否かを検討した。

さらに、本研究では BmNPC2 タンパク質の下流細胞内シグナルとして AMP-activated protein kinase (AMPK) に着目した。AMPK の活性化は細胞増殖に対して抑制的に働くことが分かっている(Motoshima *et al*, 2006)。また、脂肪細胞における活性化 AMPK は脂肪の分解を抑制することが報告されている(Daval *et al*, 2005)。すなわち、AMPK の活性化は脂肪細胞におけるトリグリセリド蓄積量の増大を誘導すると考えられる。これらの知見から私は、細胞増殖抑制とトリグリセリド蓄積促進に寄与する AMPK が BmNPC2 タンパク質

の下流で活性かするという仮説を立てた。NPC2 タンパク質の作用機構を解明することによって、NPC2 タンパク質を応用した動物の代謝制御機構が明らかになると考えこの検証に着手した。

結果

1. 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

第一説において私は BmNPC2 タンパク質がカイコ由来培養細胞である BmN4 細胞のトリグリセリド蓄積を促進することを明らかにした。次に、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か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、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 (Figure 1-15)。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 令 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 (Figure 1-16)。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私の仮説と矛盾しない結果である。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 (Figure 1-17)。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 レベルが減弱していた (Figure 1-18)。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か否かを検証した。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体においてトリグリセリド蓄積量の上昇、ならびに *BmFABP1* の mRNA 量の増大が認められた (Figure 1-19,1-20)。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ェ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 15 kDa のタンパク質を単一バンドとして検出した (Figure 1-21)。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 (Figure 1-22)。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。

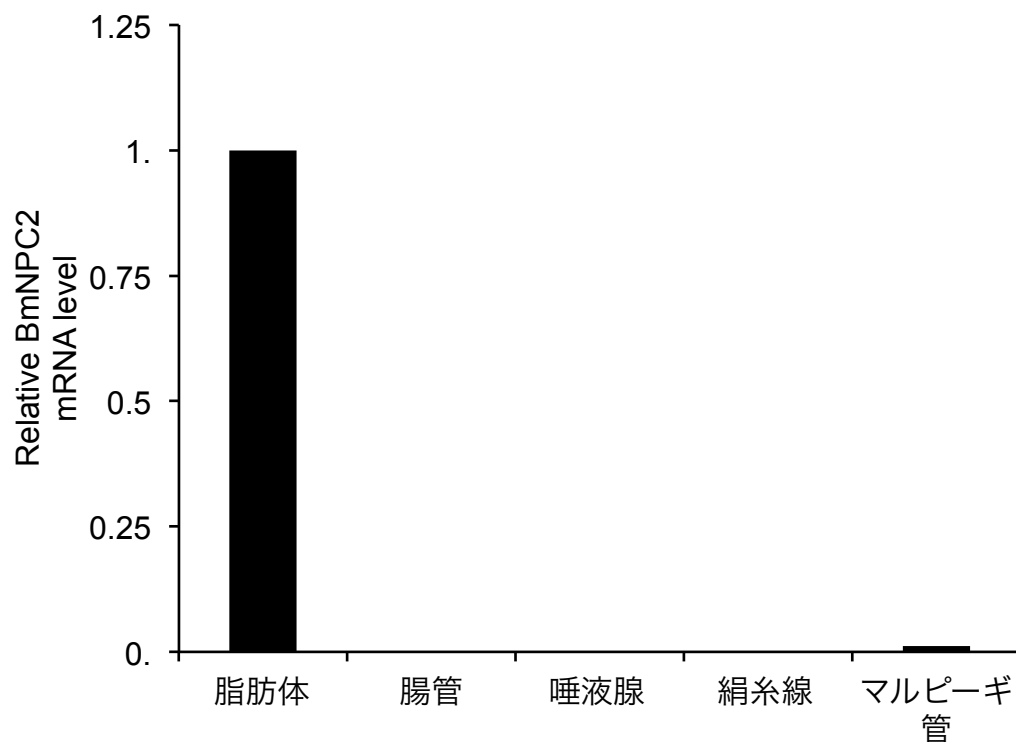


Figure 1-15 カイコ組織における BmNPC2 mRNA の発現解析

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* 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。

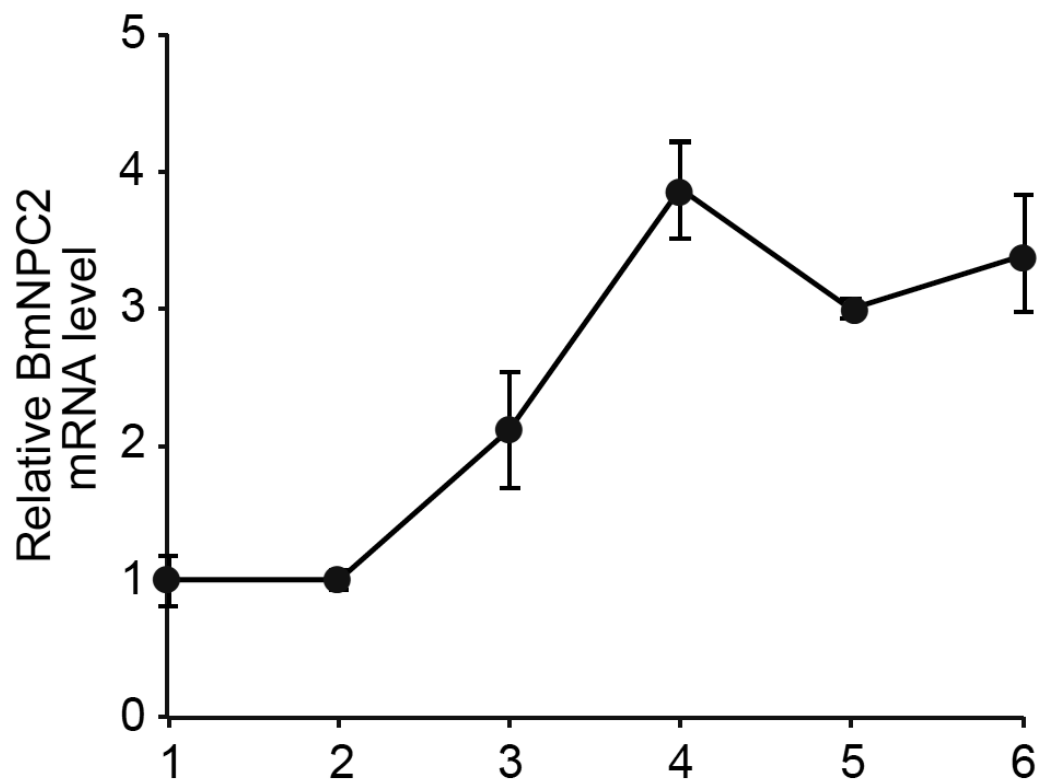


Figure 1-16 カイコの成長に伴った BmNPC2 の発現変動

5 週齢カイコ幼虫を経時的に解剖し、脂肪体を摘出した。RNA 画分を調製、cDNA を作成後、定量的 RT-PCR 法により *Rpl* 内部標準とした *BmNPC2* の mRNA 量を定量した。図は 5 週齢 1 日目の脂肪体における mRNA 量を 1 とした相対的な発現量を示す。データは平均値±標準誤差($n=2\sim4$)を示す。

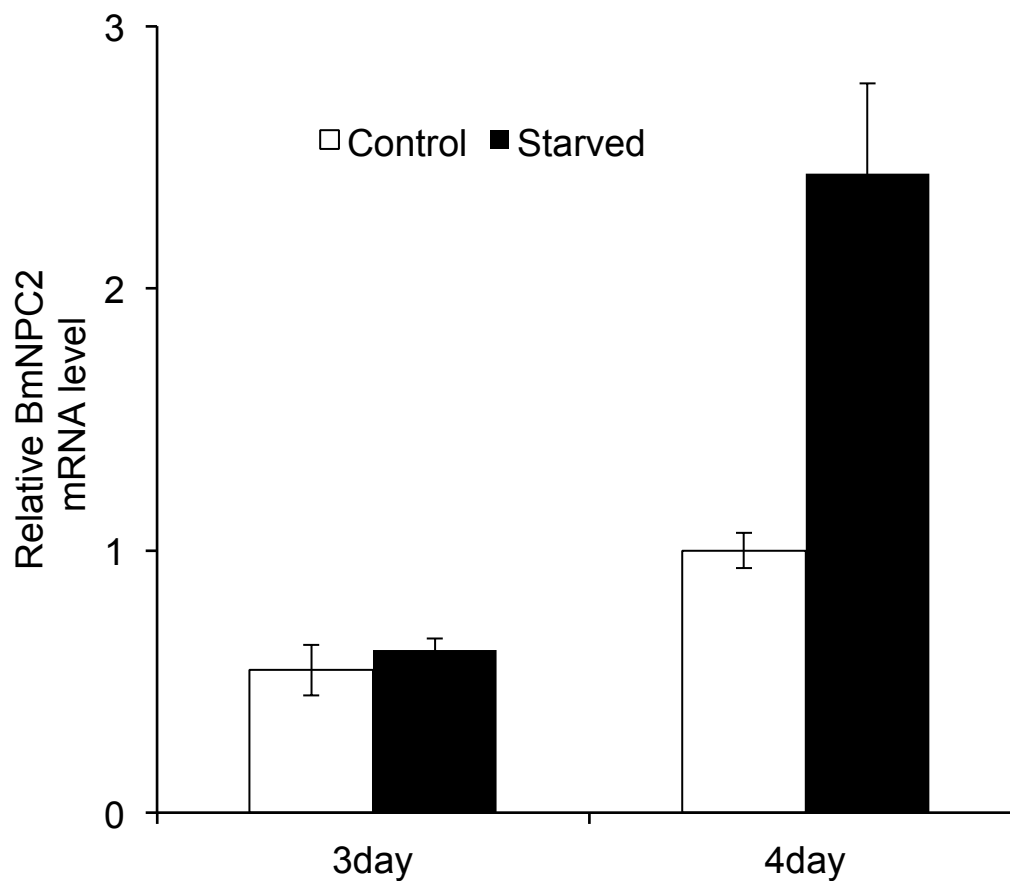


Figure 1-17 飢餓条件による BmNPC2 の発現誘導

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* 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 として平均値±標準誤差($n=3$)を示す。

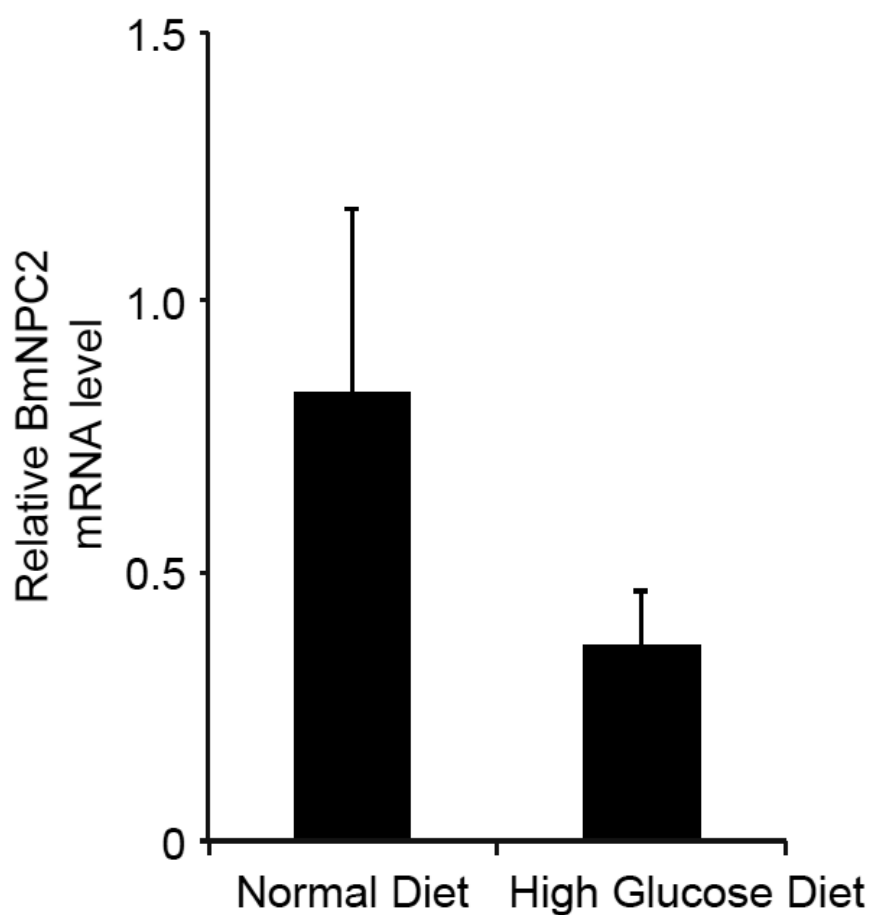


Figure 1-18 再給餌による BmNPC2 の発現抑制

5 週齢 2 日目からカイコに対する給餌を中止し、4 日目から 2 日間通常飼料(Normal Diet)または 10% グルコースを含む飼料(High Glucose Diet)を給餌したカイコ(5 週齢 6 日目)脂肪体における *BmNPC2* の相対的な発現量を示す。データは飢餓条件後、再給餌前の群(5 週齢 4 日目)の平均値を 1 として平均値 \pm 標準誤差($n=3$)を示す。

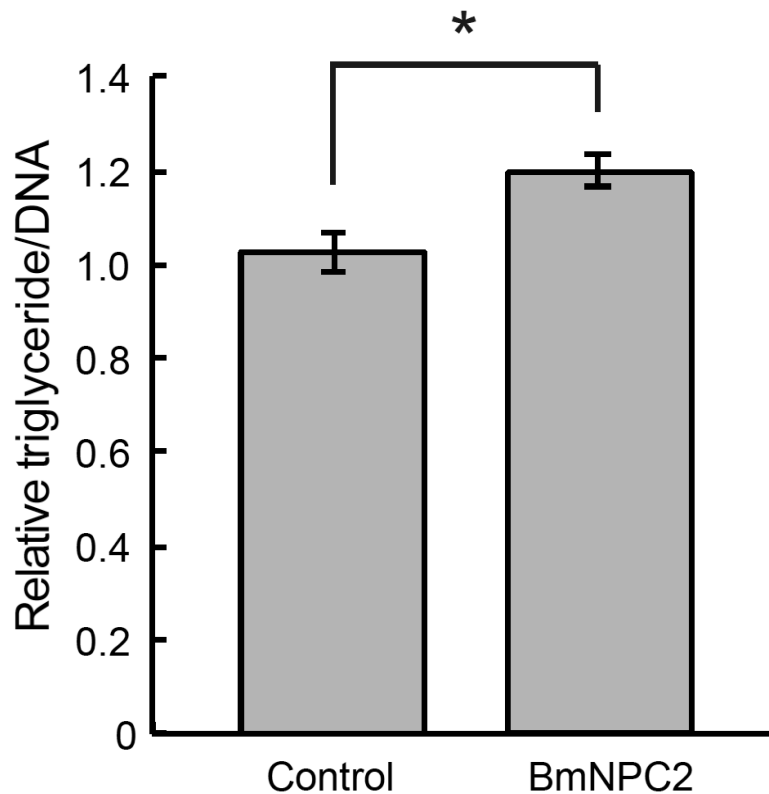


Figure 1-19 BmNPC2 タンパク質によるカイコ脂肪体におけるトリグリセリド蓄積の促進

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、脂肪体ライセートを調製した。ライセートから Bligh-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、ライセートからフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコール法によって核酸画分を調製し 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 として規格化して表示した。データは平均値 \pm 標準誤差($n=4$)を示す。*; $p<0.05$ 。

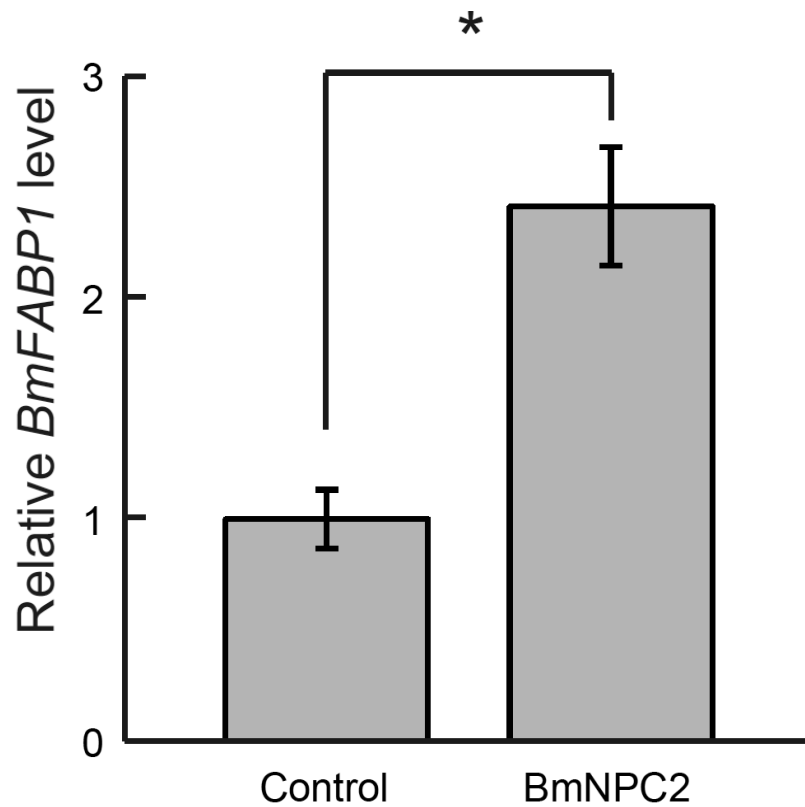


Figure 1-20 BmNPC2 タンパク質によるカイコ脂肪体における *BmFABP1* の発現誘導
 5 週齢 2 日目カイコ幼虫に対してのリコンビナント BmNPC2 タンパク質、または Buffer(Control 群)を 50 μ L 注射し 72 時間後、脂肪体から RNA 画分を調製、cDNA を作成後、定量的 RT-PCR 法により *BmFABP1* の mRNA 量を定量した。*Rpl* を内在性コントロールに用い、Control 群の *BmFABP1* mRNA 量の平均値を 1 として平均値 \pm 標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。

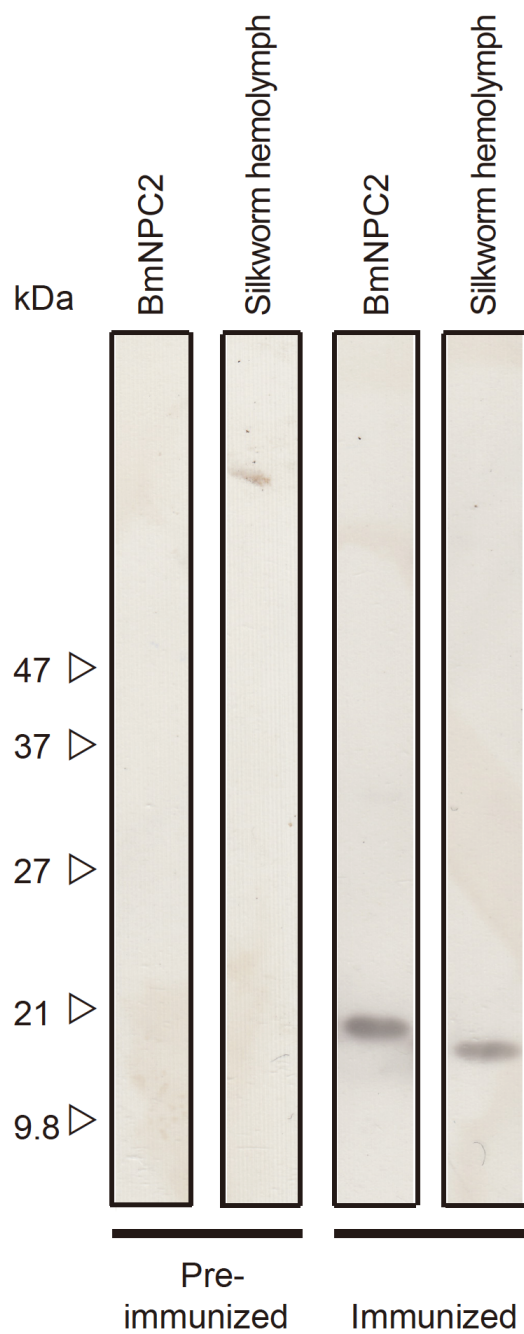


Figure 1-21 抗 BmNPC2 タンパク質抗血清の作出

日本白色種ウサギ♀に対して 200 μ g のリコンビナント BmNPC2 を 2 週間毎に計 5 回免疫し、免疫前、免疫後それぞれの血清を得た。得られた血清を用いてリコンビナント BmNPC2 タンパク質あるいはカイコ体液に対するウェスタンブロッティングを行った。

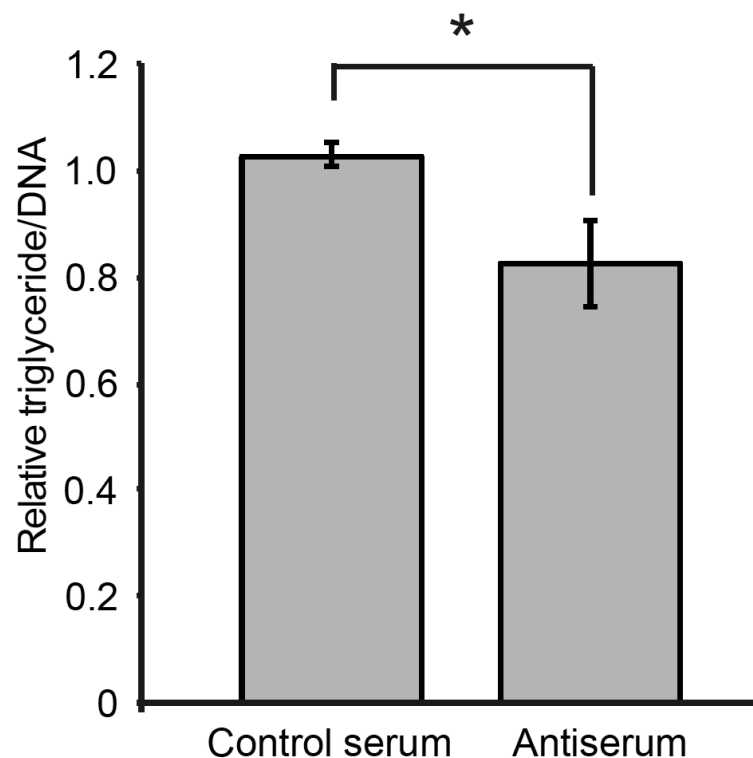


Figure 1-22 抗 BmNPC2 タンパク質抗血清によるカイコ脂肪体におけるトリグリセリド蓄積の減弱

5 週齢 2 日目カイコ幼虫に抗 BmNPC2 タンパク質抗血清あるいは通常ウサギ血清注射し、72 時間後に脂肪体を摘出した。ポリトロンを用いてライセートを調製し、DNA および脂質画分を抽出した。A₂₆₀ の値から DNA 量を、酵素定量法によりトリグリセリド量をそれぞれ定量した。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 として規格化して表示した。データは平均値±標準誤差($n=8$)を示す。*; $p<0.05$ 。

2. BmNPC2 タンパク質の作用機構の解析

私は、これまでに NPC2 タンパク質について得られている知見、すなわち NPC2 タンパク質がコレステロールの輸送体として機能すること、細胞外から作用する NPC2 タンパク質の活性はマンノース 6 リン酸によって阻害されることに鑑みて、本研究によって見いだした細胞増殖抑制活性ならびにトリグリセリド蓄積促進活性における BmNPC2 タンパク質の作用機構の解明に着手した。まず、BmNPC2 タンパク質のコレステロール結合能が活性に必要であるか否かを検討した。ヒト NPC2 タンパク質においてコレステロール結合を失わせるアミノ酸置換が報告されている(Ko *et al*, 2003)。特に、シグナルペプチド配列を除いた配列における第 66 番のフェニルアラニン残基をアラニン残基に置換する方法に着目した。この残基はヒト、マウス、ショウジョウバエ、カイコにおいて良く保存されており、結晶構造解析からもコレステロール結合ポケットに位置する (Figure 1-23)。カイコにおいて第 90 番のフェニルアラニン (シグナルペプチドを除いた場合第 72 番) がヒトの第 66 番のフェニルアラニン残基に相当する。私は、F90A のアミノ酸置換変異を導入したリコンビナント BmNPC2 タンパク質を作出した (Figure 1-24)。この変異タンパク質がコレステロール結合能を有するか否かをラベルコレステロールを用いて検討したところ、野生型の BmNPC2 タンパク質に比べて F90A 変異タンパク質はコレステロール結合能が減弱していた (Figure 1-25)。この F90A 変異タンパク質が、BmN4 細胞に対して細胞増殖抑制活性を有するか否かを [3 H]チミジンの取り込みアッセイによって評価した。その結果、F90A 変異タンパク質は [3 H]チミジンの取り込み抑制活性を有し、その比活性は野生型と比べて低下しなかった (Table 1-2)。また、F90A 変異タンパク質を添加して培養した BmN4 細胞ではトリグリセリド蓄積量の増大 (Figure 1-26) および *BmFABP1* の発現上昇が見られた (Figure 1-27)。以上の結果は、BmNPC2 タンパク質による BmN4 細胞の増殖抑制ならびにトリグリセリド蓄積促進活性において、コレステロール結合能は必要ではないことを示唆している。次に、BmNPC2 タンパク質がマンノース 6 リン酸感受性であるか否かを検討した。先行研究において、NPC2 タンパク質はマンノース 6 リン酸受容体との結合を介して細胞内に取り込まれると考えられており、マンノース 6 リン酸を添加することにより NPC2 タンパク質とマンノース 6 リン酸受容体の結合が競合的に阻害されると推定されている(Willenborg *et al*, 2005)。BmNPC2 タンパク質と BmN4 細胞をマンノース 6 リン酸添加または非添加において培養し、24 時間後に細胞を回収してウェスタンブロッティングを行ったところ、マンノース 6 リン酸の添加により細胞画分に検出される BmNPC2 タンパク質の量が減弱した (Figure 1-28)。また、BmNPC2 タンパク質とマンノ

ース 6 リン酸を同時に添加して BmN4 細胞を培養し、 $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込みとトリグリセリド量を測定した。その結果、マンノース 6 リン酸の添加によって BmNPC2 タンパク質による $[^3\text{H}]$ チミジンの取り込み抑制が減弱した (Figure 1-29)。また BmNPC2 タンパク質依存的なトリグリセリド蓄積促進が半分程度に減少した (Figure 1-30)。以上の結果は、BmNPC2 タンパク質の活性が部分的にマンノース 6 リン酸感受性であることを示唆している。

ここまでの解析から BmNPC2 タンパク質はコレステロール結合非依存的にトリグリセリド蓄積を促進することが推定される。近年、NPC2 タンパク質のコレステロール結合非依存的な活性が複数報告されているが、その分子機構の理解は不十分である。本研究において私は、細胞増殖の抑制とトリグリセリドの蓄積の両方に関与するリン酸化酵素である AMPK に着目した。BmNPC2 タンパク質を添加した培地を用いて培養した BmN4 細胞に対して、リン酸化 AMPK (活性化型) 抗体によるウェスタンブロッティングを行った。その結果、BmNPC2 タンパク質を添加した BmN4 細胞において、非添加群に比べてリン酸化 AMPK の量が大きかった (Figure 1-31)。したがって、BmNPC2 タンパク質の添加によって AMPK の活性化レベルが高く保たれると考えられる。次に AMPK の阻害剤を用いて、AMPK の活性化状態がカイコ NPC タンパク質によるトリグリセリド蓄積の促進に寄与しているか否かを検討した。その結果、AMPK の阻害剤である Compound C の添加によって BmNPC2 タンパク質依存的な BmN4 細胞のトリグリセリド蓄積の促進がキャンセルされた (Figure 1-32)。以上の結果は、BmNPC2 タンパク質が AMPK の活性化を介して BmN4 細胞のトリグリセリド蓄積を促進することを示唆している。

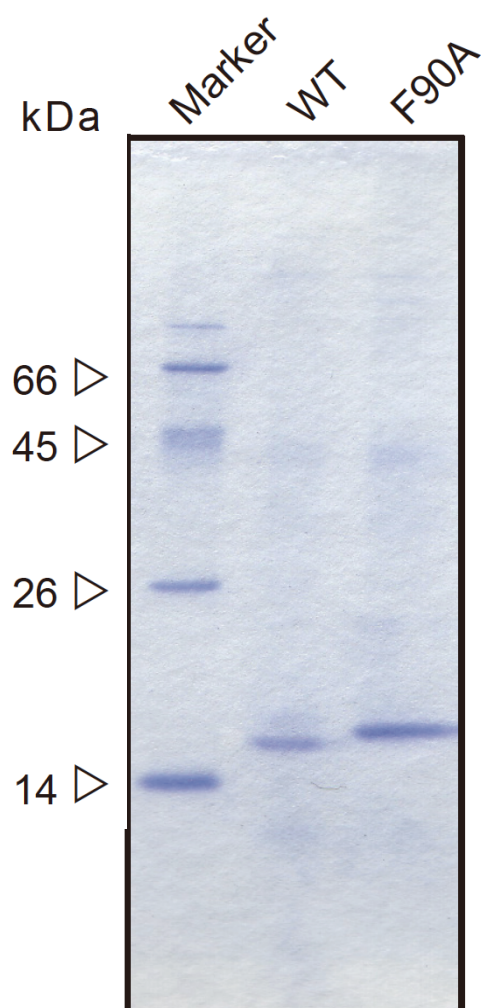


Figure 1-24 F90A 変型 BmNPC2 タンパク質の作出

BmNPC2 タンパク質の cDNA をクローニングしたプラスミドに対して変異を導入したプライマーによる伸長反応を行うことによってアミノ酸点変異を導入した cDNA を得た。この cDNA を用いて野生型と同様にリコンビナントタンパク質の発現と精製を行った。その精製した野生型(WT)および変異型(F90A)リコンビナント BmNPC2 タンパク質画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。

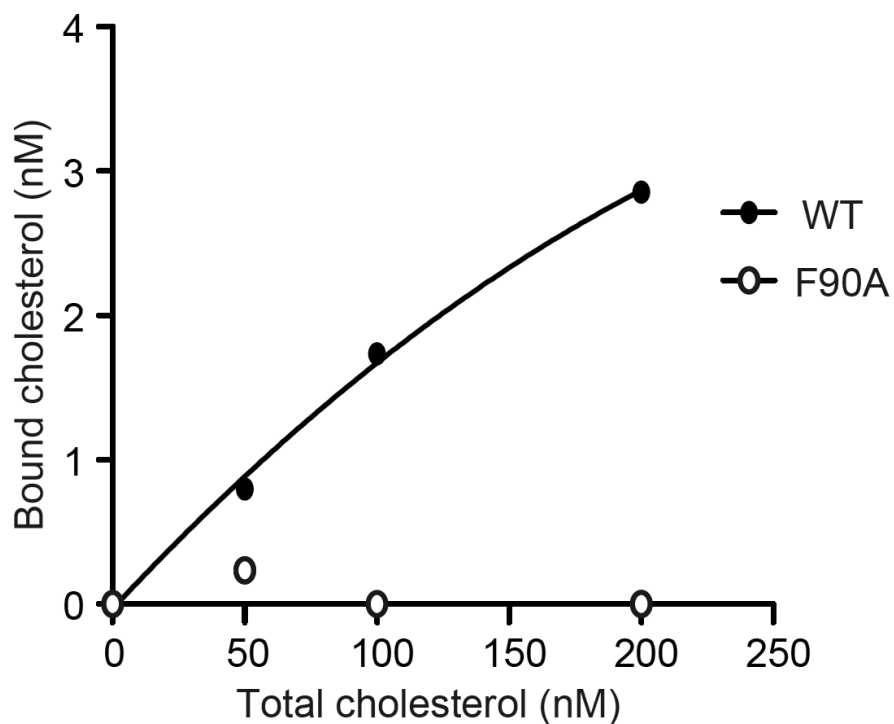


Figure 1-25 BmNPC2 タンパク質への F90A 点変異の導入によるコレステロール結合能の喪失

野生型野生型(WT)および変異型(F90A)リコンビナント BmNPC2 タンパク質 50 μ g を ^3H コレステロールと 30°Cにおいて 30 分間インキュベートした後 CentriSep スピンカラムを用いて遊離コレステロールと BmNPC2 結合コレステロールを分離した。結合画分の放射活性を液体シンチレーションによって計測し、コレステロール量として算出した。

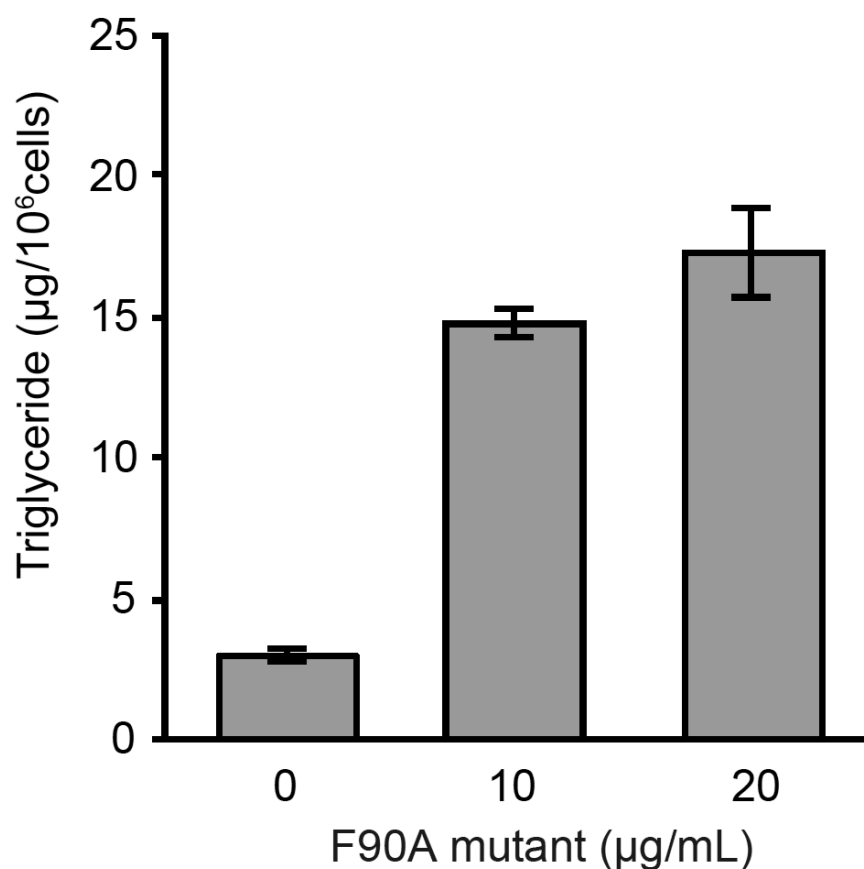


Figure 1-26 F90A 変異型 BmNPC2 タンパク質によるトリグリセリド蓄積の促進

F90A 変異型 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、Bligh-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。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。

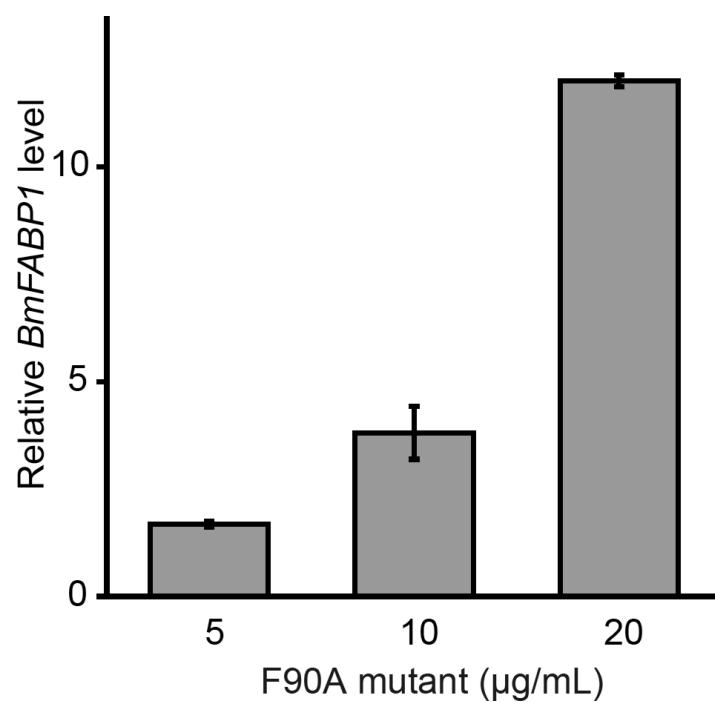


Figure 1-27 F90A 変異型 BmNPC2 タンパク質による *BmFABP1* の発現誘導

F90A 変異型 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、定量的 RT-PCR 法によって *Rpl* 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。

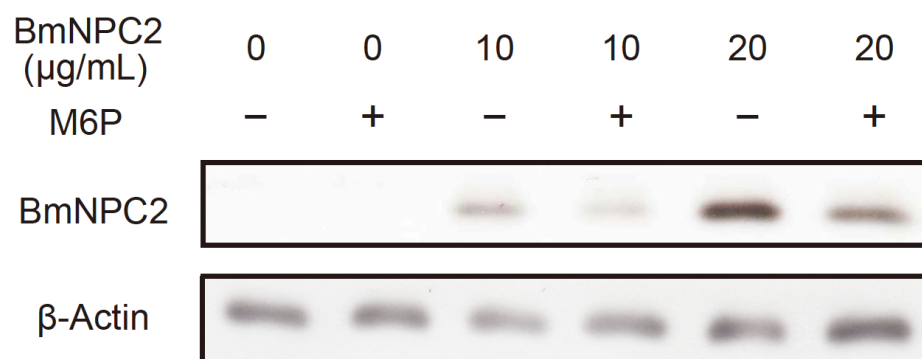


Figure 1-28 BmNPC2 タンパク質の BmN4 細胞への取り込みに対するマンノース 6 リン酸による阻害

BmN4 細胞に対して、BmNPC2 タンパク質および 25mM マンノース 6 リン酸(M6P)を添加して 24 時間培養した。その後、細胞を回収し抗 BmNPC2 タンパク質抗血清を用いたウェスタンブロッティングに供した。

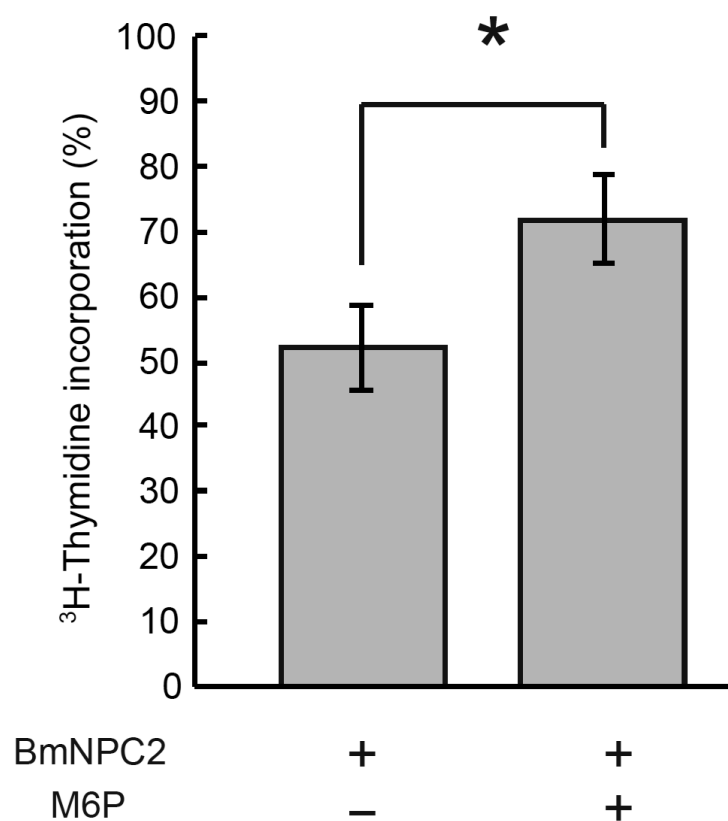


Figure 1-29 BmNPC2 タンパク質の BmN4 細胞の [³H]チミジン取り込み抑制に対するマンノース 6 リン酸による阻害

BmN4 細胞に対して 10 μg/mL BmNPC2 タンパク質および 25mM マンノース 6 リン酸を添加して 24 時間培養した。その後、 [³H]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。*; $p<0.05$ 。

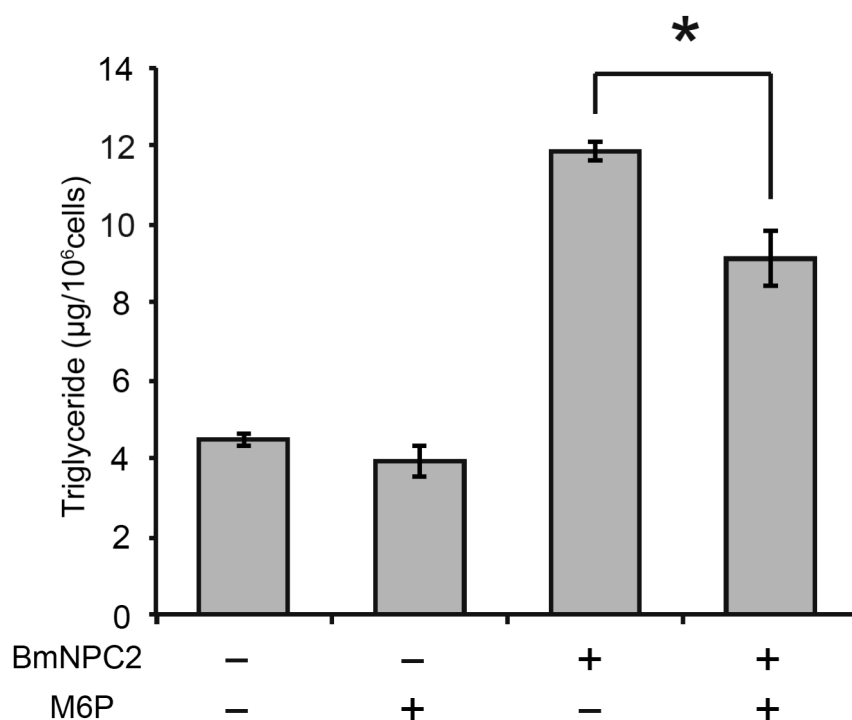


Figure 1-30 BmNPC2 タンパク質による BmN4 細胞におけるトリグリセリド蓄積の促進に対するマンノース 6 リン酸による阻害

BmN4 細胞に対して 10 μg/mL BmNPC2 タンパク質および 25mM マンノース 6 リン酸を添加し 2 日間培養を行った。Bligh-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。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。

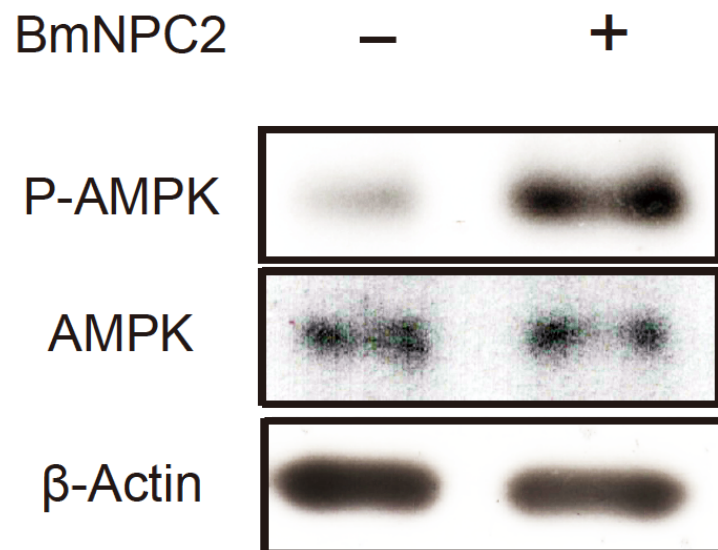


Figure 1-31 BmNPC2 タンパク質による BmN4 細胞における AMPK の活性化

BmN4細胞に対して20 μg/mL BmNPC2タンパク質を添加し24時間培養を行った。その後、細胞を回収し抗リン酸化AMPKα抗体、抗AMPKα抗体、抗β-Actin抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

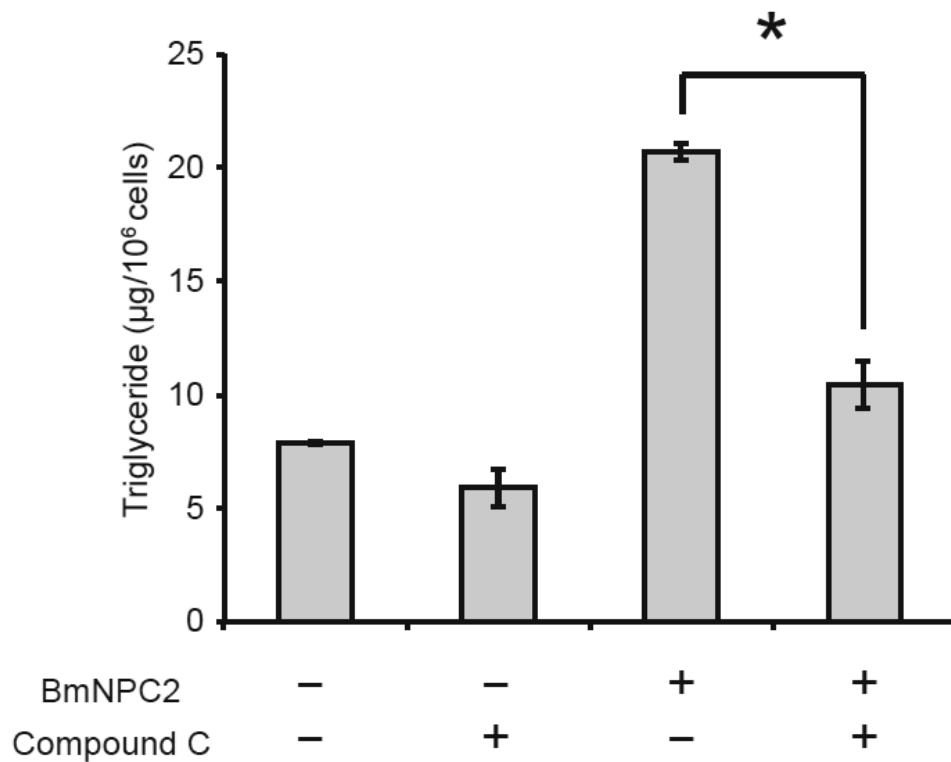


Figure 1-32 BmNPC2 タンパク質による BmN4 細胞におけるトリグリセリド蓄積の促進に対する AMPK 阻害剤による抑制

BmN4細胞に対して10 μg/mL BmNPC2タンパク質および5 μM Compound Cを添加して48時間培養を行った。その後、Bligh-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。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。

考察

第一章第二節では、BmNPC2 タンパク質がカイコ個体の脂肪蓄積に寄与することを示した。また、その分子機構としてこれまで哺乳動物 NPC2 タンパク質において知られていた知見に着目し、コレステロール結合が活性に必要ではないこと、ならびにカイコと哺乳動物の NPC2 タンパク質が共通の物質によって阻害されることを示した。加えて、NPC2 タンパク質の下流で働くシグナル伝達因子として AMPK の寄与を明らかにした。

これまで、ショウジョウバエを用いた解析により、NPC2 遺伝子を欠損 (a-h の 8 つのアイソフォームのうち a、b の 2 つを欠損した) した個体では正常に羽化が進行せず蛹致死の表現型を示す。すなわち昆虫の個体発生において NPC2 タンパク質は重要な役割を果たしていると考えられる。ショウジョウバエの *npc2* 変異体は哺乳動物の場合と同様に、体細胞においてコレステロールの以上蓄積が観察される。一方で、ショウジョウバエの *npc2* 変異体の致死性はコレステロールを給餌することによって解除されるなど(Huang *et al*, 2007)、コレステロールの異常蓄積と個体死の関係は明らかではない。マウスにおいてニューロステロイド (Allopregnanolone) の投与により NPC における寿命の短縮が抑制されるという結果が得られたことから、2004 年にニューロステロイド仮説が提唱された (Griffin *et al*, 2004)。すなわち、NPC1 または NPC2 タンパク質がコレステロールを前駆体とする特定のニューロステロイドの産生に関与しており、これらの遺伝子の機能喪失によって前駆体であるコレステロールが蓄積するとともに、必須なニューロステロイドを欠くため死に至るというものである。これに対して、Allopregnanolone の効果ではなく vehicle として使われていたシクロデキストリンが活性の本体であるという報告があり (Liu *et al*, 2009)、哺乳動物モデルにおいてもコレステロールと NPC の関連性の理解は不十分である。

本研究において私は、BmNPC2 タンパク質がカイコ脂肪体における脂肪蓄積に関与することを示した。また、BmNPC2 タンパク質の発現はカイコ脂肪体において高く、蛹化に至る過程において発現量が増大することを示した。これは NPC2 タンパク質の動物個体レベルでの生理活性に関する新たな知見である。また、BmNPC2 タンパク質の mRNA 量は飢餓ストレスによって増大することがわかった。飢餓は昆虫の変態のトリガーの一つである。加えて、完全変態昆虫における脂肪蓄積は正常な変態に必要であると考えられている。これら観点から私は、BmNPC2 タンパク質は飢餓状態における脂肪蓄積と変態の進行に関与するのではないかと推定している。

NPC2 タンパク質においてもっともよく研究されているのはそのコレステロール結合能であるが、前述したように NPC2 タンパク質のコレステロール結合の動物個体における意義は明らかではない。近年、コレステロール結合非依存的な NPC2 タンパク質の活性が複数報告されているとともに、本研究において見いだした NPC2 タンパク質の活性もコレステロール結合非依存的である。このような NPC2 タンパク質の活性の解明により、動物個体における NPC2 タンパク質の意義が明らかになり、NPC の病体の理解が深まると期待される。

本研究において、NPC2 タンパク質の下流で起こるイベントとして AMPK の活性化を見いだした。AMPK は飢餓ストレス応答を制御するキナーゼである。したがって、NPC2 タンパク質がカイコ脂肪体において飢餓ストレスによって発現誘導されることは、個体レベルでの飢餓応答を調節することにつながるため合理的であると考えられる。また近年の研究により、クルクミンによる細胞内カルシウム濃度の上昇が NPC の病体を改善するという報告がなされた(Lloyd-Evans *et al*, 2008)。細胞内カルシウム濃度の上昇は AMPK の活性化条件の一つである(Woods *et al*, 2005)。これらの知見から私は、AMPK の活性化が NPC2 タンパク質の生理的役割であると推論している。

材料と方法

カイコの飼育ならびに BmN4 細胞の培養、細胞数計測、RT-PCR、トリグリセリド量の定量は第一節の方法に準じた。

カイコ脂肪体サンプルに対する定量的 RT-PCR

カイコを解剖し脂肪体組織をポリトロンを用いてライセートを調製した。cDNA 合成および RT-PCR 反応は BmN4 細胞の場合と同様に行った。プライマーは *BmNPC2* Forward: 5'cgcggaaggtttcttgcactt3'、Reverse: 5'ggccggtcttgagcttagttg3'を用いた。

BmNPC2 タンパク質を注射したカイコ脂肪体におけるトリグリセリド蓄積量の測定

5 齢 1 日目カイコからメスを選別して人工飼料シルクメイト(日本農産工業株式会社)を与えて飼育した。5 齢 2 日目に体重を測定し体重 1.9 ± 0.2 g のカイコに対してリコンビナント BmNPC2 タンパク質 (300 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、または buffer (25 mM HEPES pH 7.2、100 mM NaCl、20% w/v グリセロール) 50 μL を注射した。24 時間後、脂肪体を摘出しポリトロンを用いて 4 匹分をあわせたライセートを調製後、Bligh - Dyer 法により脂質画分を抽出し、トリグリセリド E テストワコー(wako)によりトリグリセリドの量を測定した。またフェノール-クロロホルム-イソアミルアルコールによって DNA を抽出しエタノール沈殿、再溶解後 A_{260} の値から DNA 量を測定した。サンプル非注射群のトリグリセリド/DNA の比を 100% として各サンプル注射群のトリグリセリド蓄積量を算出した。抗 BmNPC2 タンパク質抗血清を注射したカイコ脂肪体におけるトリグリセリド蓄積量の測定は、5 齢 2 日目カイコに 50 μL サンプルを注射した後、72 時間後の脂肪体を摘出した。以降の操作は、上記と同様に行った。

抗 BmNPC2 タンパク質抗血清の作出

日本白色種ウサギ♀に対して 200 μg のリコンビナント BmNPC2 タンパク質を 2 週間毎に計 5 回免役し、免疫前、免疫後それぞれの血清を得た。得られた血清を用いてリコンビナント BmNPC2 タンパク質あるいはカイコ体液に対するウェスタンブロットを行った。

変異型リコンビナントタンパク質の作出

BmNPC2 タンパク質 cDNA をクローニングした Plasmid DNA を鋳型に、変異を導入したプライマー (Forward: 5'gcaggccagatccaaaactt3', Reverse: 5'cctcgttaccggccaagaat3') を用いて PCR により Plasmid 全長を増幅した。続いて *Dpn* I 処理し、大腸菌にトランスフォーメーションし Plasmid を抽出した。得られた Plasmid から再び Bac-to-Bac Baculovirus Expression Systems (Invitrogen)を用いて発現ウイルスを作出した。リコンビナントタンパク質画分の調製は野生型 BmNPC2 タンパク質の調製方法に準じた。

コレステロール結合アッセイ

野生型野生型(WT)および変異型(F90A)リコンビナント BmNPC2 タンパク質 50 μ g (10 mM リン酸バッファ(pH 7.0)、130 mM NaCl、0.01% Triton X-100)を $[^3\text{H}]$ コレステロールと 30°C において 30 分間インキュベートした。その後、CentriSep スピニングカラムに供し、パススルー画分を BmNPC2 結合コレステロール画分とした。結合画分の放射活性を液体シンチレーションによって計測し、コレステロール量として算出した。

NPC2 の取り込みアッセイ

BmN4 細胞に対して、BmNPC2 タンパク質および 25mM マンノース 6 リン酸(M6P)を添加して 24 時間培養した。その後、セルスクレイパーをもちいて細胞を回収し、PBS によって 1 回洗浄した。得られた細胞に対して SDS サンプルバッファを加えて溶解し、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供した。抗 BmNPC2 タンパク質抗血清を用いたウェスタンブロッティングに供した。

AMPK のウェスタンブロッティング

リン酸化 AMPK(Thr172) α 、AMPK α 、 β -Actin に対する抗体は CST Japan から購入した。リン酸化 AMPK の検出においては 5% phosphoblocker (Cell biolabs)を、その他に対しては 5% スキムミルクをブロッキング剤として用いた。

第二章

マウス 3T3-L1 細胞を用いた NPC2 タンパク
質による脂肪蓄積促進機構の解析

緒言

第二章では、NPC2 タンパク質の脂肪蓄積促進活性が哺乳動物においても応用可能であるかを検討した。近年、欧米型の生活習慣の下で肥満などの生活習慣病が増大し問題となっている。肥満は食物の過剰摂取等の環境因子によって脂肪組織の肥大化が促進されることによって起こる。脂肪組織は主に脂肪細胞から構成される組織である。脂肪組織の肥大化は脂肪細胞の増殖分化が促進されることによって脂肪細胞の数そのものが増える要素と、個々の脂肪細胞が脂肪の蓄積量を増大させる要素によって支配されと考えられる。脂肪細胞はレプチンなどの内分泌因子の産生を介して摂食と代謝を調節する機能を有している。したがって、脂肪細胞の分化は脂肪組織全体の脂肪蓄積量の調節にとって重要な役割を果たしている。加えて、脂肪細胞はアディポカインの産生を介して糖尿病や高脂血症といった他の生活習慣病の病態に影響を与えることが明らかとなっている。以上の点から、脂肪細胞の分化を制御する機構、および脂肪の蓄積量を調節する機構を明らかにすることは、動物個体が環境因子に適応したエネルギー代謝を行う仕組みを理解し、肥満をはじめとするヒトの生活習慣病の克服を目指す上で重要な課題である。

本研究において私は、カイク体液因子である NPC2 タンパク質がカイクの脂肪蓄積を促進することを見いだした。第一章で述べたように、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が報告されている(Csepegi *et al*, 2010)。ノックダウンによる検証ではリソソーム中に存在する内因性 NPC2 タンパク質の機能と、細胞外のホルモンとしての NPC2 タンパク質の機能が分けられないため、体液性因子としての NPC2 タンパク質の脂肪細胞における機能の理解は不十分であった。マウス線維芽細胞 3T3-L1 細胞は脂肪細胞分化のモデルとして用いられている(Green & Kehinde, 1975; Kasturi & Wakil, 1983)。私は本研究において、この 3T3-L1 細胞を用いてマウス NPC2 タンパク質が脂肪細胞分化および脂肪蓄積を促進するという仮説を立てこれを検証した。これまで、インスリン、BMP、FGF などのタンパク質がデキサメタゾン、イソブチルメチルキサンチン等の人工合成薬剤存在下において 3T3-L1 細胞の脂肪細胞への分化を促進することが知られている(Smith *et al*, 1988; Jin *et al*, 2006; Sakaue *et al*, 2002)。これまで知られている分化誘導ホルモンが遺伝学的な検証で明らかにされてきた一方で、体液から生理活性を指標として脂肪細胞の分化および脂肪蓄積の促進因子に着目するという点において本研究は新規性があると考えている。

また、NPC2 遺伝子に欠失変異を持つヒト繊維芽細胞は、ヒト NPC2 タンパク質によっ

てのみでなく、酵母 NPC2 タンパク質によってもコレステロール蓄積異常が回復する (Berger *et al*, 2005)。すなわち NPC2 タンパク質の活性は生物種間において高度に保存されていることが推定される。これまでの動物細胞の細胞増殖ならびに代謝を調節する体液因子についても、昆虫と哺乳動物において交換可能である例が知られている。例えばヒトインスリンはカイコの血糖値を低下させる作用を示す (Matsumoto *et al*, 2011)、あるいは昆虫細胞の増殖促進因子が哺乳動物細胞の増殖を促進するという例が知られている (Ohnishi *et al*, 2001)。私は、BmNPC2 タンパク質とカイコ細胞、マウス NPC2 タンパク質とマウス細胞という組み合わせだけでなく BmNPC2 タンパク質とマウス細胞、マウス NPC2 タンパク質とカイコ細胞という組み合わせにおいても NPC2 タンパク質の活性が見いだされるという仮説を立てた。この検証によって、NPC2 タンパク質の保存性の理解が深まると期待される。また、第三章において述べる昆虫体液因子の抗がん剤としての応用につながると私は考え、この検証に着手した。

最後に、NPC2 タンパク質がどのような受容体を介して活性を示すかは不明であった。これまで、NPC2 タンパク質の相互作用因子がマンノース 6 リン酸受容体を含め複数報告されているが (Harrison *et al*, 2009; Liao *et al*, 2012)、いずれも細胞内の情報伝達に関わるという知見は得られていない。そこで本研究においては、ホルモンとしての NPC2 タンパク質受容体を明らかにするため、相互作用する膜タンパク質の同定を試みた。

結果

1. NPC2 タンパク質による 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化および脂肪蓄積への寄与

BmNPC2 タンパク質がカイク細胞に対して *BmFABP1* 遺伝子の発現を上昇させることを第一章で述べた。マウス繊維芽細胞である 3T3-L1 細胞が脂肪細胞へ分化したことを知る指標の一つに *BmFABP1* のホモログである *aP2/Fabp4* 遺伝子の発現上昇が用いられている。私は His-tag 融合 murine NPC2 タンパク質を作出し(Figure 2-0)、3T3-L1 細胞における *aP2* 遺伝子の発現を促進するか否かを検証した。その結果、デキサメタゾンおよびイソブチルメチルキサンチンの存在下において、murine NPC2 タンパク質による *aP2* 遺伝子の発現誘導が認められた (Figure 2-1)。この結果は、murine NPC2 タンパク質が 3T3-L1 細胞の脂肪細胞分化を促進することを示唆している。さらに、このときマウス NPC タンパク質の添加によって AMPK のリン酸化の亢進が見られた(Figure 2-2)。

また、BmNPC2 タンパク質を 3T3-L1 細胞に添加した場合においても *aP2* 遺伝子の発現上昇が認められた (Figure 2-3)。加えて murine NPC2 タンパク質を BmN4 細胞に添加したところ、*BmFABP1* 遺伝子の発現が促進された (Figure 2-4)。これらの結果は、NPC2 タンパク質の生理活性が生物種間において高度に保存されていることを示唆している。

次に、私は NPC2 タンパク質による脂肪蓄積の促進がマウス細胞においても観察されるか否かを検討した。脂肪細胞に分化誘導した 3T3-L1 細胞に対して murine NPC2 タンパク質を添加し、24 時間後の脂肪蓄積量を測定した。その結果、コントロールであるバッファ添加群に比べて、マウス NPC2 タンパク質を添加した群では約 20%程度のトリグリセリド蓄積量の増大が認められた (Figure 2-5)。さらに、脂肪細胞だけでなくマウス卵巣由来細胞である CHO-K1 細胞を用いて murine NPC2 タンパク質による脂肪蓄積促進が見いだされるか否かを検討したところ、CHO-K1 細胞においても murine NPC2 タンパク質によるトリグリセリド蓄積の促進が誘導されることが分かった (Figure 2-6)。これらの結果は、NPC タンパク質はマウス細胞においても脂肪蓄積を促進することを示唆している。さらに、murine NPC2 タンパク質を添加した 3T3-L1 細胞においてエネルギー代謝に関与する遺伝子の mRNA 量を定量的 RT-PCR 法を用いて測定した。脂肪細胞の転写因子をコードする *Pparg*、*Cebpa* 遺伝子および脂肪酸トランスポーターをコードする *Cd36* 遺伝子の発現量に murine NPC2 タンパク質の添加による有意な変動は認められなかった (Figure 2-7,2-8)。一方で、murine NPC2 タンパク質の添加によって脂肪細胞トリグリセリド分解酵素をコードする *Pnpla2* 遺伝子の発現量が減少していた (Figure 2-9)。また murine NPC2

タンパク質の添加によって長鎖脂肪酸アシル CoA デヒドロゲナーゼ *Acadl* の発現量は増大していたが、脂肪酸分解の律速段階であるカルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ *Cpt1b*、および中鎖脂肪酸アシル CoA デヒドロゲナーゼ *Acadm* 遺伝子の発現量が減少していた (Figure 2-10)。以上の結果は、murine タンパク質は 3T3-L1 細胞のトリグリセライドの分解に関与する遺伝子および中鎖脂肪酸の分解に関与する遺伝子の発現を抑制することを示唆している。

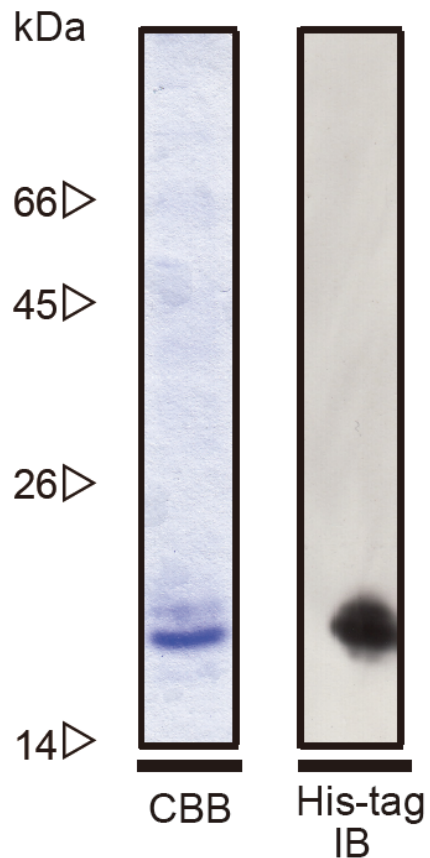


Figure 2-0 リコンビナント murine NPC2 タンパク質の作出

3T3-L1 細胞から RNA を調製し、murine NPC2 タンパク質の cDNA クローニングし、C 末端に 6×His-tag を導入したコンストラクトを pFastBac プラスミドにクローニングした。得られたプラスミドを導入したバキュロウイルスを作成し、Sf 9 細胞を用いてタンパク質を発現させた。得られた培養上清からコバルトキレートカラムを用いて精製した画分を murine NPC2 タンパク質画分とした。図は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の CBB 染色または抗 His-tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検出した結果を示す。

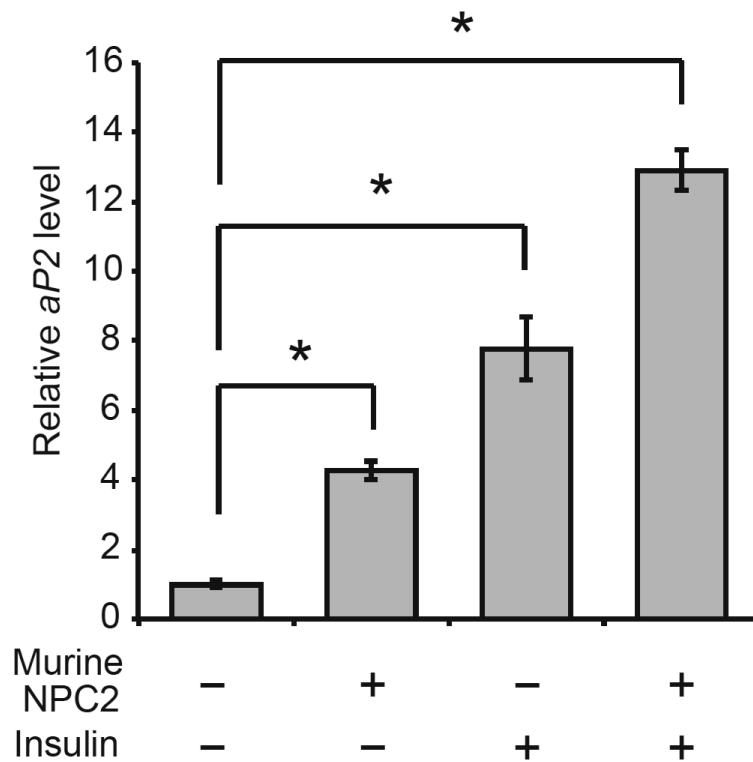


Figure 2-1 murine NPC2 タンパク質による 3T3-L1 繊維芽細胞に対する分化誘導の促進

3T3-L1 繊維芽細胞に対して 1 μ M デキサメタゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチンを用いて脂肪細胞への分化誘導を 3 日間行った。この分化誘導の期間に、さらに 20 μ g/mL murine NPC2 タンパク質または 1 μ M インスリンを添加した場合における *aP2* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて定量した。内部標準遺伝子は *arbp* を用いた。データは平均値 \pm 標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。

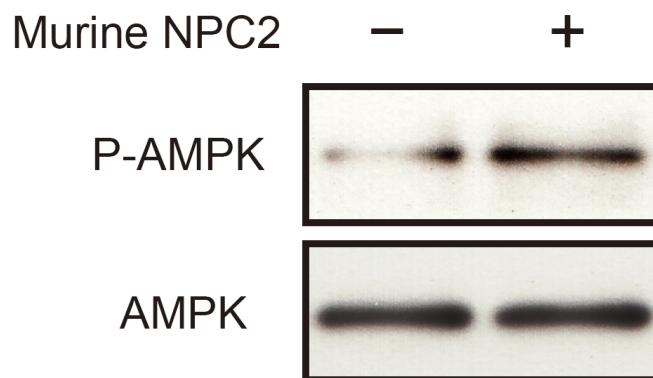


Figure 2-2 murine NPC2 タンパク質による 3T3-L1 繊維芽細胞に対する AMPK の活性化

3T3-L1 繊維芽細胞に対して 1 μ M デキサメタゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチンを用いて脂肪細胞への分化誘導を 3 日間行った。この分化誘導の期間に、さらに 20 μ g/mL murine NPC2 タンパク質を添加した場合における AMPK のリン酸化をウェスタンブロットティングによって検出した。

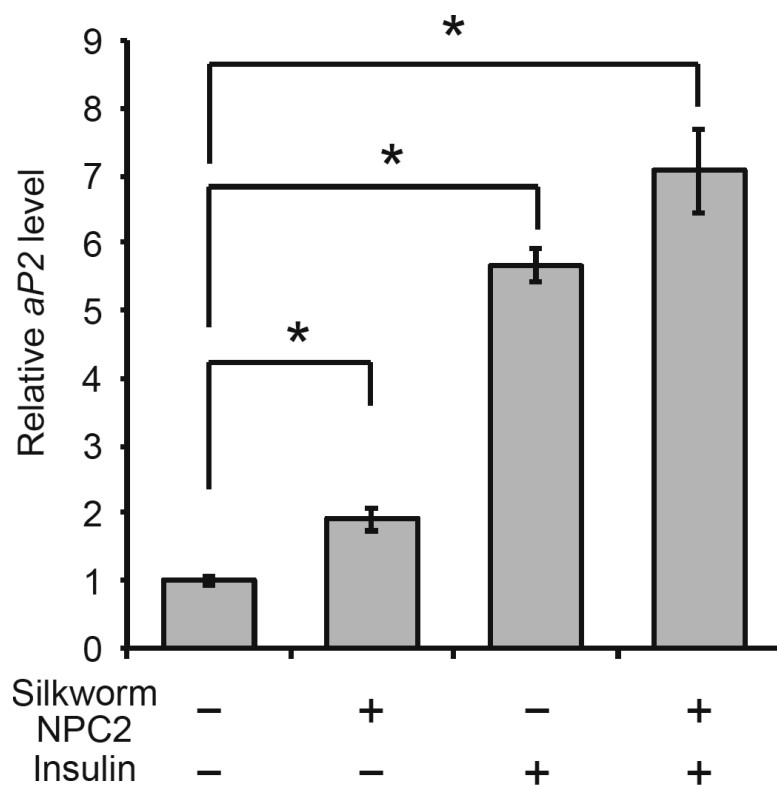


Figure 2-3 BmNPC2 タンパク質による 3T3-L1 繊維芽細胞に対する分化誘導の促進

3T3-L1 繊維芽細胞に対して 1 μ M デキサメタゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチンを用いて脂肪細胞への分化誘導を 3 日間行った。この分化誘導の期間に、さらに 20 μ g/mL BmNPC2 タンパク質または 1 μ M インスリンを添加した場合における *aP2* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR 法を用いて定量した。内部標準遺伝子は *arbp* を用いた。データは平均値 \pm 標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。

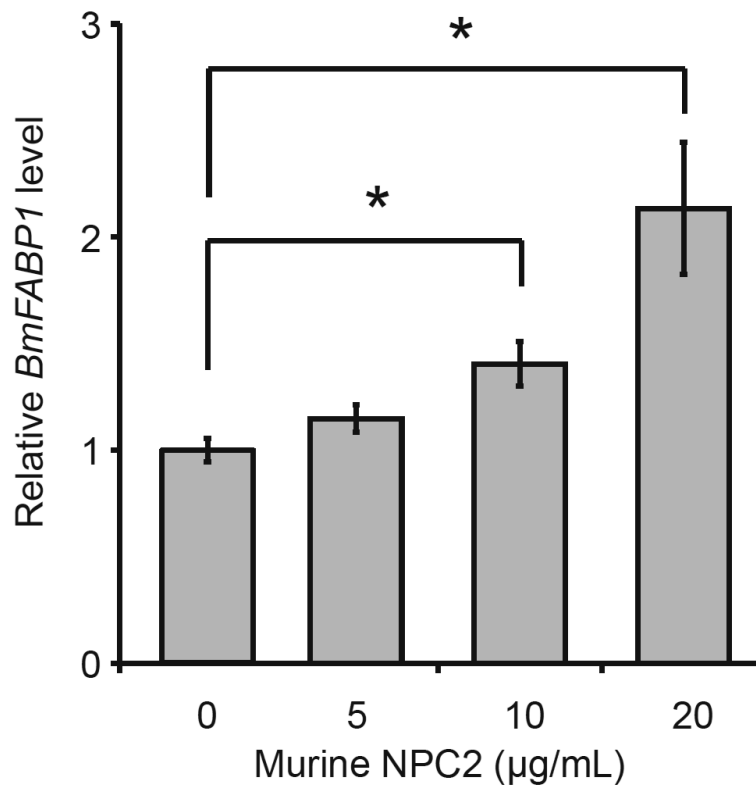


Figure 2-4 murine NPC2 タンパク質による BmN4 細胞に対する *BmFABP1* の発現誘導
Murine NPC2 タンパク質を添加した培地を用いて BmN4 細胞を 2 日間培養し、定量的 RT-PCR 法によって *Rpl* を内部標準とした相対的な *BmFABP1* の mRNA 量を定量した。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。

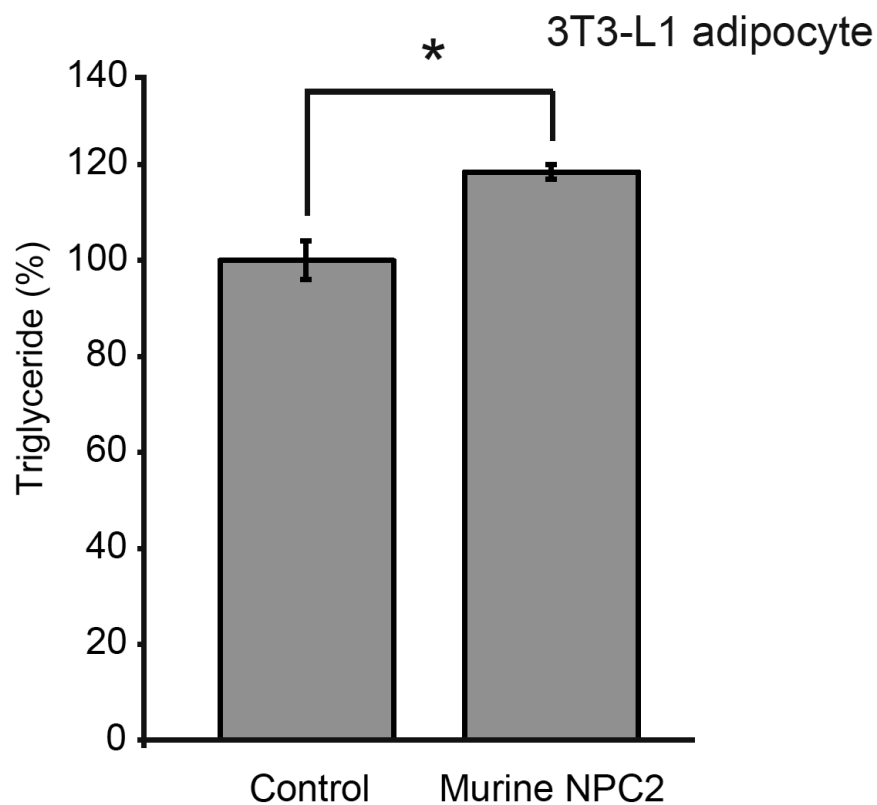


Figure 2-5 murine NPC2 タンパク質による 3T3-L1 脂肪細胞に対する脂肪蓄積の促進
 3T3-L1 脂肪細胞に対して 20 $\mu\text{g/mL}$ murine NPC2 タンパク質を添加し 24 時間培養を行った。その後、トリプシン EDTA を用いて回収し Bligh-Dyer 法により総脂質画分を調製しトリグリセリド量を定量した。データは平均値 \pm 標準誤差($n=2$)を示す。*; $p<0.05$ 。

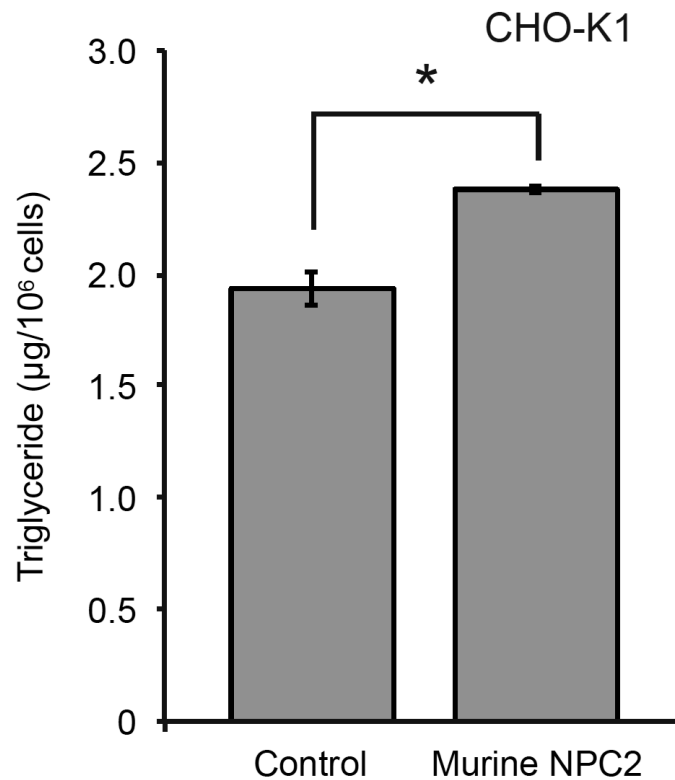


Figure 2-6 murine NPC2 タンパク質による CHO-K1 細胞に対する脂肪蓄積の促進

CHO-K1 細胞に対して 20 μg/mL murine NPC2 タンパク質を添加し 24 時間培養を行った。その後、トリプシン EDTA を用いて回収し Bligh-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。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。

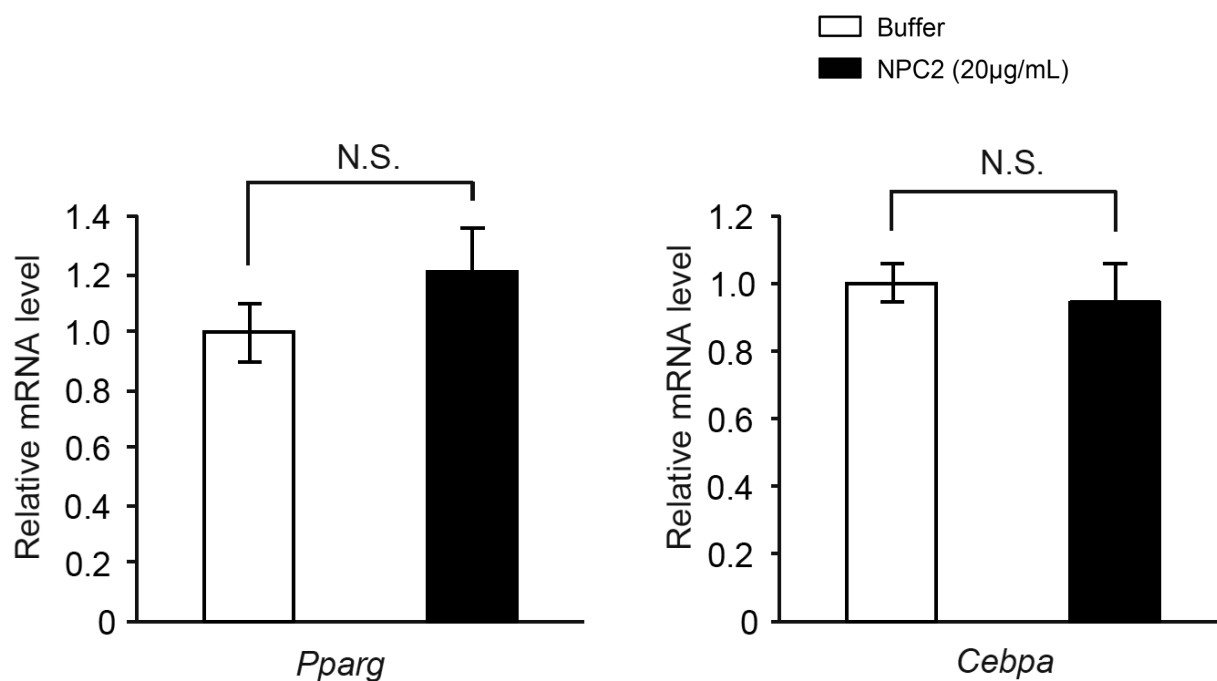


Figure 2-7 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪細胞関連転写因子の発現量に対する murine NPC2 タンパク質の影響

3T3-L1 脂肪細胞に対して 20 µg/mL murine NPC2 タンパク質を添加し 24 時間培養を行った。その後、定量的 RT-PCR によって *Pparg*、*Cebpa* の mRNA 量を定量した。内部標準遺伝子として *arbp* を用いた。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。N.S.; not significant

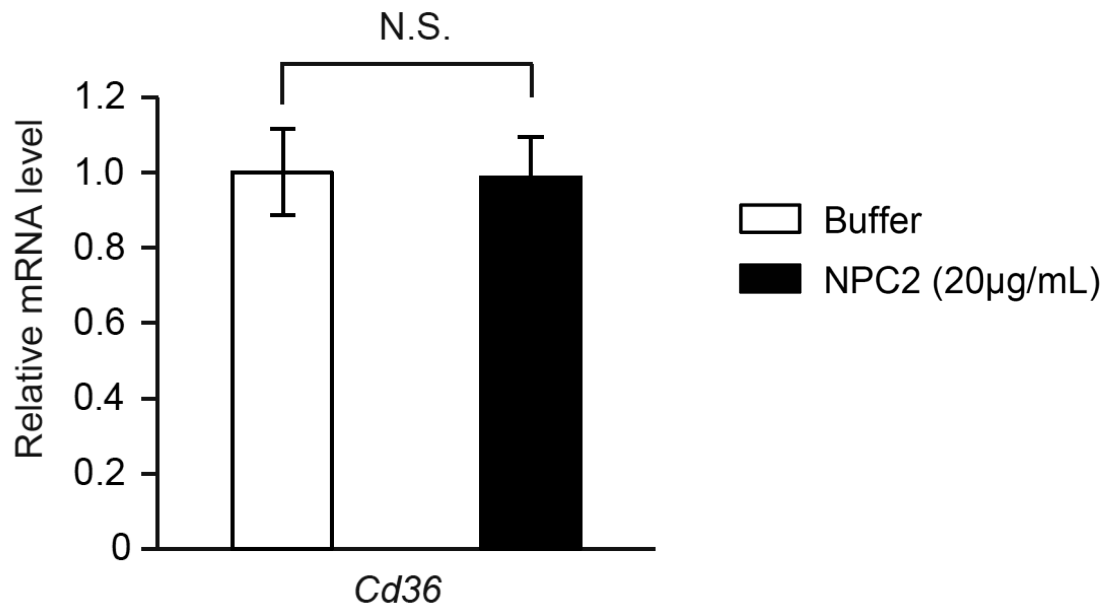


Figure 2-8 3T3-L1 脂肪細胞における脂肪酸輸送タンパク質の発現量に対する murine NPC2 タンパク質の影響

3T3-L1 脂肪細胞に対して 20 µg/mL murine NPC2 タンパク質を添加し 24 時間培養を行った。その後、定量的 RT-PCR によって *Cd36* の mRNA 量を定量した。内部標準遺伝子として *arbp* を用いた。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。N.S.; not significant

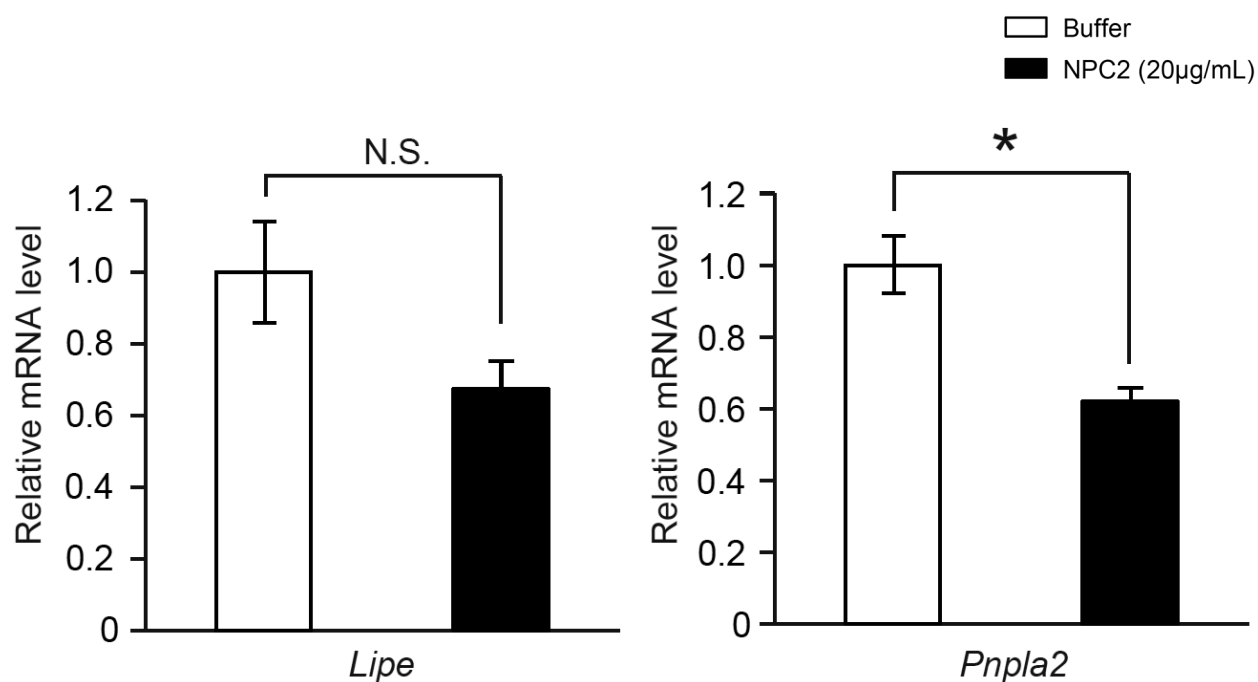


Figure 2-9 3T3-L1 脂肪細胞におけるトリグリセリド分解酵素の発現量に対する murine NPC2 タンパク質の影響

3T3-L1 脂肪細胞に対して 20 μg/mL murine NPC2 タンパク質を添加し 24 時間培養を行った。その後、定量的 RT-PCR によって *Lipe*、*Pnpla2* の mRNA 量を定量した。内部標準遺伝子として *arbp* を用いた。データは平均値±標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。N.S.; not significant

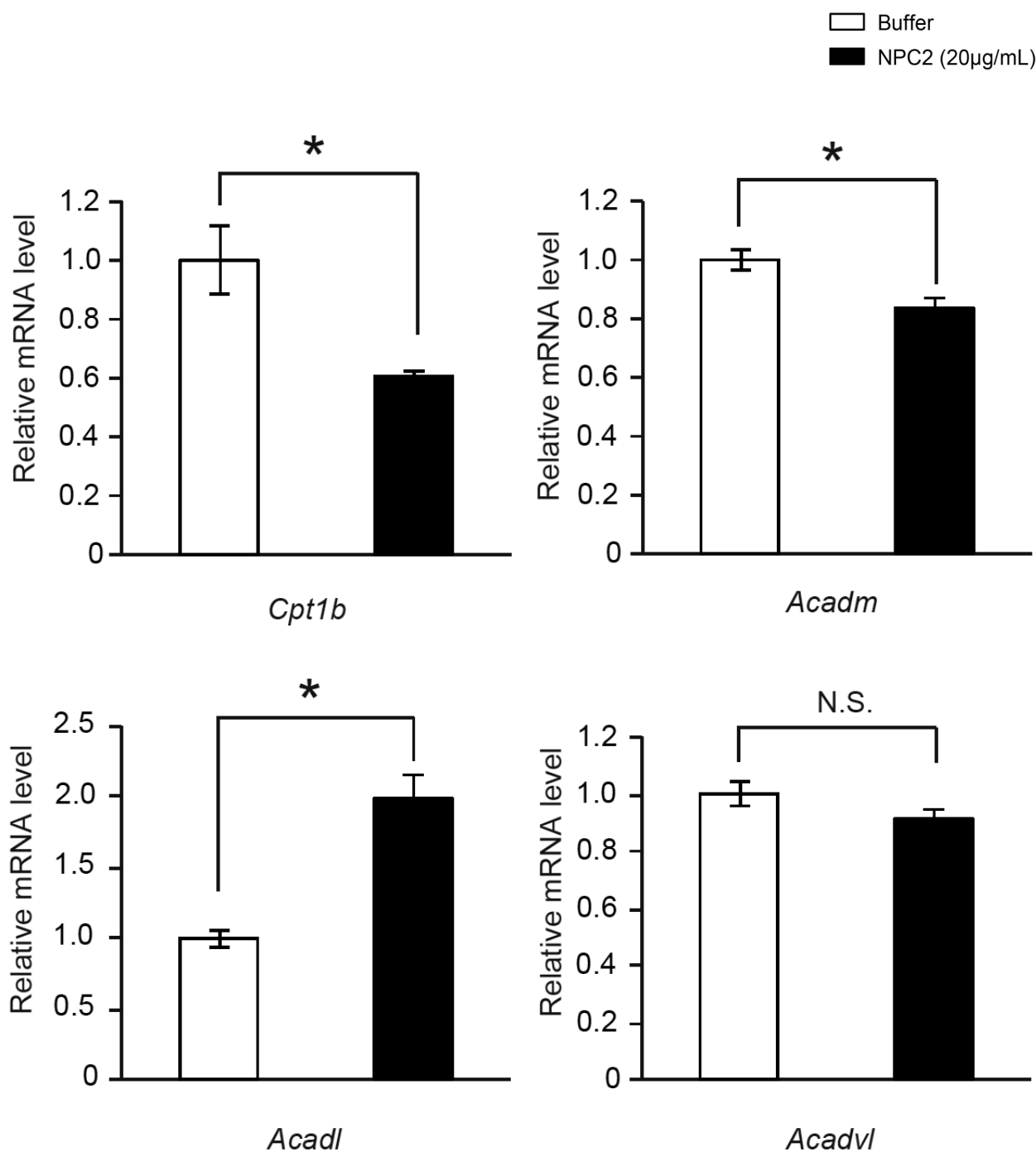


Figure 2-10 3T3-L1 脂肪細胞における β 酸化関連酵素の発現量に対する murine NPC2 タンパク質の影響

3T3-L1 脂肪細胞に対して 20 μ g/mL murine NPC2 タンパク質を添加し 24 時間培養を行った。その後、定量的 RT-PCR によって *Cpt1b*、*Acadm*、*Acadl*、*Acadvl* の mRNA 量を定量した。内部標準遺伝子として *arbp* を用いた。データは平均値 \pm 標準誤差($n=3$)を示す。*; $p<0.05$ 。N.S.; not significant

2. マウス NPC2 タンパク質の新規相互作用膜タンパク質の同定

私は、3T3-L1 細胞を用いて NPC2 タンパク質の新規相互作用因子の探索を試みた。細胞膜非透過性のタンパク質クロスリンカーである DTSSP を用いて相互作用因子を探索する方法を用いた。DTSSP は還元条件を用いることで SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動の際に切断することが可能である。3T3-L1 細胞、murine NPC2 タンパク質、および DTSSP を混合した後、murine NPC2 タンパク質に導入した His-tag を用いてアフィニティー精製を行った。得られた画分を還元条件において SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供したところ、murine NPC2 タンパク質以外に複数のタンパク質のバンドが検出された (Figure 2-11)。これらのタンパク質を切り出し、トリプシン消化後、質量解析によってペプチド断片の分子量を計測した。得られた分子量群から Mascot 解析を行った。Mascot 解析の Score が、一般的な同定の基準値とされる 50 以上となったタンパク質はマウス Cytoskeleton-associated protein 4 (CKAP4)のみであった (Figure 2-11(白矢印のバンド), 2-12)。この他のバンドの候補タンパク質は Score が 50 以下であり、またそれぞれの最も Score の高い候補が膜タンパク質ではなかったことから解析から除外した。次に、この系において murine NPC2 タンパク質の添加依存的に CKAP4 の増大が起こるか否かを抗 CKAP4 抗体を用いたウェスタンブロッティングによって検証したところ、murine NPC2 タンパク質の添加により CKAP4 のバンド強度の増大が認められた (Figure 2-13)。この結果は CKAP4 タンパク質がマウス NPC2 タンパク質の相互作用因子の一つであることを示唆している。さらに私は、マウス NPC2 タンパク質と CKAP4 に直接の結合が見られるか否かを検討するため、CKAP4 のリコンビナントタンパク質の作出に着手した。CKAP4 は細胞外ドメイン、膜貫通領域、細胞内ドメインから構成されると先行研究において推定されている。そこで私は CKAP4 の細胞外ドメイン (Extracellular domain; ECD) のリコンビナントタンパク質を得ることにした (Figure 2-14)。大腸菌を用いてリコンビナント GST 融合 CKAP4-ECD タンパク質を作出し、マウス NPC2 タンパク質を混合した後、GST-tag に対するアフィニティー精製を行った。アフィニティー精製画分に対して抗 His-tag 抗体によるウェスタンブロッティングを行ったところ、GST タンパク質に比べて GST 融合 CKAP4-ECD を用いた精製画分の方がマウス NPC2 タンパク質のバンド強度が大きかった (Figure 2-15)。CKAP4 は Akt の活性を抑制することが報告されている (Shahjee *et al*, 2010)。そこで 3T3-L1 細胞における Akt のリン酸化を評価したところ、murine NPC2 の添加によって Akt のリン酸化が減弱した (Figure 2-16)。以上の結果は、CKAP4 は NPC2 タンパク質の新規相互作用因子であることを示唆している。

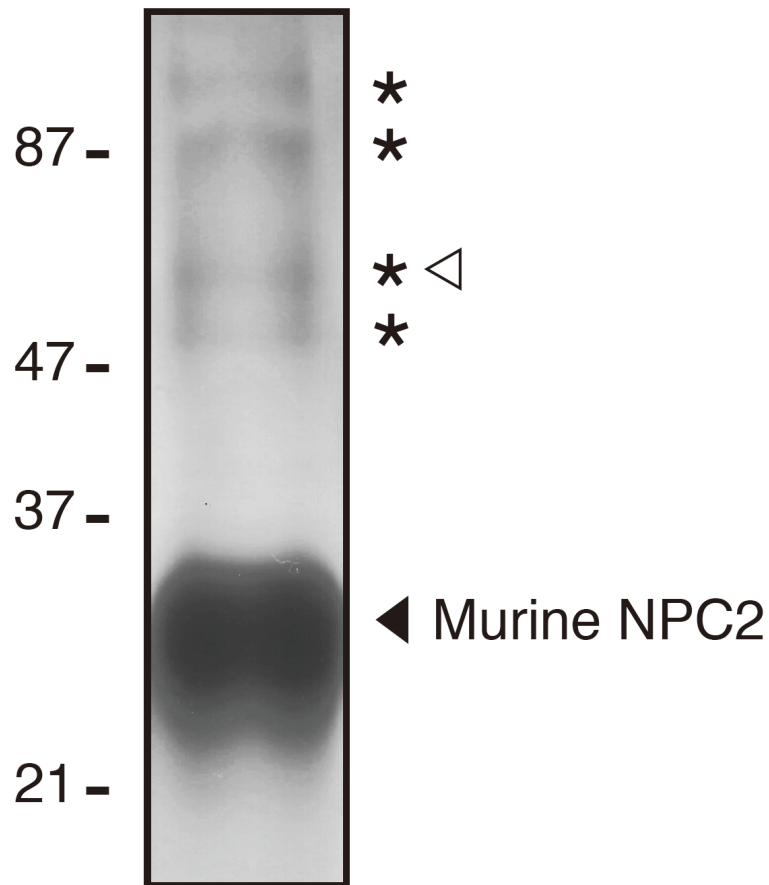


Figure 2-11 3T3-L1 細胞、murine NPC2 タンパク質およびクロスリンカーを用いた murine NPC2 タンパク質の相互作用因子の探索

3T3-L1 細胞に対して murine NPC2 タンパク質とタンパク質架橋剤 DTSSP を混合し、コバルトキレートカラムを用いて murine NPC2 タンパク質に導入した His-tag に対するアフィニティー精製を行った。得られた画分を SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し CBB 染色を行った。黒矢印; murine NPC2、*; 本研究において着目したバンド、白矢印; Mascot 解析によって同定できたバンド。

Identification of CKAP4

Enzyme:

Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P.

Fixed modifications: Carboxymethyl (C), Xlink:DTSSP (K)

Variable modifications: Oxidation (M)

Mass values searched: 39

Mass values matched: 17

Protein sequence coverage: 33%

1	MPSAKQRGSK	GGHGAASPSD	KGAHPSGGAD	DVAKKPPAAP	QQPQPPAPHP
51	PQHPQNQAHR	GGHRGRSSAA	TANASSASCS	RRLGRVLNFL	FYLSLVAAAA
101	FSGWYVHHVL	EEVQQVRRGH	QDFSR <u>QRDEL</u>	<u>GQGLOGVEQK</u>	VQSLQATFGT
151	FESLLR <u>NSQH</u>	<u>KQDLTEK</u> AVK	EGESELNRIS	EVLQKLQNEI	LKDLSGDIHV
201	VKDARERDFT	SLENTVEERL	TELTK <u>SINDN</u>	<u>IATFTDVQK</u> R	SQKEINEVKM
251	K <u>VASLEESKG</u>	<u>DR</u> SQDVKTLK	DAVK <u>EVQASM</u>	<u>MSRER</u> DIEAL	KSSLQTMESD
301	VYTEVRELVS	LK <u>QEQQAFKQ</u>	<u>AADSER</u> LALQ	ALTEKLLRSE	ESSSRLPEDI
351	RR <u>LEEELQQL</u>	<u>KVGAHGSEEG</u>	<u>AVFKDSK</u> ALE	ELQR <u>QTEGLG</u>	<u>ARLQYVEDGV</u>
401	<u>YSMQVASARH</u>	<u>TESLESLLSK</u>	<u>SQEYEQRLAM</u>	<u>LQEHVGNLGS</u>	<u>SSDLASTVRS</u>
451	<u>LGETQLALSS</u>	<u>DLK</u> ELKQSLG	ELPGTVESLQ	EQVLSLLSQD	QAQAEGLPPQ
501	DFLDRLSSLD	NLKSSVSQVE	SDLK <u>MLRTAV</u>	<u>DSLVAYSVKI</u>	ETNENNLESA
551	KGLLDDLNRD	LDRLFLKVEK	IHEKI		

Figure 2-12 質量分析による murine NPC2 タンパク質相互作用因子の同定

Mascot 解析の結果を示す。赤字; 同定されたペプチド断片。

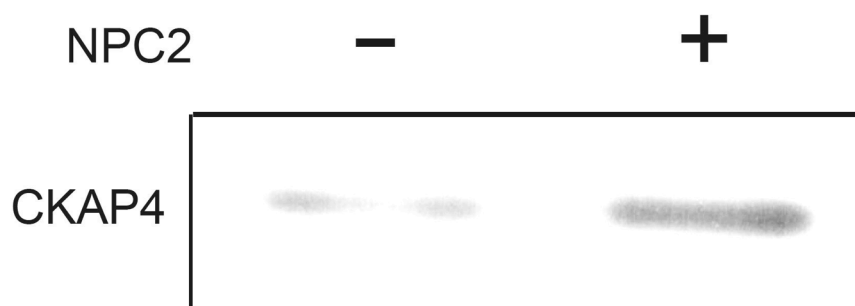


Figure 2-13 murine NPC2 タンパク質の相互作用因子画分における CKAP4 の増大
 3T3-L1 細胞と DTSSP に対して、さらに murine NPC2 を添加した混合物をコバルトキレートカラムに供した。得られた画分に対して抗 CKAP4 抗体を用いたウェスタンブロッティングを行った。

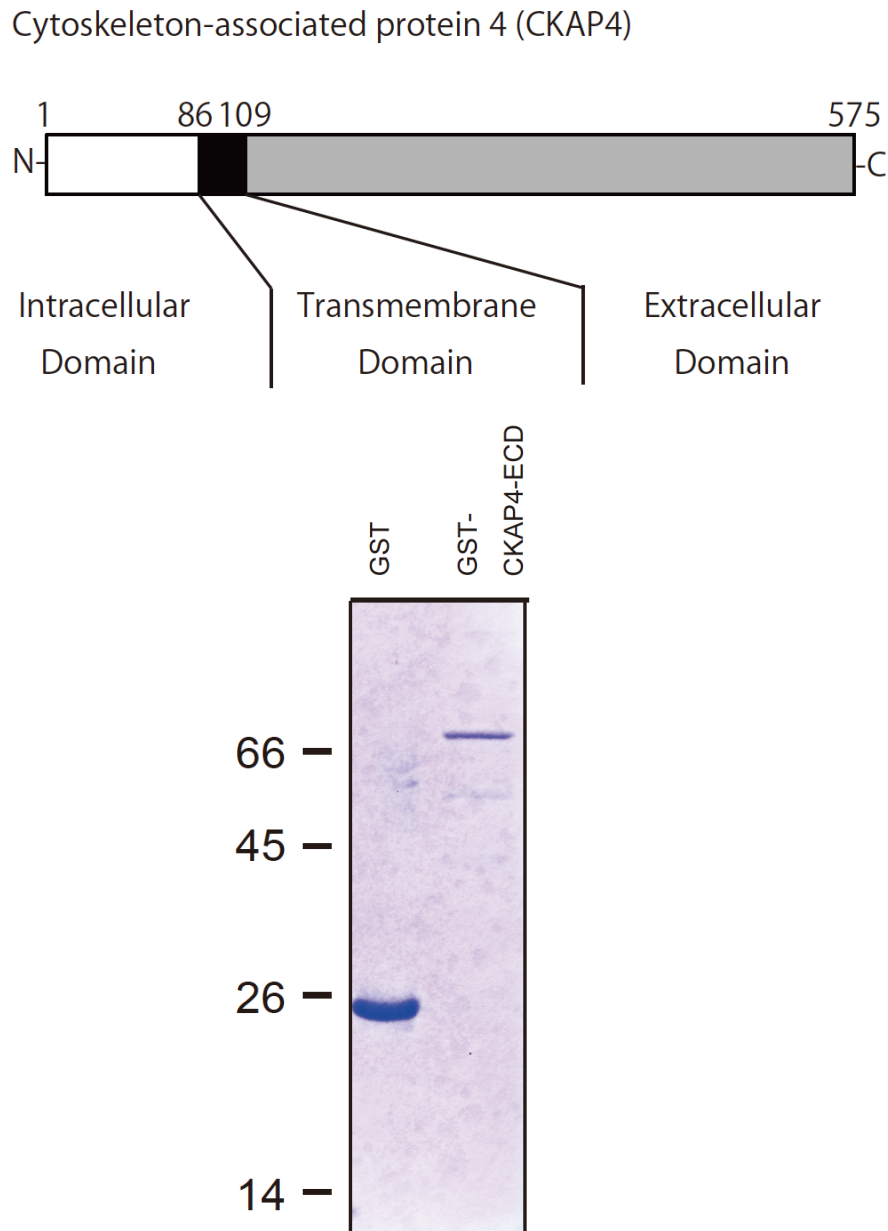


Figure 2-14 CKAP4 細胞外ドメインと GST 融合タンパク質の作出

マウス CKAP4 のトポロジーモデルを上段に示す。3T3-L1 細胞から cDNA を調製し、CKAP4-Extracellular domain (ECD)をコードする配列を pGEX4T3 プラスミドにクローニングした。得られたプラスミドを BL21(DE3)pLysS 大腸菌に発現させ、グルタチオンセファロースカラムを用いて精製した。GST タンパク質は pGEX4T3 空ベクターを用いて同様に発現させ、精製した。

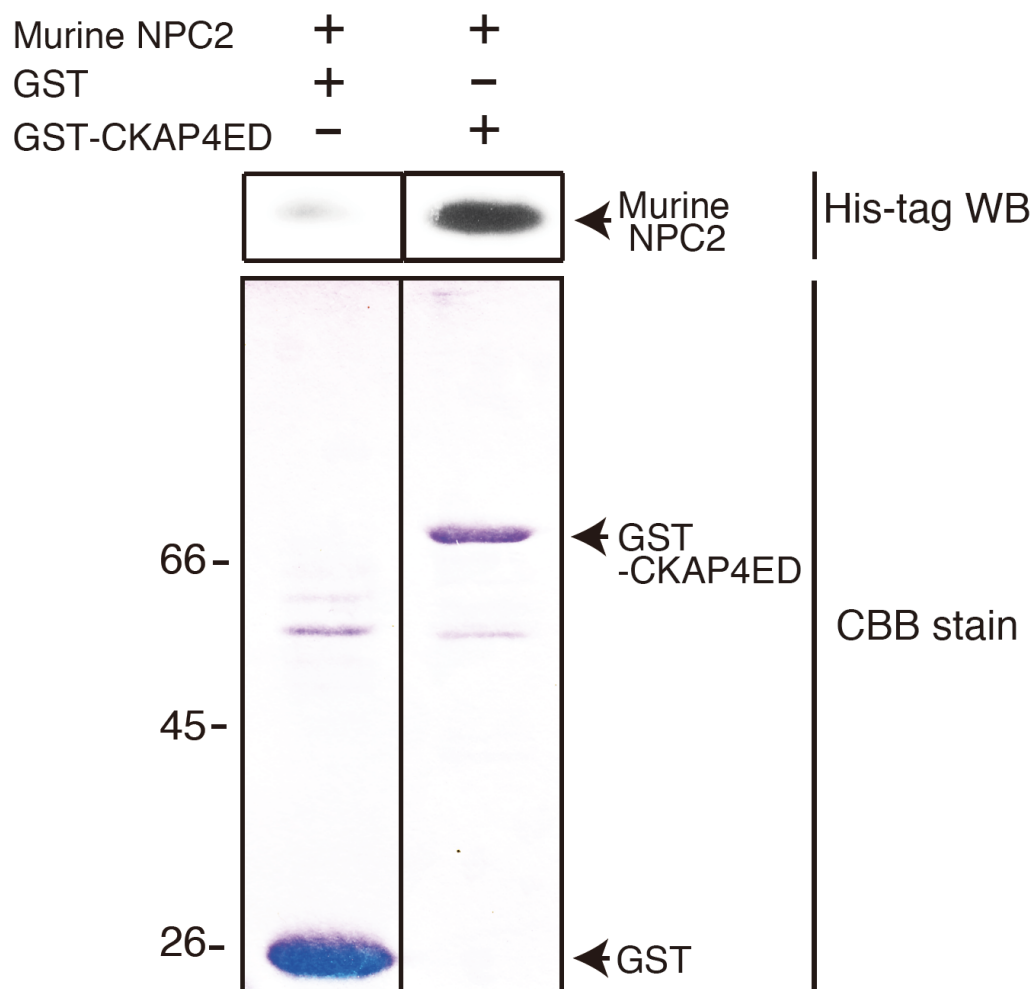


Figure 2-15 CKAP4 細胞外ドメインと GST の融合タンパク質を用いた murine NPC2 タンパク質に対する GST プルダウンアッセイ

GST タンパク質または GST-CKAP4-ECD タンパク質をグルタチオンセファロースレジン 20 μ L に吸着させ、200 μ g/mL murine NPC2 タンパク質 200 μ L と混合した。25 mM HEPES(pH 7.2)、100 mM NaCl、10% グリセロールバッファを用いて 5 回洗浄した後、SDS サンプルバッファに溶解した。得られた画分を抗 His-tag 抗体を用いたウェスタンブロッティングに供した。

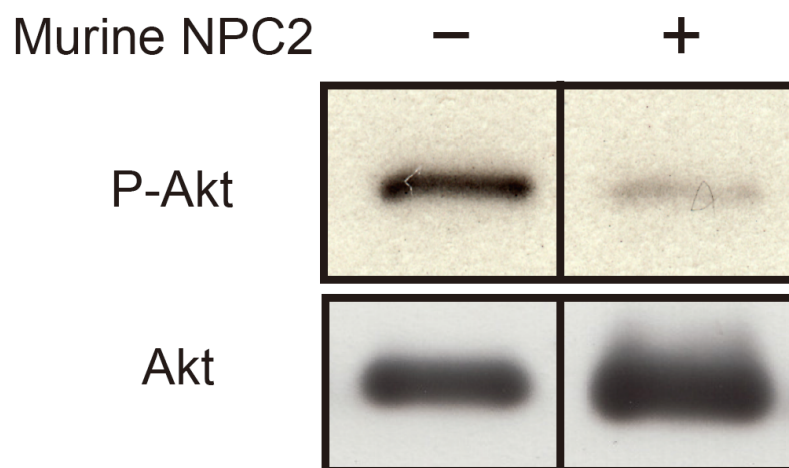


Figure 2-16 murine NPC2 タンパク質による 3T3-L1 繊維芽細胞に対する AMPK の活性化

3T3-L1 脂肪細胞に対して 20 $\mu\text{g/mL}$ murine NPC2 タンパク質を添加し、24 時間培養した。その後細胞を溶解し、Akt のリン酸化をウェスタンブロットティングによって検出した。

考察

第二章において私は、哺乳動物細胞における NPC2 タンパク質の機能に関する解析を行った。Murine NPC2 タンパク質がマウス繊維芽細胞 3T3-L1 の脂肪細胞への分化を促進することを明らかにした。また murine NPC2 タンパク質が 3T3-L1 脂肪細胞や CHO-K1 細胞においてトリグリセリドの蓄積を促進することを見いだした。そして murine NPC2 タンパク質の新規相互作用因子として CKAP4 を同定した。

これまでの研究において NPC2 のノックダウンによりヒト脂肪細胞のトリグリセリド蓄積量が減少することが報告されているが(Csepegi *et al*, 2010)、ノックダウンによる細胞内 NPC2 タンパク質の減少と細胞外 NPC2 タンパク質の減少は区別されていない。また NPC2 の欠損は細胞内へのコレステロール蓄積量の増大という表現型を示すため、NPC2 タンパク質量の過多と脂質蓄積量の大小関係は一般化されていない。したがって、細胞外から添加した NPC2 タンパク質が脂肪細胞のトリグリセリド蓄積を促進することを本研究において始めて明らかにしたと私は考えている。

先行研究における NPC2 のノックダウンは脂肪細胞トリグリセリドリパーゼ (ATGL) の発現を上昇させることがわかっている。私は murine NPC2 タンパク質の添加によって ATGL のマウスホモログである *Pnpla2* の発現量が減少することを見いだしており、先行研究と一致していると考えられる。NPC2 タンパク質によるトリグリセリドリパーゼの発現減少は細胞における脂肪分解の抑制につながると考えられる。第一章において私は NPC2 タンパク質が AMPK を活性化させることを論じている。AMPK は脂肪細胞において anti-lipolytic な作用を持つと考えられており(Daval *et al*, 2005)、NPC2 タンパク質によるトリグリセリドリパーゼの発現減少と矛盾しない結果である。

一方、脂肪細胞分化に関しては本研究と先行研究の間に一見した乖離が認められる。本研究では NPC2 タンパク質の添加により脂肪細胞分化が促進されると考察しているのに対し、先行研究では NPC2 の欠損繊維芽細胞では脂肪細胞分化能を獲得する（間葉系幹細胞の性質を示す）と考察している(Csepegi *et al*, 2010)。これに対して私は二つの仮説を考えている。一つは、NPC2 タンパク質が細胞を分化した状態に固定する作用があるとする仮説である。すなわち本研究では脂肪細胞を未分化な状態から分化状態へ平衡を移動させ、先行研究では NPC2 を欠損することで分化状態が可塑的になるという仮説である。もう一つの仮説は、必ずしも排他的ではないが、脂肪細胞の分化誘導方法の違いによって説明するものである。古典的な脂肪細胞の分化誘導剤はインスリン、デキサメタゾン、イソブチル

メチルキサンチンの混合カクテルによるものであり本研究ではこちらを用いている。一方、先行研究では PPAR γ アゴニストを用いた分化誘導を行っている。PPAR γ は混合カクテルの下流で活性化されるため、PPAR γ アゴニストでは分化誘導に必要な内因性因子が少ないと考えられる。例えば、オートファジーに必須な遺伝子 *Atg5* をノックダウンした 3T3-L1 細胞は混合カクテルによる分化誘導がほとんどみられないのに対し、PPAR γ アゴニストによる分化誘導は正常に進行する(Ro *et al*, 2013)。したがって、例えば NPC2 タンパク質がオートファジーの誘導を介した脂肪細胞分化に寄与しているならば本研究と先行研究は矛盾せず説明できると考えられる。なお、NPC2 タンパク質によるオートファジーの誘導は第三章において考察する。

NPC2 タンパク質の相互作用因子としてこれまで報告されているタンパク質として、Mannose 6-phosphate receptor (M6PR)、Nogo-B receptor (NgBR)、Glycine N-methyltransferase (GNMT) が知られている。Mannose 6-phosphate receptor はリソソームタンパク質に共通してみられるマンノース 6 リン酸修飾を認識して新規合成リソソームタンパク質または細胞外タンパク質の後期エンドソーム/リソソームへの移行を行っていると考えられている。NPC2 タンパク質はリソソームのプロテオーム解析から同定されたため(Naureckiene *et al*, 2000)、M6PR と NPC2 タンパク質の相互作用は NPC2 タンパク質の発見当時から推定されていた。細胞外からのマンノース 6 リン酸修飾タンパク質の取り込みに預かる M6PR は cation-independent M6PR (CI-M6PR) と呼ばれる膜タンパク質であり、insulin like growth factor 2 (IGF-II) 受容体としても知られている。CI-M6PR は細胞表面にも存在しているが、細胞内に GPCR のような酵素ドメインを有さず、IGF-II の細胞外からのクリアランスに作用していると考えられている。NgBR と NPC2 タンパク質の相互作用は、yeast two-hybrid 法による NgBR の相互作用因子のスクリーニングから発見された(Harrison *et al*, 2009)。GNMT と NPC2 タンパク質の相互作用も同様に、yeast two-hybrid 法による GNMT の相互作用因子のスクリーニングから発見された(Liao *et al*, 2012)。いずれの場合においても NPC2 タンパク質を基準とした相互作用因子の探索は行われていない。したがって本章における NPC2 タンパク質の新規相互作用膜タンパク質の探索は新しい試みである。

NgBR をノックダウンすることにより細胞内の NPC2 タンパク質のクリアランスが速くなることがわかっている。GNMT を過剰発現させた細胞では NPC2 タンパク質の半減期が延長することが見いだされている。以上の点から、NPC2 タンパク質のこれまで同定されている相互作用因子は NPC2 タンパク質の安定性に寄与することがわかっている一方で、

直接情報伝達に与ることは予測できない。本研究では murine NPC2 タンパク質の新規相互作用因子として CKAP4 を同定した。CKAP4 はゴルジ-小胞体間の膜タンパク質として同定されているが、細胞膜にも局在することがわかっている。最近の研究によって、CKAP4 は Anti-proliferative factor (APF) の受容体として報告されている(Conrads *et al*, 2006)。APF は間質性膀胱炎の患者の体液から検出されるペプチドであり、膀胱がん細胞に対して増殖を抑制する活性を有する(Shahjee *et al*, 2010)。この知見は私が NPC2 タンパク質において見いだした細胞増殖抑制活性と合致するものである。CKAP4 は DNA 結合領域を有しており、リガンド結合後核内へ移行し転写因子として働くことが報告されている(Matika *et al*, 2012)。したがって、CKAP4 は NPC2 タンパク質の受容体として情報伝達を行い得るといえる。

材料と方法

リコンビナントタンパク質画分の調製法、ウェスタンブロッティング法、RT-PCR 法は第一章で用いた方法に準じた。

Murine NPC2 タンパク質 cDNA のクローニング

3T3-L1 細胞から murine NPC2 タンパク質の cDNA を Zero Blunt TOPO PCR クローニングキット(Invitrogen)を用いてクローニングした。PCR プライマーは Forward: 5' TAT CCA CGA TGC GTT TTC TG 3'、Reverse: 5' CCA AGG AGC CTA GCT TGT GA 3'を用いて 1 回目の増幅を行い、さらに Reverse: 5' CTA GTG GTG ATG GTG ATG ATG GCT TGT GAT CTG AAC TGG GAT 3'を用いて 2 回目の増幅を行うことによって C 末端に His-tag を導入した。

細胞培養

3T3-L1 繊維芽細胞は JCRB 細胞バンクより購入した(JCRB9014)。3T3-L1 繊維芽細胞は Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)(Invitrogen)に 10%FBS(Hyclone)および、100 IU ペニシリン(Invitrogen)、100 μ g/mL (Invitrogen)ストレプトマイシン(Invitrogen)を添加した培地を用い、37°C 5%CO₂ 条件下で培養した。3T3-L1 細胞は 2 日に 1 回培地交換を行い、サブコンフルエントの段階で経代した。CHO-K1 細胞は東京大学大学院薬学系研究科 有田 誠 准教授から分与して頂いた。CHO-K1 細胞は Ham's F12 Medium (wako)に 10%FBS および、100 IU ペニシリン、100 μ g/mL ストレプトマイシンを添加した培地を用い、37°C 5%CO₂ 条件下で培養した。

3T3-L1 繊維芽細胞の脂肪細胞への分化

3T3-L1 細胞を 12 well plate(IWAKI tissue culture treated)に播種し、コンフルエントに達するまで培養した後、さらに 2 日間培養を続けた。この間、2 日に 1 回培地交換を行った。コンフルエントから 2 日後(day 0 とする)、経代用培地に 1 μ M デキサメタゾン、0.5 mM イソブチルメチルキサンチン、1 μ g/mL インスリンを添加した培地に交換し 3 日間培養した。その後(day 3)、経代用培地に交換し培養した。その間 3 日に 1 回培地交換を行った。実験には day 9 の細胞を用いた。

抗体

AMPK の抗体は第一章と同じである。抗リン酸化 Akt(Ser473)抗体および抗 Akt 抗体は CST Japan から購入した。抗 CKAP4 抗体は Sigma から購入した。

RT-PCR primer

RT-PCR 用プライマーは *Pnpla2* (Forward: 5' GGA CCC GGG AAG ATT GGT 3', Reverse: 5' AGC ACA AAG TTC TGG GCA AGA 3'), *Cpt1b* (Forward: 5' GTG CAA GCA GCC CGT CTA G 3', Reverse: 5' TTG CGG CGA TAC ATG ATC AT 3'), *Acadm* (Forward: 5' GCT GGA GAC ATT GCC AAT CAG 3', Reverse: 5' ATC CAT AGC CTC CGA AAA TCT G 3'), *aP2* (Forward: 5' GAT GCC TTT GTG GGA ACC T 3', Reverse: 5' CTG TCG TCT GCG GTG ATT T 3'), *Pparg* (Forward: 5' TCA GCT CTG TGG ACC TCT CC 3', Reverse: 5' ACC CTT GCA TCC TTC ACA AG 3'), *Cebpa* (Forward: 5' CAA GAA CAG CAA CGA GTA CCG 3', Reverse: 5' GTC ACT CGT CAA CTC CAG CAC 3'), *Cd36* (Forward: 5' CGG AAC TGT GGG CTC ATT G 3', Reverse: 5' GCA TGA GAA TGC CTC CAA ACA 3'), *Lipe* (Forward: 5' CTC CTA TGA CCT ACG GGA AGG A 3', Reverse: 5' TCA GAT TTT GCC AGG CTG TTG 3'), *Acadl* (Forward: 5' GGC AAA ATA CTG GGC ATC TGA 3', Reverse: 5' CTC CGT GGA GTT GCA CAC AT 3'), *Acadvl* (Forward: 5' TGG CCT GGT CAC CGG TAA 3', Reverse: 5' ACC TTG CCA GGG CCT GAT 3'), *arbp* (Forward: 5' TTT GGG CAT CAC CAC GAA AA 3', Reverse: 5' GGA CAC CCT CCA GAA AGC GA 3')を用いた。

相互作用因子の同定

3T3-L1 細胞を 75 cm² フラスコ 3 枚に培養し、コンフルエントに達してから 2 日後に PBS で 2 回洗浄した後、セルスクレイパーを用いて細胞を回収した。回収した細胞を遠心によって濃縮し 800 μ L とした。細胞懸濁液に終濃度 25 mM DTSSP (DOJINDO) および 20 μ g/mL murine NPC2 タンパク質を加え 1 mL とした。4°C において 2 時間混和した後、1M Tris/HCl (pH 8.0)を 50 μ L 加えてクロスリンク反応を停止させた。得られた懸濁液を 1% Triton X-100、2M 塩酸グアニジンを用いて可溶化し、コバルトカラム(Thermo scientific)を用いて精製した。得られた画分を 2 メルカプトエタノールによる還元条件化において SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動に供し、CBB 染色を行った。

質量分析および Mascot 解析

質量分析はトリプシンによるゲル内消化後、Microflex LRF 20 (Bruker Daltonics)を用いて行った。得られたペプチド質量をリジン残基への DTSSP Xlink をパラメーターに加えて Mascot 解析に供した。タンパク質が同定されたとするクライテリアは Expect value <0.05, Score >50 とした。

CKAP4 細胞外ドメインと GST 融合タンパク質の作出

3T3-L1 由来 cDNA から Forward primer: 5'gctggtatgtccatcacgtc3'、Reverse primer: 5'aagaaactgtgccccacac3'を用いて PCR を行い、得られた増幅断片に対してさらに Forward primer: 5' AAGAATTCCgtcctggagg3'、Reverse primer: 5' AACTCGAGGtagatcttt3'を用いた PCR を行った後、pGEX4T3 プラスミドの *EcoRI* および *XhoI* サイトにクローニングした。得られたプラスミドを大腸菌 BL21(DE3)pLysS に導入し培養した。対数増殖期の細胞に対して 0.5 mM イソプロピル- β -チオガラクトピラノシドを加えてさらに培養し遠心によって菌体を回収した。菌体を超音波処理によって破碎し、遠心上清をグルタチオンセファロースカラムによって精製した。GST プルダウンアッセイは大腸菌培養液 5 mL 分の GST タンパク質または GST-CKAP4 タンパク質を 20 μ L のグルタチオンセファロースレジンを吸着させることによって行った。

第三章

マウス FM3A 細胞を用いた NPC2 タンパク 質による細胞増殖抑制機構の解析

緒言

第三章ではカイコ体液、あるいは NPC2 タンパク質の細胞増殖抑制活性に着目し、マウスがん細胞増殖抑制因子としての NPC2 タンパク質の解析を行う。第二章において BmNPC2 タンパク質における知見がマウスにおいても適応可能であることを検証した。がん細胞の増殖を制御する天然物の同定は、新しい抗がん剤の候補およびがん治療の標的となる生理機構の発見につながることを期待される。これまで植物からパクリタキセル、ビンクリスチン、カンプトテシン等のがん細胞の増殖を抑制する有機化合物が同定されてきた。動物である昆虫も哺乳動物がん細胞に対する増殖抑制因子を探索するリソースとなる。これまで昆虫体液から哺乳動物がん細胞の増殖を抑制する分子の同定が報告されており、これらはペプチド性の因子である(Lichtenstein *et al*, 1986; Koyama *et al*, 1996; Chen *et al*, 1997; Iwasaki *et al*, 2009)。特に抗菌ペプチドなどのペプチド性のガン細胞増殖抑制因子は、哺乳類においても保存されており、がん抑制因子として働いている(Sun *et al*, 2006; Xu *et al*, 2008; Han *et al*, 2014)。したがって、これらのペプチド性の細胞増殖抑制因子の探索と機能の解析は、動物がもともと持つがん抑制機構の解明に貢献すると考えられる。私は第一章での成果に基づき、NPC2 タンパク質によるがん細胞増殖の抑制が起こると考え、この検証と分子機構の解明に着手した。

本研究において私は NPC2 タンパク質によってオートファジーが誘導されるという仮説を立てた。近年、オートファジーが腫瘍形成に重要な役割を果たすことが示唆されている(Yang *et al*, 2011)。ヒト乳がん、子宮がん、前立腺がんの 40-75%で、オートファジーに必要な遺伝子 *BECN1* の単一对立遺伝子性の異常が起きている(Qu *et al*, 2003)。また、オートファジーに必要な *Atg5* をモザイク欠損したマウスは多発性肝腫瘍を形成することが明らかとなっている(Takamura *et al*, 2011)。加えて、AMPK の活性化剤や mTOR の阻害剤といったオートファジーを促進する薬剤が、抗がん活性を有することから(Chresta *et al*, 2010; Feng *et al*, 2014; Feldman *et al*, 2009; Yu *et al*, 2010)、オートファジーの制御はがん治療の標的になると考えられる。これまでの研究において、オートファジーは一般的に飢餓状態に応答して誘導されることが知られているが、オートファジーを誘導する体液因子はほとんど知られていない。マウス細胞においても NPC2 タンパク質の下流において AMPK が活性化すると想定される。ここで、AMPK の活性化によってオートファジーが誘導されることから、私は NPC2 タンパク質がオートファジーを誘導するという仮説を立てこの検証に着手した。

結果

1. カイコ体液および NPC2 タンパク質によるマウスがん細胞の増殖抑制

本研究ではがん細胞としてマウス腹水がん細胞 FM3A を用いた。カイコ体液を培地へ添加することにより、マウスがん細胞 FM3A の増殖が抑制された (Figure 3-1)。この活性はカイコ体液を 100°C 5 分間加熱処理することによって失われた (Figure 3-2)。カイコ体液の腹腔内投与により、FM3A 細胞を腹腔内に注射したマウスの死が遅延した (Figure 3-3)。したがって、カイコ体液中には熱感受性の増殖抑制因子が存在すると思われる。これまでの研究において見いだされている昆虫体液中のがん細胞増殖抑制因子として抗菌ペプチドが挙げられるが、抗菌ペプチドは細菌感染によって誘導され、通常の個体中での発現量は大きくない (Yamakawa & Tanaka, 1999; Miyashita *et al*, 2014)。また、抗菌ペプチドは熱耐性であることから、カイコ体液中のがん細胞増殖抑制因子は抗菌ペプチドとは異なると私は考えた。BmNPC2 タンパク質は健常なカイコ体液中の主要な細胞増殖抑制因子である。そこで私は BmNPC2 タンパク質がカイコ体液中のがん細胞増殖抑制活性を担うのではないかと考え、これを検証した。その結果、BmNPC2 タンパク質を 20 µg/mL 培地へ添加することにより、FM3A 細胞の増殖が抑制された (Figure 3-4)。このとき、カイコ体液中に含まれる BmNPC2 タンパク質量をウェスタンブロッティングによって推定したところ、約 240 µg/mL であった (Figure 3-5)。これにより、カイコ体液が細胞増殖抑制活性を示す濃度において BmNPC2 タンパク質は約 50 µg/mL と計算されることから、私は BmNPC2 タンパク質がカイコ体液によるがん細胞の増殖抑制に寄与していると判断した。さらに NPC2 タンパク質の保存性から、マウス NPC2 タンパク質において FM3A 細胞の増殖抑制が見られるという仮説を私は立てた。これを検証した結果、murine NPC2 タンパク質を培地へ添加することにより、FM3A 細胞の増殖が抑制された (Figure 3-6)。以上の結果は、BmNPC2 タンパク質および murine NPC2 タンパク質が FM3A 細胞の増殖を抑制することを示唆している。

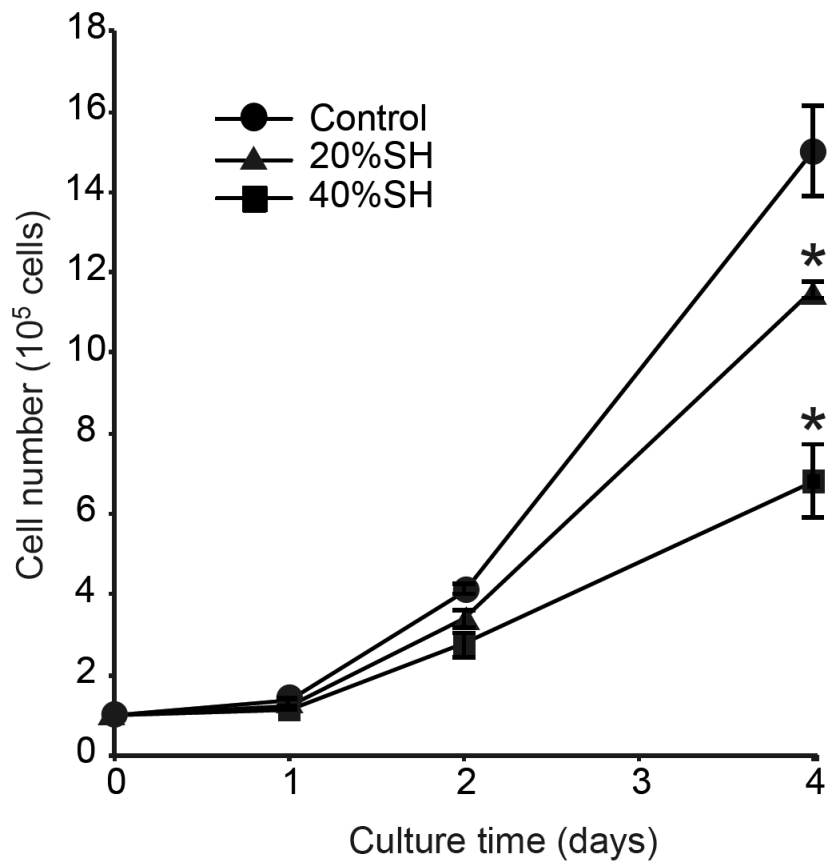


Figure 3-1 カイコ体液による FM3A 細胞の増殖抑制

カイコ体液(SH)を 20%または 40% 添加した培地を用いて FM3A 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。データは平均値±標準誤差($n=3$)を表す。培養 4 日目の細胞数を用いて Control 群に対する Student の t 検定を行った。*; $p<0.05$

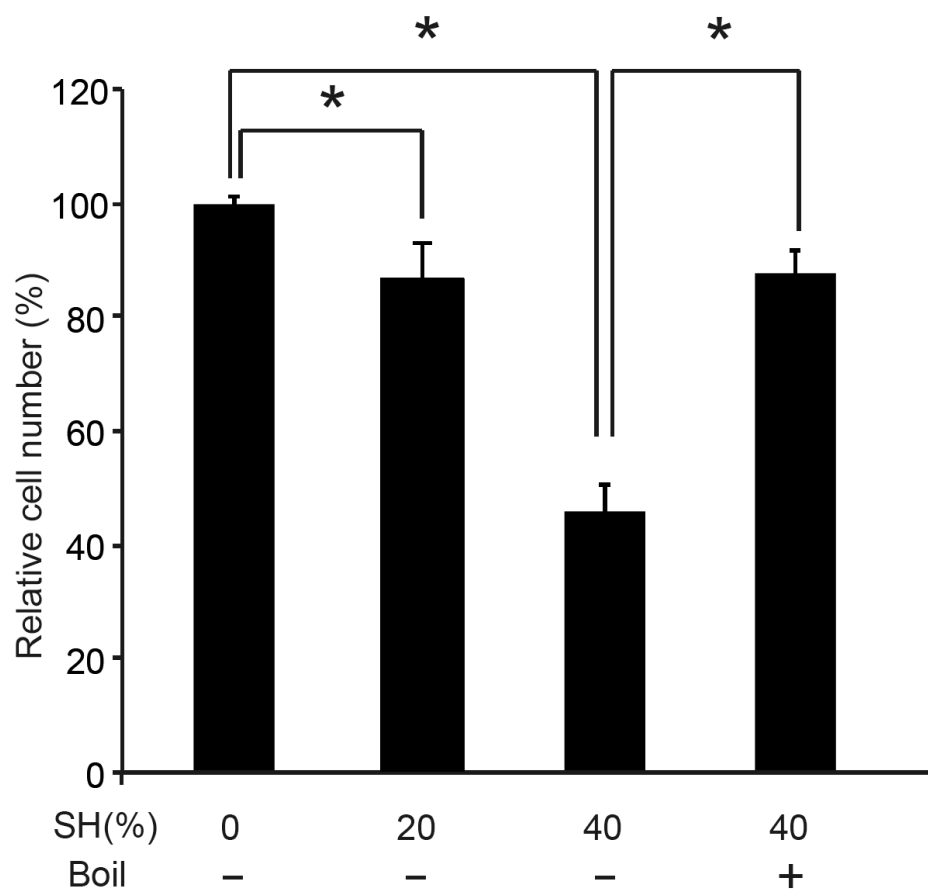


Figure 3-2 カイコ体液の加熱処理による細胞増殖抑制活性の失活

カイコ体液(SH)を 100°C5 分間加熱処理し、その遠心上清を FM3A 細胞に添加して培養した。培養 48 時間において血球計算盤を用いて細胞数を計測した。データは平均値±標準誤差($n=3$)を表す。*; $p<0.05$ 。

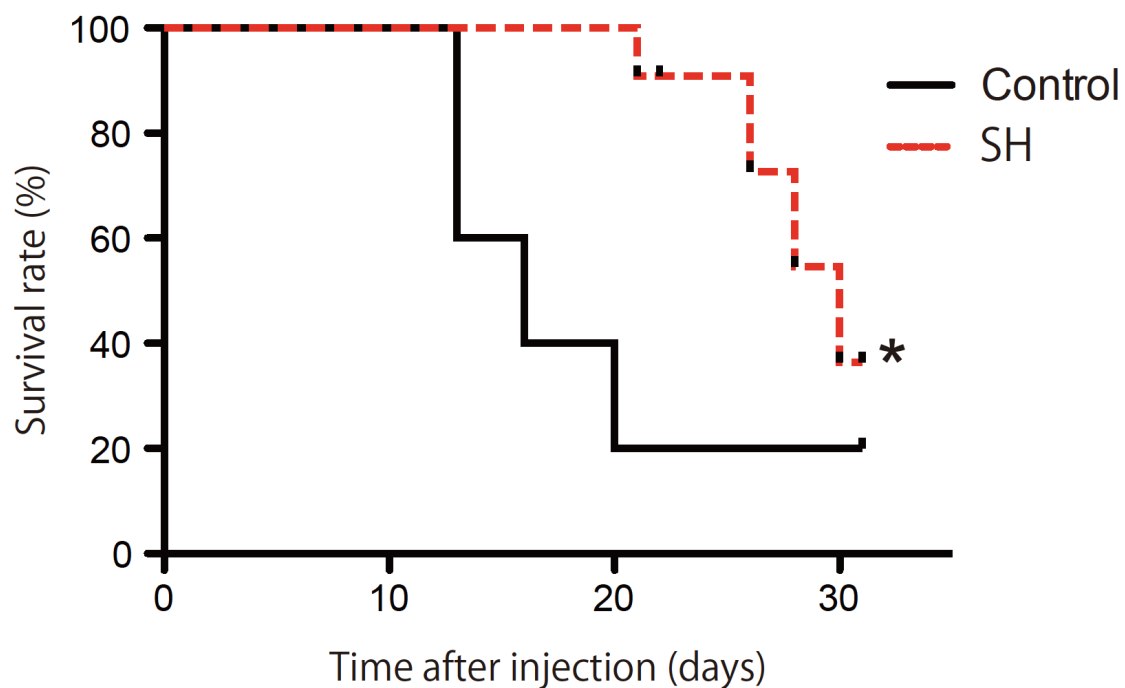


Figure 3-3 カイコ体液による FM3A 細胞移植マウスの生存時間の延長

FM3A 細胞をマウス腹腔内に注射した。カイコ体液(SH)または Control(25mM HEPES(pH 7.2)、100mM NaCl、10%グリセロール)を 200 μ L/day、毎日腹腔内投与し続け、経時的にマウスの生存率を計測した。生存曲線の統計処理は log-rank test によって行った。SH 群 ($n=9$)、Control 群($n=5$)。*; $p<0.05$

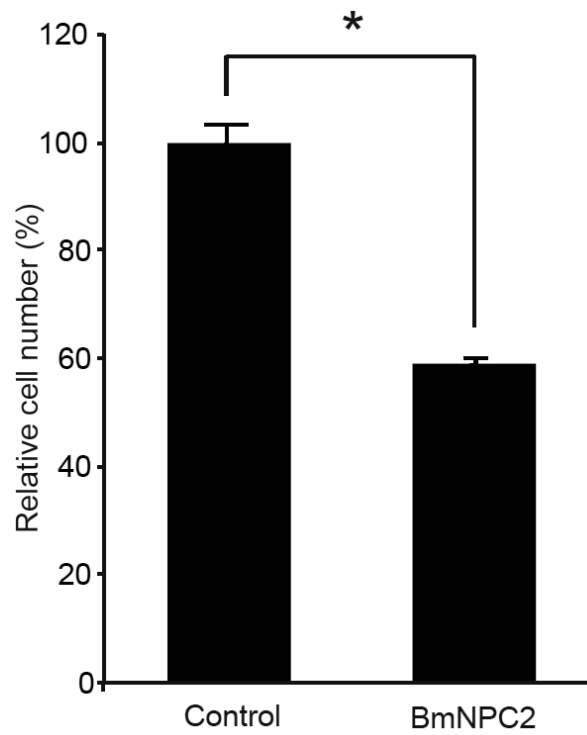


Figure 3-4 BmNPC2 による FM3A 細胞の増殖抑制

FM3A 細胞に対して 20 $\mu\text{g/mL}$ BmNPC2 タンパク質を添加し 48 時間培養を行った。培養 48 時間において血球計算盤を用いて細胞数を計測した。データは平均値 \pm 標準誤差($n=3$)を表す。*; $p<0.05$ 。

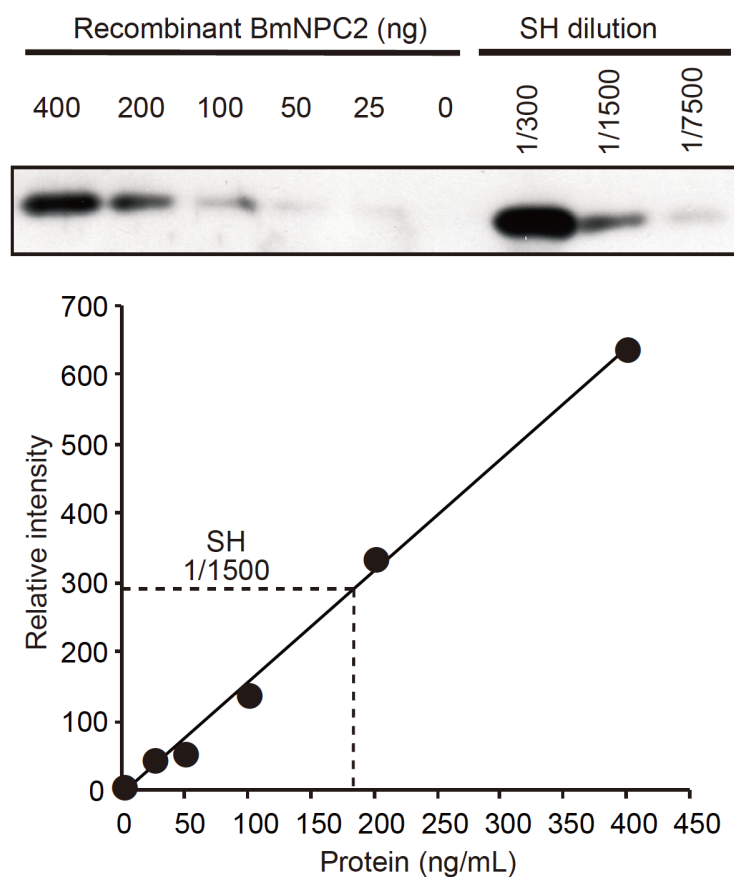


Figure 3-5 カイコ体液中の BmNPC2 タンパク質量の定量

リコンビナント BmNPC2 タンパク質およびカイコ体液の希釈系列(SH dilution)(10 μ L) を抗 BmNPC2 タンパク質抗血清によるウェスタンブロッティングに供した。得られたバンド強度を Image J デンシトメーターによって定量化し、リコンビナント BmNPC2 タンパク質のバンド強度から線形回帰によって検量線を作成した。この検量線を用いてカイコ体液中に存在する BmNPC2 タンパク質量を求め、1/300、1/1500、1/7500 の 3 点の平均値を算出した。

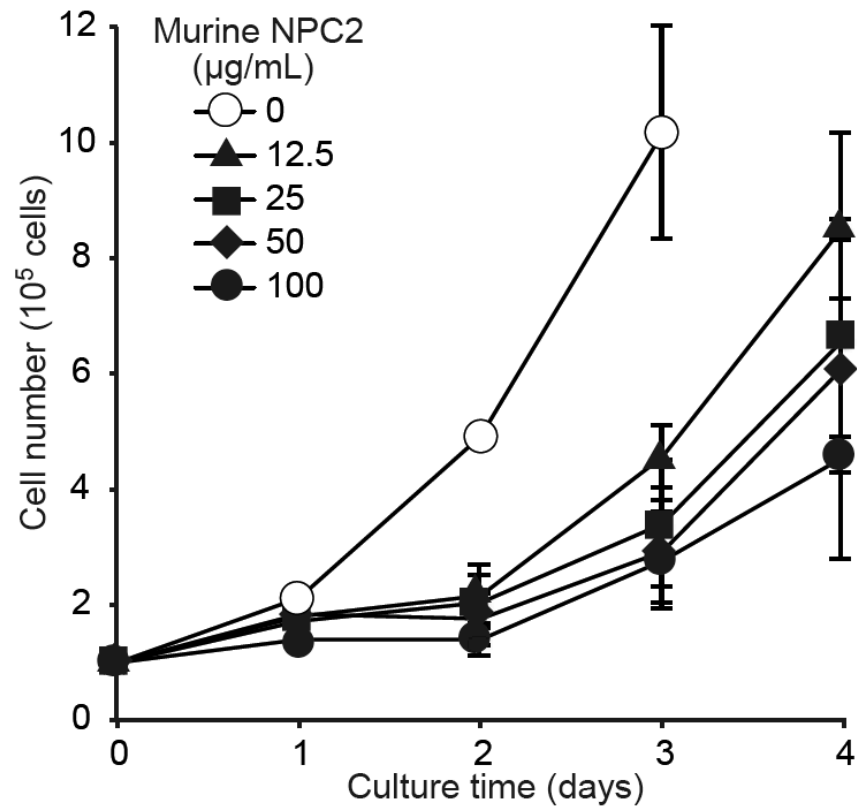


Figure 3-6 Murine NPC2 タンパク質による FM3A 細胞の増殖抑制

FM3A 細胞に対して murine NPC2 タンパク質を添加して培養し、血球計算盤を用いて経時的に細胞数を計測した。データは平均値±標準誤差($n=2$)を表す。

2. NPC2 タンパク質によるオートファジーの誘導

カイコ体液および NPC2 タンパク質によるがん細胞の増殖抑制の作用機構として私はオートファジーの誘導に着目した。第一章において述べた AMPK はオートファジーの活性化因子の一つである(Kim *et al*, 2011)。カイコ体液を添加した FM3A 細胞において、オートファジーの正の調節因子である AMPK の活性化が起こっていた (Figure 3-7)。また、オートファジーの負の調節因子である Akt および mTOR の不活性化、ならびに mTOR の基質の一つである S6K のリン酸化の減弱が生じていた (Figure 3-7)。これらの傾向は BmNPC2 タンパク質においても観察された (Figure 3-8)。そして、カイコまたはマウス NPC2 タンパク質を添加した FM3A 細胞において、抗 LC3 抗体を用いた免疫染色を行ったところ、LC3 抗体陽性な輝点の形成が確認された (Figure 3-9)。したがって、NPC2 タンパク質添加群においてオートファゴソームの形成数が大きいと推定される。加えて、カイコ体液ならびに NPC2 タンパク質を添加した FM3A 細胞では、非添加群と比べてオートファゴソームの構成タンパク質である LC3-II の量が大きかった (Figure 3-10、3-11、3-12)。LC3-II はオートファジーの基質として分解を受けるため、オートファジーの誘導によってだけでなくオートファジーによる分解が阻害されることによって LC3-II 量の増大が導かれることが分かっている(Mizushima & Yoshimori, 2007; Klionsky *et al*, 2012)。そのため、一般的にはオートファジーによる分解の阻害剤を用いることによって両者を区別することができると考えられている(Mizushima & Yoshimori, 2007)。FM3A 細胞に対して、BmNPC2 タンパク質とオートファジーによる分解の阻害剤の一つであるクロロキンを添加した。その結果、クロロキンの存在下においても、NPC2 タンパク質による LC3-II の増大が見られた (Figure 3-13)。これらの結果は、NPC2 タンパク質によってオートファジーが誘導されることを示唆している。さらに、NPC2 タンパク質によるオートファジーの誘導が FM3A 細胞の増殖抑制に寄与しているか否かをクロロキンをを用いて検討した。その結果、クロロキンの添加によって BmNPC2 タンパク質による FM3A 細胞の増殖抑制が部分的にキャンセルされた (Figure 3-14)。したがって、私は NPC2 タンパク質によるオートファジーの誘導が FM3A 細胞の増殖抑制に寄与していると判断した。

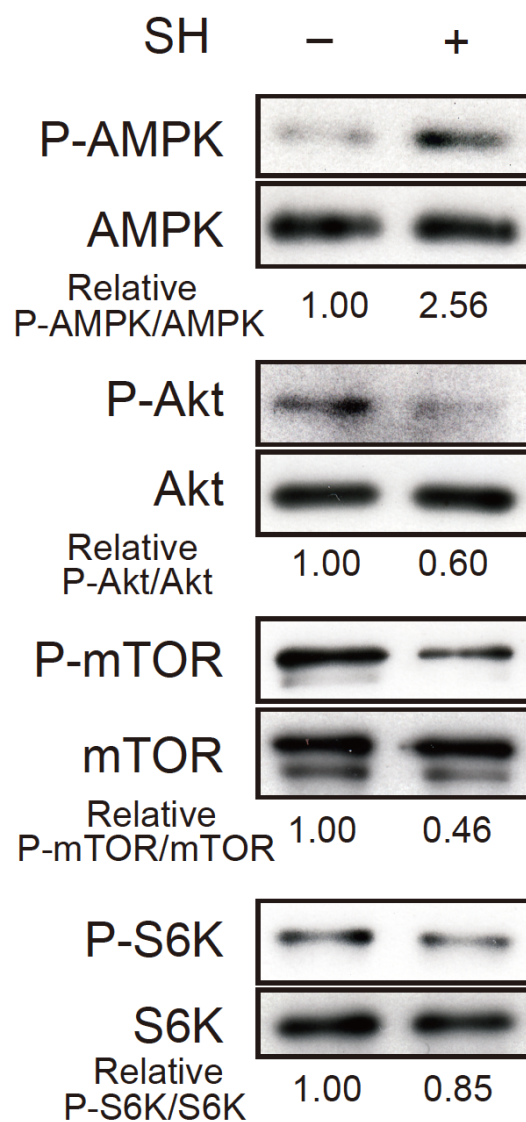


Figure 3-7 カイコ体液による AMPK の活性化および Akt 経路の不活性化

カイコ体液を 20% 添加した培地を用いて FM3A 細胞を 48 時間培養した後、細胞を回収してウェスタンブロッティングに供した。それぞれのバンド強度を Image J デンシトメーターを用いて定量し、リン酸化タンパク質と総タンパク質の比を求め、カイコ体液非添加群を 1 として表示した。

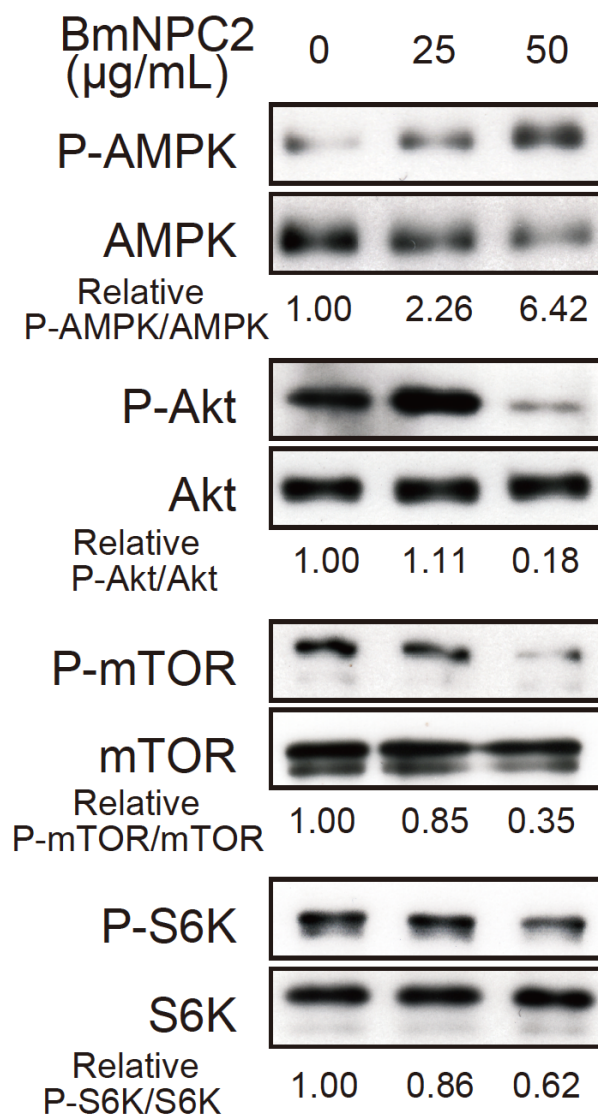


Figure 3-8 BmNPC2 タンパク質による AMPK の活性化および Akt 経路の不活性化

BmNPC2 タンパク質を添加した培地を用いて FM3A 細胞を 48 時間培養した後、細胞を回収してウェスタンブロッティングに供した。それぞれのバンド強度を Image J デンシトメーターを用いて定量し、リン酸化タンパク質と総タンパク質の比を求め、BmNPC2 タンパク質非添加群を 1 として表示した。

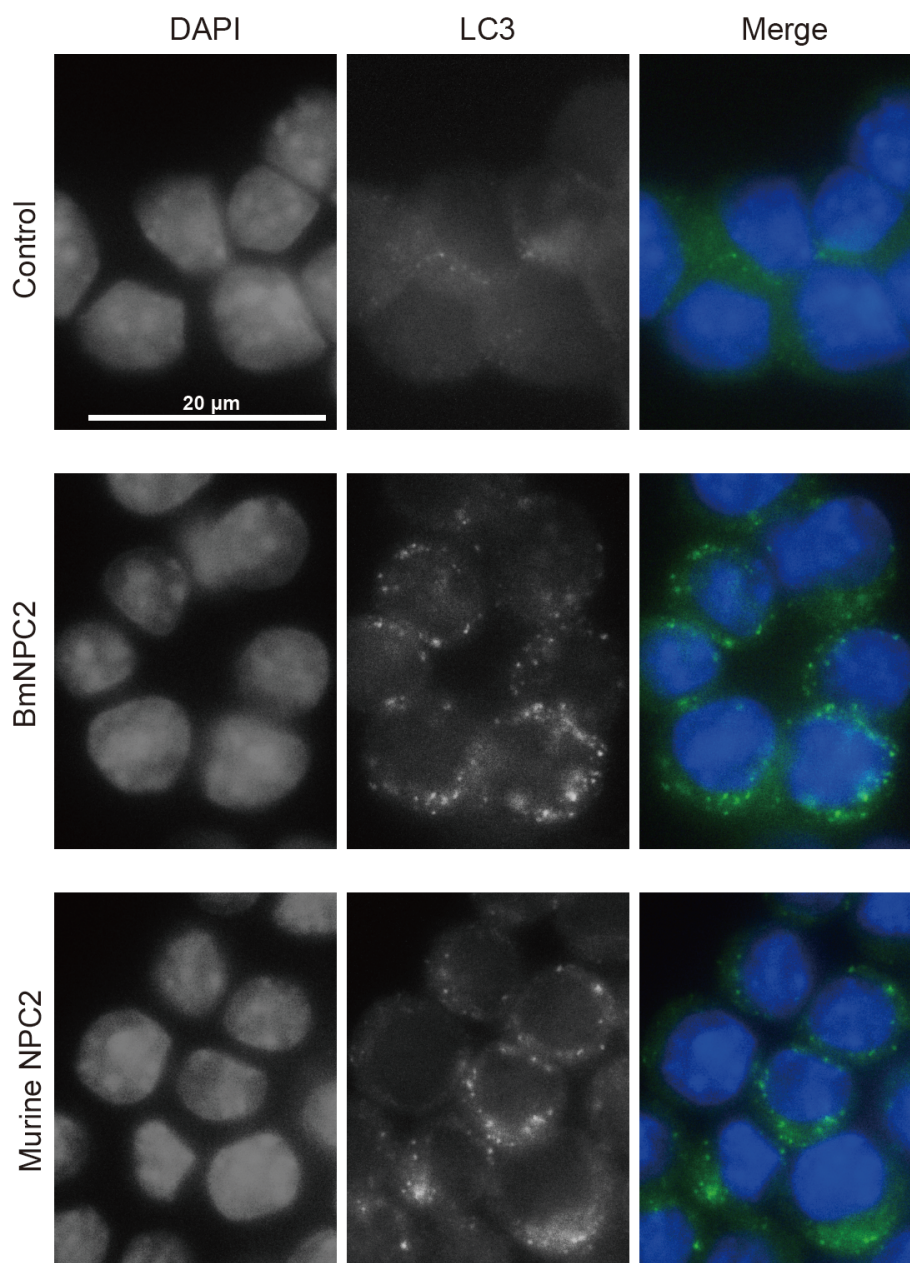


Figure 3-9 NPC2 タンパク質によるオートファゴソームの形成促進

FM3A 細胞に対して 20 $\mu\text{g/mL}$ BmNPC2 タンパク質または 20 $\mu\text{g/mL}$ murine NPC2 タンパク質を添加し 48 時間培養した。その後、抗 LC3B 抗体を一次抗体、抗 Rabbit IgG 抗体(FITC 標識)を二次抗体として蛍光免疫染色を行った。

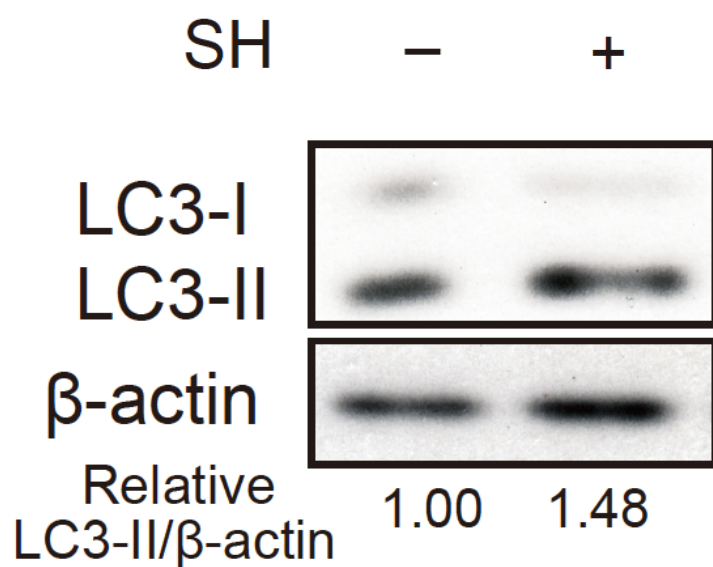


Figure 3-10 カイコ体液による LC3-II の増大

カイコ体液を 20% 添加した培地を用いて FM3A 細胞を 48 時間培養した後、細胞を回収してウェスタンブロッティングに供した。それぞれのバンド強度を Image J デンシトメーターを用いて定量し、LC3-II と β -Actin の比を求め、カイコ体液非添加群を 1 として表示した。

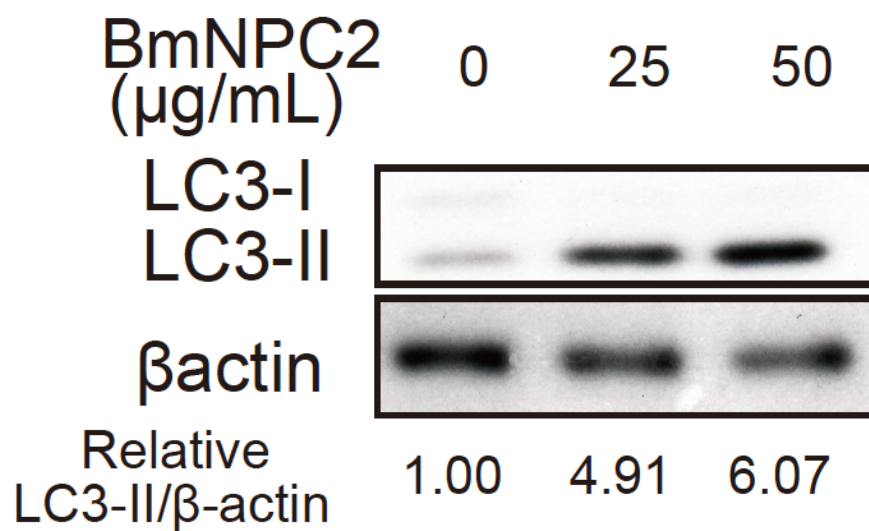


Figure 3-11 BmNPC2 タンパク質による LC3-II の増大

BmNPC2 タンパク質を添加した培地を用いて FM3A 細胞を 48 時間培養した後、細胞を回収してウェスタンブロッティングに供した。それぞれのバンド強度を Image J デンシトメーターを用いて定量し、LC3-II と β -Actin の比を求め、BmNPC2 タンパク質非添加群を 1 として表示した。

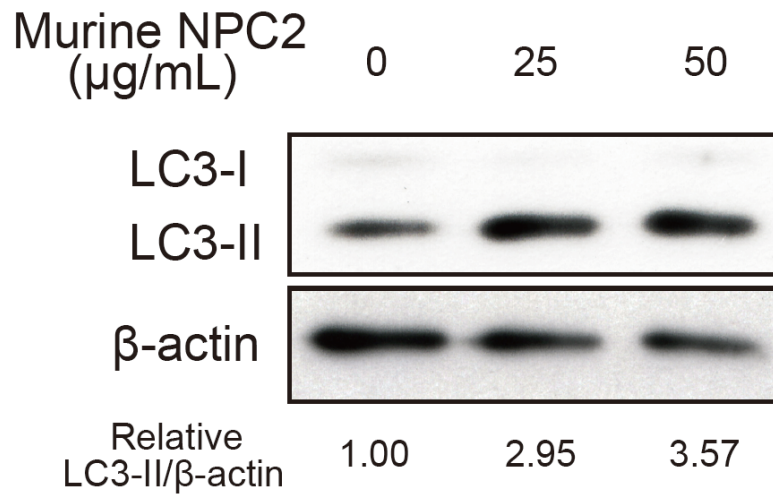


Figure 3-12 Murine NPC2 タンパク質による LC3-II の増大

Murine NPC2 タンパク質を添加した培地を用いて FM3A 細胞を 48 時間培養した後、細胞を回収してウェスタンブロッティングに供した。それぞれのバンド強度を Image J デンシトメーターを用いて定量し、LC3-II と β -Actin の比を求め、murine NPC2 タンパク質非添加群を 1 として表示した。

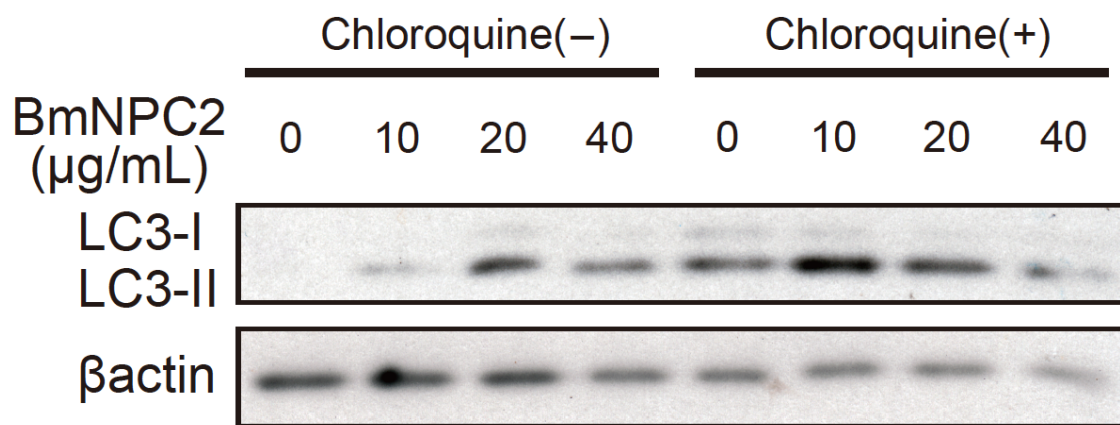


Figure 3-13 クロロキンの添加による LC3-II の増大

BmNPC2 タンパク質または 10 μM クロロキン(Chloroquine)を添加した培地を用いて FM3A 細胞を 48 時間培養した後、細胞を回収してウェスタンブロッティングに供した。

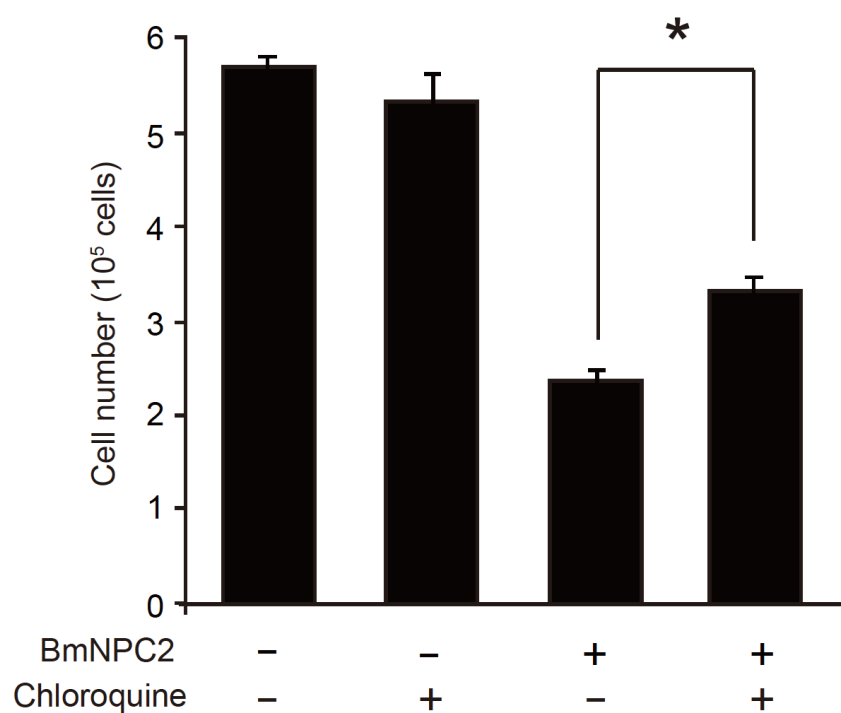


Figure 3-14 BmNPC2 タンパク質による増殖抑制活性のクロロキンによる減弱

FM3A 細胞に対して 10 μ g/mL BmNPC2 タンパク質および 10 μ M クロロキンを添加し培養を行った。培養 48 時間において血球計算盤を用いて細胞数を計測した。データは平均値 \pm 標準誤差($n=3$)を表す。*; $p<0.05$ 。

考察

第三章において、NPC2 タンパク質がオートファジーを誘導することを示唆した。本項では NPC2 タンパク質とオートファジーの関連性について述べる。

NPC2 タンパク質が AMPK の活性化、Akt/mTOR の不活性化を誘導することを本章において示した。AMPK は ULK の活性化因子でありオートファジーを誘導する(Kim *et al*, 2011)。また、第二章において見いだした CKAP4 の既知のリガンドである APF は Akt の活性を抑制することが報告されている(Shahjee *et al*, 2010)。したがって NPC2 タンパク質も Akt 経路を抑制すると私は予想した。Akt/mTOR はオートファジーの抑制経路である(Kim *et al*, 2011)。これらの知見から、NPC2 タンパク質がオートファジーを誘導することが予想された。

NPC2 タンパク質は肝臓細胞、グリア細胞などにおいて発現が高い。*Npc2* 欠損マウスが呈する病理学的な所見として肝臓および脾臓の肥大、小脳プルキンエ細胞をはじめとする神経細胞の進行性脱落が知られている(Elrick *et al*, 2010; Sayre *et al*, 2010)。一方で、オートファジー因子である *Atg5*、*Atg7* の欠損マウスの病理学的所見としても、肝臓および脾臓の肥大、小脳プルキンエ細胞の進行性脱落が知られている(Nishiyama *et al*, 2007; Komatsu *et al*, 2005; Mortensen *et al*, 2010)。したがって、これらの遺伝子欠損による表現型は類似しているといえる。最近の研究により *Npc1* 欠損マウスにおいてオートファジーの不全が起こっていることが報告された(Elrick *et al*, 2012)。*Npc1* 欠損マウスは *Npc2* 欠損マウスと同様の表現型を示すと考えられている(Sleat *et al*, 2004)。以上の観点から、NPC2 タンパク質は動物個体におけるオートファジー機構に寄与していると私は考えている。オートファジーは飢餓ストレスによる誘導が起こることが知られている一方で、肝臓細胞や神経細胞では非飢餓ストレス状態においても一定程度のオートファジーが起こることにより細胞浄化作用を示すと考えられている。NPC2 タンパク質はこれらの細胞から分泌されうることから、autocrine/paracrine 因子として基底レベルのオートファジーの維持に寄与していると私は推定している。

次に、本研究において NPC2 タンパク質について得られた知見と、オートファジーの関連について述べる。オートファジーは脂肪細胞分化、ならびに脂肪蓄積に必要であると考えられている(Ro *et al*, 2013)。すなわち、*Atg5* または *Atg7* を欠損したマウスでは脂肪細胞分化と脂肪蓄積が抑制されることがわかっている。これらの知見は本研究における NPC2 タンパク質による脂肪細胞分化ならびに脂肪蓄積の促進活性と矛盾しない。また、本研究

において私は BmNPC2 タンパク質の発現量に変態時期に上昇することを見いだした。カイコを初めとする完全変態昆虫ではその変態に伴って細胞増殖の抑制およびオートファジーによる組織の除去が行われる(Romanelli *et al*, 2014)。したがって、NPC2 タンパク質がオートファジーの誘導を介して変態を促進しているという仮説を提唱したいと考えている。

生体膜の構成因子であるコレステロールがオートファジーの正または負の調節に関与していると考えられている。すなわち、シクロデキストリン処理によってコレステロールを減少させる(Cheng *et al*, 2006)、または Itraconazole 処理によってコレステロールをエンドリソソームに蓄積させる(Xu *et al*, 2010)とオートファジーが誘導されることが示された。したがって、コレステロールの量または局在変化がオートファジーを調節すると考えられるがその分子機構は不明である。肝臓および小腸に発現し、細胞内のコレステロール輸送を制御するタンパク質として NPC1L1 が知られている。NPC1L1 は細胞外リポプロテイン-細胞膜/初期エンドソーム-後期エンドソーム/リソソームといった生体膜間のコレステロール輸送を行っている。近年、高脂血症治療薬である Ezetimibe はヒト肝臓細胞においてオートファジーを誘導することが報告された(Yamamura *et al*, 2014)。Ezetimibe の作用機序は NPC1L1 の阻害であると考えられている。NPC1L1 は NPC2 タンパク質の負の調節因子であり、mRNA レベルは変化せず、タンパク質の安定性に影響を与える(Yamanashi *et al*, 2012)。これらの知見から私は、Ezetimibe が NPC2 タンパク質の誘導を介してオートファジーを促進する機構が存在すると着想するに至った。今後、NPC2 タンパク質によるオートファジーの誘導機構の解析により、NPC2 タンパク質の下流経路を標的とした高脂血症治療法の開発や Ezetimibe の新規使用法の開発につながると予想される。

材料と方法

細胞培養

FM3A 細胞は学習院大学大学院自然科学研究科生命科学専攻 花岡 文雄 教授より分与していただいた。FM3A 細胞は DMEM(Invitrogen)に 10%FBS(Hyclone)および、100 IU ペニシリン(Invitrogen)、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Invitrogen)ストレプトマイシン(Invitrogen)を添加した培地を用い、33°C 5%CO₂ 条件下で経代した。カイコ体液、BmNPC2 タンパク質、murine NPC2 タンパク質の効果を見るすべての実験において、実験 24 時間前に FM3A 細胞の培地を無血清 DMEM に交換し実験に用いた。また、これらの実験時は 33°C 5%CO₂ 条件下で培養したが、培地は経代時と異なり DMEM 5%FBS 50 IU ペニシリン 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ストレプトマイシンを添加した培地を用いた。

細胞増殖抑制試験

FM3A 細胞を初期細胞数 10^5 cells となるように 24 well plate に播種しそれぞれの培地の効果を検討した。カイコ体液による増殖抑制試験においてそれぞれの培地の構成は、カイコ体液無添加; [45% DMEM、5% FBS、50% saline]、カイコ体液 20%添加; [45% DMEM、5% FBS、30% saline、20% カイコ体液]、カイコ体液 40%添加; [45% DMEM、5% FBS、10% saline、40% カイコ体液]をもちいた。BmNPC2 タンパク質および murine NPC2 タンパク質は培地に 10% v/v となるように添加し、非添加群は 25 mM HEPES (pH7.2)、100 mM NaCl、10 %グリセロールを対照として加えた。

マウス FM3A 移植腹水がんモデル

FM3A 細胞をマウス腹腔内に注射した。カイコ体液または HBS(25mM HEPES(pH 7.2)、100mM NaCl、10%グリセロール)を 200 $\mu\text{L}/\text{day}$ 、毎日腹腔内投与し続け、経時的にマウスの生存率を計測した。生存曲線の統計処理は log-rank test によって行った。

抗体

リン酸化 AMPK α 、AMPK α 、リン酸化 Akt、Akt、 β -Actin は第一章および二章で用いた抗体と同じものを用いた。mTOR 抗体、S6K 抗体、LC3-B 抗体は CST Japan から購入した。リン酸化 mTOR 抗体(Ser2448)、リン酸化 S6K 抗体(Thr412)は Millipore から購入した。抗 Rabbit IgG 抗体(FITC 標識)は Santa Cruz から購入した。

蛍光免疫染色

サンプルを添加し 48 時間培養した FM3A 細胞を回収し、PBS で 1 回洗浄した。細胞を氷冷メタノールに懸濁し-20 °C 15 分間処理して固定した。その後、PBS を用いて 2 回洗浄し、ブロッキング溶液(PBS、3% 通常ヤギ血清、0.1% Triton X-100)に懸濁し室温にて 1 時間維持した。細胞を遠心にて回収し、1:200 に希釈した LC3-B 抗体を含むブロッキング溶液に懸濁した後、1 時間室温に保持した。そして PBS を用いて 3 回洗浄した後、1:200 に希釈した抗 Rabbit IgG 抗体(FITC 標識)を含むブロッキング溶液に懸濁しさらに 1 時間室温暗条件でインキュベーションした。PBS を用いて 3 回洗浄した後、遠心して細胞を集め、ProLong Gold antifade with DAPI (Invitrogen) を加えて速やかにプレパラートを作成した。蛍光像は Leica DM 4000B を用いて撮影した。

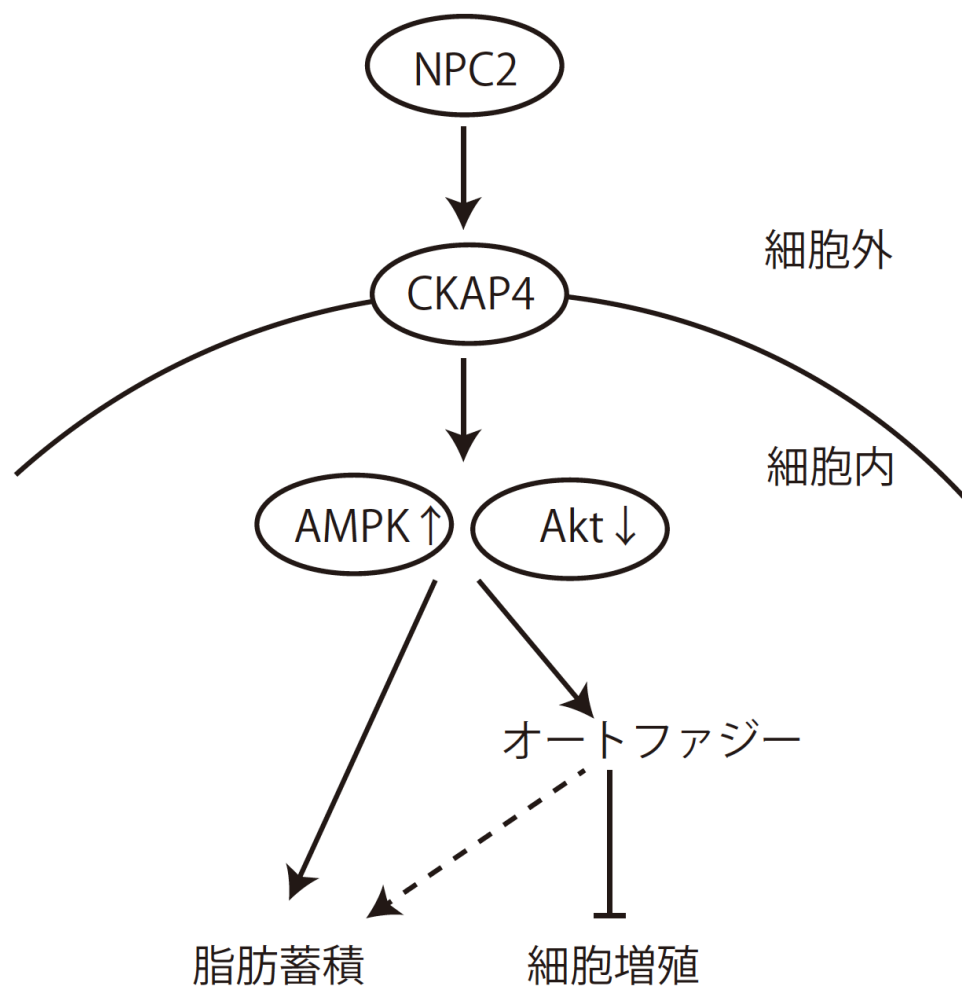
総括

本研究において私は、昆虫であるカイコとその培養細胞に着目して、動物種間に保存された細胞増殖抑制ならびに脂肪蓄積促進を誘導する体液因子の探索および機能解析を行った。本研究で明らかにしたことを以下にまとめる。

- 1) カイコ細胞において細胞増殖抑制ならびに脂肪蓄積促進を誘導する体液因子として真核生物に高度に保存された因子である NPC2 タンパク質を同定した。
- 2) マウス細胞においても NPC2 タンパク質が細胞増殖抑制ならびに脂肪蓄積促進に寄与することを示した。
- 3) NPC2 タンパク質の下流に存在する分子として、細胞膜における相互作用因子 CKAP4、および細胞内で働く因子として AMPK を同定した。
- 4) NPC2 タンパク質が CKAP4、AMPK 等を介してオートファジーを誘導することを示唆した。

これらをモデル図として次頁にまとめた。すなわち、NPC2 タンパク質が CKAP4 を受容体として AMPK の活性化および Akt の不活性化を引き起こし、オートファジーの誘導を介して細胞増殖抑制ならびに脂肪蓄積促進に寄与すると私は考えた。AMPK と Akt は相互に抑制的な活性が知られており、NPC2 タンパク質の下流においてどちらが先に制御されるかは不明である。また、CKAP4 の下流で AMPK、Akt が調節される分子機構も不明であり、今後の検討課題である。

NPC2 タンパク質は近年、肥満モデルマウスの肝臓や脂肪肝、肝細胞がんにおいて発現が低下していることが報告されている。NPC2 は肥満モデルマウスの脂肪肝や肝細胞がんにおいては発現が低下していることが報告されている。本研究によって明らかになった細胞外 NPC2 の機能を中心としてこれらの病態の理解を進展させていきたいと私は考えている。



本研究のモデル図

- Akiduki G & Imanishi S (2007) Establishment of a lipid accumulation model in an insect cell line. *Arch. Insect Biochem. Physiol.* **66**: 109–121
- Berger AC, Vanderford TH, Gernert KM, Nichols JW, Faundez V & Corbett AH (2005) *Saccharomyces cerevisiae* Npc2p is a functionally conserved homologue of the human Niemann-Pick disease type C 2 protein, hNPC2. *Eukaryotic Cell* **4**: 1851–1862
- Chen HM, Wang W, Smith D & Chan SC (1997) Effects of the anti-bacterial peptide cecropin B and its analogs, cecropins B-1 and B-2, on liposomes, bacteria, and cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1336**: 171–179
- Cheng J, Ohsaki Y, Tauchi-Sato K, Fujita A & Fujimoto T (2006) Cholesterol depletion induces autophagy. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **351**: 246–252
- Chresta CM, Davies BR, Hickson I, Harding T, Cosulich S, Critchlow SE, Vincent JP, Ellston R, Jones D, Sini P, James D, Howard Z, Dudley P, Hughes G, Smith L, Maguire S, Hummersone M, Malagu K, Menear K, Jenkins R, et al (2010) AZD8055 is a potent, selective, and orally bioavailable ATP-competitive mammalian target of rapamycin kinase inhibitor with in vitro and in vivo antitumor activity. *Cancer Res.* **70**: 288–298
- Conrads TP, Tocci GM, Hood BL, Zhang C-O, Guo L, Koch KR, Michejda CJ, Veenstra TD & Keay SK (2006) CKAP4/p63 is a receptor for the frizzled-8 protein-related antiproliferative factor from interstitial cystitis patients. *J. Biol. Chem.* **281**: 37836–37843
- Csepegi C, Jiang M & Frolov A (2010) Somatic cell plasticity and Niemann-pick type C2 protein: adipocyte differentiation and function. *J. Biol. Chem.* **285**: 30347–30354
- Daval M, Diot-Dupuy F, Bazin R, Hainault I, Viollet B, Vaulont S, Hajdich E, Ferré P & Foufelle F (2005) Anti-lipolytic action of AMP-activated protein kinase in rodent adipocytes. *J. Biol. Chem.* **280**: 25250–25257
- Elrick MJ, Pacheco CD, Yu T, Dadgar N, Shakkottai VG, Ware C, Paulson HL & Lieberman AP (2010) Conditional Niemann-Pick C mice demonstrate cell autonomous Purkinje cell neurodegeneration. *Hum. Mol. Genet.* **19**: 837–847
- Elrick MJ, Yu T, Chung C & Lieberman AP (2012) Impaired proteolysis underlies autophagic dysfunction in Niemann-Pick type C disease. *Hum. Mol. Genet.* **21**: 4876–4887
- Feldman ME, Apsel B, Uotila A, Loewith R, Knight ZA, Ruggero D & Shokat KM (2009) Active-site inhibitors of mTOR target rapamycin-resistant outputs of mTORC1 and mTORC2. *PLoS Biol.* **7**: e38
- Feng Y, Ke C, Tang Q, Dong H, Zheng X, Lin W, Ke J, Huang J, Yeung S-CJ & Zhang H (2014) Metformin promotes autophagy and apoptosis in esophageal squamous cell carcinoma by downregulating Stat3 signaling. *Cell Death Dis* **5**: e1088
- Green H & Kehinde O (1975) An established preadipose cell line and its differentiation in culture. II. Factors affecting the adipose conversion. *Cell* **5**: 19–27
- Griffin LD, Gong W, Verot L & Mellon SH (2004) Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone. *Nat. Med.* **10**: 704–711
- Han Q, Wang R, Sun C, Jin X, Liu D, Zhao X, Wang L, Ji N, Li J, Zhou Y, Ye L, Liang X, Jiang L, Liao G, Dan H, Zeng X & Chen Q (2014) Human beta-defensin-1 suppresses tumor migration and invasion and is an independent predictor for survival of oral squamous cell carcinoma patients. *PLoS ONE* **9**: e91867

- Harrison KD, Miao RQ, Fernandez-Hernández C, Suárez Y, Dávalos A & Sessa WC (2009) Nogo-B receptor stabilizes Niemann-Pick type C2 protein and regulates intracellular cholesterol trafficking. *Cell Metab.* **10**: 208–218
- Heo K, Jariwala U, Woo J, Zhan Y, Burke KA, Zhu L, Anderson WF & Zhao Y (2006) Involvement of Niemann-Pick type C2 protein in hematopoiesis regulation. *Stem Cells* **24**: 1549–1555
- Homma K, Matsushita T & Natori S (1996) 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.* **271**: 13770–13775
- Huang X, Warren JT, Buchanan J, Gilbert LI & Scott MP (2007) *Drosophila* Niemann-Pick type C-2 genes control sterol homeostasis and steroid biosynthesis: a model of human neurodegenerative disease. *Development* **134**: 3733–3742
- Iwasaki T, Ishibashi J, Tanaka H, Sato M, Asaoka A, Taylor D & Yamakawa M (2009) Selective cancer cell cytotoxicity of enantiomeric 9-mer peptides derived from beetle defensins depends on negatively charged phosphatidylserine on the cell surface. *Peptides* **30**: 660–668
- Jin W, Takagi T, Kanesashi S-N, Kurahashi T, Nomura T, Harada J & Ishii S (2006) Schnurri-2 controls BMP-dependent adipogenesis via interaction with Smad proteins. *Dev. Cell* **10**: 461–471
- Kanaya T & Kobayashi J (2000) Purification and characterization of an insect haemolymph protein promoting in vitro replication of the *Bombyx mori* nucleopolyhedrovirus. *J. Gen. Virol.* **81**: 1135–1141
- Kasturi R & Wakil SJ (1983) Increased synthesis and accumulation of phospholipids during differentiation of 3T3-L1 cells into adipocytes. *J. Biol. Chem.* **258**: 3559–3564
- Kawamura K, Shibata T, Saget O, Peel D & Bryant PJ (1999) A new family of growth factors produced by the fat body and active on *Drosophila* imaginal disc cells. *Development* **126**: 211–219
- Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* **13**: 132–141
- Kirchhoff C, Osterhoff C & Young L (1996) Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis. *Biol. Reprod.* **54**: 847–856
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akira S, Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Albert ML, Albin RL, Alegre-Abarrategui J, et al (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **8**: 445–544
- Ko DC, Binkley J, Sidow A & Scott MP (2003) The integrity of a cholesterol-binding pocket in Niemann-Pick C2 protein is necessary to control lysosome cholesterol levels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 2518–2525
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K & Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* **169**: 425–434
- Koyama K, Wakabayashi K, Masutani M, Koiwai K, Watanabe M, Yamazaki S, Kono T, Miki K & Sugimura T (1996) Presence in *Pieris rapae* of cytotoxic activity against human carcinoma cells. *Jpn. J. Cancer Res.* **87**: 1259–1262
- Liao Y-J, Chen T-L, Lee T-S, Wang H-A, Wang C-K, Liao L-Y, Liu R-S, Huang S-F & Chen Y-MA (2012) Glycine N-methyltransferase deficiency affects Niemann-Pick type C2 protein stability and regulates hepatic cholesterol homeostasis. *Mol. Med.* **18**: 412–422

- Liao Y-J, Lin M-W, Yen C-H, Lin Y-T, Wang C-K, Huang S-F, Chen K-H, Yang C-P, Chen T-L, Hou M-F & Arthur Chen Y-M (2013) Characterization of Niemann-Pick Type C2 protein expression in multiple cancers using a novel NPC2 monoclonal antibody. *PLoS ONE* **8**: e77586
- Lichtenstein A, Ganz T, Selsted ME & Lehrer RI (1986) In vitro tumor cell cytolysis mediated by peptide defensins of human and rabbit granulocytes. *Blood* **68**: 1407–1410
- Liu B, Turley SD, Burns DK, Miller AM, Repa JJ & Dietschy JM (2009) Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1^{-/-} mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 2377–2382
- Lloyd-Evans E, Morgan AJ, He X, Smith DA, Elliot-Smith E, Sillence DJ, Churchill GC, Schuchman EH, Galione A & Platt FM (2008) Niemann-Pick disease type C1 is a sphingosine storage disease that causes deregulation of lysosomal calcium. *Nat. Med.* **14**: 1247–1255
- Manning BD (2004) Balancing Akt with S6K: implications for both metabolic diseases and tumorigenesis. *J. Cell Biol.* **167**: 399–403
- Matika CA, Wasilewski M, Arnott JA & Planey SL (2012) Antiproliferative factor regulates connective tissue growth factor (CTGF/CCN2) expression in T24 bladder carcinoma cells. *Mol. Biol. Cell* **23**: 1976–1985
- Matsumoto Y, Sumiya E, Sugita T & Sekimizu K (2011) An invertebrate hyperglycemic model for the identification of anti-diabetic drugs. *PLoS ONE* **6**: e18292
- Millat G, Chikh K, Naureckiene S, Sleat DE, Fensom AH, Higaki K, Elleder M, Lobel P & Vanier MT (2001) Niemann-Pick disease type C: spectrum of HE1 mutations and genotype/phenotype correlations in the NPC2 group. *Am. J. Hum. Genet.* **69**: 1013–1021
- Miyashita A, Kizaki H, Kawasaki K, Sekimizu K & Kaito C (2014) Primed immune responses to gram-negative peptidoglycans confer infection resistance in silkworms. *J. Biol. Chem.* **289**: 14412–14421
- Mizushima N & Yoshimori T (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**: 542–545
- Mortensen M, Ferguson DJP, Edelmann M, Kessler B, Morten KJ, Komatsu M & Simon AK (2010) Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 832–837
- Motoshima H, Goldstein BJ, Igata M & Araki E (2006) AMPK and cell proliferation--AMPK as a therapeutic target for atherosclerosis and cancer. *J. Physiol. (Lond.)* **574**: 63–71
- Nagasawa H, Kataoka H, Hori Y, Isogai A, Tamura S, Suzuki A, Guo F, Zhong XC, Mizoguchi A & Fujishita M (1984) Isolation and some characterization of the prothoracicotropic hormone from *Bombyx mori*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**: 143–152
- Naureckiene S, Sleat DE, Lackland H, Fensom A, Vanier MT, Wattiaux R, Jadot M & Lobel P (2000) Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease. *Science* **290**: 2298–2301
- Nishiyama J, Miura E, Mizushima N, Watanabe M & Yuzaki M (2007) Aberrant membranes and double-membrane structures accumulate in the axons of Atg5-null Purkinje cells before neuronal death. *Autophagy* **3**: 591–596
- Ohnishi A, Oda Y & Hayakawa Y (2001) Characterization of receptors of insect cytokine, growth-blocking peptide, in human keratinocyte and insect Sf9 cells. *J. Biol. Chem.* **276**: 37974–37979
- Pospisilik JA, Schramek D, Schnidar H, Cronin SJF, Nehme NT, Zhang X, Knauf C, Cani PD, Aumayr K, Todoric J, Bayer M, Haschemi A, Puviindran V, Tar K, Orthofer M, Neely GG, Dietzl G, Manoukian A,

- Funovics M, Prager G, et al (2010) Drosophila genome-wide obesity screen reveals hedgehog as a determinant of brown versus white adipose cell fate. *Cell* **140**: 148–160
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen E-L, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G & Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* **112**: 1809–1820
- Ro S-H, Jung CH, Hahn WS, Xu X, Kim Y-M, Yun YS, Park J-M, Kim KH, Seo M, Ha T-Y, Arriaga EA, Bernlohr DA & Kim D-H (2013) Distinct functions of Ulk1 and Ulk2 in the regulation of lipid metabolism in adipocytes. *Autophagy* **9**: 2103–2114
- Romanelli D, Casati B, Franzetti E & Tettamanti G (2014) A molecular view of autophagy in Lepidoptera. *Biomed Res Int* **2014**: 902315–11
- Sakaue H, Konishi M, Ogawa W, Asaki T, Mori T, Yamasaki M, Takata M, Ueno H, Kato S, Kasuga M & Itoh N (2002) Requirement of fibroblast growth factor 10 in development of white adipose tissue. *Genes Dev.* **16**: 908–912
- Sayre NL, Rimkunas VM, Graham MJ, Crooke RM & Liscum L (2010) Recovery from liver disease in a Niemann-Pick type C mouse model. *J. Lipid Res.* **51**: 2372–2383
- Shahjee HM, Koch KR, Guo L, Zhang C-O & Keay SK (2010) Antiproliferative factor decreases Akt phosphorylation and alters gene expression via CKAP4 in T24 bladder carcinoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **29**: 160
- Sleat DE, Wiseman JA, El-Banna M, Price SM, Verot L, Shen MM, Tint GS, Vanier MT, Walkley SU & Lobel P (2004) Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **101**: 5886–5891
- Smith PJ, Wise LS, Berkowitz R, Wan C & Rubin CS (1988) Insulin-like growth factor-I is an essential regulator of the differentiation of 3T3-L1 adipocytes. *J. Biol. Chem.* **263**: 9402–9408
- Sun CQ, Arnold R, Fernandez-Golarz C, Parrish AB, Almekinder T, He J, Ho S-M, Svoboda P, Pohl J, Marshall FF & Petros JA (2006) Human beta-defensin-1, a potential chromosome 8p tumor suppressor: control of transcription and induction of apoptosis in renal cell carcinoma. *Cancer Res.* **66**: 8542–8549
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K & Mizushima N (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* **25**: 795–800
- Wang H-B, Sakudoh T, Kawasaki H, Iwanaga M, Araki K, Fujimoto H, Takada N, Iwano H & Tsuchida K (2009) Purification and expression analysis of imaginal disc growth factor in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **55**: 1065–1071
- Willenborg M, Schmidt CK, Braun P, Landgrebe J, Figura von K, Saftig P & Eskelinen E-L (2005) Mannose 6-phosphate receptors, Niemann-Pick C2 protein, and lysosomal cholesterol accumulation. *J. Lipid Res.* **46**: 2559–2569
- Woods A, Dickerson K, Heath R, Hong S-P, Momcilovic M, Johnstone SR, Carlson M & Carling D (2005) Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase kinase-beta acts upstream of AMP-activated protein kinase in mammalian cells. *Cell Metab.* **2**: 21–33
- Xu J, Dang Y, Ren YR & Liu JO (2010) Cholesterol trafficking is required for mTOR activation in endothelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 4764–4769
- Xu N, Wang Y-S, Pan W-B, Xiao B, Wen Y-J, Chen X-C, Chen L-J, Deng H-X, You J, Kan B, Fu A-F, Li D, Zhao X & Wei Y-Q (2008) Human alpha-defensin-1 inhibits growth of human lung adenocarcinoma xenograft in nude mice. *Mol. Cancer Ther.* **7**: 1588–1597

- Yamakawa M & Tanaka H (1999) Immune proteins and their gene expression in the silkworm, *Bombyx mori*. *Dev. Comp. Immunol.* **23**: 281–289
- Yamamura T, Ohsaki Y, Suzuki M, Shinohara Y, Tatematsu T, Cheng J, Okada M, Ohmiya N, Hirooka Y, Goto H & Fujimoto T (2014) Inhibition of Niemann-Pick-type C1-like1 by ezetimibe activates autophagy in human hepatocytes and reduces mutant α 1-antitrypsin Z deposition. *Hepatology* **59**: 1591–1599
- Yamanashi Y, Takada T, Shoda J-I & Suzuki H (2012) Novel function of Niemann-Pick C1-like 1 as a negative regulator of Niemann-Pick C2 protein. *Hepatology* **55**: 953–964
- Yamanashi Y, Takada T, Yoshikado T, Shoda J-I & Suzuki H (2011) NPC2 regulates biliary cholesterol secretion via stimulation of ABCG5/G8-mediated cholesterol transport. *Gastroenterology* **140**: 1664–1674
- Yang ZJ, Chee CE, Huang S & Sinicrope FA (2011) The role of autophagy in cancer: therapeutic implications. *Mol. Cancer Ther.* **10**: 1533–1541
- Yu K, Shi C, Toral-Barza L, Lucas J, Shor B, Kim JE, Zhang W-G, Mahoney R, Gaydos C, Tardio L, Kim SK, Conant R, Curran K, Kaplan J, Verheijen J, Ayril-Kaloustian S, Mansour TS, Abraham RT, Zask A & Gibbons JJ (2010) Beyond rapalog therapy: preclinical pharmacology and antitumor activity of WYE-125132, an ATP-competitive and specific inhibitor of mTORC1 and mTORC2. *Cancer Res.* **70**: 621–631

謝辞

本研究の遂行にあたり、常に厳しくご指導して頂きました東京大学大学院薬学系研究科微生物薬品化学教室 関水と久教授に心より感謝申し上げます。関水先生は教室全体の研究を指導されると同時に、自ら研究を遂行する最前線に立たれており、研究者とは如何なるものか、研究を推進ために必要な考え方は何かということを身をもって示して下さいました。ありがとうございました。

研究の成果や実行に関して積極的にディスカッションに応じてくださり、鋭いコメントや御指導をしていただくとともに、研究室生活においても多くの御指摘をしていただいた同研究室の垣内力准教授、浜本洋助教、松本靖彦助教に感謝致します。自分の研究を如何にして世の中に発信して行くか、他の研究者に理解してもらうためにはどのように説明すれば良いかを学ばせて頂きました。ありがとうございました。

本論文の作成にあたり、大変貴重な御助言をして頂きました長崎国際大学 黒川健児准教授に感謝申し上げます。ありがとうございました。

微生物薬品化学教室の教室員の方々に感謝致します。カイコにおける解析にあたり、大変長い間、時間をかけて研究の御指導をいただいた石井健一博士、堀江亮博士、安川淳一朗博士に感謝致します。脂肪蓄積の解析において深い考察を与えてくださった林陽平博士、がん細胞増殖抑制に関して多大な御助力をいただいた稲垣善則博士にあらためて感謝申し上げます。

先輩方、同期生ならびに後輩達は貴重な時間を割いて私とディスカッションして頂き研究を遂行する上で非常に有意義な考察をさせて頂きました。また同時に、研究者ないし研究のあり方について、学生という同じ視点から議論を重ねることができ、一段と深い考え方を得ることができました。時には、研究を離れた生活面においても有用な助言を頂き、一層研究に邁進することができました。ありがとうございました。

最後に、遠く鳥取の地から惜しめない応援を送ってくれた家族に感謝したいと思います。ありがとうございました。