

## 針通電刺激とストレスタンパク質との関連

明治鍼灸大学 化学教室

小林 和子

**要旨:** ラットの臀部筋肉に針通電刺激 (5 Hz, 3~5 mA) を15分間与えた後, 3時間経過後に, 臀部筋肉を摘出, ホモジナイズおよび遠心分離し, タンパク質を抽出した. このタンパク質の二次元電気泳動を行った結果, 分子量70000, 71000, 85000, 100000のストレスタンパク質が検出された. これらのタンパク質は, 灸刺激を与えた場合に認められた熱ショックタンパク質 (hsp 70, hsp 71, hsp 85, hsp 100) と同様と考えられる.

### Relationship between Electroacupuncture and Stress Proteins

KOBAYASHI Kazuko

*Department of Chemistry, Meiji College of Oriental Medicine*

**Summary:** Muscle of the hip in rat was electrically stimulated for 15 min using electroacupuncture system (5 Hz, 3~5mA). Rats were sacrificed under deep anesthesia and the muscular tissues between the electrodes were excised 3 h after the stimulation. The proteins extracted from the homogenized and centrifuged tissues were analyzed by two dimensional gel electrophoreses. Stress proteins with molecular weight of 70000, 71000, 85000 and 100000 were detected. These proteins were similar to heat shock proteins (hsp 70, hsp 71, hsp 82 and hsp 100) induced by the moxibustion as reported previously.

**Key Words:** ストレスタンパク質 Stress protein, 二次元ゲル電気泳動 Two dimensional gel electrophoresis, 針通電刺激 Electroacupuncture, 筋 Muscle

#### I はじめに

細胞や生物個体を死なない程度に熱処理すると熱ショックタンパク質 (hsp) が合成される<sup>1)</sup>. このタンパク質は熱以外のストレスによっても合成されるが, これらは, hsp も含めてストレスタンパク質と呼ばれている. ストレスタンパク質の重要な役割の一つは, ストレスによってできる変性タンパク質に結合することにより, 変性タンパク質によっておこる細胞傷害作用をなくしてしまうことではないかと考えられていた. これ以外に

もっと重要な役割を担っていることが最近明らかになってきた. 細胞質で合成されたタンパク質が膜で囲まれた細胞内小器官へ入るためには, 一本の紐のような状態になることが必要であるが, ここに酵母では hsp 70 が働いていることが報告されている<sup>2)</sup>. また, もとの活性のある立体構造には別のストレスタンパク質によって戻す.

人体に直接熱を与える治療方法である灸刺激と hsp との関連については, ラットの施灸部筋肉中で hsp が合成されることを既に報告した<sup>3,4)</sup>.

ここでは、熱刺激である灸に対して機械的刺激である針刺激のうち針通電刺激とストレスタンパク質との関連について検討した。

## II 実験方法

ウイスター系ラット(雄, 8週齢, 250g)にカルバミド酸エチル(1.4g/kg)を腹腔内注射して麻酔し、臀部筋肉に双極電極を1cmの間隔で深さ1cmまで挿入し電気刺激(5Hz, 3~5mA)を15分間与えた。また、体温は36~37°C(直腸温)にニクロム線ヒーターを用いて保った。比較するために灸刺激も既に報告した方法によって行った<sup>2,3)</sup>。3時間後に刺激部筋肉を摘出した。灸刺激とhspとの関連についての実験<sup>3,4)</sup>で施灸直後では、hsp 70の合成が認められず、3時間経過した後、hsp 70が認められ、24時間経過後には正常状態に戻ることが確認されているので、3時間経過後に処理した。摘出した組織に10mMトリスー塩酸緩衝液(pH7.4) 5mM塩化マグネシウム、0.5mMフッ化フェニルメチルスルホニル溶液を加え、ホモジナイザーによって粉碎した後、遠心分離してタンパク質を分離した。タンパク質の濃度はLowry法によって分析した。抽出したタンパク質を二次元ゲル電気泳動法によって分析した。

### 電気泳動法

二次元ゲル電気泳動は、一次元目にゲルディスク等電点電気泳動、二次元目にSDSゲルスラブ電気泳動を行うO' Farrell<sup>5)</sup>の方法に従って行った。一次元目のゲルは、30%アクリルアミド-ビスアクリルアミド(20:1)混合液1.6ml, 0.004%リポフラビン1.5ml, 0.45%テトラメチルエチレンジアミン1.5ml, 1.5%過硫酸アンモニウム0.08ml, 尿素6.13g, 20% Nonident P-40 1.2ml, 蒸留水1.0mlに、1.6%pH 5-7両性担体および0.4%pH 3.5-10両性担体(LKB社)を含む全量12mlのゲル混合液を、暗室で、ディスク用ガラス管(径2.5mm, 長さ13cm)に、800μlずつ、15cmの注射針を付けた注射器を用いて気泡をいれないように充填した後、光重合させて作った。タンパク質試料100μgを、1.6%

pH 5-7両性担体, 0.4%pH 3-10両性担体, 8.5M尿素, 2% Nvident P-40, 5%β-メルカプトエタノールの混液に溶解し、ゲルディスク上に添加し、上部泳動槽(陽極)に0.02Mリン酸, 下部泳動槽(陰極)には1M水酸化ナトリウム水溶液を充填し、300V定電圧で17~18時間、10°Cに冷却しながら泳動を行った。二次元目は、Laemmliの不動続緩衝液法<sup>6)</sup>にしたがってSDSゲルスラブを作製した。30%アクリルアミド-ビスアクリルアミド(37.5:1)混合液10ml, 1.5Mトリスー塩酸(pH8.8) 7.5ml, 10% SDS 0.3ml, 1.5%過硫酸アンモニウム1.0ml, テトラメチルエチレンジアミン15μl, 蒸留水11.2mlを混合し、これをゲルスラブ用ガラス板対の間に流入して10%アクリルアミド分解ゲルスラブを作製し、その上部に4%濃度のアクリルアミド濃縮ゲルを重合させて、ゲルスラブ(厚さ1mm, 幅13.5cm, 長さ12.5cm)を作製した。一次元目のゲルディスクをゲルスラブの上部にアガロースで固定した後、20mA定電流で15時間泳動させた。ゲルはCoomassie Brilliant Blue R液で3時間染色後、酢酸-エタノール-水(2:9:9)溶液で脱色し、乾燥保存した。

### III 結果と考察

針通電刺激を与えた後、3時間経過後に処理された筋組織から抽出されたタンパク質の等電点/SDS二次元ゲル電気泳動の結果を図1に示した。分子量70,000(図1のa), 71,000(図1のb), 85,000(図1のc)と100,000(図1のd)のストレスタンパク質が認められた。一方、今回行った灸刺激による実験では、灸刺激を与えた後、3時間経過後に処理されたラットの二次元ゲル電気泳動のパターン(図2)において、既に報告した分子量70,000と71,000のhsp 70とhsp 71<sup>3,4)</sup>のほかに分子量85,000のhsp 85と分子量100,000のhsp 100も検出された。hsp 85及びhsp 100は、ラット肝において湯浴中での加温により合成されることが報告されており<sup>8)</sup>、また、ラットへのアンフェタミン注射によって誘導

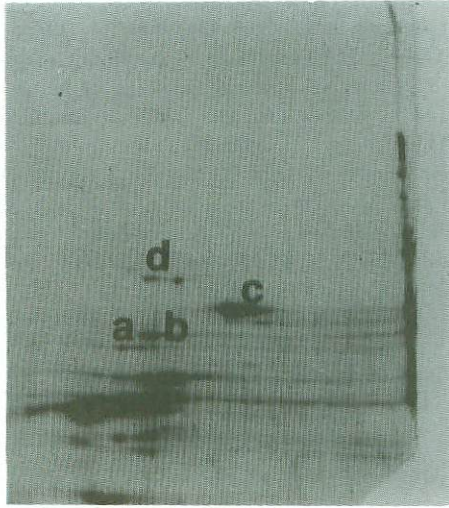


図1 針通電刺激を与えた後3時間経過後に処理されたラットの二次元ゲル電気泳動



図2 灸刺激を与えた後3時間経過後に処理されたラットの二次元電気泳動. aは hsp 70, bは hsp 71, cはhsp 85, dは hsp 100 に相当する.

された発熱や虚血による無酸素状態においても hsp 70 のほかに hsp 89 が合成されることが報告されている<sup>9)</sup>。針通電刺激による電気泳動結果と灸刺激による電気泳動結果を比較すると(図1と図2), 両者はほぼ同様の泳動パターンを示していると考えられる。

hsp は熱ショック以外の一過性ストレス, たとえばエタノール, アミノ酸アナログ, 遷移金属イオン, 無酸素化などを受けると合成されることはよく知られているが, そのほとんどは試験管内の培養された均一細胞におけるものである。また, ラットのような生物個体に対する熱の与え方も, 全個体に均一に与えられたもので局所的なものではない。ここで, ラット個体に局所的に針通電刺激を与えることによって, 灸による熱刺激と同様に hsp を含むストレスタンパク質が合成されることが確認された。これは各々重要な働きを担っていると考えられるストレスタンパク質の観点だけに限れば, 同じ hsp 70, 71, 85, 100を, 生理的には異なる二つの刺激によって, 合成することになり, 灸と針通電による治療効果の類似性に関連している可能性もある。

熱ショックタンパク質やストレスタンパク質は細胞内に局在しており, hsp 70 をはじめ重要な機能を持っていると考えられているが, hsp 70 以外で, hsp 100 や hsp 90 は筋肉の筋原線維の主要タンパク質であるアクチンと結合能を持つタンパク質であることが報告されており<sup>10, 11)</sup>, ここで認められた hsp 100 や hsp 85 が針灸刺激の作用機序に関係しているかもしれない。

#### 謝 辞

動物実験について生理学教室川喜田健司助教授に御協力をいただき, 深謝する。また, 本研究は, その一部を卒業研究のテーマとして行ったものである。当大学4回生, 飯星将盛君, 大田美香君, 島津高洋君に深謝する。

なお, 本研究は, 文部省科学研究費補助金(課題番号 01772029)によって行ったものである。

## 文 献

- 1) 飯田秀利: 熱ショックタンパク質の分子生物学. 生化学 57: 1282~1289, 1985.
- 2) Chirico W J, Waters M J, Blobel G: 70 K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. Nature 332: 805~810, 1988.
- 3) 小林和子, 高岡裕, 竹石和秀: 灸と熱ショックタンパク質との関連. 医学のあゆみ 148: 199~200, 1989.
- 4) 小林和子: 灸における熱ショックタンパク質 (hsp) の意義. 明治鍼灸医学 4: 67~71, 1988.
- 5) O Farrell P H: High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem 250: 4007~4021, 1975.
- 6) Laemmli U K: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. Nature 227: 680~685, 1970.
- 7) Fujio N, Hatayama T, Kinoshita H et al: Induction of four heat-shock proteins and their mRNAs in rat after whole-body hyperthermia. J Biochem 101: 181~187, 1987.
- 8) Cairo G, Bardella L, Schiaffonati L et al: Synthesis of heat shock proteins in rat liver after ischemia and hyperthermia. Hepatology 5: 357~361, 1985.
- 9) Koyasu S, Nisida E, Miyata Y et al: HSP-100, a 100-kDa heat shock protein, is a Ca<sup>2+</sup> calmodulin-regulated actin-binding protein. J Biol Chem 264: 15083~15087, 1989.
- 10) Rebbe N F, Hickman W S, Ley T S et al: Nucleotide sequence and regulation of a human 90-kDa heat shock protein gene. J Biol Chem 264: 15006~15011, 1989.