

ストレスタンパク質について

小林 和子

明治鍼灸大学 化学教室

はじめに

最近注目されているストレスタンパク質については多くの総説や解説が広範囲にわたって発表されているので¹⁻⁴⁾、筆者があらためて説明するのは分不相応ではあるが、鍼灸刺激とストレスタンパク質との関連について研究報告⁵⁻¹²⁾もしているため、ストレスタンパク質について調べてみた。鍼灸医学関連分野に従事しておられる方々に少しでも参考になれば幸いである。

ストレスという言葉は現在では非常に一般的になっているが、細胞へのストレスという点で考えると、外部環境の変化、たとえば、温度、圧力、放射線、金属イオン、酸素、ある種の無機化合物、あるいは有機化合物などの存在が考えられる。また、生体組織の損傷、虚血、ウイルス感染などの病理的变化もストレスとして作用すると考えられる。このようなストレスに対処して生き残るための機構を、生物は獲得してきた。いわゆるストレス応答とよばれるもので、あらゆる生物に認められる。このストレス応答の主役が、ストレスタンパク質であると主張する人もいる。

生体防御機構としてのストレスタンパク質合成

細胞を生理的な温度より5-10℃くらい高い温度にすると、平常時のタンパク質合成のレベルが下がって、かわりに数種類のタンパク質、つまりストレスタンパク質あるいは熱ショックタンパク質が合成される。このときの温度は、高すぎる

と細胞がストレス応答をおこす時間もなく死んでしまうので、死なない程度のストレスである。最初にこのようなタンパク質が見つかったとき与えられたストレスが熱であったため、熱ショックタンパク質 (Heat Shock Protein)、略してHSPとも呼んでいる。熱以外の金属イオンやアルコールのような有機化合物、組織の損傷、虚血などによっても誘導合成される。また、後で述べるが、これらのタンパク質は複数の遺伝子にコードされているマルチジーンで、ストレス依存的に発現するものだけでなく平常時にも存在するものがあり、すべてをまとめてストレスタンパク質あるいはHSPと呼んでいる。これらは、生体防御機構として働くと考えられている。

ストレスタンパク質の誘導合成が生体防御機構として機能しているということのわかりやすい例が、ストレスに対する抵抗性である。培養CHO (Chinese Hamster Ovary cell, 卵巣、遺伝子発現の調節機構、突然変異の研究に使用される) を、いきなり、46℃で、14分加熱すると、ほとんど死んでしまうが、あらかじめ、40℃で1時間加熱し、37℃で4時間経過させた後、46℃14分加熱すると、生存率が非常に高くなる²⁾ (加熱処理しないものを1.0として生存率は0.35)。熱のかわりに4%エタノールで処理し、37℃4時間経過後46℃14分加熱しても同じように生存率が高くなる¹³⁾ (生存率0.24)²⁾。つまり、40℃の熱や4%エタノールのような弱いストレスを与えてストレスタンパク質を

Key Words : ストレスタンパク質 Stress protein, 多重遺伝子族 Multigene families, ストレス抵抗性 Stress tolerance, 分子シャペロン Molecular chaperone

誘導合成させておくと (37°C, 4時間という時間はタンパク質合成のために必要な時間である), 致死的な高温である46°Cの強いストレスに対して抵抗性をえることができる。そして, この抵抗性はエタノールに対してえられたものでも熱に対して抵抗性があるという交差性抵抗である。

ストレスタンパク質の研究上の興味

ストレスタンパク質の研究は1962年の Ritossa による報告が最初とみなされている¹⁴⁾。ショウジョウバエの多糸染色体 (polytene chromosome) のパフの発現のパターンが, 高温とDNP (2, 4-dinitrophenol) というストレスによって変化するという報告である。その後, 合成されたストレスタンパク質の同定やそのmRNAの同定, 転写や翻訳という遺伝子発現の過程が研究され^{15, 16)}, バイオテクノロジー (クローニングなど) の発展に伴って最近10年間ストレスタンパク質遺伝子の特定や誘導のメカニズムが研究されてきた。

研究上の興味は, およそ三つある。ひとつは, ストレスタンパク質の誘導合成がドラマチックではあるが, 一時的, 一過的であり, その時いろいろなレベルで変化する細胞内の構造や機能, 遺伝子の発現のメカニズムである。ふたつめは, 多重遺伝子族, マルチジーン (multigeneまたはpolygene) であることである。よく似た塩基配列の遺伝子部位が繰り返し存在しており, アミノ酸配列のよく似たタンパク質がいくつか存在していて機能は似ているが, ストレスなどの刺激 (シグナル, 細胞サイクルのコントロールファクター) に対して独立に発現する。みつめは, 先に述べたストレス抵抗性 (Stress tolerance) である。

ストレスタンパク質ファミリー

ストレスタンパク質遺伝子の多重性とその発現するストレスタンパク質は, 細胞のタイプによって異なっているが, 基本的には機能は同じで, 分子量で分けられたひとつのグループ, つまりファミリーと呼ばれるグループはほ乳類でも植物でもバクテリアでも同じである (表1)¹⁾。たとえば,

分子量7万程度のストレスタンパク質はHSP70ファミリーとよばれ, どの細胞にもある。分子量9万程度のはHSP90, 6万はHSP60, 2万はHSP20, 1万はHSP10とよぶ。ひとつのファミリーの各メンバーは細胞内器官によって違っている。ストレス依存的に発現するものをHSP, ストレスによらず平常時にも存在しているものをHSCと呼ぶことがある。これは, 後で述べる。

HSP遺伝子の発現機構

前述した研究上の興味のひとつは, 遺伝子の発現の機構であったが, 大腸菌の場合では, シグマ32 (シグマ因子は転写時にRNAポリメラーゼ酵素のコア酵素に結合して完全なRNAポリメラーゼとなる) と呼ばれる不安定なタンパク質が転写調節因子である^{2, 17)}。これは平常時でも少し存在しており, シグマ32のmRNAも平常時に転写されて存在しているが, ストレスが与えられるとシグマ32のmRNAからの翻訳がリボソームで促進されるし, シグマ32タンパク質も安定化される。すると, シグマ32をサブユニットとするRNAポリメラーゼが増えてストレスタンパク質遺伝子DNAから, ストレスタンパク質mRNAを合成する過程, つまり転写が促進される。さらに翻訳されてストレスタンパク質が合成されてくるわけであるが, ある程度の量になると, 負のフィードバックがかかり, 抑制される。シグマ32も不安定になる。従ってストレスタンパク質の誘導は一時的, 一過的になっている。

真核生物ではHSP遺伝子DNAの上流に熱ショックエレメント (Heat Shock Element, HSE) があり, 塩基配列はすべての真核生物で共通である。熱ショック転写調節因子 (Heat Shock Factor, HSF) が, DNAのHSEに結合して転写がおこる。HSFは平常時は非活性だが, 熱などで活性型にかわると考えられている。

細胞の変化

ストレスが細胞に与えられると, 細胞内が変化する。たとえば, 細胞を熱処理するとHSC70お

表1 ストレスタンパク質の種類

(ストレス依存的に発現するものをHSP、構成的に発現するものをHSC、Heat shock cognate protein、で示す)

Hsp family	Genes	Cytoplasm	ER	Chloropl.	Mitochondria
Mammalian cells					
Hsp90	3	Hsp89 α Hsp89 β	Grp94	-	-
Hsp70	7-8	Hsc72, 70 Hsp70A Hsp70B	Grp78	-	Hsc70 (DnaK) Hsp73
Hsp60	1	-	-	-	Hsp60 (GroEL)
Hsp20	1	Hsp25-27	-	-	-
Hsp10	1	-	-	-	Cpn10 (GroES)
Ubiquitin		Ubiquitin	-	-	-
Plants cells					
Hsp90	1	Hsp80	?	-	-
Hsp70	5	Hsc70 Hsp70	Grp78	Hsc70 _s	Hsc70 _m
Hsp60	2	-	-	Hsc60 _s	Hsc60 _m
Hsp20	~20	15-20 Represent. of Hsps 15-19	?	Hsp21 Hsp22	?
Hsp10	1	-	-	Cpn10	?
Ubiquitin		Ubiquitin	-	-	-
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (yeast)					
Hsp90	2	Hsp90 Hsc90	?	-	-
Hsp70	8	SSA1-4 SSB1, 2	KAR2	-	SSC1
Hsp60	1	-	-	-	Hsp60
Hsp20	1	Hsp26	-	-	-
Ubiquitin		Ubiquitin	-	-	-

よびストレス誘導されたHSP70が核内に移行し、核小体に移ることが知られている¹⁸⁾。これは、ストレスによって変性した合成途中のリボソームに核小体に移ったHSC70やHSP70が結合して、変性リボソームなどが不溶性の沈澱を形成して細胞に致命的な傷を与えることを防いでいると考えられている。

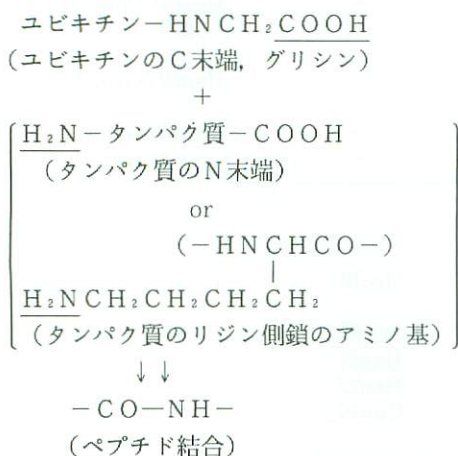
繊維芽細胞に熱ショックを与えると、アクチンが核内に移行し、アクチン繊維の束であるアクチンロッドを形成する¹⁹⁾。分子量18Kのアクチン結合タンパク質であるコフィリンも核内に移りアク

チンとともにロッドを形成することが知られているが、その意味はまだ明らかではない。

ユビキチンというタンパク質はストレスタンパク質でもあるが、76個のアミノ酸残基からなるなどの真核生物にもあるタンパク質で、タンパク質の分解に関係している。酵素系(Ubiquitin conjugating enzyme)の作用で、ユビキチンのC末端のグリシンのカルボキシル基が、いろいろなタンパク質のリジン側鎖のアミノ基またはN末端のアミノ基とペプチド結合する。これがタンパク質のユビキチン化で、タンパク質が分解される。スト

レスによってユビキチンの合成が促進されるのは、ストレスによって変性した分解しなければならないタンパク質が増えたためではないかと考えられているが、ユビキチンの機能についてはまだよくわかっていない。

タンパク質のユビキチン化



HSPの機能

ストレスタンパク質はマルチジーンで、よく似たアミノ酸配列のファミリーであると既に述べた。いろいろな分野で独自に研究されていたタンパク質が実は同じストレスタンパク質であることが、タンパク質アミノ酸配列決定によってだんだんわかってきたからである。免疫グロブリン分泌の研究グループは、不完全なアセンブリー（再配列）の抗体に結合しているH鎖結合タンパク質（heavy chain binding protein, Bip）があることを認めていたが、これが、小胞体（endoplasmic reticulum, ER）に分布するHSP70ファミリーのメンバーでもともとGRP78（glucose-regulated protein, グルコース飢餓の時合成される）として知られていたタンパク質と同じものだということが明らかになった（1986年頃）。クラスリン脱コートATPアーゼは、コーテッドベシクル（膜小胞を籠状のクラスリンとよばれるタンパク質が囲んだ構造）のクラスリン殻をATP依存的

に壊すタンパク質だが、HSP70と同じである。

ファミリーのメンバーの発現や細胞内分布の違いは、HSPの機能の多様性とさまざまな部位で多種多様な使われ方をしていて巧妙に利用されていることを示している。

ストレスタンパク質は、大腸菌から高等脊椎動物、植物にいたるすべての生物にあって、そのアミノ酸配列が非常によく似ている。これは、HSPが分子機能に不可欠で生物の生存に非常に必要であることを示している。進化の過程でよく保存されてきたタンパク質といえる。ヒト染色体には少なくとも10種類のHSP関連遺伝子が存在するが、HSP70は平常時の細胞にとっても必要である。

分子シャペロン

平常時にも発現しているストレスタンパク質の生体内での重要な機能に、分子シャペロンとしての働きがある。タンパク質が細胞内で生合成されそれぞれの最適な場所に移動してその役割を果たすためには、タンパク質の立体構造形成、構造変化やサブユニットのアセンブリー（再配列）が必要であるが、このとき、サブユニット同士あるいは他のタンパク質とまちがった相互作用をしないように働き、自分自身は最終的に完成されたものには組み込まれないタンパク質がある。このようなタンパク質を分子シャペロンと呼んでいる。シャペロンというのは、本来は社交界にデビューする若い未婚女性の付き添い人のことで、普通は年配の既婚女性で、その未婚女性の世話をし、社交上の行儀作法が守られているかどうか監督する役目をする。生合成されたばかりのタンパク質や構造変化をおこした変性タンパク質はアグリゲーション（非特異的な会合体）を形成し、細胞に致命的なダメージを与えるが、分子シャペロンが存在するとタンパク質が安定化され、アグリゲーションが抑制されてタンパク質が正しい場所で役割が発揮できる。

現在、分子シャペロンとみなされているものを示した（表2）³⁾。タンパク質の立体構造形成と

表2 主な分子シャペロンと役割

名 前	役 割
(1) ヌクレオプラスミン	ヌクレオソームアセンブリー, リボソームアセンブリー
(2) 熱ショックタンパク質	
(a) シャペロニン (HSP60, HSP10)	タンパク質の折りたたみ, オリゴマーアセンブリー タンパク質の輸送, DNA複製
(b) HSP70	タンパク質の折りたたみ, オリゴマーアセンブリー タンパク質の輸送, オリゴマーディスペアセンブリー ホルモンレセプターのマスキング
(c) HSP90	
(3) シグナル認識顆粒	タンパク質の膜透過
(4) ズブチリン	ズブチリンの構造形成
プロシークェンス	
(5) α -リティックファクター	α -リティックプロテアーゼの折りたたみ
プロシークェンス	
(6) ユビキチン化リボソーム	真核生物におけるリボソームアセンブリー
タンパク質	
(7) トリガーファクター	タンパク質の輸送
(8) SecBタンパク質	タンパク質の輸送
(9) PapDタンパク質	大腸菌の線毛形成

構造変化に関与するストレスタンパク質は二つのグループに分類される。シャペロニンとHSP70である。

シャペロニンタンパク質のなかでも最もよく研究されているのは大腸菌由来のGroEである。GroEはHSP60ファミリーであるGroEL(分子量57259)とHSP10ファミリーであるGroES(分子量10368)からなっている。GroELはタンパク質再生中間体や変性タンパク質を認識し、結合する。GroELと結合することによりアグリゲーションを生じる性質を失い安定化される。この結合は疎水的相互作用によるのではないかといわれている。ATPが存在すると、GroELはATPと結合して加水分解する。このとき再生中間体はGroELから脱離し、正しく折り畳まれ、活性を持った構造を形成する。この脱離の段階でGroESがなんらかのかたちでGroELを助ける働きをすると考えられている。しかし、まだ、よくわかっていない点が多い。

固体レベルでのHSP

9.5日目のラット胎児を42°C、10分間の熱ショック

クでタンパク質合成させた後、 $[^{35}\text{S}]$ メチオニンで38°C、60分間ラベルし、1.5時間後、3時間後、4.5時間後、6時間経過後に調べると、1.5時間後には平常時のタンパク質合成量は減少して、HSPが増加し、その後HSPが徐々に減少して6時間後にはほぼ元に戻っている²⁰⁾。9.5日目のラット胎児に熱ショックを与えて2日後の11.5日目の様子を調べた場合、42°C、10分間の穏やかな熱ショックを与えたものでは、前脳、中脳、後脳とも発育は正常であるが、いきなり43.5°C、7.5分の強い熱ショックを与えたものでは、眼と前脳に欠陥が認められる。しかし、42°C、10分間の弱い熱ショックを与えて、熱ショック応答を誘導させ、38.5°Cで1時間おいた後、43.5°C、7.5分の強い熱ショックを与えたものでは、胎児が少し小さく、発育に遅れが認められるが、形態的には欠けた部分は認められない²¹⁾。弱い熱ショックをあらかじめ与えてHSPを合成させておくと、致命的な熱ショックにたいして抵抗性を獲得できることを示している。この熱抵抗性は、弱い42°Cの熱を与えた後、15分後から6時間後まで持続する。4時間あるいは2分節分の発育の遅れは、神経系

への影響はよくわからないが、全体的な発育面からみると充分回復しており、生まれる時までにはこの遅れを克服していると考えられる。

ラットの脳に損傷を与えたときの h s p 70 遺伝子の誘導の経時変化を in situ ハイブリッド形成法 (大脳皮質でカット, ^{35}S でラベル化された h s p 70 アンチセンスリボプローブを使用) によって調べたものでは²²⁾, 損傷を受けた後 2 時間経過後に, 損傷箇所でも局所的に h s p 70 mRNA が誘導されていることが, はっきり示されている。12 時間後, 24 時間後と徐々に減少しており, h s p 70 mRNA の誘導が一過的であることがわかる。

鍼灸刺激との関連

個体レベルでのストレスは臨床医学の重要なテーマであり, 細胞レベルでのストレスは分子生物学, 細胞生物学, 生化学などの基礎医学のテーマである。個体レベルでのストレスは, 内部環境の変化をおこす要因と考えられ, 気温や気圧の変動, 食事, 体温の低下や血圧の上昇をもたらす精神的要因などであるが, これらの影響には個体差があり, 個別的である。細胞レベルのストレスと共通点は, ストレスにたいする抵抗性があることで, それも交差性抵抗を示すことである。鍼灸刺激は熱的刺激, 機械的刺激, 電氣的刺激であるが, 弱い刺激を与えて抵抗性をもたせる治療法と考えれば, ストレスタンパク質あるいは熱ショックタンパク質との関連も考えられる。灸や針通電刺激との関連性については, 実験結果をいくつか既に報告している⁵⁻¹²⁾。

おわりに

非常に広い分野でストレスタンパク質の関連が考えられる。炎症, 感染症, 虚血, 老化など病気との関連についても指摘されているが, 基礎的な研究による機構は明らかでない。ストレスタンパク質のアミノ酸配列が大腸菌から高等脊椎動物, 植物にいたるすべての生物において非常によく似ており, 生物進化における役割も考えられるが, まだよくわかっていない。

文 献

- 1) Hightower L, Nover L (Eds): Heat Shock and Development, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1991.
- 2) 矢原一郎: ストレス応答とストレスタンパク質. 生化学, 64: 1244~1261, 1992.
- 3) 河田康志, 永井 純: 分子シャペロンタンパク質. 化学, 48: 194~198, 1993.
- 4) 十亀弘子, 小久保利雄: 分子シャペロンはどのようにタンパク質の折りたたみ中間体を認識するか. 化学と工業, 47: 686~687, 1994.
- 5) Kobayashi K: Induction of Heat-Shock Protein by Moxibustion. Amer J Chin Med, to be submitted.
- 6) 小林和子, 高岡 裕, 竹石和秀: 灸と熱ショック蛋白質との関連. 医学のあゆみ, 148: 199~200, 1989.
- 7) 小林和子: 灸の効果と熱のショックタンパク質との関連性. 上原記念生命科学財団研究報告集, 3: 1~3, 1989.
- 8) 小林和子: 鍼灸刺激とストレスタンパク質との関連. 全日本鍼灸学会雑誌, 39: 338~341, 1989.
- 9) 小林和子: 灸における熱ショックタンパク (h s p) の意義. 明治鍼灸医学, 4: 67~71, 1988.
- 10) 小林和子: 針通電刺激とストレスタンパク質との関連. 明治鍼灸医学, 5: 63~66, 1989.
- 11) 小林和子, 島津高洋, 大田美香, 飯星将盛: 針刺激によって誘導されたストレスタンパク質の分析. 全日本鍼灸学会雑誌, 40: 365~368, 1990.
- 12) 小林和子: 針灸刺激によって誘導されるストレスタンパク質の二次元電気泳動パターン画像解析による定量. 全日本鍼灸学会雑誌, 42: 165~168, 1992.
- 13) Li G C, Hahn G M: Ethanol-induced tolerance to heat and to adriamycin. Nature, 274: 699~701, 1978.
- 14) Ritossa F: A new puffing pattern induced by heat shock and DNP in Drosophila. Experientia, 18: 571~573, 1962.
- 15) Tissieres A, Mitchell H K, Tracy U M: Protein synthesis in salivary glands of D melanogaster. Relation to chromosome puffs. J Mol Biol, 84: 349~398, 1974.
- 16) McKenzie S L, Meselson M: Translation in vitro of Drosophila heat-shock messages. J Mol Biol, 117: 279~283, 1977.
- 17) 森 浩植, 永井宏樹, 由良 隆: Med. Immunol, 21: 547~552. 1991.
- 18) Lewis M J, Pelham R B: Involvement of ATP in the nuclear and nucleolar functions

- of the 70 kD heat shock protein. EMBO J, 4 : 3137~3143, 1985.
- 19) Iida K, Iida H, Yahara I : Heat shock-induction of the intranuclear actin rods in cultured mammalian cells. Exp Cell Res, 165 : 207~215, 1986.
- 20) Walsh DA, Hightower LE, Klein NW et al : The induction of the heat shock proteins during early mammalian development. Heat shock, Cold Spring Harbor Lab Symp 2 : 92, 1985.
- 21) Walsh DH, Klein NW, Hightower LE, et al : Heat shock and thermotolerance during early rat embryo development. Teratology, 36 : 181~191, 1987.
- 22) Brown IR, Rush SJ, Ivy GO : Induction of a heat shock gene at the site of tissue injury in the rat brain. Neuron, 2 : 1559~1564, 1989.

Stress Protein

KOBAYASHI Kazuko

Department of Chemistry, Meiji College of Oriental Medicine.