

1. 研究課題名：動物細胞のストレス応答に関する研究 (I) :  
熱ショック蛋白質 (HSP) の機能に関する研究
2. 研究機関：長崎大学薬学部放射線生命科学 ([kzsuzuki@net.nagasaki-u.ac.jp](mailto:kzsuzuki@net.nagasaki-u.ac.jp))
3. 研究者：鈴木啓司
4. 研究協力者：渡邊正己 (長崎大学薬学部放射線生命科学)  
児玉靖司 (長崎大学薬学部放射線生命科学)
5. 研究期間：平成7年～9年

## 6. 要約

放射線、紫外線、熱あるいは化学物質などの環境中の物理・化学的ストレスに対し、生体はいわゆる”ストレス応答反応”と呼ばれている一連の誘導機構を惹起する。このようなストレス応答反応は、多変する自然環境中で生命が存在するために必須かつ基本的な機能として獲得したメカニズムであると考えられる。我々は、ストレス応答反応を細胞レベルあるいは分子レベルで解明するため、ストレス応答因子の同定を試みてきたが、正常ヒト胎児由来細胞において太陽紫外線や温熱変化など、マイルドなストレスに応答し誘導される蛋白質として熱ショック蛋白質 (HSP) の1つ HSP72 を同定した。これまでに、1) 紫外線や温熱処理など異なったストレスは、それぞれ CRE あるいは HSE と呼ばれるヒト HSP72 遺伝子のプロモーターに存在する別々の転写調節配列を介して HSP72 蛋白質遺伝子の発現を誘導していること、2) ファイブロネクチンなどの細胞外基質や、その量的・質的变化にともなう細胞形態変化が、ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導に影響を及ぼすこと、3) 誘導された HSP72 蛋白質は、変性蛋白質の修復や細胞周期制御を介した DNA 損傷修復のための時間的場の提供など、異なったストレスに対し異なった機能を発現すること、4) HSP72 蛋白質はストレス状況下のみならず、平常時の生理的条件下でも構成的に発現し、細胞の分裂・増殖に重要な働きをしていること、5) HSP72 蛋白質はがん抑制遺伝子産物の1つである p53 蛋白質と蛋白質-蛋白質複合体を形成し、細胞周期制御に直接的に関与する可能性があること、6) 遺伝子発現プラスミドベクターの導入による HSP72 蛋白質の過剰発現がストレス後の細胞内ゲノム不安定性を誘導すること、7) 正常ヒト細胞の老化に伴い、外的ストレスに対する応答性が低減していくこと、8) 低レベル温熱ストレスの反復が細胞寿命の延長や、細胞分化を促進すること、を明らかにしてきた。また、ヒト細胞における HSP72 相同蛋白質が、植物細胞にも存在することをハマボウフウ (*Glehnia littoralis*) 培養細胞を用いて証明し、更にこの HSP72 様蛋白質の発現レベルは植物細胞の増殖に相関して増加し、逆に細胞分化マーカーの発現に伴い減少することを見いだした。

## 7. 目的

地球上に存在する生命は、数 10 億年に渡り急激な環境変化に曝されながらその中で生存するように進化してきた。このような環境変化には、宇宙放射線量の変化や、紫外線線量変化、あるいは気温の変化、酸素濃度変化などが含まれる。現在このような急激な変化は激減し、穏やかな環境の中で活動しているが、それでも、進化の過程で獲得してきた環境変化に

対応するメカニズム、いわゆる ” ストレス応答反応 ” は現在の微弱な環境変化に対処するためにも応用されている。近年、それ単独では顕著な生物効果を示さない極微量の放射線が、生体にとってある種の刺激となって効果を表わすことが明らかになった。この低レベル刺激に対する応答反応のメカニズムは未だ不明であるが、ある種の遺伝子誘導反応が関与していることが予想されている。このような低レベルストレス応答反応はその多くが現在の安定した環境の中では眠ったままであることが予想されるが、その中にはこれまでまだ認識されていないような基本的なメカニズムが存在することが十分予想され、低レベルストレス応答反応の研究意義は非常に高い。

このような低レベル刺激によるストレス応答反応にも関与しうるストレス応答反応因子の機能とその応答メカニズムを分子レベルで解析するためには、マイルドな刺激に反応して誘導されるストレス応答因子の同定が必要不可欠である。近年、ストレス応答反応に関与するいくつかの興味深い蛋白質が同定された。その1つは癌抑制遺伝子産物 p53 蛋白質であるが、その誘導は放射線や紫外線あるいは熱変化など多くのストレスにより引き起こされることが明らかになった<sup>1)</sup>。さらに、p53 蛋白質はその変異あるいは消失がほとんど全てのがん細胞で見いだされ<sup>2)</sup>、ストレス蛋白質の機能が細胞の分裂・増殖など生存に関わる極めて基本的なものであることが予想された<sup>3)</sup>。もう1つのストレス蛋白質として HSP72 蛋白質が同定された。HSP72 蛋白質は、微生物から高等生物に至るまで幅広く普遍的に存在する熱誘導蛋白質 hsp70 ファミリーに属する蛋白質の1つで、抗 HSP72 抗体に認識される分子量 72kDa の蛋白質である<sup>4)</sup>。HSP72 蛋白質には pI 値の異なった数種の蛋白質が含まれることが明らかにされている。これまでの我々の研究から、HSP72 蛋白質の誘導は熱のみならず紫外線でも起こることが明らかになった<sup>5)</sup>。さらに、重金属、アミノ酸アナログ、血清添加、PGA 処理などの様々なストレスでも誘導されることが明らかにされており、p53 蛋白質同様に生体におけるストレス応答反応で極めて普遍的な役割を果たしている蛋白質であることが予想された。我々は、生体によるストレス受容メカニズム、あるいはストレス応答因子の生理機能を研究するため、まず HSP72 蛋白質に着目し、その遺伝子発現メカニズムや蛋白質機能の解析を計画した。

## 8 . 材料と方法

### 8-1. ストレスによる HSP72 蛋白質発現制御メカニズム

#### 【細胞培養】

ヒト正常細胞として正常ヒト胎児由来 ( HE ) 細胞を用いた。癌細胞としては、T24 ( Bladder carcinoma )、HT1080 ( Fibrosarcoma )、H1299 ( Non-small cell lung carcinoma )、RKO ( Colon carcinoma )、MCF-7 ( Mammary carcinoma )、HeLa ( Cervix carcinoma ) を用いた。細胞は 10% 牛胎児血清 ( FBS ) を含む MEM 培地を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。継代培養は、3 ~ 4 日毎に 0.2% トリプシンを用いて細胞を回収し、1 × 10<sup>6</sup> 個の細胞を T75 型培養フラスコ ( 底面積 75cm<sup>2</sup> ) に植え直すことにより行った。

#### 【細胞処理】

細胞のX線照射には T25 型フラスコ (底面積 25cm<sup>2</sup>) に植えた細胞を用いた。対数増殖期にある細胞に、X線発生装置 (150kVp、5mA) により線量率 0.44G/min の条件で照射を行った。紫外線照射は、殺菌灯ランプ (GL-15、Toshiba) により行った。直径 100mm のディッシュに植えた細胞を照射直前にリン酸緩衝液 (PBS) により 2 度洗浄し照射した。温熱処理は、細胞を植えた T25 型フラスコをプラスチックバッグに入れシールした後に 43 のウォーターバスインキュベーターに沈めることにより行った。ケルセチン (Quercetin; 3, 3', 4', 5, 7-Pentahydroxyflavone、Sigma) は DMSO に 100mM の濃度で溶解したものをストック溶液とし、これを培養液で希釈し用いた。

#### 【蛋白質抽出およびウェスタンブロッティング】

細胞全蛋白質の抽出は、トリプシン処理により回収した細胞を RIPA 溶液 (50mM Tris, pH7.2、150mM NaCl、1% Nonidet P-40、1% Sodium deoxycholate、0.1% SDS) で溶解し、遠心処理 (15000rpm、10 分、4℃) により得られる上清を回収することにより調製した。上清中の蛋白質量を BCA アッセイキット (Pierce) を用いた比色定量法により測定し、8 ~ 16 µg の蛋白質を泳動した。蛋白質は、7.5%もしくは 10%のゲルを用いた SDS-PAGE 法により分画した後 PVDF 膜に電氣的に転写した。PVDF 膜は 1 晩 10%スキムミルク中でブロッキングし、TBS-T (20mM Tris, pH7.6、0.1% Tween-20) 溶液で洗浄後 1 次抗体を処理した。1 次抗体処理後 PVDF 膜を TBS-T で 3 回洗浄し、ビオチン化 2 次抗体を処理した。処理後再び TBS-T で 3 回洗浄し、ストレプトアビジン-アルカリフォスファターゼを加えさらに反応させた。さらに TBS-T で 3 回洗浄した PVDF 膜に NBT/BCIP を基質として加え発色させた。出現したバンドの相対濃度は、PVDF 膜をデンシトメーターでスキャンすることにより求めた。

#### 【蛍光抗体法】

細胞の免疫染色には蛍光抗体法を用いた。22 × 22mm の滅菌カバーグラスに植えた細胞を各種ストレスで処理した後、-20℃ のメタノールで 5 分間固定し、PBS で洗浄し 1 次抗体を処理した。抗体の処理は 37℃ の CO<sub>2</sub> インキュベーター中で行った。洗浄後、FITC 標識した 2 次抗体を加えさらに反応させた。反応後は蒸留水を用いて洗浄し、風乾した後にオイキットを用いてスライドグラス上に封入した。蛍光顕微鏡により顕鏡し写真撮影した。

## 8-2. ストレス応答における HSP72 蛋白質の機能

#### 【細胞培養】

ヒト正常細胞として正常ヒト胎児由来 (HE) 細胞を用いた。細胞は 10%牛胎児血清 (FBS) を含む MEM 培地を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37℃・5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。継代培養は、3 ~ 4 日毎に 0.2%トリプシンを用いて細胞を回収し、1 × 10<sup>6</sup> 個の細胞を T75 型培養フラスコ (底面積 75cm<sup>2</sup>) に植え直すことにより対数増殖期にある細胞を維持した。

#### 【細胞処理】

細胞のX線照射には T25 型フラスコ (底面積 25cm<sup>2</sup>) に植えた細胞を用いた。対数増殖期にある細胞に、X線発生装置 (150kVp、5mA) により線量率 0.44G/min の条件で照射を

行った。紫外線照射は、殺菌灯ランプ (GL-15、 Toshiba) により行った。直径 100mm のディッシュに植えた細胞を照射直前にリン酸緩衝液 (PBS) により 2 度洗浄し照射した。

#### 【蛋白質抽出およびウェスタンブロッティング】

細胞全蛋白質の抽出は上述の方法で行った。核蛋白質は、Lysis buffer (10 mM HEPES、pH8.0、50 mM NaCl、0.5 M Sucrose、0.1 mM EDTA、0.5% Triton X-100、1 mM DTT、5 mM MgCl<sub>2</sub>) を用いて 4 で 5 分間細胞を溶解後 5000rpm で 1 分間遠心し、回収した細胞核を 0.5 M NaCl、5 mM Spermidine 存在下で溶解して抽出した。蛋白質の定量およびウェスタンブロッティングは上述の方法にしたがって行った。

#### 【免疫沈降法】

上述の RIPA 溶液を用いて作成した 500 μg ~ 1 mg の蛋白質試料に 1 次抗体を加え、4 の冷蔵庫中でゆっくりと旋回 (12rpm) 攪拌させながら抗原抗体反応を行った。その後、Protein A/G-agarose (OSI) を加えさらに旋回反応させ免疫複合体を形成させた。反応後、遠心 (120000rpm、10 分) により免疫複合体を沈殿として回収し、RIPA 溶液で 3 回洗浄した。免疫複合体は泳動用のサンプル溶液 (500 μl 蒸留水に 125 μl 0.5M Tris、pH6.2、50 μl β-mercaptoethanol、100 μl グリセリン、50 μl BPB を加えたもの) に懸濁し遠心 (12000rpm、10 分) 後得られた上清をその後の解析に用いた。

#### 【HSP72 蛋白質発現プラスミドの作成および細胞への導入】

HSP72 蛋白質発現ベクターは、各種プロモーターを持った発現ベクターにヒト HSP72 蛋白質をコードする hsp70 遺伝子を組み込むことにより作成した。作成した組み換え体はキアジェン DNA 抽出キット (Qiagen) を用いて精製した。プラスミド DNA の細胞への導入は、エレクトロポレーション法により行った。1 ~ 5 μg のプラスミド DNA を細胞を懸濁した PBS に添加し、パルス高 400V/cm、パルス幅 1 m sec のパルスを細胞に作用させた。エレクトロポレーション処理した細胞は 1 晩培養した後に選択培地に移し、10 ~ 14 日間培養して導入細胞を単離した。

### 8-3. 細胞老化とストレス応答性の変化

#### 【細胞培養】

ヒト正常細胞として正常ヒト胎児由来 (HE) 細胞を用いた。細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS) を含む MEM 培地を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。対数増殖状態にある細胞維持するため、3 ~ 4 日毎に 0.2% トリプシンを用いて細胞を回収し、1 × 10<sup>6</sup> 個の細胞を T75 型培養フラスコ (底面積 75cm<sup>2</sup>) に植え直すことにより継代培養を繰り返した。

#### 【細胞処理】

温熱処理は、細胞を植えた T25 型フラスコをプラスチックバッグに入れシールした後に 43 °C のウォーターバスインキュベーターに沈めることにより行った。

#### 【蛋白質抽出およびウェスタンブロッティング】

細胞全蛋白質の抽出およびウェスタンブロッティングは上述した方法により行った。

#### 【DNA の抽出およびサザンブロット法】

細胞由来の高分子 DNA は Salt-out 法により抽出した。培養した細胞を PBS でよく洗浄後、0.7%SDS、0.3mg/ml Proteinase K および 0.1mg/ml RNaseA を含む DNA lysis 溶液 (10mM Tris, pH 8.2, 400mM NaCl, 2mM EDTA) を加え、1 晩 37 °C インキュベーター中で処理した。その後細胞溶解液を回収し、1/2 容量の 5 M NaCl を加え、静かによく混ぜ均一の溶液とした。3000rpm で 15 分間遠心した後上清を回収し、2 倍量のエタノールを加え DNA を析出させた。DNA は 70%エタノールで洗浄した後乾燥させ、蒸留水に溶かした。OD260nm で DNA 濃度を測定し、10 µg を計り取り制限酵素で処理した。制限酵素は *Msp* I 及び *Hpa* II の 2 種類を用いた。いずれも 30U の酵素を加え、37 °C のウォーターバスインキュベーターで 1 晩反応させた。制限酵素処理した DNA を 0.8%アガロースゲルで分画し、ナイロン膜に転写した。その後 ECL ラベリングシステムによりパーオキシダーゼ標識した *hsp72* 遺伝子 (pH2.3) をプローブにしてハイブリダイゼーションを行った。ナイロン膜にハイブリダイズしたプローブは ECL 検出システムを用い X 線フィルム上に黒化バンドとして検出した。

#### 8-4. 低レベルストレスによる細胞寿命および細胞分化への影響

##### 【細胞培養】

ヒト正常細胞として正常ヒト胎児由来 (HE) 細胞を用いた。分化細胞としてはシリアンハムスター胎児由来細胞に紫外線を照射後、軟寒天中でのコロニー系性能を指標にクローン化した Av 細胞を用いた<sup>5)</sup>。Av クローンは、培養中の形態や形成されたコロニーの形態、ミオシン産生能などの特長から筋肉組織に分化する筋芽細胞であることが明らかにされている。細胞は 10%牛胎児血清 (FBS) を含む MEM 培地を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター内で 37 °C・5%CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。対数増殖状態にある細胞維持するため、3 ~ 4 日毎に 0.2%トリプシンを用いて細胞を回収し、1×10<sup>6</sup> 個の細胞を T75 型培養フラスコ (底面積 75cm<sup>2</sup>) に植え直すことにより継代培養を繰り返した。

##### 【細胞処理】

温熱処理は、細胞を植えた T25 型フラスコをプラスチックバッグに入れシールした後に 43 °C のウォーターバスインキュベーターに沈めることにより行った。

##### 【蛋白質抽出およびウェスタンブロッティング】

細胞全蛋白質の抽出およびウェスタンブロッティングは上述した方法により行った。

##### 【細胞分化能の検出】

細胞分化能の誘導は、細胞同士が融合し多核の筋管細胞が形成されることを指標に検討した。細胞集団として分化能の発現を検討する場合には、T25 型フラスコに 1×10<sup>5</sup> 個の細胞を植え、翌日培地交換により分化用培地 (DM 培地) に移した。DM 培地は MEM 培地に 5%あるいは 0%の FBS を加えたもので、3 ~ 4 日毎に培地交換を繰り返すことにより、細胞に分化能を誘導できる。DM 培地に移してから約 12 日間培養し、エタノールで固定後 3%ギムザ染色液で細胞を染色することにより多核細胞を検出した。一方、コロニーレベルで分化誘導を検討する場合には、直径 100mm の培養用ディッシュ当り約 50 個のコロニーが形成されるように細胞を植え、培養 5 日後に培地を DM 培地に交換し、さらに 7 日間培養を続けた。

形成されたコロニーは実体顕微鏡下で観察し、筋管細胞を含むコロニーを分化+として扱った。

#### 8-5. 植物細胞における HSP72 様蛋白質の同定とその機能

##### 【細胞培養】

植物細胞には、ハマボウフウ (*Glehnia littoralis*) 懸濁培養細胞を用いた。植物細胞用の培地は Gamborg's B5 に NAA (  $\gamma$ -naphthyl acetic acid; 1mg/ml) および kinetin (10  $\mu$ g/l) を添加したものをを用いた。

##### 【蛋白質抽出およびウェスタンブロットティング】

植物細胞蛋白質の抽出は、細胞を乳鉢に計り入れ RIPA 溶液を加えた後搗り潰し、遠心により上清を得ることで回収した。試料溶液中の蛋白質量は BCA アッセイキット (Pierce) を用いた比色定量法により測定し、8 ~ 16  $\mu$ g の蛋白質を泳動した。ウェスタンブロットティングは動物細胞の場合と同様の方法を応用して行った。

#### 9. 結果

##### 9-1. ストレスによる HSP72 蛋白質発現制御メカニズム

##### 【各種ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導】

正常ヒト胎児由来細胞における HSP72 蛋白質の誘導を、放射線、紫外線および温熱ストレスを加えた後に観察した (図1)。

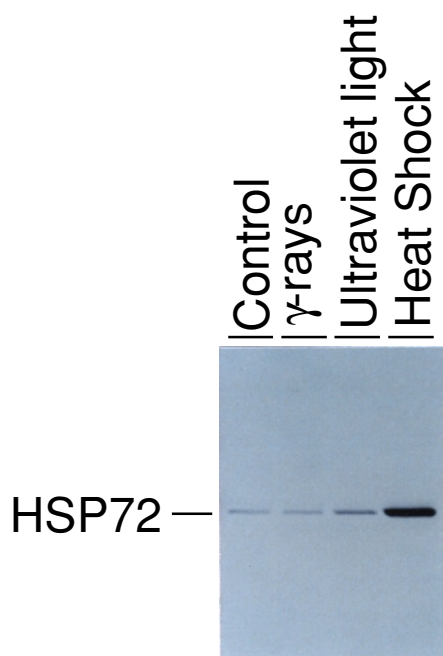


図1 各種ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導

その結果、温熱ストレスあるいは紫外線ストレスにより HSP72 蛋白質が誘導されるが放射線では誘導されないことがわかった。HSP72 蛋白質の誘導動態をストレス後の時間経過を追って調べると、紫外線ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導は照射 6 時間後から観察され、最大発現レベルは 12 時間後に見られた。HSP72 蛋白質の誘導は、紫外線照射後 24 時間目で最大誘導レベルの約 2/3 に達し、48 時間後には定常レベルに戻った。一方、温熱ストレスによる HSP72 蛋白質の発現は 43 2 時間の温熱処理中に既に始まり、処理後 6 ~ 8 時間目に最大に達した。HSP 蛋白質の誘導はその後も続き、処理後 7 日目に定常レベルにまで低下した。X 線照射の場合は照射後 24 時間目まで観察したが有意な増加は認められなかった。

つぎに、各種ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導に関わる転写調節因子を明らかにするために、HSE を介した HSP72 蛋白質誘導を特異的に抑制するとして報告された植物フラボノイドの一種であるケルセチンを用い、HSP72 蛋白質の誘導に対する影響を検討した。その結果、ケルセチン処理は定常時の HSP72 蛋白質の発現にはなんら影響を与えないのに対し、温熱ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導は濃度依存的に抑制された。また、紫外線による誘導には全く影響を及ぼさなかった。以上の結果から、HSP72 遺伝子の温熱ストレス応答にはケルセチン感受性のメカニズム、即ち HSE を介したストレス応答経路が関与するが、紫外線による誘導には別の転写調節因子活性化経路が働いていることが明らかになった。

#### 【細胞接着によるストレス応答反応の修飾】

細胞外の情報を細胞内へ伝達するメカニズムの 1 つとして、細胞膜上に存在するインテグリンを介した経路が存在する。インテグリンは細胞外基質の受容体であるが、代表的な細胞外基質であるファイブロネクチンとそのリセプターとの相互作用がストレス応答反応に影響を及ぼすかどうか調べた。実験には、アンチセンス-ファイブロネクチン遺伝子発現ベクターを導入し、人為的にファイブロネクチン量を減少させた線維肉腫細胞 (HT1080) 由来のクローン (HTNF1) を用いた。アンチセンスファイブロネクチン遺伝子は細胞内で転写されているセンスファイブロネクチン遺伝子と 2 重鎖 RNA を形成し、その結果蛋白質への翻訳が抑制される。図 2 に示したように、コントロールベクターのみを導入したクローン (HTMCS5) と比較して、アンチセンスファイブロネクチン導入細胞 (HTNF1) ではファイブロネクチン合成量が 80% 近く減少していた。また、抗ファイブロネクチン抗体による免疫染色でも、HTNF1 細胞ではファイブロネクチンメッシュワークがあまり発達していなかった。次に、HTMCS5 細胞および HTNF1 細胞を 43 2 時間あるいは 6 時間処理したときの HSP72 蛋白質の誘導について調べたところ、ファイブロネクチン減少細胞では 2 時間および 6 時間いずれの処理においても、温熱ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導が HTMCS5 細胞に比べ約 50% に減少していた (図 3)。以上の結果から、温熱ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導は、細胞の基質への接着により影響を受けることが明らかになった。



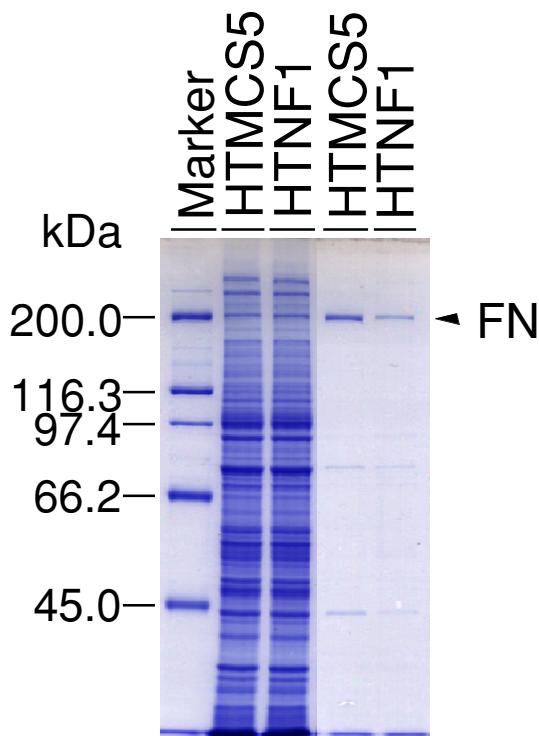


図2 アンチセンス導入細胞におけるファイブロネクチン合成量

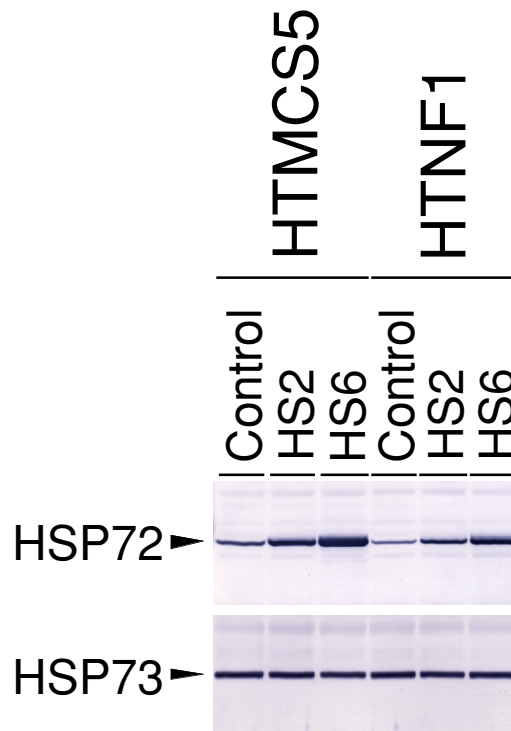


図3 温熱処理後の HSP72 蛋白質の誘導

## 9-2. ストレス応答における HSP72 蛋白質の機能

### 【各種ストレスにより誘導された HSP72 蛋白質の局在性】

紫外線や温熱処理により誘導されるストレス応答因子 HSP72 蛋白質の機能を明らかにするため、ストレスにより誘導された HSP72 蛋白質が細胞内のどの部分に存在するか細胞内での局在性を蛍光抗体法を用いて調べた。その結果、温熱ストレスにより誘導された HSP72 は細胞核内全体あるいは核小体に分布するが、紫外線により誘導された HSP72 蛋白質は細胞核内で斑点上の存在形態を取ることを見いだした(図4)。紫外線照射後の HSP72 蛋白質の誘導動態は DNA 合成の回復と高い相関性を示すことから、HSP72 蛋白質が DNA と直接的に相互作用するのかどうか DNA セルローズを用いたアフィニティークロマト法を用い検討した。その結果、図5に示すように非還元下で HSP72 蛋白質が DNA 結合蛋白質として回収されることを見いだした。さらに、免疫沈降法を用いた検討の結果、生理的非ストレス条件下あるいは温熱ストレス下で HSP72 蛋白質と p53 蛋白質は免疫共沈殿されることが明らかになり、正常ヒト細胞におけるストレス応答反応が p53 機能を介して作動している可能性が初めて明らかになった。



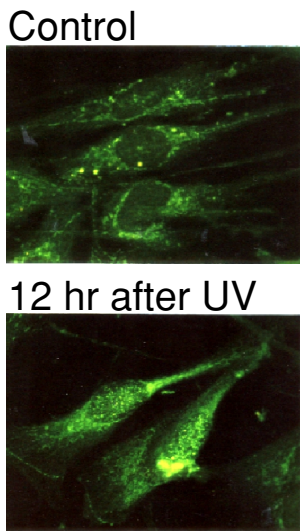


図4 紫外線照射後の HSP72 蛋白質の核内局在性

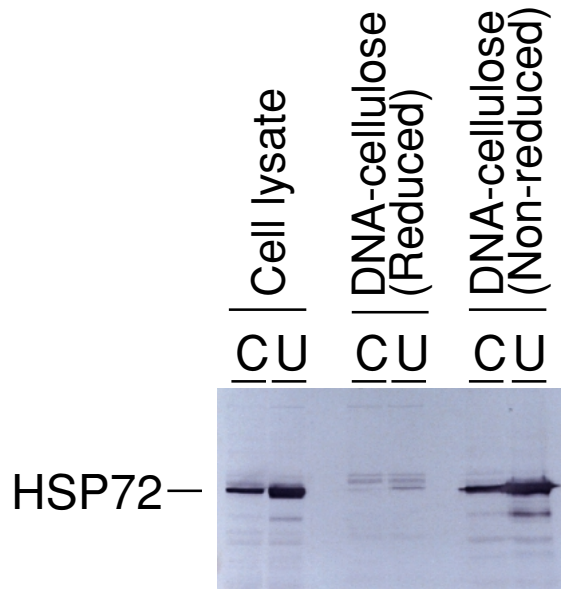


図5 HSP72 蛋白質の DNA 結合能

【ストレス後のゲノム安定性における役割】

紫外線ストレスにより誘導された HSP72 蛋白質が核内で DNA 合成の制御に関与している可能性が高いことから、ヒト HSP72 遺伝子の発現ベクターシステムを構築して HSP72 蛋白質の人為的な発現亢進がストレス応答反応をどう変化させるか検討した。発現ベクターには亜鉛の添加により転写活性化されるメタロチオネイン遺伝子プロモーターを用いた。まず、発現ベクターを導入した細胞に亜鉛を添加して HSP72 蛋白質を高発現させると、細胞の増殖速度が上昇することが明らかになった。さらに、細胞集団中の S 期細胞の割合を調べると、HSP72 高発現群でその割合が有意に増加していることがわかり、HSP72 蛋白質が細胞増殖を直接的に制御していることが明らかになった。そこで次に、HSP72 蛋白質の強制的発現が紫外線ストレス後のゲノムの安定性にどう関わっているかを調べた。紫外線はピリミジン-ピリミジンの二量体あるいは(6-4)光産物を DNA 中に誘導することから、遺伝子に点突然変異が誘起されると予想される。そこで、ヒト X 染色体に存在するヒポキサンチン・グアニン・フォスフォリボシルトランスフェラーゼ (HPRT) 遺伝子に起こる突然変異生成を指標にゲノムの安定性を検討した。HPRT 遺伝子変異細胞は、6-チオグアニン (6-TG) を入れた培養液中で生存することから、6-TG 耐性をマーカーに変異細胞の出現頻度を比較した結果、HSP72 遺伝子導入細胞では、亜鉛存在下で紫外線を照射した際、紫外線により誘発される HPRT 遺伝子の変異頻度が HSP72 蛋白質を高発現させない場合と比べて 2 倍程度有意に上昇することが明らかになった。

### 9-3.細胞老化とストレス応答性の変化

正常ヒト胎児由来細胞の細胞老化過程において、ストレスに対する応答性が変化するのかがどうか明らかにした。まず、幼若な正常ヒト胎児由来細胞 (passage 5)、あるいは老化期に入った細胞 (passage 25) を用いて、ストレス応答性を比較した。ヒト正常細胞は passage 5 付近では活発に増殖しており、細胞分裂時間はおおよそ 18 時間であった。一方、passage 25 付近では分裂能が極端に低下し、分裂時間は 48 時間以上になっている。ウェスタンブロット法による HSP72 蛋白質の発現を検討した結果、図 6 に示すように構成的な発現は両細胞を通じて変化していなかったが、温熱処理後の HSP72 蛋白質の誘導は老化細胞において若い細胞の約 50% に減少しており、熱ストレスに対する応答性が老化細胞において低下していることが明らかになった。この誘導能低下の原因を明らかにするために、ヒト HSP72 遺伝子を

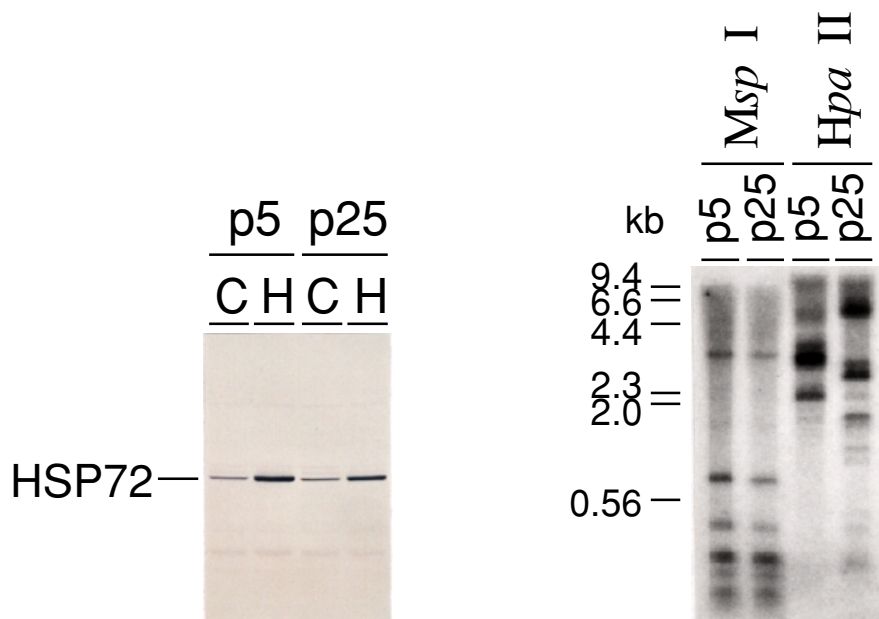


図 6 細胞老化に伴う HSP72 蛋白質  
の温熱誘導性の減少

図 7 加齢に伴う *hsp72* 遺伝子の  
メチル化

含む DNA 領域におけるメチル化の程度をサザンブロット法により検討した (図 7)。Passage 5 および passage 25 の細胞より DNA を抽出後、DNA のメチル化に影響されない *Msp* I と、同じ塩基配列を認識してメチル化によってその活性が阻害される *Hpa* II を用いて別々に DNA を消化し、*hsp72* 遺伝子をプローブにしてサザンハイブリダイゼーションを行った結果、*Msp* I による消化では両継代期の細胞で検出されたバンドパターンに差は認めなかったが、*Hpa* II の場合は異なったパターンを確認した。さらに、バンドの解析から、passage 5 で見られた 2 本の特徴的なバンド (2.3 kb および 3.0 kb) が passage 25 では高分子側 (2.7 kb および 6.0 kb) にシフトしていることがわかった。この結果は、passage 5 の細胞で *Hpa* II に認識された *hsp72* 遺伝子上の部位のいくつか passage 25 ではメチル化によってマスクされていることを意味している。したがって、HSP72 遺伝子領域は細胞の加

齢にともないメチル化を受けることが明らかになった。

#### 9-4. 低レベルストレスによる細胞寿命および細胞分化への影響

##### 【微量温熱ストレス反復の細胞寿命への効果】

前項で述べたように細胞老化に HSP72 蛋白質の誘導能の減少が関わっている可能性が示されたことから、HSP72 蛋白質を恒常的に発現させた場合に細胞寿命に変化が起きるのかどうか検討した。まず、温熱ストレスにより低レベルの HSP72 蛋白質を恒常的に発現させる条件を模索した。43 の温浴に細胞の入ったフラスコを 15 分、30 分、1 時間、2 時間浸し、HSP72 蛋白質の誘導について調べたところ、いずれの処理時間でも処理後 6 時間をピークに HSP72 蛋白質が誘導されることがわかった (図 8)。

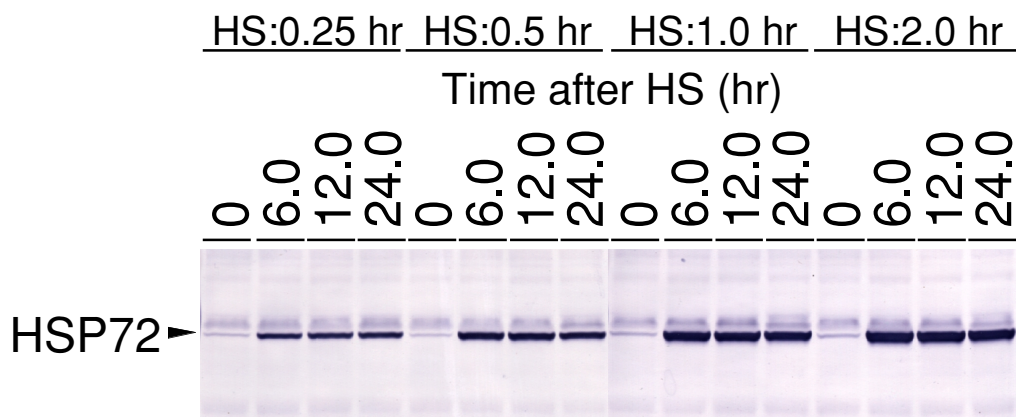


図 8 低レベル温熱ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導

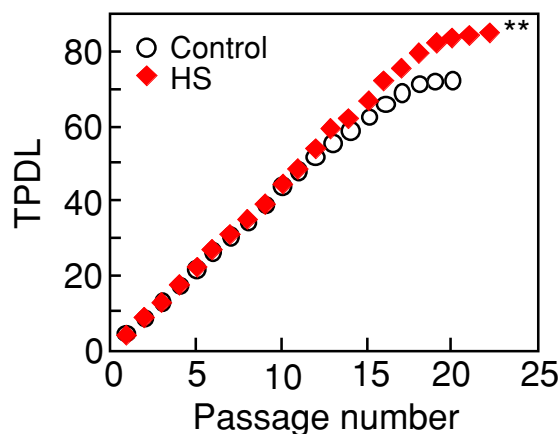


図 9 低レベル温熱ストレスによる  
TPDN の延長

最大誘導レベルは処理時間に比例して増加し、15 分処理でコントロールの約 7 倍、30 分処理で約 10 倍、1 時間及び 2 時間処理ではそれぞれコントロールの 16 倍、20 倍に達した。こ

のように、温熱処理による HSP72 蛋白質の誘導動態は処理時間に依存しないことがわかった。また、わずか 15 分間の処理でも HSP72 蛋白質が有意に誘導されることを初めて示した。別に検討した細胞生存率は、15 分間の温熱処理の場合 95%以上とほとんどの細胞が生存できる処理条件であることがわかり、15 分間の低レベル温熱処理を 2 日毎に反復することにより、細胞数をほとんど損なうことなく、恒常的に HSP72 蛋白質の高いレベルを保つことができることがわかった。そこで次に、低レベル温熱ストレスを 5 種類の異なった正常ヒト胎児由来細胞に施し、細胞の増殖能および細胞寿命の変化を検討した。細胞培養は 1 週間毎に行ない、1 週間を 1 継代期とした。まず各継代期における細胞増殖率を検討すると、非処理群に対し低レベルストレス処理群で増加していることがわかった。そこで各継代期における細胞増殖率より細胞集団倍加数 (PDN) を算出し、各継代期での PDN を足し併せることによって細胞老化に至るまでの総集団倍加数 (TPDN) を算出し比較した (図 9)。その結果、未処理群においてはいずれの細胞でも TPDL50-70 において増殖能が減少し、細胞形態も巨大細胞が出現するなど細胞老化に特長的な状態を示した。これに対し微量温熱ストレス反復処理群では、いずれの細胞系においても TPDL 値の増加が観察され、HE20、HE49、HE51 細胞においては未処理群に対し 10%以上もの増加が見られた (Wilcoxon の順位検定; \*\*:  $p < 0.001$ )。また、それ以外の 2 細胞でも未処理群に対する増加は有意で ( $p < 0.01$ )、低レベル温熱ストレスの反復が、本来それぞれの細胞に固有であるはずの寿命が延長することが明らかになった。

#### 【微量温熱ストレスの細胞分化に及ぼす影響】

温熱ストレスの細胞分化に及ぼす影響は、筋芽細胞の筋管への分化を指標に検討した。筋芽細胞は通常の 10%血清入りの培養液の中では活発に増殖するが、5%血清を含む DM 培地中では増殖率が低下し、やがて細胞同士が融合し、多核の筋管を形成する (図 10)。我々は、同じ筋芽細胞由来のクローンで染色体異常により分化能を消失した細胞 (Av21) を用い、分化能 (+) 細胞と分化能 (-) 細胞に対する温熱ストレスの影響を比較した。分化能 (-) 細胞では DM 培地中でも多核化は全く観察されない。このような筋管細胞への分化は mass-culture を用いて観察されるが、分化頻度を算出するために、コロニー形成法の導入を検討した。分化能を示すコロニーは DM 培地中で培養することによって、コロニー内にギムザ染色液で濃染される巨大な筋肉繊維 (Myotube, MT) が出現する。このような MT は通常の 10%FBS 含有培地中での培養では全く出現せず、また、DM 培地中でも必ずしも全ての細胞が MT を形成しなかった。温熱ストレスの細胞分化への影響は、43 2 時間の条件で細胞を処理後、コロニー形成法で検討した。温熱ストレスは約半数の細胞に致死的に作用する量を選んだ。7 日間の DM 培地中での培養後ギムザ染色液で染色すると、分化能 (+) である Av22 細胞では、約 17%であった MT (+) コロニーの出現頻度が 43%近くに上昇し、温熱ストレスを加えることによって分化能が上昇した (表 1)。さらに、通常分化能を示さない Av21 細胞でも、温熱ストレスを加えることによって約 6%近くのコロニーが MT 形成能を示すことがわかった。以上の結果より、温熱ストレスが細胞の持つ分化能を促進することが示された。

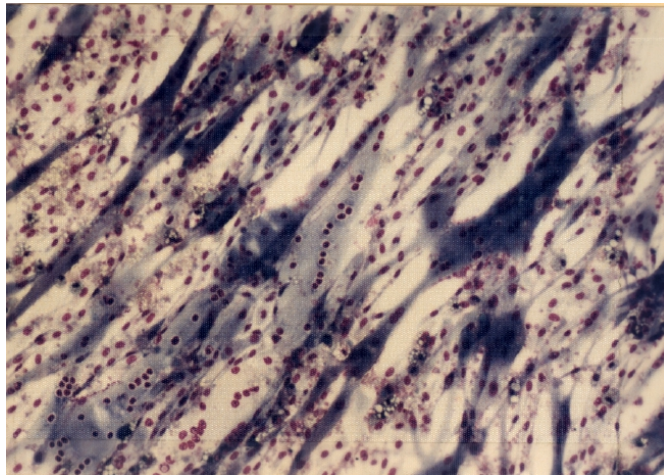


図 10 多核筋管細胞の形成

表 1 温熱ストレスによる筋芽細胞の分化誘導

Cells	S.F. <sup>a</sup>	% MT-positive colonies <sup>b</sup>
Av21		
Control	1.0	0.0
HS	0.53	5.7
Av22		
Control	1.0	16.9
HS	0.39	42.2

<sup>a</sup>Surviving fraction.

<sup>b</sup>Percentage of colonies containing myotubes.

低レベル微弱温熱ストレスの分化能に及ぼす影響は、処理細胞を長期間に渡り維持することによって検討した。3x10<sup>5</sup> 個の細胞を T25 型フラスコに植え、3日後に 0.5 時間、1.0 時間あるいは 2.0 時間の温熱ストレスを加え、翌日 DM 培地に交換した。いずれのフラスコでも 1 週間後には多核筋管細胞の形成が確認されたが、0.5 時間あるいは 1.0 時間処理群では、2.0 時間処理群に比べてより巨大な多核筋管細胞の出現が確認されたため、そのまま培養を継続した。5日から7日毎に DM 培地で培地交換を繰り返し1ヶ月以上培養した結果、微弱温熱ストレス負荷群において多核筋管細胞の一部領域で周期的拍動が確認された。同一のフラスコの中で、確認されただけでも 10 個以上の筋管細胞が拍動をしていた。そこで、Av 細胞を 5%あるいは 0%FBS を含む DM 培地中で培養し、1週間後に細胞全蛋白質を抽出して



HSP72 蛋白質の発現を調べた。その結果、分化能 (+) の Av22 細胞では、DM 培地中で HSP72 蛋白質の発現が確認された。一方、分化能 (-) 細胞の Av21 でも HSP72 蛋白質の発現が認められたが、Av22 細胞の 10 分の 1 以下と、その発現量はわずかであった。両細胞において温熱ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導を比較したが、その発現量には全く違いはなかった。

### 9-5. 植物細胞における HSP72 様蛋白質の同定とその機能

植物細胞にもヒト細胞における HSP72 相同蛋白質が存在するかどうかを、ヒト HSP72 蛋白質を認識する様々な抗体を用いたウェスタンブロット法により

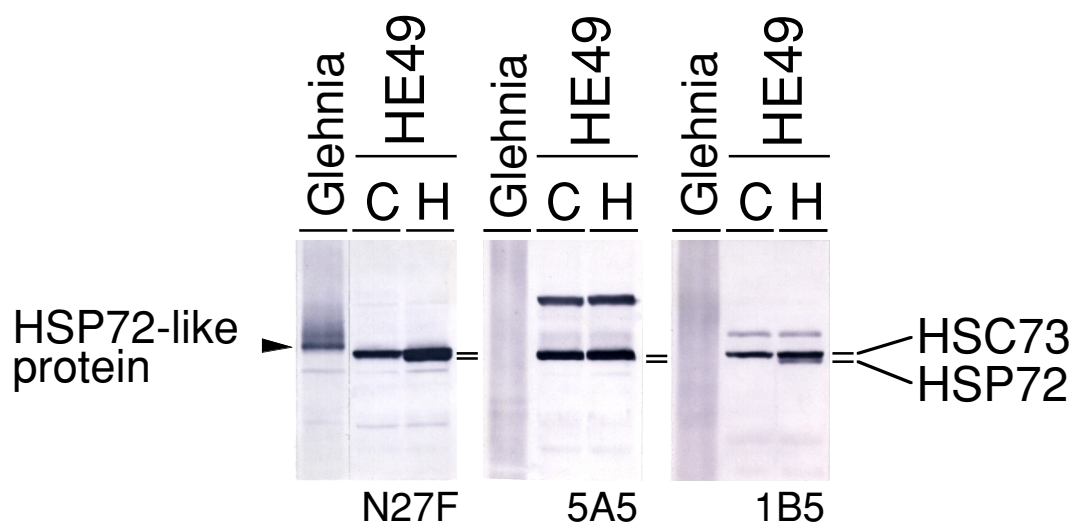


図 11 ハマボウフウ (*Glehnia littoralis*) 培養細胞における HSP72 様蛋白質の同定

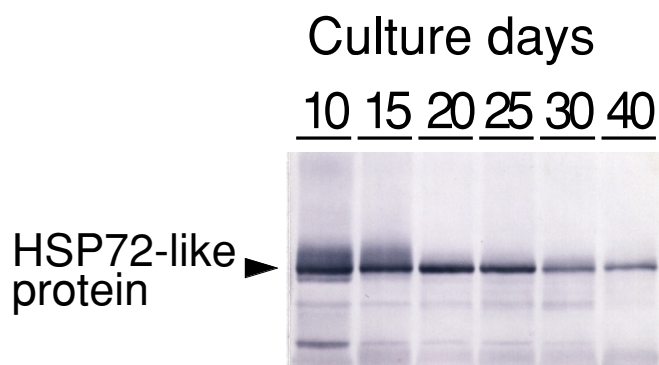


図 12 増殖に伴う HSP72 様蛋白質の減少

検討した。液体振盪培養したハマボウフウ (*Glehnia littoralis*) 細胞を用いたウェスタンブロット分析の結果を図 11 に示したが、数種類の抗体のうち抗 HSP72/HSP70 抗体であるクローン N27F を用いると HSP72 様蛋白質として濃いバンドと薄いバンドの 2 本が共に検出された。そこで次にこの抗体を用いて HSP72 様蛋白質合成量の相対的变化を細胞増殖あるいはアントシアニン合成量と比較検討したところ、HSP72 様蛋白質の相対量は培養開始後徐々に減少し、40 日目では培養 10 日目で見られた合成量の約 5 分の 1 にまで減少していた (図 12)。さらに HSP72 様蛋白質の 2 本のバンドのうち高分子側のものが、増殖が停止し始める培養開始 20 日目で消失しているのが明らかになった。細胞の増殖に対応する湿重量は培養開始 10 日後ぐらいから急激に立ち上がり 20 日目でピークを迎えた後減少し、アントシアニ

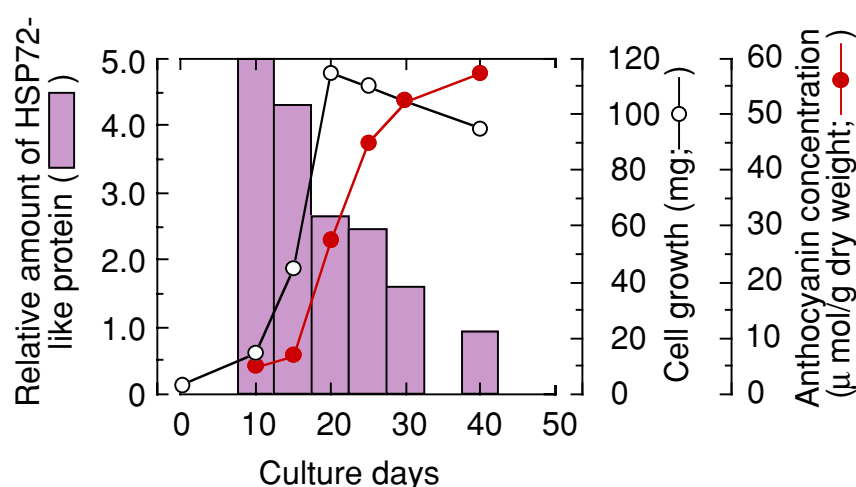


図 13 ハマボウフウ細胞の増殖に伴う HSP72 様蛋白質の発現とアントシアニン合成量との比較

ン量は増殖が停止する直前の 17 日目ぐらいから増加し始め、培養開始後 30 日目でほぼ最大値に達してその後はほぼ一定の値を維持した (図 13)。この様に、アントシアニン量の変化と HSP72 様蛋白質の合成量変化は鏡像関係にあり、アントシアニンの増殖低下に伴う合成量増加と HSP72 様蛋白質産生量との間には、完全な逆比例関係が存在することが明らかになった。そこでさらに、アントシアニンを合成していない白色のハマボウフウにおける HSP72 様蛋白質の発現をアントシアニン陽性のものと比較した (図 14)。その結果、アントシアニンを合成しているハマボウフウでは HSP72 様蛋白質の発現が減少しているのと同時に、高分子側のバンドが完全に消失していた (図 15)。



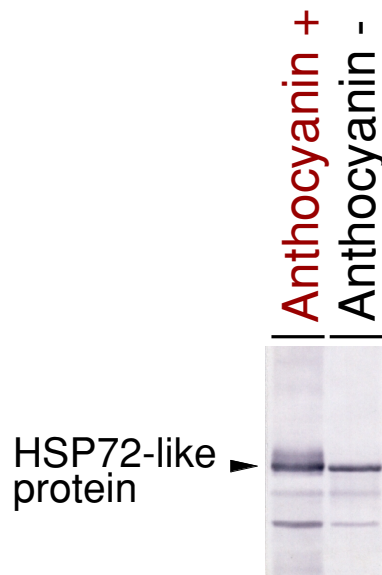


図 15 HSP72 様蛋白質の発現

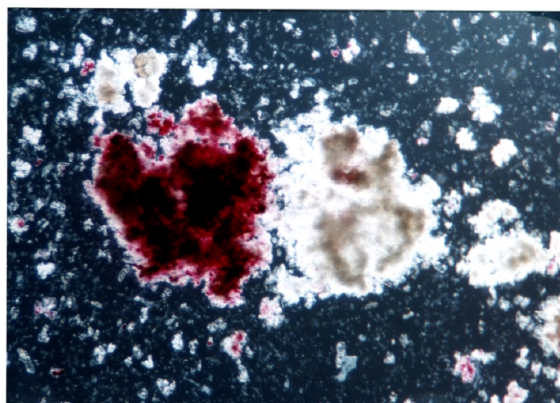


図 14 ハマボウフウ培養カルス

左側のカルスではアントシアニン  
が合成が観察できる。

## 10. 考察

### 10-1. ストレスによる HSP72 蛋白質発現制御メカニズム

正常ヒト胎児由来細胞を用いて、放射線、紫外線、および温熱ストレスが HSP72 蛋白質を誘導するかどうか検討した。その結果、温熱ストレスのみならず、紫外線ストレスによっても誘導されることが明らかになった(図 1)<sup>5)</sup>。さらに HSP72 蛋白質の誘導動態の比較から、異なったストレスに対して別々の転写制御メカニズムが働いているのではないかと考えられた。図 16 に示すように、ヒト HSP72 遺伝子プロモーターには CAAT や TATA などの

基本プロモーターの他に SRE、HSE、CRE、AP2、GCbox などの転写調節因子の結合配列が存在する。温熱ストレスは HSE の活性化を介して HSP72 蛋白質を誘導するが、HSE の活性化を抑制する植物フラボノイド（ケルセチン）は紫外線による HSP72 蛋白質の誘導を抑制しなかった。最近、紫外線による遺伝子発現誘導に關与する領域、UV responsive element（URE）が同定された。URE は HSP72 遺伝子プロモーター上の CRE に類似の配列を有することから、紫外線による HSP72 蛋白質の誘導には CRE が關与しているのではないかと予想される。転写調節因子は多くの場合リン酸化によってその機能が制御されている。本研究の結果明らかになったように、異なったストレスに対しては別々の転写因子が作動していることから、異なったストレスは異なったシステムによって受容され、別々の情報伝達経路によりその情報が伝達され、遺伝子上流のプロモーターに結合する異なった転写因子のリン酸化によってその情報が集約され、最終的に同一のストレス応答因子の発現誘導が総合的に制御されるのではないかと考えられる。

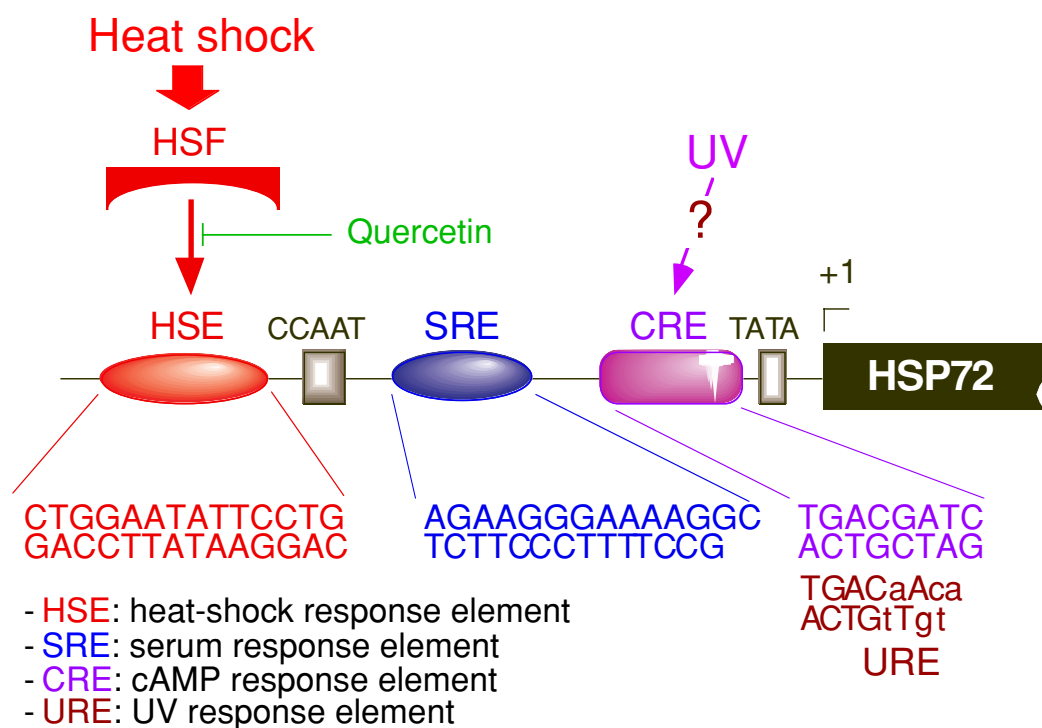


図 16 ヒト HSP72 遺伝子プロモーター領域の構造

ファイブロネクチンに代表される細胞外基質が、細胞の基質への接着に重要な役割を果たしていることはよく知られているが、多くの癌細胞でファイブロネクチンが消失あるいは減少していることから、細胞接着が細胞の増殖制御に直接關与していることが示唆されている<sup>6)</sup>。近年、細胞膜を貫通するファイブロネクチンリセプターの細胞内側に介在する蛋白質として Focal Adhesion Kinase（FAK）が同定されたが、FAK の持つリン酸化活性がファイブロネクチンとそのリセプターとの相互作用によって制御されていることから、細胞外の情報が FAK を介して細胞内に伝達され細胞増殖制御が行われていることが考えられた。最近、

FAK からの情報伝達が細胞のアポトーシスをも制御しているという報告が相次いでなされ<sup>7)</sup>、細胞膜を介した情報伝達経路の重要性が改めて認識されている。

この様なことから、細胞接着は細胞のストレスに対する応答性にもなんらかの影響を及ぼすと考えられ実験を行った結果、図3に示したように細胞接着の低減が温熱ストレス応答を減弱することが明らかになった。さらに我々は、細胞接着が HSP72 蛋白質の細胞内局在性の変化にも影響を及ぼすことを最近見いだした<sup>8)</sup>。過度の温熱ストレスは細胞に致命的な障害をもたらすが、致死効果を正常ヒト細胞とヒト癌細胞とで比較すると、細胞同士が密に接触していない対数増殖期において、正常細胞の温熱処理に対する感受性はがん細胞の感受性とほぼ同じであるのに対し、高密度接触状態では感受性に有意な差が見られた。即ち、細胞接触状態の正常細胞において、温熱処理に対し抵抗性の獲得が観察された。HSP72 蛋白質の誘導が温熱抵抗性の獲得に重要な役割を果たすことから、HSP72 蛋白質の誘導を検討した結果、正常細胞で 10 倍以上の誘導が確認されたのに対し、がん細胞では多くの細胞で定常状態で既に多量の発現が見られ、温熱処理による最終的な誘導絶対量は正常細胞における誘導量に匹敵することが明らかになり、ストレス蛋白質の発現量のみでは正常細胞における温熱抵抗性獲得は説明不可能であった。HSP72 蛋白質は、温熱処理後細胞質から細胞核内に移動し機能するが、正常細胞での移行は高密度接触状態に対数増殖期に比べより効率的に行われていることが明らかになった。ところが、がん細胞ではこのような効率的な移行が高密度接触状態でも観察されなかった。HSP72 蛋白質の核移行メカニズムは未だ不明であるが、高密度接触状態ではファイブロネクチンメッシュワークが極めて高度に発達していることから、低密度状態の細胞よりも多量の情報が細胞膜リセプターから伝達され HSP72 蛋白質の核移行が促進されたのではないだろうか。

## 10-2. ストレス応答における HSP72 蛋白質の機能

HSP72 蛋白質は核移行シグナルを有し、様々なストレスが細胞に及んだあとその一部は細胞質から核へと移行してその機能を果たす。そこで、核内での機能を明らかにする目的でストレス後の核内での存在形態を調べた。その結果、温熱ストレスと紫外線ストレスの後でその存在形態が明らかに異なることがわかった。温熱ストレス後は核内に均一に分布しその一部は核小体に局在化するのに対し、紫外線ストレス後は核内に微細な斑点を形成した(図4)。このような存在形態の違いは、HSP72 蛋白質の機能がストレスの種類によって異なることを予想させた。既に熱ストレス後誘導された HSP72 蛋白質は、熱により変成した蛋白質に結合してその高次構造の回復に関与することが明らかにされているが、紫外線照射後の存在形態は細胞核内の極めて限られた場所でそれとは別の機能を果たしているのではないかと考えた。検討の結果、HSP72 蛋白質の誘導動態が紫外線照射後の DNA 合成の回復と関連すること、HSP72 蛋白質が細胞周期制御に関わる p53 蛋白質と相互作用すること、HSP72 蛋白質が DNA と相互作用することから(図5)、HSP72 蛋白質は紫外線ストレス応答における DNA 合成制御の解除に関わっているのではないかと考えられた<sup>5)</sup>。

そこで、HSP72 蛋白質を人為的に高発現させ、紫外線ストレスに対する細胞の応答がどう変化するかを調べた。その結果、HSP72 蛋白質の発現は紫外線の致死作用には顕著な効果を

示さなかったのに対し、紫外線による HPRT 遺伝子座の突然変異生成には促進的な効果を示し、HSP72 蛋白質の発現により紫外線による突然変異生成頻度が 2 倍以上上昇した<sup>9)</sup>。その理由に関しては、HSP72 蛋白質と p53 蛋白質とが相互作用することから以下のように解釈している。即ち、生理的条件下では、細胞周期の G1/S 境界で p53 蛋白質が一時的に増加し、DNA 合成期への細胞周期の進行を制御している。その後、HSP72 蛋白質の増加と共に p53 機能が消失し細胞周期は進行していくのであるが、HSP72 蛋白質が過剰に存在すると p53 の細胞周期抑制機能に異常が生じ、細胞周期が強制的に進行することによって DNA 損傷が十分に修復されないうちに細胞周期が進行して結果として突然変異が増加する。事実、後述するように紫外線照射後 p53 蛋白質が誘導されて細胞周期が一時停止する。p53 機能がいつまでも作用していると細胞は再び増殖することができないため、なんらかの方法で p53 機能を無効にする機構があると考えられる。その候補として p53 蛋白質と相互作用する HSP72 蛋白質を考えてもいいのではないだろうか。

このように HSP72 蛋白質の機能はストレス応答時のみならず細胞の増殖とも密接に関連していることが予想されるが、事実 HSP72 蛋白質の人為的高発現は細胞の増殖を有意に高めた<sup>9)</sup>。後述するように、この結果はストレス応答のメカニズムが実は細胞本来の生理活性とも密接に関連することを意味する。言い方を変えれば、ストレス応答に関わる因子は生命の存在にとっても極めて重要な機能を有している言うことができる。増殖に関する多くの遺伝子には数多くの突然変異が報告されているが、HSP72 蛋白質遺伝子にはそのような報告が全くないのは、HSP72 蛋白質機能が生命の存在に必須な役割を担っていることの現れではないだろうか。

以上の結果より、様々なストレスによって異なったメカニズムで誘導される HSP72 蛋白質は、そのストレスに応じて異なった細胞内局在性を示し、異なった場所でその機能を発現する(図 17)。温熱ストレスの場合は熱による変性蛋白質との会合により変性蛋白質の機能を回復させる一方で、紫外線ストレスの場合には抑制された DNA 合成を再び開始させるためにその機能を発現する。HSP72 蛋白質には ATP 分解活性以外に明らかな機能ドメインはないことから HSP72 蛋白質の機能発現は HSP72 蛋白質に会合する蛋白質の機能に依存すると考えられる。したがって、HSP72 蛋白質がストレスに応じて異なった機能を発現することは、各ストレスに対応して異なったパートナーと会合することを示唆し、その 1 つのパートナーが癌抑制蛋白質 p53 であることが明らかになった。また、ストレス応答メカニズムは生命の存在そのものにも関わる極めて普遍的なものであることが示唆された。

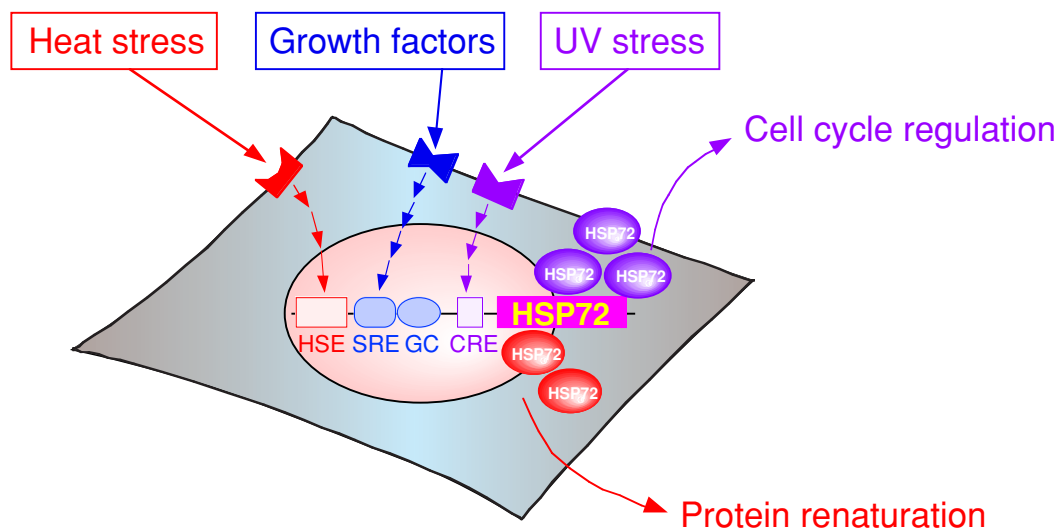


図 17 各種ストレスによって誘導された HSP72 蛋白質の機能

### 10-3.細胞老化とストレス応答性の変化

ストレスに対応して様々な機能を発現する HSP72 蛋白質は、細胞の増殖とりわけ DNA 合成の制御に重要な役割を果たしていることが示された<sup>9)</sup>。さらに、HSP72 蛋白質の産生量は細胞周期が S 期に入る前に急激に誘導されることから、HSP72 蛋白質の誘導と細胞の加齢との間に負の相関関係があるのではないかと予想した。そこで、正常ヒト胎児由来細胞の老化に伴う HSP72 蛋白質の誘導について検討したところ、図 6 に示すように細胞の加齢とともに温熱ストレスによる誘導が顕著に減少した。老化細胞は細胞の増殖能が低減すると同時に DNA 合成能も減少することが知られているが、HSP72 蛋白質が DNA 合成期の前に誘導される必要があることを考えると、ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導能を減少させるのと同じメカニズムが DNA 合成能の低減にも関与しているのではないかと考え、*hsp72* 遺伝子領域のメチル化の状態を調べた。図 7 に示すように CCGG 配列を認識する 2 種類の制限酵素を用いると、passage 5 の細胞で両者に違いが認められ、若い細胞でも *hsp72* 遺伝子領域はある程度メチル化されていることが明らかになった。次に、メチル化の影響を受ける *Msp* I について結果を比較したところ、加齢とともに出現するバンドが高分子側に移行した。これは、制限酵素が切断する部位が減少したことを示すことから、細胞老化とともに *hsp72* 遺伝子領域のメチル化が亢進されたことが明らかになった。最近、遺伝子領域のメチル化は、メチル化シトシン認識蛋白質の結合に伴うヘテロクロマチン化の最初の引き金になることが明らかになってきた。したがって、加齢に伴う *hsp72* 遺伝子領域のメチル化は、この領域のヘテロクロマチン化を引き起こし、結果として温熱ストレスや DNA 合成期直前の *hsp72* 遺伝子転写の活性化を減退させることにつながったと考えられる。

HSP72 蛋白質誘導能の減少がなぜ細胞老化と関連するかについてはまだ十分に理解されていないが、既に述べたように 1 つの可能性は HSP72 蛋白質の DNA 合成における機能が減少することであろうと思われる。しかしながら、もう 1 つの可能性として HSP72 蛋白質の蛋白

質変性保護の機能にも注目している。細胞は生理的条件下でも多くの外的・内的ストレスに囲まれており、例えば自らのエネルギー産生に伴う酸化ストレスなどはその代表であるといえる。この様な酸化ストレスは細胞膜や DNA に障害を及ぼすだけでなく、細胞内の蛋白質の酸化をも引き起こす。この様な酸化ストレスによる変性蛋白質の修復にも HSP72 蛋白質は分子シャペロンとして機能していると考えられ、したがって *hsp72* 遺伝子のメチル化に伴うストレス応答能の低下は酸化ストレスに伴う変性蛋白質の蓄積につながっていると考えられることもできる。細胞老化において増殖能の低下と変異の蓄積のどちらが優位に働くかに関しては議論が分かれるところではあるが、いずれの場合にも HSP72 蛋白質は重要な役割を担っていることには変りはなく、細胞分裂に伴うストレス応答能の減退はおそらく加齢の原因の 1 つとして細胞老化に深く関わっていると断言しても過言ではないだろう。

#### 10-4. 低レベルストレスによる細胞寿命および細胞分化への影響

我々生命は多変する環境の中で存在している。したがって、その生命活動は環境からのストレスの影響を多分に受けていると考えられる。さらに言えば、生命の運命そのものも環境との相互作用の中で決定されている可能性がある。そこで、細胞の最も基本的な過程である老化および分化に対して、低レベルストレスがなんらかの影響を及ぼしうるものであるかどうか調べた。

まず、細胞がどの程度のレベルのストレスまで感知できるかを明らかにするため、微量温熱ストレスを細胞に作用させ HSP72 蛋白質の誘導があるか否か検討した。その結果、図 8 に示したようにわずか 15 分の処理でも HSP72 蛋白質のレベルは 5 倍以上に上昇し、その量は処理時間に比例して大きくなっていった。また、10 分あるいは 5 分間の温熱ストレスによっても、そのレベルは有意に上昇することを確認した。このように細胞は、ほんのわずかな量の温熱ストレスでも鋭敏に感知し反応し応答していることが明らかになった。このことは、一見わずかと思われるような量の温熱ストレスでも、細胞にとっては反応するに十分な環境変化であることを示している。我々は、例えば入浴など、同程度の温度変化は日常的に経験している。そこで、このような微弱な温熱ストレスの反復が、細胞の持つ固有の寿命にどのような影響を与えるか検討した。正常ヒト胎児由来細胞は指数関数的に分裂し増殖していくが、総集団倍加数 (TPDL) にして 60~70 において急速に増殖能が減少し細胞分裂が停止する。この時期、細胞形態は扁平になり場合によっては細胞質が増殖時の 10 倍以上に広がる。これら諸形質は老化に典型的な特徴で、細胞内では老化プログラムが発動していることを示す。この様な細胞に微弱温熱ストレスを加え続けるとその寿命が有意に延長することが確認された (図 10)。通常培養細胞は、37℃ に保たれた CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養されるため、温度変化にさほどさらされない状態で維持されている。従って、温熱ストレスがない条件下では細胞の寿命がむしろ短縮すると解釈したほうがいいのかも知れない。いずれにせよこれらの結果は、生命がその置かれている環境といかにに相互作用しながら生存しているかということを如実に物語るものであるといえよう。

微弱な温熱ストレスが反復されることによる寿命延長のメカニズムには、いくつかの可能性が考えられる。その 1 つは温熱ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導である。既に報告した



ように、HSP72 蛋白質の過剰発現は細胞の増殖を促進する。もう1つは、常に HSP72 蛋白質が発現されているため反復されるストレスに対し耐性を獲得し、このことが細胞分裂数の増加につながったという可能性である。後者については、Lithgow らの線虫 (*C. elegance*) を用いた実験により、その可能性が具体的に証明されている (10)。線虫にはその平均寿命が 1.5 倍に延びる Age-1 という突然変異体が報告されている。彼らはこの Age-1 変異が平均寿命の延長だけでなく、温熱ストレスに対する抵抗性をも付与することを見出した。すなわち、様々な環境ストレスに対する応答性が線虫の寿命に影響を与えていたのである。現存する生命では、調べられた限りの生物種の全てにおいて温熱ストレス応答メカニズムの存在が確認されていることから、温熱ストレスは環境ストレスの1つとして多くの生命に働き掛け、種の保存あるいは種の進化に多大な影響を与えてきたといえよう (下図参照)。

多細胞生物は、その特徴として細胞分化プロセスを介した組織構築を行なう。既に述べたように、環境ストレスとの相互作用によって生命の存在が運命付けられているとするのであれば、この細胞分化プロセスもストレスとの相互作用によってなんらかの変化を受けるはずである。我々の実験結果は、このことが実際に起こりうることを示している。表1に示したように、温熱ストレスを加えることによって細胞の持つ分化能が有意に促進されたのである。本実験では本来生体内で筋肉に分化する筋芽細胞 (Myoblasts) を用いたが、紫外線照射により分化能を消失した細胞を単離した。温熱ストレスは分化能を持つ筋芽細胞の分化を顕著に増加させたが、興味あることに、分化能 (-) の Av21 細胞でも約 6% の細胞で分化が認められた。温熱ストレスがなぜ細胞の分化プロセスを亢進したかについては、この分化能が異なる両細胞の比較から予想された。Av21 細胞と Av22 細胞の違いは、Av21 細胞が第7番染色体にトリソミーを持つ点で、この染色体異常が Av21 細胞での *c-myc* 遺伝子の発現低下の原因になっていることが予想されている (11)。*c-myc* 遺伝子は造血系細胞の分化に重要な役割を果たす遺伝子で、その遺伝子産物は多くの分化関連遺伝子の発現を制御していると考えられている。HSP70 遺伝子も実は *c-myc* 遺伝子によってその発現が制御されている遺伝子の1つで、*c-myc* 遺伝子の過剰発現が HSP70 遺伝子の発現増加を引き起こすことが示されている (12)。分化能 (+) の Av22 細胞では *c-myc* 遺伝子発現量が亢進していること、*c-myc* 遺伝子の発現増加は HSP70 遺伝子の発現を誘導すること、温熱ストレスは HSP72 蛋白質を誘導すること、を考え合わせると、HSP72 蛋白質はそれ自身細胞の分化に重要な役割を果たしていることが予想され、これこそが温熱ストレスによる細胞分化促進の分子メカニズムではないかと思われる。事実、正常ヒト細胞と異なり齧歯類細胞では普段発現が見られない HSP72 蛋白質が、分化誘導培地中で誘導されることを発見し、温熱ストレスによって誘導された HSP72 蛋白質が細胞分化に関与しているのではないかと考えている (下図参照)。

さらに興味深い事実が判明した。それは、温熱ストレスを加えた細胞を長期間維持すると、多核筋管細胞のなかに拍動する細胞が出現したことである。これまでも細切した心臓組織がそれぞれ拍動するなどの結果はよく見受けられるが、今回のように生体から切り離され無限増殖能を獲得し培養された細胞が、長期間の培養の後分化し拍動という本来生体内でのみ発現するはずの機能が復帰したという事実は今回が初めてである。この結果は、温熱ストレ



すが単に HSP72 蛋白質の誘導を介して細胞の分化能を増強しただけでなく、細胞の本来持つ潜在的な能力をも顕在化させる効果を有していることを示すものとして注目される。



.....  
.....  
..... ( *Glehnia littoralis* ) 細胞において、細胞増殖性とアントシアニン合成量が反比例するを見だしていたが、アントシアニンに代表される植物フラボノイドの 1 種ケルセチンはヒト細胞において増殖を抑制する効果があること、熱ストレスによる HSP72 蛋白質の誘導がケルセチンによって特異的に抑制されること、HSP72 蛋白質は細胞の増殖維持に必須の蛋白質であることから、植物細胞で誘導されるアントシアニン合成が、HSP72 様蛋白質合成の抑制を介して植物細胞の増殖を負にコントロールしているのではないかと考えた。その結果、図 13 に示したように、HSP72 様蛋白質の減少とハマボウフウ細胞の増殖抑制との間に密接な負の相関性が存在することがわかった。さらに、HSP72 様蛋白質の発現抑制が植物フラボノイドであるアントシアニンの合成によって引き起こされている可能性が示された。アントシアニンは植物フラボノイドとして、細胞内のセリン・スレオニンキナーゼ活性に対し抑制的に働くことが予想される。図 12 に示したように、ハマボウフウ細胞中に存在する HSP72 様蛋白質には高分子側にスメアー状に存在するバンドが確認される。これはこれまでの多くの実験結果からリン酸化された蛋白質であろうと思われる。アントシアニンが合成されるとこの高分子側のバンドが消失することや、図 15 に示したようにアントシアニン発現細胞では高分子側のバンドが全く確認されないことを考えると、アントシアニンが HSP72 様蛋白質の発現をいずれかのキナーゼ活性を抑制することにより制御している可能性は非常に高い。9-1 で報告したように、植物フラボノイドであるケルセチンが、ヒト細胞において熱により活性化されるセリン・スレオニンキナーゼ活性を阻害することがわかっている。

以上の結果より、動物細胞と植物細胞で同じストレス応答蛋白質が細胞増殖に関与していることがあきらかにされた。この結果はストレス応答メカニズムが種を越えて生命の存在に極めて重要な役割を果たしていることを示した点で、非常に興味深い知見であるといえよう。

## 11. 今後の展開

本研究によって、ストレス応答分子の1つである HSP72 蛋白質が単一のストレスに対する応答を担っているだけでなく、より普遍的に細胞の増殖や分化あるいは老化を規定する因子としても機能している可能性が示された。したがって HSP72 蛋白質に限らず、ストレス応答により誘導される多くのストレス応答因子は、普段は細胞の生存・維持に重要かつ基本的な役割を果たしているが、それが緊急時には本来とは別の形で動員されその機能が応用されることが明らかになった。このようなストレス応答反応は激変する環境から生体を保護するよう進化し、そのストレスが大きく致死的である場合には細胞内のダメージを積極的に排除したりあるいはそのための時間的猶予を与えるように機能し、一方、そのストレスが小さい場合には環境からの刺激を利用しその環境における生存が有利になるよう個体数の増加を招来するよう機能していることが示唆された。さらに、このようなストレス応答反応を担う蛋白質因子は動物・植物細胞を問わず共通して存在することが明らかになり、ストレス応答反応が現存する生命に共通した極めて基本的機能であることが推察された。

現在我々を取り巻く環境の変化はかつてほど苛酷ではない。このようなことから環境ストレスの生命に対する働きかけも、生物進化が活発であった以前と比べると激減していると思われる。おそらく、これまでの環境ストレスは生命の機能進化に深く関与してきたと考えられ、現在もその機能は潜在的には保有しているのであろう。このような意味から生命が新たなストレスと対峙したときには、これまで予想されなかったような新たな応答を示すことが充分考えられ、現存する生命の新たな可能性の発掘につながるものと期待される。

今後、これまでの研究で得られた結果をもとに、我々生命の持つ潜在能力を新たに引き出すことができるかどうか模索するため、以下にあげる3項目について明らかにしていきたい。

### 1) ストレス受容および応答に関与する情報伝達経路の解明

我々は生命は様々な環境ストレスに囲まれて生命活動を行っている。本研究でも明らかのように、各ストレスに対しては別々の情報伝達経路が作用している。このことは、異なったストレスに対しては異なった受容メカニズムが存在することを意味する。細胞には、細胞膜、細胞質、核と少なくとも3つの異なったストレス受容領域がある。したがって、まずストレスがどのように受容されるか明らかするため、各種ストレスを感知するのが細胞膜なのか細胞質なのか、あるいは核で行われるのかを解明したい。さらに、これら細胞内の異なった領域でのストレス受容が最終的にどのようにして同一の遺伝子発現を引き起こすのか、HSP72 遺伝子上流のプロモーターへの情報伝達経路についても明らかにしたい。

### 2) 低レベルストレスに対する細胞応答の解析

本研究で明らかになったように、低レベル温熱ストレスは細胞の寿命を延長させ、さらに細胞分化を劇的に促進した。これら結果は、我々生命の存在そのものが環境ストレスとの相互作用により育まれていることを如実に表している。したがって、環境からの刺激をほんの少しでも増すことによって我々生命の持つ能力が飛躍的に高まることも十分に理解できる。温熱ストレスに限らず多くの物理的ストレスは細胞に作用することによってエネルギーを付与する。今後は、異なった物理形をもつエネルギー、紫外線あるいは電離放射線など、が低レベルストレスとして生命に作用したときに温熱ストレスの場合と同じような生命活動の亢

進が見られるのかどうか明らかにしたい。

### 3) ストレス応答の個人差の分子レベルでの解明

我々は、例えば海水浴の後で赤くなる人もいれば黒くなる人もいるというように、ストレスに対する反応に個人差があることを経験的に知っている。本研究でも、温熱に応答するプロモーターを単離し、その下流に挿入したマーカー遺伝子の発現を指標に細胞ごとにプロモーターの反応性が異なるかどうか検討したところ、同じように温熱ストレスに曝されているのも関わらず、反応する細胞をあれば全く反応性を示さない細胞など様々に存在することを見いだした。この様な反応性の差は細胞周期の違いや細胞増殖状態の違いを反映しているのではないかと予想されたが、増殖静止状態の細胞でも全く同じような反応性のバラツキが観察されたことから、より本質的なメカニズムが存在しているのではないかと考えた。この様なことから、なぜ細胞レベルでストレスに対する応答性に差が出るのかを明らかにし、さらにその結果を元にストレス応答の個人差がなぜでるのかそのメカニズムを分子レベルで解明したい。

21世紀に入り我々を取り巻く環境はますますストレスフル (stressful) なものになることは確実である。この様な時代の中でいかにストレスとうまく折り合って生活していくかという問題は我々に突き付けられた極めて切実な問題である。しかしながら、本研究でも明らかになったように、環境変化は本来積極的な意味での刺激として我々に作用し、そして我々生命を育ててきたことは間違いない。したがって、我々はストレスの本質をより科学的に解明することによって、健やかに生活し老いていくための基礎技術を手にしなければならない。このような意味で、ストレス科学は今後ますます成熟させるべき領域であり、そこでは生物学者に留まらず社会系や人文系をはじめ多くの学問領域の研究者が集い学際的な研究を推し進める必要があると切に感じる。今後本研究の結果が、そのような新しい社会生活技術の開発に貢献できることを期待している。

## 12. 参考文献

1. C. Prives: Signaling to p53: Breaking the MDM2-p53 circuit, *Cell*, 95, 5-8 (1998)
2. C. C. Harris: p53 tumor suppressor gene: from the basic research laboratory to the clinic-an abridged historical perspective, *Carcinogenesis*, 17, 1187-1198 (1996)
3. A. J. Levine: p53, the cellular gatekeeper for growth and division, *Cell*, 88, 323-331 (1997)
4. R. I. Morimoto: Heat shock, the role of transient inducible responses in cell damage, transformation, and differentiation, *Cancer Cell*, 3, 295-301 (1991)
5. K. Suzuki and M. Watanabe: Augmented expression of HSP72 protein in normal human fibroblasts irradiated with ultraviolet light, *Riochem. Biophys. Res. Commun.*, 185, 1257-1264 (1992)
6. K. Suzuki and M. Watanabe: Multistep changes of cytoskeletal organization and extracellular matrix during the process of neoplastic transformation in Syrian/Golden hamster embryo cells, *Tissue Cell Res. Commun.*, 9, 17-24 (1991)

7. T. Igishi, S. Fukuhara, V. Patel, B. Z. Katz, K. M. Yamada and J. S. Gutkind: Divergent signaling pathways link focal adhesion kinase to mitogen-activated protein kinase cascades. Evidence for a role of paxillin in c-jun nh(2)-terminal kinase activation. *J. Biol. Chem.*, 274, 30738-30746 (1999).
8. M. Watanabe, K. Suzuki, S. Kodama and T. Sugahara: Normal human cells at confluence get heat resistance by efficient accumulation of HSP72 in nucleus, *Carcinogenesis*, 16, 2373-2380 (1995)
9. K. Suzuki and M. Watanabe: Modulation of cell growth and mutation induction by introduction of the expression vector of human hsp70 gene, *Exp. Cell Res.*, 215, 75-81 (1994)
10. G. J. Lithgow, T. M. White, S. Melow and T. E. Johnson: Thermotolerance and extended life-span conferred by single-gene mutation and induced by thermal stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 7540-7544 (1995)
11. K. Suzuki, F. Suzuki, O. Nikaido and M. Watanabe: Suppression of differentiation phenotypes in myogenic cells: association of aneuploidy and altered regulation of c-myc gene expression. *Exp. Cell Res.*, 195, 416-422 (1991)
12. R. E. Kinston, A. S. Baldwin Jr and P. A. Sharp: Regulation of heat shock protein 70 gene expression by c-myc. *Nature*, 312, 280-282 (1984)

### 13 . 研究業績

#### 13-1. 原著論文

1. M. Watanabe, K. Suzuki, S. Kodama and T. Sugahara: Normal human cells at confluence get heat resistance by efficient accumulation of HSP72 in nucleus, *Carcinogenesis*, 16, 2373-2380 (1995)
2. T. K. Hei, Z. Y. He and K. Suzuki: Effect of antioxidant on fiber mutagenesis, *Carcinogenesis*, 16, 1673-1678 (1995)
3. Tom K. Hei, C. Q. Piao, T. Sutter, J. C. Willey and K. Suzuki: Cellular and molecular alterations in human epithelial cells transformed by high LET radiation, *Adv. Space Res.*, 18, 137-148 (1996)
4. K. Suzuki and T. K. Hei: Mutation induction in  $\gamma$ -irradiated primary human bronchial epithelial cells and molecular analysis of the HPRT- mutants, *Mutation Res.*, 349, 33-41 (1996)
5. K. Suzuki and T. K. Hei: Induction of heme oxygenase in mammalian cells by mineral fibers: Distinct effects of reactive oxygen species, *Carcinogenesis*, 17, (1996)
6. K. Suzuki, Multistep nature of X-ray-induced neoplastic transformation in mammalian cells: genetic alterations and instability, *J. Radiat. Res.*, 38, 55-63 (1997)

### 13-2.総説など

1. 鈴木啓司, 細胞による放射線受容とシグナル伝達経路活性化の分子メカニズム, 放射線生物研究, 32, 31-45 (1997)
2. 鈴木啓司, 放射線応答とシグナル伝達系, 放射線科学, 40, 304-308 (1997)

### 13-3.国際学会発表

1. K. Suzuki, C. Q. Piao, J. C. Willey, and T. K. Hei, Identification of transforming sequence in human bronchial epithelial cells malignantly transformed by  $\alpha$ -particles. The 10th International Congress of Radiation Research, August 21-September 1, 1995, Würzburg, Germany.
2. M. Watanabe, K. Maeda, S. Kodama, and K. Suzuki, Suppression of p53 gene by transfection of anti-p53 DNA vector lead to increase in X-ray sensitivity of human cells. The 10th International Congress of Radiation Research, August 21-September 1, 1995, Würzburg, Germany
3. T. K. Hei, C. Q. Chang, T. Sutter, and K. Suzuki, Cellular and molecular alterations in human bronchial epithelial cells transformed by radon alpha particles. A Workshop on Neoplastic Transformation in Human Cell Systems in Culture: Mechanisms of Carcinogenesis, September 7-9, 1995, Chicago, USA.

### 13-4.国内学会発表

1. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：ヒト気管上皮細胞における  $\alpha$ 線誘発突然変移の分子生物学的解析、第 32 回放射線影響懇話会、平成 7 年 7 月 21 日、福岡。
2. 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：放射線で誘発される発がんに関する遺伝的不安定性、第 32 回放射線影響懇話会、平成 7 年 7 月 21 日、福岡。
3. 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司：アンチセンス遺伝子導入法と発現解析とその応用、日本放射線医学会第 34 回生物部会学術大会、平成 7 年 4 月 13 日-14 日、名古屋。
4. 野上良太、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己：癌形質発現に関連した熱ショックタンパク 72、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉。
5. 栢多慎吾、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：マウス m5S 細胞における遺伝的不安定性の誘導、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉。
6. 児玉靖司、橋本裕数、鈴木啓司、井上さとみ、石崎寛治、渡邊正己：発現誘導型ベクターを用いたヒト *gadd45* 遺伝子のヒト不死化細胞への導入、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉。
7. 渡邊正己、三宅美恵子、鈴木啓司、児玉靖司、鈴木雅雄、加瀬陽子、菅原努：低線量放射線で誘導される遺伝的不安定性、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉。
8. 森俊雄、橋本光正、二階堂修、田野恵三、鈴木啓司、渡邊正己：細胞周期進行の一時的抑制で生じる 4 倍体細胞は制がん剤耐性化とゲノム不安定性化の両方の傾向を示す、日

- 本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉.
9. 三宅美恵子、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己：放射線による染色体異常の誘発と その運命、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉.
  10. 小山真治、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己、松本拓郎、宮崎哲郎：L-アスコルビン酸の放射線防護効果、日本放射線影響学会第 38 回大会、平成 7 年 11 月 8 日-10 日、千葉.
  11. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己、正常ヒト細胞における p53 蛋白質発現と機能制御、日本癌学会第 55 回総会、平成 8 年 10 月 10 日-12 日、横浜.
  12. 渡邊正己、児玉靖司、鈴木啓司、放射線による突然変異と細胞がん化の原因となる常温で安定なラジカル、日本癌学会第 55 回総会、平成 8 年 10 月 10 日-12 日、横浜.
  13. 児玉靖司、橋本裕数、鈴木啓司、石崎寛治、渡邊正己、ヒト gadd45 遺伝子の機能解析、日本癌学会第 55 回総会、平成 8 年 10 月 10 日-12 日、横浜.
  14. 鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己、正常ヒト細胞における X 線による情報伝達系および p53 応答経路の活性化、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪.
  15. 菓子野元郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己、Werner 症候群由来細胞における突然変異の多重 PCR 法による解析、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪.
  16. 栢多信吾、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己、遺伝的不安定性に対する適応応答効果、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪.
  17. 児玉靖司、山口健太郎、鈴木啓司、石崎寛治、渡邊正己、Ataxia telangiectasia 細胞における導入 gadd45 遺伝子の機能解析、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪.
  18. 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己、温熱によるヒト細胞の致死過程における細胞球状化の意味、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪.
  19. 橋本光正、二階堂修、田野恵三、鈴木啓司、渡邊正己、森俊雄、細胞周期進行の一時的抑制で生じる多倍体細胞の制がん剤耐性化の機構解析、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪.
  20. 渡邊正己、小山真治、木村多賀子、児玉靖司、鈴木啓司、宮崎哲郎、突然変異と細胞がん化の原因となる長寿命有機ラジカル、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪.
  21. 楊 治、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己、ヒト胎児由来細胞の分裂寿命に対する低線量放射線の影響、日本放射線影響学会第 39 回大会、平成 8 年 11 月 18 日-20 日、大阪.
  22. 菓子野元郎、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己、Werner 症候群由来細胞における突然変異特性、第 13 回日本薬学会九州支部大会、平成 8 年 11 月 30 日-12 月 1 日、熊本.
  23. 中畑圭二、鈴木啓司、児玉靖司、渡邊正己、温熱刺激に対するヒト細胞の球状化と細胞死の関連、第 13 回日本薬学会九州支部大会、平成 8 年 11 月 30 日-12 月 1 日、熊本.
  24. 楊 治、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己、ヒト胎児由来細胞における低線量放射線の生物効果、第 13 回日本薬学会九州支部大会、平成 8 年 11 月 30 日-12 月 1 日、熊本.

25. 栢多信吾、児玉靖司、鈴木啓司、渡邊正己、低線量放射線の遺伝的不安定性への影響、第13回日本薬学会九州支部大会、平成8年11月30日-12月1日、熊本。

13-5. 新聞など  
なし

13-6. 特許  
なし

14.

- (1) Title: Molecular mechanism of stress response in mammalian cells (I): Identification of heat shock proteins and their functions in cell growth and differentiation.
- (2) Institute: Laboratory of Radiation and Life Science, School of Pharmaceutical Sciences, Nagasaki University (kzsuzuki@net.nagasaki-u.ac.jp).
- (3) Name: Keiji Suzuki
- (4) Collaborators: Seiji Kodama and Masami Watanabe (Nagasaki University)
- (5) Research year: 1995~1997
- (6) Abstract:

Stress response is the fundamental mechanism, by which organisms can adapt to varying environment. Physical and chemical stressors, such as ionizing radiation, ultraviolet light, chemicals, and temperature shift have been shown to induce various protein factors which are involved in the stress response in mammalian cells. In order to understand the biological significance of the stress response, it is indispensable to clarify the induction mechanism, and the function of the stress-induced proteins.

Recently, a member of protein family, called heat shock protein (HSP) 70 family, has been identified as a protein that is induced in normal human embryo cells exposed to ultraviolet light. This protein, named HSP72, was found to be expressed constitutively and induced not only after UV irradiation but also by heat shock treatment. Using a plant flavonoid, quercetin, we found that HSE, the heat shock responsible element, is responsible for the induction of HSP72 by heat shock treatment. On the other hand, UV increases HSP72 level by an activation of CRE (cAMP responsible element). These results indicate that different stresses may activate different signal transduction pathways. We also found that extra-cellular matrix can regulate HSP72 induction, since HSP72 induction by heat was diminished in cells whose fibronectin level was decreased drastically by an introduction of anti-sense fibronectin DNA.



HSP72 protein is a multi-functional protein. While HSP72 protects proteins from denaturation by heat in heat-shocked cells, the results suggested that it might be involved in cell cycle regulation of cells exposed to UV stress. We showed the protein-protein association between HSP72 and p53 protein, which regulates cell cycle progression between G1 and S phase. Furthermore, we examined whether overexpression of HSP72 protein affected cell growth. We found that overexpression of HSP72 enhanced cell growth and mutation frequency of the human HPRT locus by UV light, suggesting that HSP72 plays a role in DNA replication and it regulate the integrity of the genome.

In order to examine the age-difference in the stress response, we compared the induction of the HSP72 gene by heat shock between young and pre-senescent cells. While constitutive level of HSP72 protein was the same between both cell ages, the induction was diminished significantly in aged cells. Using the restriction enzymes *Hpa* II and *Msp* I, whose reactivity was differentially affected by cytosine methylation, we found that DNA locus including the human HSP72 gene was hypermethylated during the cellular senescence. The results suggest that stress responsiveness is decreasing as increasing the number of cell doublings, and that stress response is regulated in part by methylation of the gene. Furthermore, we found that repetitive treatment of low-dose stress extended the life span of the norml human embryo cells and that it enhanced cellular differentiation of the rodent myoblast cells to myotube tissue.

Since the hsp70 family is widely distributed not only in eukaryotic cells but also in prokaryotes, we tried to identify HSP72-like proteins in the plant cells. Among five different monoclonal antibodies recognizing human HSP72 protein, one antibody could reacted with approximately 70 kDa protein in plant cells by western blot analysis. This HSP72-like protein increased slightly after heat shock treatment suggesting that there are similar stress response in plant cells to those in mammalian cells. Interestingly, augmented expression of this protein was observed when plant cells grew exponentially, and the level was decreased drastically as increasing the production level of anthocyanin, which is the marker for plant cell differentiation.

Our present study indicates that the stress response is a fundamental process in the living organisms. It utilizes the same proteins involved in the physiological process, such as cell growth and cell differentiation. The emergency system exists commonly between the animal and the vegetable kingdoms, and protects organisms from harmful environmental changes.