

ストレスたん白質の誘導におよぼす大豆たん白質の影響

Induction of Heat Shock Proteins in Rats Fed Soy Protein Isolate

平川哲也・六反一仁・手嶋茂忠・二川 健・木戸康博・岸 恭一(徳島大学医学部)

Tetsuya HIRAKAWA, Kazuhito ROKUTAN, Shigetada TESHIMA,
Takeshi NIKAWA, Yasuhiro KIDO and Kyoichi KISHI
Department of Nutrition, School of Medicine, The University of Tokushima,
Tokushima 770

ABSTRACT

We examined the stress-induced synthesis of a heat shock protein with molecular mass of 72 kilodalton (HSP70) and its modification by protein nutrition in rats. Male Wistar rats were fed 5% casein, 5% soy protein isolate (SPI), 20% casein, or 20% SPI diet for 3 wks and subjected to restraint and water-immersion stress. The stress rapidly induced accumulations of HSP70 mRNA and its protein within 30 min in rats fed 20% protein diets. Rats fed 20% SPI diet showed more enhanced stress response than rats fed 20% casein diet. Protein malnutrition impaired the induction of HSP70 and caused severe gastric ulcer lesion. However, when 5% SPI diet was given instead of 5% casein, it preserved the stress-induced expression of HSP70 mRNA and partially suppressed ulcer formation. These results suggest that SPI may have a beneficial effect on acquisition of resistance to stress ulcer possibly by enhancing the induction of heat shock proteins in gastric mucosa. *Rep. Soy Protein Res. Com., Jpn.* **16**, 4-8, 1995.

さまざまなストレスにより引き起こされるストレス応答は、生体の恒常性を維持するための重要な反応である反面、ストレス関連疾患など多くの疾病の増悪因子とされている。ストレス潰瘍に代表されるように、胃は生体のストレス反応を端的に示す臓器であり、ストレス潰瘍の成因とそれに対する防御機構については多くの研究がなされてきた。

細胞自身がストレス抵抗性を獲得する分子機構として、熱ショックたん白質 (HSP, heat shock protein) あるいはストレスたん白質と呼ばれる一群のたん白質の存在が明らかにされ、その構造と分子シャペロンとしての機能が明らかにされつつある¹⁾。我々は、胃粘膜細胞でのストレスたん白質の誘導と、それに伴う障害物質に対する抵抗性の獲得を初めて報告した²⁾。また、胃病変におけるストレスたん白質の意義についても注

目されているが³⁾、その役割については未だ明確な答えは得られていない。

本研究では、水浸拘束ストレス負荷ラットを用いて、胃粘膜における最も代表的なストレス誘導性のストレスたん白質であるHSP70の誘導と、それに対する分離大豆たん白質 (SPI) の影響を調べるとともに、胃粘膜におけるストレスたん白質の役割についても考察した。

方 法

実験動物と試薬

ウイスター系雄性ラットは日本SLC (静岡) より購入した。分離大豆たん白質 (SPI) は不二製油 (大阪) より提供を受けた。抗HSP70ポリクローナル抗体は秋田大学伊藤英晃先生より提供していただいた。Enhanc-

ced chemiluminescence (ECL) Western blot detection kitと [α - 32 P] dCTPは日本アマシャム社 (東京) より購入した。Isogenは日本ジーン (富山) より、human HSP70 cDNA (ATCC57494)と glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase cDNA (GAPDH, ATCC57090)は American Type Culture Collection (Rockville, MD)よりそれぞれ購入した。他の試薬はSigma社 (St. Louis, MO) およびナカライテスク (京都) より購入した。

飼育とストレス負荷

7週齢、体重200 gのWistar系雄性ラットを実験に使用した。食餌たん白質源としてカゼインあるいはSPIを5%および20%含む食餌を投与した4群に分け、水とそれぞれの食餌を自由摂取させた。3週間の飼育後、個々のラットを金網で拘束し、23°Cに設定した恒温水槽に剣状突起まで水浸させる水浸拘束ストレスを施行した。

HSP70 mRNAの解析

水浸拘束ストレス負荷30分、1、2、4時間後、直ちにラットを断頭により屠殺し、視床下部、副腎ならびに胃粘膜を摘出した。それぞれの臓器0.1 gからIsogenを用い組織内全RNAを抽出した。抽出したRNAの40 μ gを1%アガロースゲルで電気泳動した後、ナイロンフィルター (Hybond N+membrane) にトランスファーした。メンブレンは、あらかじめランダムプライマー法にて [α - 32 P] CTPでラベルしたHSP70 cDNAプローブにてハイブリダイゼーションを行い、オートラジオグラフィーでHSP70 mRNA量を解析した。HSP70 mRNA量はGAPDH mRNAの発現量で補正した。

HSP70たん白質の解析

水浸拘束ストレス負荷後に、上記と同様に摘出した視床下部、副腎ならびに胃粘膜を6M尿素、0.4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 0.5 mM dithiothreitolおよび0.5 mM phenylmethyle sulfonylefluorideを含む50 mM Tris-HClバッファー (pH7.4) 中にホモジナイズし、さらに27Gの注射針に20回通して全たん白質を抽出した。40 μ gたん白質量を8%ゲルを用いたSDS-PAGEにより分離し、PVDF膜にトランスファーした。メンブレンはブロッキング後、室温で1時間、5,000倍に希釈した抗HSP70ポリクローナル抗体でインキュベーションした。結合した抗体はECLシステムで検出した。

結 果

摂食量及び体重増加量

摂食量と体重増加量は、以前報告した結果と同様であり⁴⁾、カゼイン群とSPI群には有意な変化は認められなかったが、5%たん白質食群では20%たん白質食群に比べ、摂食量と体重増加量が明らかに低下しており、以前の飼育と同様の低たん白質栄養状態が再現できた。

HSP70 mRNAの発現

20%カゼイン食で飼育したラットに水浸拘束ストレスを負荷し、胃粘膜でのHSP70 mRNAの発現を調べFig. 1に示した。ストレス負荷後30分以内に明らかなHSP70 mRNAの増加が認められた。各食餌群でのHSP70 mRNA/GAPDH mRNAをデンスitometer

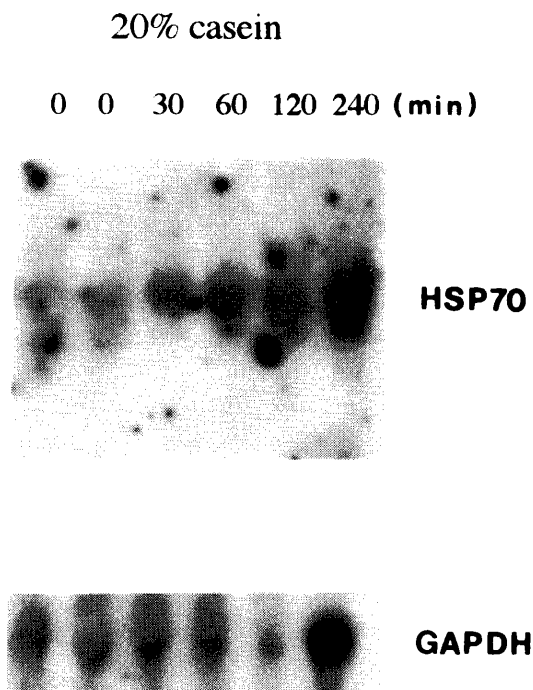


Fig. 1. Expression of HSP70 mRNA in gastric mucosa after restraint and water-immersion stress. Rats fed 20% casein diet for 3 wks were subjected to restraint and water-immersion stress for the indicated time. Total RNA was extracted from gastric mucosa, and HSP70 and GAPDH mRNAs were analyzed by Northern blotting as described in Materials and Methods.

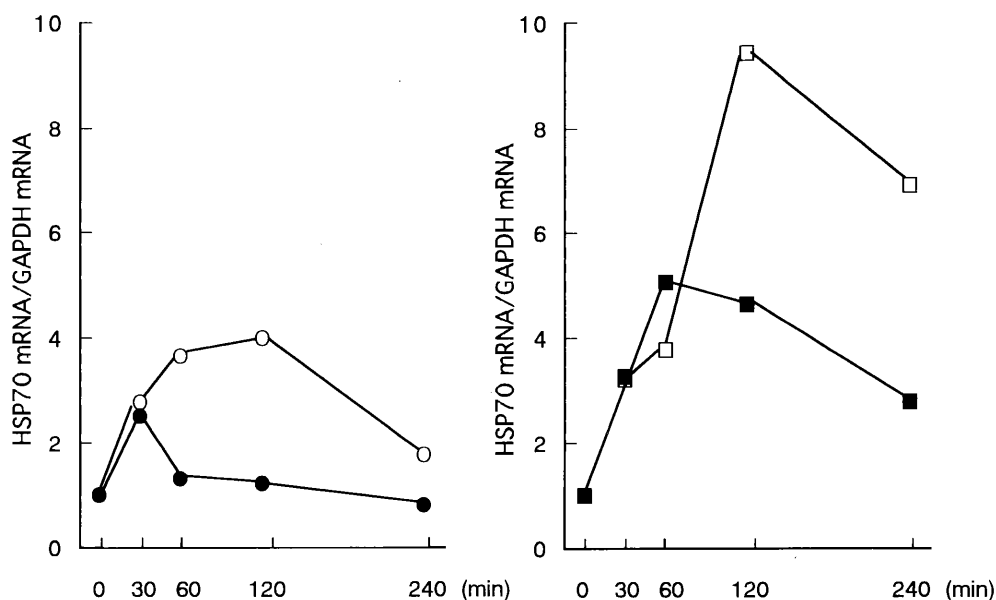


Fig. 2. Time-dependent accumulation HSP70 mRNA in rats fed different diets. Rats were fed 5% casein (●), 5% SPI (■), 20% casein (○), or 20% SPI (□) for 3 wks and subjected to the stress. HSP70 and GAPDH mRNA levels were measured as described in the legend to Fig. 1 and quantitated by a densitometer. Time-dependent accumulation of HSP70 mRNA was standardized by the level of GAPDH mRNA.

で測定しFig. 2に示した。低たん白質食を摂取しているラットでは、明らかにHSP70 mRNAの発現が低下していた。さらに、SPI食群はカゼイン食群に比べHSP70 mRNAの発現が増加していた。視床下部および副腎での発現を同様に調べたが、いずれにおいてもSPI食群で低たん白質栄養によるHSP70 mRNAの発現低下が抑えられ、20%たん白質食ではカゼインに比してSPI食での発現は亢進していた（データは示さず）。

水浸拘束ストレスによるHSP70たん白質の誘導

水浸拘束ストレスによる胃粘膜のHSP70の誘導についてウェスタンブロット法により確認した (Fig. 3)。20%カゼイン食群では、HSP70 mRNAの発現とほぼ同じ時間経過で、ストレス負荷後30分で明らかなHSP70たん白質の誘導を認めた。しかしながら、低たん白質食で飼育したラットではHSP70 mRNAのわずかな増加を認めるものの、水浸拘束ストレスによる

HSP70たん白質の誘導はほとんど検出されなかった。一方、20%カゼイン食と20%SPI食群でのHSP70たん白質のレベルを比較すると、ラットの個体差はあるものの明らかにSPI食群でHSP70たん白質の誘導レベルが高く、この結果は、HSP70 mRNAの結果と一致していた。

考 察

*in vivo*におけるストレスたん白質の誘導については、Holbrookのグループが精力的に研究を進めている。ラットのストレスモデルを用い、種々の臓器でのストレスたん白質の誘導を調べ、特に、副腎と血管内皮細胞に強く誘導される事を報告した⁵⁾。さらに、その誘導にはそれぞれCRF、ACTHとグルコルチコイドが関与している事を明らかにし、生体でのストレスたん白質の誘導には、視床下部・下垂体・副腎系による

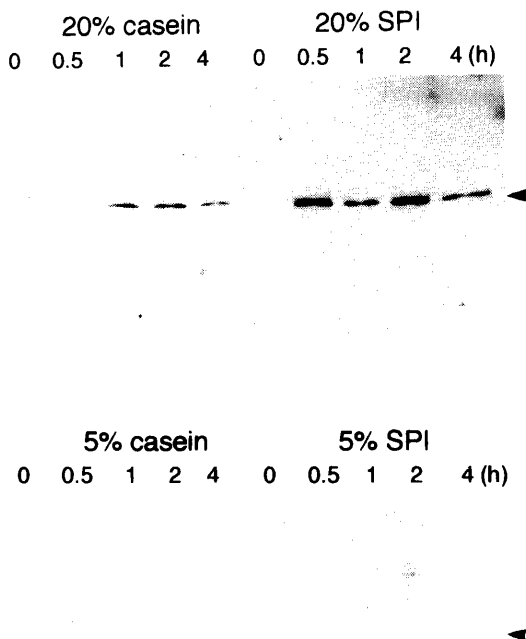


Fig. 3. Detection of HSP70 by Western blotting. Each group of mice was subjected to the stress, and whole tissue protein was extracted from gastric mucosa. HSP70 was detected by Western blotting as described in Materials and Methods.

ストレス反応の結果であると推察している⁶⁾。ストレスたん白質と病態との関連については、組織傷害の指標、あるいは傷害に対する抵抗性の指標として漠然と理解されている。我々は、培養胃粘膜細胞でのストレスたん白質の誘導と致死傷害物質に対する抵抗性の獲得を明らかにしているが²⁾、胃病変におけるストレスたん白質の役割については明確な答えは得られていない。

今回、たん白質栄養状態によるストレスたん白質の誘導の変化について検討を行った。ラットに水浸拘束ストレスを負荷すると、HSP70 mRNAとたん白質は潰瘍形成に先立ち30分以内に誘導される。低たん白質栄養状態はストレス潰瘍の発生を増悪させ、HSP70の誘導を阻害した。胃粘膜の防御機構は、被蓋上皮細胞、粘液、粘膜血流などの多くの機構により規定され、ま

た、プロスタグランディンをはじめとする多くの調節因子により左右される。ストレスたん白質の誘導のみで胃粘膜の抵抗性を論じる事は出来ない。しかしながら、低たん白質栄養状態では、胃粘膜と同様に視床下部と副腎でのHSP70の誘導も低下しており、低たん白質栄養状態における胃粘膜でのストレスたんぱく質の誘導の低下は、生体全体でのストレス応答の低下と関連している事を確認した。

食餌たん白質源としてカゼインとSPIを用いて、ストレス応答を比較した。20%たん白質食では、明らかにSPI食の方がHSP70のmRNAの発現、たん白質の誘導とも亢進していた。5%食では、ともにHSP70の誘導は阻害されていたが、mRNAの発現はSPI食でより保たれており、SPI食の方が明らかにストレス潰瘍の潰瘍係数は低値であった(データは示さず)。このように、SPIはカゼインに比べストレスたん白質の誘導を増強し、ストレス潰瘍の発生を抑えていた。SPIがカゼインに比して、HSP70の誘導を高めるメカニズムについては不明だが、ストレスたん白質の誘導は、主に転写レベルで調節されている。加齢に伴うストレスたん白質の誘導の低下のメカニズムとして、構成的に発現している転写因子(HSF1)量の低下が報告されており⁷⁾、転写因子の発現量について検討する必要があると考えている。また、カゼイン及びSPI食におけるストレス応答の相違については、たん白質のアミノ酸パターン並びに摂取されたアミノ酸の利用という面からの検討も必要であると思われる。

文 献

- 1) Hendrick JP and Hartl F-U (1993): Molecular chaperone functions of heat-shock proteins. *Ann Rev Biochem*, **62**, 349-384.
- 2) Nakamura K, Rokutan K, Marui N, Aoike A and Kawai K (1991): Induction of heat shock proteins and their implication in protection against ethanol-induced damage in cultured guinea pig gastric mucosal cells. *Gastroenterology*, **101**, 161-166.
- 3) 六反一仁 (1995): 胃病変におけるストレス蛋白質の意義. 日本消化器病学会雑誌, **92**, 1-6.
- 4) 二川 健, 山本 孝, 山内 有信, 大野 誉子, 難波 佳世, 木戸 康博, 六反一仁, 岸 恭一 (1994): 運動に伴うフリーラジカル傷害の抑制に対する大豆たん白質の効果. 大豆たん白質研究会会誌, **15**, 44-49.

- 5) Udelsman R, Blake MJ and Holbrook NJ (1991) : Molecular response to surgical stress : Specific and simultaneous heat shock protein induction in the adrenal cortex, aorta, and vena cava. *Surgery*, **110**, 1125-1131.
- 6) Udelsman R, Blake MJ, Stagg CA and Holbrook NJ (1994) : Endocrine control of stress-induced heat shock protein 70 expression *in vivo*. *Surgery*, **115**, 611-616.
- 7) Fawcett TW, Sylvester SL, Sarge KD, Morimoto RI and Holbrook NJ (1994) : Effects of neurohormonal stress and aging on the activation of mammalian heat shock factor 1. *J Biol Chem*, **269**, 32272-32278.