原 著

日本ハイパーサーミア学会第2回大会
研究奨励賞受賞論文

HeLa 及びラット 3Y1-B 細胞における温熱ショックによる HSP70 の核小体への蓄積

大塚健三 中村普武 佐藤周子

愛知県がんセンター研究所放射線部

Nucleolar Accumulation of HSP70 by Heat Shock in HeLa and Rat 3Y1-B Cells

Kenzo Ohtsuka, Hiromu Nakamura and Chikako Sato

Department of Experimental Radiology, Aichi Cancer Center Research Institute, Chikusa-ku,
Nagoya 464.

Abstract

Intracellular localization of mammalian 70,000 D heat shock protein (HSP70) in HeLa and rat 3Y1-B cells that had been heat shocked or treated with chemical stressors was investigated using indirect immunofluorescent staining. The antiserum used specifically recognized the HSP70 in HeLa and 3Y1-B cells, and HSP was increased by heating cells at 42°C for 2 or 4 h and by prior treatment with chemical stressors (sodium arsenite, cadmium chloride, 8-hydroxyquinoline and ethanol). There was diffuse cytoplasmic staining at 37°C, whereas nucleoli were stained brightly when cells were heated at 42°C for 2 h. This rapid accumulation of HSP70 in the nucleoli was not inhibited by cycloheximide (50 µg/ml). Translocation of HSP to the nucleoli was specific for heat because no translocation was induced by treatment with chemical stressors. When the cells were returned to 37°C after heating, the HSP in their nucleoli disappeared rapidly and diffuse cytoplasmic staining was present after 4-6 h for 3Y1-B cells and 6-9 h for HeLa cells. Our results suggest that the transient accumulation of HSP70 in the nucleoli that is induced by heat shock is not correlated with the development of thermotolerance.

Key Words:

熱ショック蛋白質	Heat shock protein
細胞内分布	Cellular distribution
イミューノブロッティング	Immunoblotting
蛍光抗体法	Immunofluorescence
HeLa 細胞	HeLa cells
ラット 3Y1-B 細胞	Rat 3Y1-B cells

1. はじめに

原核及び真核生物では、それらを最適温度より 5～10°C 高い温度に曝露することにより、いわゆる heat shock proteins (HSPs) と呼ばれる数種類の特殊なポリペプチドが合成されることが知られている^{1)~3)}。哺乳動物細胞では、HSPs 合成の増

加と温熱耐性発現とが良く相関することが報告されている^{4)~7)}。

HSPs の温熱耐性発現における機能はまだよくわかっていないが、HSPs の細胞内局在については間接蛍光抗体法^{8)~11)}、及び生化学的な細胞分画法¹²⁾¹³⁾などを用いて研究されている。それによる

と、70キログルトン HSP (HSP70) は正常温度では細胞質及び核全体にうっすら存在しているが、温熱処理した細胞では、それが核特に核小体へ集積してくると言われている。

今回我々は、HSP70 に対する抗血清を作成し、HeLa 及びラット 3Y1-B 細胞における HSP70 の細胞内分布を検討し、既に報告されていることを支持する結果を得た。更に HSP70 の核小体への蓄積と消失の時間経過、及び HSPs 合成を誘導する化学物質の影響についても検討し、温熱耐性との関連を考察した。

2. 材料と方法

Furth マストサイトーマ細胞からの HSP70 の精製、HSP70 に対するウサギ抗血清の作成、及びイミュノプロットティング法による HSP70 の検出方法は既に報告した¹⁴⁾。

HeLa 細胞は10%牛胎児血清を含む Dulbecco's Modified Eagle MEM (日水) 中で、またラット 3Y1-B 細胞 (九大, 生医研, 木村元喜教授より分与) は10%牛胎児血清を含む F12 培養液中で継代維持した。

HSPs の誘導方法として、42°Cの温熱処理、又はヒ素 (NaAsO_2)、カドミウム (CdCl_2)、オキシシン (8-hydroxyquinoline)、エタノールなどの化学物質による処理を用いた。

イミュノプロットティングを行なうために、対数増殖期にある細胞を温熱又は化学物質による処理をした後、SDS sample buffer¹⁵⁾ 中で超音波により溶解し、その細胞溶解液を SDS 電気泳動¹⁵⁾ にかけた。泳動ゲルをクマシーブルー染色及びイミュノプロットティングを行なった。

間接蛍光抗体染色を行なうために、細胞を Lab-Tek チャンバーストライド (Miles Scientific, USA) に植えて37°Cで2日間培養した後、温熱又は化学物質で処理した。その細胞を PBS で洗い、-20°Cメタノールに10分間浸し、固定した。一次抗体としてウサギ抗 HSP70 抗血清を、二次抗体として FITC を結合した抗ウサギ IgG (H+L) (Zymed, USA) をそれぞれ $1/_{60}$ 希釈で用いた。顕

微鏡は Fluorophoto microscope (Nikon) を用いた。

3. 結果

HeLa 及びその他の哺乳動物細胞では HSP70 を構成的に合成していることが報告されている⁹⁾。今回用いた HeLa 及び 3Y1-B 細胞では温熱処理しない対照でも HSP70 が検出れた (図1B, lane3 及び図1D, lane3)。また42°C 2～4時間の温熱、及び化学物質での処理によって HSP70 の合成は増加することがクマシーブルー染色及びイミュノプロットティングにより示された (図1)。

次に間接蛍光抗体法により、HSP70 の細胞内分布を検討した。37°Cの対照の細胞では細胞質全体がうっすらと染色されており、核内は染色されなかった (図2A 及びD)。細胞を42°C 2時間の温熱処理すると、核内の小球状の構造が強く染色された (図2B及びE)。この構造体は位相差顕微鏡でみられる核小体と完全に一致した (図2C及びF)。また温熱による HSP70 の核小体への蓄積は、サイクロヘキシミド ($50\mu\text{g}/\text{ml}$) の添加では阻害されなかった (図3)。従って、この過程には蛋白質の新規合成が必要でなく、温熱処理それ自体があらかじめ細胞質に存在していた HSP70 の核小体への移行を引起こしたことを意味している。

細胞を温熱処理後37°Cに戻すと、核小体に蓄積していた HSP70 は急速に消失した (図4)。HeLa 細胞では、数個の小球状の核小体が、温熱処理後2時間で多くの小さな粒状の構造体に変化するものが観察された (図4B)。これは核小体の分離 (segregation) と思われる。その後この染色像は急速に消失した。HSP70 の核小体への蓄積及び核小体からの消失の時間経過を定量的に調べた。核小体及び小粒状の構造が染色されている細胞を positive cell として数えた (図5)。細胞を37°Cから42°Cに移すと、1時間後にはほとんどすべての細胞の核小体に HSP70 が蓄積した。そして温熱処理後37°Cに戻すと、核小体に蓄積していた HSP70 は HeLa では6～9時間後、3Y1-B では4～6時間後には完全に核小体から消失した。

次に HSPs の合成を誘導することが知られている化学物質 (chemical stressor) の, HSP70 の細胞内分布に対する効果を検討した. HeLa 及び 3Y1-B 細胞で, ヒ素, カドミウム, オキシシン, エ

タノールのいずれの化学物質で処理しても HSP70 の核小体への蓄積は観察されなかった(図 6). このことは HSP70 の核小体への蓄積は温熱に特異的であることを示している.

図 1

SDS電気泳動による HeLa 及びラット 3Y1-B 細胞の HSP70 の検出。

A,B, HeLa 細胞; C,D, 3Y1-B 細胞。 A,C, クマシーブルー染色。

B,D, イミュノブロッティング。

lane 1, 42°C 2時間; lane 2, 42°C 4時間; lane 3, 対照; lane 4, 50 μ M NaAsO₂ 4時間; lane 5, 50 μ M CdCl₂ 4時間; lane 6, 100 μ M 8-hydroxyquinoline 4時間; lane 7, 6% ethanol 1時間→正常培養液中4時間。
分子量マーカーを左側に示した (kD)。矢印が HSP70。

図2 間接蛍光抗体法による HSP70 の細胞内分布。

上段, HeLa 細胞; 下段, 3Y1-B 細胞。

A,D, 37°C 対照。

B,E, 42°C 2 時間。

C,F, B 及び E の位相差顕微鏡写真。

C 及び F における phase dense な核小体と B 及び E の強く蛍光染色されている構造体は一致することに注意。

図3 HSP70の核小体への蓄積に対するサイクロヘキシミド (50 μ g/ml) の効果。
A,B, HeLa 細胞; C,D, 3Y1-B 細胞。
A,C, 42°C 2時間加温。
B,D, サイクロヘキシミド存在下で 42°C 2時間加温。

図4 温熱処理 (heat shock, HS) 後の染色像の変化。
上段, HeLa 細胞; 下段, 3Y1-B 細胞。
A, 42°C 2時間; B, HS 後 37°C 2時間; C, HS 後 37°C 4時間; D, HS 後 37°C 6時間; E, HS 後 37°C 9時間; F, 42°C 2時間; G, HS 後 37°C 1時間; H, HS 後 37°C 2時間; I, HS 後 37°C 4時間; J, HS 後 37°C 6時間。

図5 HSP70の核小体での蓄積と消失の時間経過。
HeLa (—○—)及び3Y1-B (---△---)細胞を各時点で固定、蛍光染色し、核小体及び小粒状の構造体が染色される細胞を positive cell として数えた。各点は total 400個以上の細胞を含む(3回の実験の合計)。

図6 HSP70の細胞内分布に対する化学物質の影響。

上段, HeLa細胞; 下段, 3Y1-B細胞。

A,E, 50 μ M NaAsO₂ 4時間。

B,F, 50 μ M CdCl₂ 4時間。

C,G, 100 μ M 8-hydroxyquinoline 4時間。

D,H, 6% ethanol 1時間→正常培養液 4時間。

4. 考 察

哺乳動物細胞では、一度非致死的な温熱処理によって次の温熱に対して一時的に抵抗性になることが知られており、この現象は温熱耐性と呼ばれている¹⁶⁾¹⁷⁾。温熱耐性は非遺伝的な一過性の現象であり、温熱処理後数時間で発現し、3～5日間かかってゆっくり減衰する⁵⁾⁷⁾¹⁷⁾。この温熱耐性は、温熱処理のみでなくいくつかの化学物質によっても発現する。そしてこれらの化学物質は同時に HSPs の合成を誘導することも報告されている⁶⁾⁷⁾。

今回我々は、①温熱処理によって核小体に蓄積した HSP70 は、処理後急速に核小体から拡散し、数時間後には完全に消失すること、② HSPs 合成を促進する化学物質によっては HSP70 の核小体への蓄積がみられないこと、を示した。これらの結果は、HSP70 の一過性の核小体への蓄積は温熱耐性発現とは関連しないことを示唆している。

Velazquez と Lindquist⁸⁾ はショウジョウバエを用いた実験で、温熱だけでなく低酸素処理によっても HSP70 が核に移行し、同時に次の温熱処理に対して抵抗性になることを観察し、HSP70 の核への移行が生物を環境のストレスから防護するのに働いているだろうと推論している。しかし彼らは、ショウジョウバエの生存率を1つの時間間隔でしか見ておらず、また他の化学物質の効果については調べていない。従って彼らの実験条件では、HSP70 の核への移行と温熱耐性発現との関連ははっきりしないと思われる。

最近、HSP70 は細胞骨格系と関連していること⁹⁾¹⁰⁾¹²⁾¹³⁾¹⁴⁾¹⁸⁾、また核酸と親和性があるとの報告¹⁰⁾¹⁹⁾²⁰⁾がいくつかあるが、これらのことと温熱耐性との関連はまだ不明であり、今後の興味ある問題である。

5. まとめ

① HSP70 に対して特異性の高い抗血清を用いた蛍光抗体法により、HeLa 及びラット 3Y1-B 細胞における HSP70 の細胞内分布を検討した。

② 37°C では細胞質全体がうっすらと染色されるが、42°C 2 時間の温熱により核小体が強く染色さ

れた。この染色像の変化はサイクロヘキシミドでは阻害されなかった。

③ 温熱処理後細胞を 37°C に戻すと、核小体に蓄積していた HSP70 は急速に拡散し、数時間後には完全に消失した。

④ HSP70 の核小体への蓄積は、ヒ素、カドミウム、オキシソ、エタノールなどの化学物質によっても誘導されなかった。

⑤ これらの結果から、HSP70 の核小体への一時的な蓄積は、温熱耐性発現とは関連しないことが示唆された。

6. 謝 辞

この研究の一部は文部省科研費がん特1加納班(#59010030及び60010035)の援助を受けた。本研究は第2回日本ハイパーサーミア学会大会において研究奨励賞を受賞したものであり、ここに感謝の意を表す。

文 献

- 1) Ashburner, M. and Bonner, J.J.: The induction of gene activity in *Drosophila* by heat shock. Cell 17: 241-254, 1979.
- 2) Schlesinger, M.J., Ashburner, M. and Tissières, A. (editors): Heat Shock from Bacteria to Man (Cold Spring Harbor, N. Y., Cold Spring Harbor Lab.), 1982.
- 3) Atkinson, B.G. and Walden, D.B. (editors): Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress (N.Y., Academic Press), 1985.
- 4) Subject, J.R., Sciandra, M.S. and Johnson, M.B.: Heat shock proteins and thermotolerance; a comparison of induction kinetics. Br. J. Radiol. 55: 579-584, 1982.
- 5) Landry, J., Bernier, D. Chretien, P., Nicole, L.M., Tanguay, R.M. and Marceau, N.: Synthesis and degradation of heat shock protein during development and decay of

- thermotolerance. *Cancer Res.* 42: 2457-2461, 1982.
- 6) Li, G.C. and Werb, Z.: Correlation between synthesis of heat shock proteins and development of thermotolerance in Chinese hamster fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79: 3218-3222, 1982.
 - 7) Li, G.C. and Laszlo, A.: Thermotolerance in mammalian cells: A possible role for heat shock proteins. In *Changes in Eukaryotic Gene Expression in Response to Environmental Stress*, edited by B.G. Atkinson and D.B. Walden (N.Y., Academic press), pp.227-254, 1985.
 - 8) Velazquez, J.M. and Lindquist, S.: hsp70: Nuclear concentration during environmental stress and cytoplasmic storage during recovery. *Cell* 36: 655-662, 1984.
 - 9) Welch, W.J. and Feramisco, J.R.: Nuclear and nucleolar localization of the 72,000-dalton heat shock proteins in heat-shocked mammalian cells. *J. Biol. Chem.* 259: 4501-4513, 1984.
 - 10) La Thangue, N.B.: A major heat-shock protein defined by a monoclonal antibody. *The EMBO J.* 3: 1871-1879, 1984.
 - 11) Pelham, H.R.B.: Hsp70 accelerate the recovery of nucleolar morphology after heat shock. *The EMBO J.* 3: 3095-3100, 1984.
 - 12) Levinger, L. and Varshavsky, A.: Heat-shock proteins of *Drosophila* are associated with nuclease-resistant, high-salt-resistant nuclear structures. *J. Cell Biol.* 90: 793-796, 1981.
 - 13) Tanguay, R.M.: Genetic regulation during heat shock and function of heat-shock proteins: a review. *Can. J. Biochem. Cell Biol.* 61: 387-394, 1983.
 - 14) Ohtsuka, K., Tanabe, K., Nakamura, H. and Sato, C.: Association of 69,000 and 68,000 dalton heat shock proteins with the cytoskeleton and structural relations among heat shock proteins in murine mastocytoma cells. Submitted for publication.
 - 15) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685, 1970.
 - 16) Gerner, E.W. and Schneider, M.J.: Induced thermal resistance in HeLa cells. *Nature* 256: 500-502, 1975.
 - 17) Henle, K.J. and Dethlefsen, L.A.: Heat fractionation and thermotolerance: A review. *Cancer Res.* 38: 1843-1851, 1978.
 - 18) Wang, C., Gomer, R.H. and Lazarides, E.: Heat shock proteins are methylated in avian and mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 77: 3531-3535, 1981.
 - 19) Welch, W.J. and Feramisco, J.R.: Rapid purification of mammalian 70,000-dalton stress proteins: Affinity of the proteins for nucleotides. *Mol. Cell. Biol.* 5: 1229-1237, 1984.
 - 20) Schönfelder, M., Horsch, A. and Schmid, H.-P.: Heat shock increases the synthesis of the poly(A)-binding protein in HeLa cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 6884-6888, 1985.