

## 灸における熱ショックタンパク質(hsp)の意義

明治鍼灸大学 化学教室

小林 和子

**要旨：**ラット臀部に15分間施灸することにより、熱ショックタンパク質(hsp)が合成誘導されるかどうか、二次元電気泳動法を用いて検討した。施灸により、皮下では45°Cに、筋層内では39-40°Cに15分間保ったラットを、施灸直後、3時間経過後、24時間経過後に、各々処理し、臀部筋肉を摘出し、常法により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い、対照ラットと比較すると、施灸後3時間経過後に処理したラットにおいて熱ショックタンパク質(hsp70とhsp71)が検出された。施灸直後および24時間経過後のラットでは、hsp71は検出されたが、hsp70は認められなかった。またhsp71は対照ラットにおいても認められた。

### The Appearance of Heat-Shock Proteins (hsp) by Moxibustion

KOBAYASHI Kazuko

Department of Chemistry, Meiji College of Oriental Medicine

**Summary:** Rats were cauterized with moxa on the hips. The subcutaneous and intramuscular temperatures were kept at 45°C and at 39-40°C for 15 min, respectively. Rats were killed by perfusion of sucrose solution under deep anesthesia and the muscle tissues of the hips were collected from the bodies at 0 h, 3 h and 24 h after the moxibustion. The proteins were extracted from the tissues and two dimensional gel electrophoreses of the proteins were carried out. Heat-shock protein of molecular mass 70,000 (hsp 70) was detected in the rat killed 3 h after the moxibustion, but not in the rats killed 0 h and 24 h after the moxibustion. Heat-shock protein of molecular mass 71,000 (hsp 71) was detected in every rat muscle examined.

---

**Key Words:** 热ショックタンパク質 Heat shock proteins (hsp),  
二次元ゲル電気泳動 Two dimensional gel electrophoresis, 灸 Moxibustion, 筋 Muscle.

## Iはじめに

鍼灸の治効メカニズムのうち、鎮痛、除痛作用については、多くの神経生理学的な検討がなされてきたが、生体の homeostasis や、免疫系への影響についての研究報告はまだ少ない。最近、高温やエタノール、アミノ酸アナログ、遷移金属イオン、無酸素化などの一過性ストレスを受けると合成され、温熱耐性などの熱ショックやストレスに対する抵抗性獲得に機能している熱ショックタンパク質(hsp)<sup>1)</sup>が、分子レベル、細胞レベルでの遺伝子発現機構のモデル系としてだけでなく、個体レベルで免疫系への関与や生理的意義という視野から注目されている<sup>2)</sup>。灸は人体に直接熱ショックを与える治療方法であり、その効果が数時間持続するという観点にたつて、灸刺激が hsp の誘導に関与しており、hsp が灸の治効メカニズムに主要な役割を果たしている可能性が考えられる。今回は施灸前後の hsp 誘導合成について、ラットの施灸部筋肉からタンパク質を抽出し、二次元ゲル電気泳動法によって hsp 合成過程を分析した。

## II 実験方法

### <タンパク質の抽出>

ペントバルビタール麻酔下の、Sprague-Dawley(雄、8週令、200g)ラットの臀部を剃毛し、針状熱電対型温度計を臀部皮下(筋膜上)と筋層内に各々挿入した後、モグサを10mgずつ10回、15分間施灸し、温度を経時的に記録した。施灸直後、3時間経過後、24時間経過後のラットおよび、施灸していない対照ラットを、麻酔下に0.25Mショ糖溶液で経心臓還流後、臀部筋肉を摘出した。組織に10mMトリス-塩酸(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、遠心分離操作(3500rpm、10min、4°C)を行ってタンパク質を分離した。タンパク質の濃度は、Lowry 法<sup>3)</sup>によって分析した。標準タンパク質として牛血清アルブミンを用いた。

### <電気泳動法>

二次元ゲル電気泳動法は、O'Farrell<sup>4)</sup>の方法によって行った。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%リボフラビン1.5ml、0.45%テトラメチレンジアミン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、水1.0mlに、1.6% pH5-7両性担体および0.4% pH3.5-10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13cm)に、800μlずつ長い注射針(15cm)を附けた注射器を用いて気泡を入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(400μg)を、lysis buffer(pH3.5-10両性担体0.4%、pH5-7両性担体1.6%、8.5M尿素、2%Nonident P-40、5%β-メルカプトエタノール)に溶解し、300V定電圧で17~18時間、等電点電気泳動を行った。泳動は上部泳動槽(陽極)に0.02Mリン酸を、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、10°Cに冷却しながら行われた。その後、ディスクゲルをドデシル硫酸ナトリウム(SDS)緩衝液中で30分間40°Cで保温し、ゲルを平衡化した。二次元目は、Laemmliの不連続緩衝液法<sup>5)</sup>により、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-塩酸(pH8.8)7.5ml、10% SDS 0.3ml、1.5%過硫酸アンモニウム1.0ml、テトラメチレンジアミン15μl、水11.2mlを混合し、10%アクリルアミド分離スラブゲルを作製し、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、スラブゲル(横13.5cm、縦12.5cm)を作製した。一次元目の平衡化したディスクゲルをスラブゲル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。分子量は、分子量の常用対数と相対移動度との関係を分子量マーカーとタンパク質を基準として求

め、検出されたタンパク質の相対移動度より求めた。

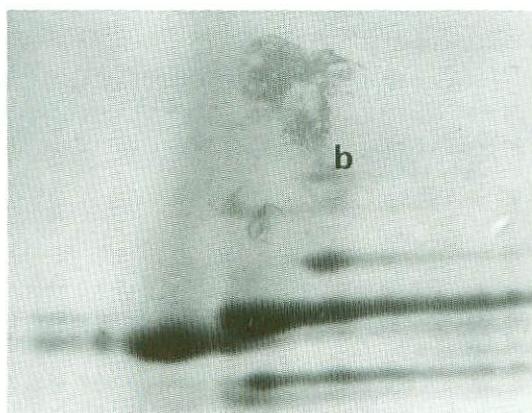
また、より簡便な方法として、一次元目にレクタンゲル等電点電気泳動を行う、アトーチャン社のラビダスミニスラブ二次元電気泳動セットを用いて同様の実験を行い、得られるゲル（8cm×8cm）のタンパク質分離泳動パターンを比較した。タンパク質は80μg/20μlを負荷し、一次元目は、200V定電圧で3時間泳動させ、二次元目は15mA定電流で3時間泳動を行った。染色は、Coomassie Brilliant Blue法と、タンパク質をグルタルアルデヒドで固定後、アンモニア性硝酸銀で酸化することにより銀を析出させる反応を用いた銀染色法（銀染色キットワコー使用）によって行った。

### III 結果と考察

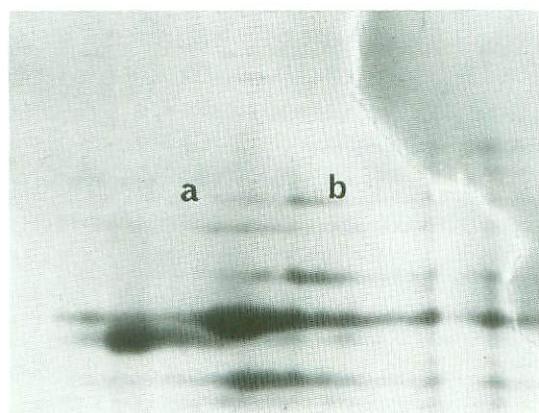
ラットの全身加温により体温を37°Cから41°Cに15分間上昇させた後、3～4時間室温に置いておくと、hspが合成されると報告されている<sup>6,7)</sup>。ラットにモグサ10mgを10回施灸すると、ラットの臀部筋肉の温度は皮下（筋膜上）で45°Cに、筋層内では39～40°Cに15分間保たれていた。施灸前の

温度は37°Cであり、施灸により皮下では通常の体温より7°C、筋層内では2～3°C上昇した状態が15分間保たれることになる。ラットの臀部筋肉を、施灸直後、3時間経過後、24時間経過後に摘出し、抽出したタンパク質の二次元ゲル電気泳動を行った。そのパターンは、15分間の施灸後直ちに処理されたラットについては施灸していない対照ラットの場合とほぼ同じであったが、施灸後3時間経過後処理されたラットの場合には、対照動物と異なっていた（図1）。新しく検出されたタンパク質（図1、(2)のa）は分子量70,000の熱ショックタンパク質（hsp 70）で、これまで報告されているラット肝のhsp 70<sup>6,7)</sup>の位置と一致している。施灸後24時間経過後のラットではhsp 70は検出されず、施灸直後および対照動物の場合と同様であった。また、分子量71,000の熱ショックタンパク質（hsp 71）（図1、(1), (2)のb）は、対照、施灸直後、3時間後、24時間後のいずれの場合にも認められ、ラット肝の場合<sup>7)</sup>と同様であった。

レクタンゲルを一次元目に用いるラビダスミニスラブ-2D電気泳動セットを使って同様の実験を行った場合、得られたゲルは図2のようであっ



(1)



(2)

図1 ラット臀部筋肉の二次元ゲル電気泳動。

(1)施灸していない対照ラット、(2)施灸後3時間経過した後処理されたラット、aはhsp 70、bはhsp 71に相当する。

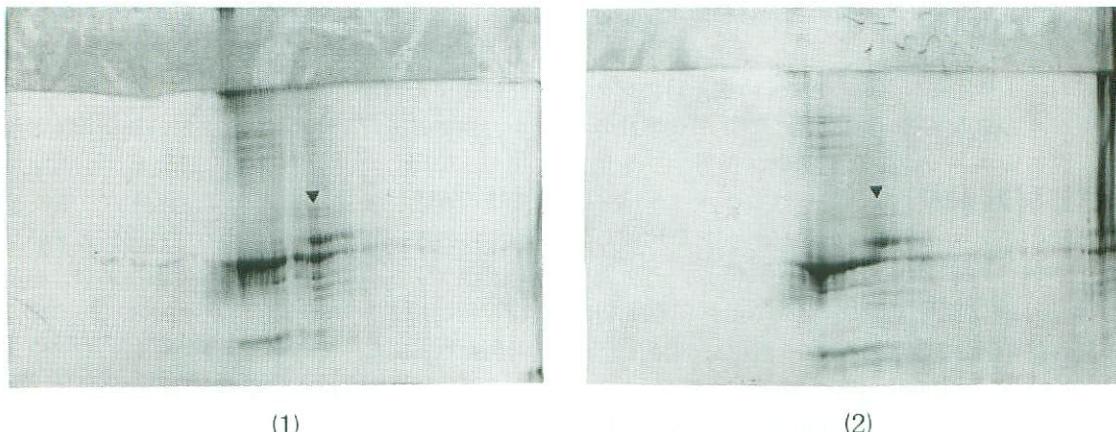


図2 ラピダスミニスラブ二次元電気泳動セットを用いた場合

(1)施灸後3時間経過した後処理されたラット、(2)施灸後24時間経過した後処理されたラット。▼は hsp を示す。(1)では、検出されるが、(2)では明確ではない。

た。図1に比べて、タンパク質量が少ないため、検出の感度は悪いが、3時間経過後のパターンと他の場合との差は認められた。

ラット肝については、ラットへの薬剤注射による発熱<sup>6)</sup>や、湯浴中の加温<sup>7)</sup>、虚血による無酸素状態<sup>8)</sup>などによってhspが合成されることが報告されているが、ラット筋組織については報告されていない。今回、灸刺激によって筋組織においてもhsp 70が合成されることが確認された。灸刺激のような局所的な熱の与え方によってもhspが合成されることは、灸のように熱を与えることで治療を行う方法において、hspが生理性の役割を果たしていることを示唆している。施灸直後ではhsp 70の合成が認められず、3時間くらい経過した後にhsp 70が合成され、24時間後には通常の状態にもどることは、灸の効果が直後より数時間後に認められることに関連しているかもしれない。また、hspが合成されると温熱耐性を獲得することが知られており<sup>2)</sup>、灸刺激による効果と関連している可能性もある。

最近、正常な状態でも存在するhspファミリーがタンパク質の細胞内輸送に主要な役割を果たしていることが、酵母について報告されている<sup>8,9)</sup>。

hsp 70およびhsp 71のようなhspファミリーが、生体の homeostasis のコントロールに関与している可能性が、充分に考えられる。

## 謝辭

ラットの処理については解剖学教室熊本賢三講師に御協力をいただき深謝する。本研究の一部は、当大学4回生、竹石和秀君、高岡裕君の協力により行われたものである。

なお、本研究は、文部省科学研究費補助金（課題番号 63772005）および上原記念生命科学財団研究奨励金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. および同引用文献。
  - 2) 古家雅代, 加納永一: ヒートショックプロテインと温熱耐性. 医学のあゆみ 141 : 961～963, 1987.
  - 3) Lowry O H, Rousenbrough N J, Farr A L, et al : Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem 193 : 265～275, 1951.

- 4) O'Farrell P H : High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* **250** : 4007～4021, 1975.
- 5) Laemmli U K : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* **227** : 680～685, 1970.
- 6) 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.
- 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) Chirico W J, Waters M J, Blobel G : 70K heat shock related proteins stimulate protein translocation into microsomes. *Nature* **332** : 805～810, 1988.
- 9) Deshaies R J, Koch B D, Werner-Washburne M, et al : A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* **332** : 800～805, 1988.