

Jurkat 細胞の熱ショック応答に対するケルセチンの効果

Effects of Quercetin on Heat Shock Responses of Jurkat Cells

長坂祐二*
Yuji Nagasaka

Summary

Effects of quercetin on heat shock responses of Jurkat cells were examined. Quercetin inhibited the induction of HSP70. ERK was phosphorylated by heat shock in the presence of quercetin, but not by heat shock alone. JNK was phosphorylated by heat shock and the phosphorylation was inhibited by quercetin. Heat-induced serine 38 phosphorylation of stathmin was inhibited by quercetin. Thus, many heat shock responses tested here were inhibited by quercetin. These findings suggest that quercetin inhibits the upstream of many phosphorylation cascades activated by heat shock.

1. 緒言

細胞は、周囲の環境からホルモンやサイトカインなど生理的な刺激、あるいは種々の化学的、物理的な刺激を受け取り、それに適切に応答することにより生存している。このような刺激の中には、高温、低温、酸化的ストレス、浸透圧の変化など、細胞の生存にとって不利な刺激も含まれる。これら細胞にとって有害な刺激に対して適切に対処し、細胞の生存をはかることを細胞のストレス応答という。ストレス応答には細胞が自ら死んで行くアポトーシスも含まれる。種々のストレスは、それぞれ特有なストレス応答を引き起こすが、ストレスの種類にかかわらず共通の変化も見られる。その中でも特に重要なものが、熱ショックタンパク質 (Heat Shock Proteins, HSP) と呼ばれる一群のタンパク質の誘導と、細胞内タンパク質のリン酸化・脱リン酸化状態の変化である¹⁾。

HSPは、当初熱ショックにより新たに合成される蛋白質として発見されたが、酸化的ストレスや虚血など様々なストレスによっても誘導されることから明らかになり、現在ではストレス蛋白質とも呼ばれる。HSPには多様な蛋白質が含まれており、その分子量によりHSP70, HSP90, HSP60などのファミリーに分類されている。HSPの主な機能は、合成過程にあるペプチドに結合してペプチドの折りたたみを助けるシャペロン機能、蛋白質の膜透過、ステロイドホルモン受容体の機能調節、熱ショックなどで部分変性した蛋白質の安定化、正常化などである¹⁾。

タンパク質の可逆的なリン酸化・脱リン酸化反応は、ホルモンやストレスなど細胞外からの刺激を受け取り、

その情報を細胞内の標的蛋白質に伝達する細胞内情報伝達の最も重要な調節機構である。HSPのいくつか (HSP90やHSP27など) は、熱ショックによりリン酸化されることが知られている^{2,3)}。HSPの発現は、HSPをコードしている遺伝子のプロモーター領域に特異的に結合し、HSP遺伝子の転写を促進するHSF (Heat Shock Factor) により調節されているが、熱ショックはHSFのリン酸化をもたらし、HSFの転写活性を促進してHSP合成を増加させる⁴⁻⁶⁾。熱ショックは、mRNAからペプチドを合成するときの開始因子であるInitiation Factor 2のリン酸化を促進する一方、リボゾーム蛋白S6やInitiation Factor 4B, 4Fの脱リン酸化を促進する⁷⁾。DNAからmRNAへの転写を行なうRNA Polymerase IIのC端は熱ショックによりリン酸化を受ける⁸⁾。このような蛋白質のリン酸化状態の変化は、転写、翻訳というDNAから蛋白質合成にいたる過程を抑制し、熱ショックのために間違った蛋白質を合成することを予防する働きがあると考えられている。

蛋白質の可逆的なリン酸化・脱リン酸化反応は、プロテイン・キナーゼとプロテイン・ホスファターゼにより触媒される。プロテイン・キナーゼには多くの種類があるが、細胞外からの刺激により活性化され、細胞内蛋白質をリン酸化するプロテイン・キナーゼとしてMAP (Mitogen-activated Protein) キナーゼ・ファミリーがよく知られている⁹⁾。MAPキナーゼ・ファミリーに含まれるERK (Extracellular signal-regulated Kinase) は熱ショックにより活性化され^{10,11)}、HSP27や、RNA Polymerase II, HSFなどのリン酸化

* 山口県立大学大学院 健康福祉学研究所生活健康科学専攻

を調節するリン酸化カスケードの上流キナーゼであり、細胞のストレス応答において重要な役割を果たすと考えられている^{8,12)}。

ケルセチンは、植物に含まれるフラボノイドの一種である。フラボノイドは、フェニル基(A環とB環)が炭素原子3つを介して結合した化学構造を形成している成分の総称で、ケルセチンは図1に示すように5つの-OH基を持つフラボノールである。

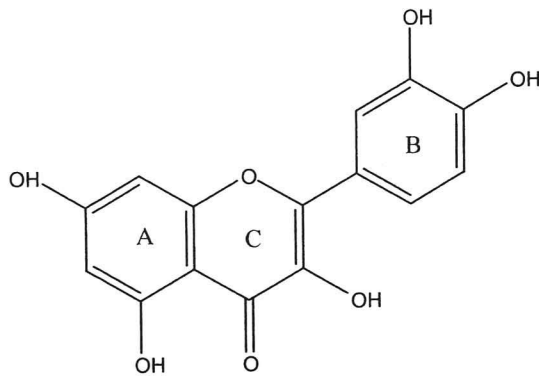


図1 ケルセチンの構造

近年、フラボノイドは食品に含まれる抗酸化物質として注目されているが、抗酸化作用以外に培養細胞の増殖抑制¹³⁾、解糖系の抑制¹⁴⁾、タンパク質合成の抑制¹⁵⁾、プロテイン・キナーゼやATPaseの抑制¹⁷⁾など、動物細胞に対して多彩な生理活性を示すことが知られている。

我々は、ケルセチンが熱ショックによるERKの活性化を修飾し、細胞内タンパク質のリン酸化状態を変化させることにより、細胞をアポトーシスに導く作用があることを報告してきた¹⁸⁾。ケルセチンは、ストレスによる細胞内蛋白質のリン酸化・脱リン酸化状態を修飾し、細胞のストレス応答に影響を与える可能性がある。そこで、今回、熱ショックによって引き起こされる細胞内の変化(熱ショックタンパク質の合成促進、MAPキナーゼ・ファミリーの活性化、スタスミンのリン酸化)に対するケルセチンの効果について検討した。

2. 方法

2-1 細胞培養

実験はヒトTリンパ球性白血病細胞由来のJurkat細胞を用いた。Jurkat細胞(10⁷個)は10%牛胎児血清を含むRPMI-1640培養液(シグマ)80mlに浮遊させ、37°C、5%二酸化炭素のインキュベーター内で1週間培

養した。増殖した細胞浮遊液(10⁸個)を200G、5分間遠心し、上清の培養液を捨てた後、血清を含まない、HEPES緩衝液(10mM)を加えたRPMI-1640培養液40mlに浮遊させ、10mlずつ直径10cmの培養ディッシュに分注して実験に用いた。

熱ショックは、培養ディッシュを45°Cに加温した水槽に30分間浸すことにより行なった。実験プロトコルにしたがって細胞をインキュベーションした後、直ちに200G、5分間遠心することにより集めた細胞を1mlの生理食塩水で洗浄して、細胞重量を測定した。細胞の溶解は、細胞重量の5倍量の細胞溶解液(1%ノニドットP-40, 1mM EDTA, pH7.4)を加えて激しく混和後、20,800G、10分間遠心した上清を以下のアッセイの試料とした。試料の蛋白濃度はCBB-G250溶液(ナカライ)を用いて測定した。実験試料はアッセイが行なわれるまで-80°Cに凍結保存した。

2-2 ウェスタン・ブロッティングと免疫染色

試料の蛋白濃度は5mg/mlに希釈して電気泳動に用いた。SDS-PAGE(SDS-ポリアクリルアミド電気泳動)は、Laemmli法に準じて行った¹⁹⁾、アクリルアミド濃度は分離ゲルで10%、濃縮ゲルで3%とし、15mAの定電流(70~150V)で約2時間泳動した。泳動終了後、ゲル中の蛋白質を0.1%SDSを含む10mMCAPS, pH 11(シグマ)中で電気泳動的にpolyvinylidene difluoride(PVDF膜)(ミリポア)へ転写した。蛋白質を転写したPVDF膜は、5%スキムミルク(森永)中で30分間振盪してブロッキングした後、一次抗体を加えて12時間振盪した。HSP70とMAPキナーゼ・ファミリー(ERK, JNK, p38MAPK, リン酸化ERK(pERK), リン酸化JNK(pJNK), リン酸化p38MAPK(pp38MAPK))に対する一次抗体はサンタクルズ社より購入した。スタスミンのC端および16番目, 25番目, 38番目のセリンがリン酸化したスタスミンに対する一次抗体はSobel博士(INSERM, France)より供与された。一次抗体の非特異的な結合を除くために0.05%Tween20溶液(片山化学)で3回洗浄して、ペルオキシダーゼでラベルした二次抗体(サンタクルズ)を2時間作用させ、0.05%Tween20溶液で5回洗浄後、ECR溶液(アマシャム-ファルマシア)にPVDF膜を浸して発光させることにより、X線フィルムに感光させてバンドを検出した。

2-3 2次元電気泳動法

2次元電気泳動はO'Farrell法に準じて行った²⁰⁾。1次元目の等電点電気泳動には、2% Ampholine (pH3.5~10) (アマシャム-ファルマシア) を含む4%ポリアクリルアミドのキャピラリーゲル (1mm×62mm) を用いた。泳動は、200V定電圧で30分間、400V定電圧で24時間 (9700Vh) 行った。2次元目のSDS-PAGEは、等電点電気泳動終了後のキャピラリーゲルを15%ポリアクリルアミドゲルの上に密着しておき、SDSを含むサンプル緩衝液で3回洗浄後、15mAの定電流 (70~150V) で約2時間泳動した。分離した蛋白質は、0.05% CBB-R250溶液で24時間染色して検出した。

3. 結果

3-1 熱ショックたんぱく質の誘導に対するケルセチンの効果

熱ショックにより誘導されるHSPにはHSP90, HSP70, HSP27など多くの種類があるが、今回はもともと多量に誘導されるとされているHSP70の発現について、HSP70に対する抗体を用いた免疫染色により検討した。図には示さないが、HSP70の発現は、45°C, 30分間の熱ショックの後、37°Cに戻して3時間後に増加することを確認している。

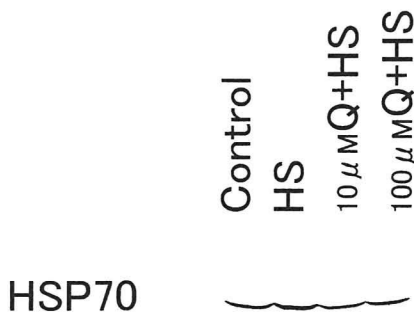


図2 HSP70のウェスタン・ブロッティング
HS: 熱ショック, Q: ケルセチン

図2は45°C, 30分間の熱ショック後、37°Cで3時間インキュベーションを続け、試料を採取したものである。第2レーンに示すように、細胞内に発現するHSP70の蛋白質量は熱ショックにより増加している。熱ショックを加える30分前に10µMケルセチンを加えると、HSP70の発現はコントロールと同程度まで抑制された (第3レーン)。100µMケルセチンを加えたときは、わずかにHSP70発現を抑制したが、10µMのときより軽度であった。

3-2 MAPキナーゼ・ファミリーに対するケルセチンの効果

MAPキナーゼ・ファミリーには、ERK, JNK, p38MAPKの3種類が存在する⁹⁾。いずれも1本差のペプチドよりなり、1つのアミノ酸をはさんで存在するチロシン残基とスレオニン残基がともにリン酸化されることにより活性化される。今回はERK, JNK, p38MAPKおよび、リン酸化ERK (pERK), リン酸化JNK (pJNK), リン酸化p38MAPK (pp38MAPK) をそれぞれ特異的に認識する抗体を用いてMAPキナーゼ・ファミリーのリン酸化を検討した (図3)。

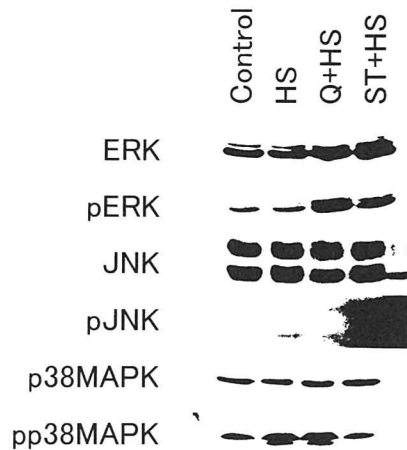


図3 MAPキナーゼ・ファミリーのウェスタン・ブロッティング
HS: 熱ショック, Q: ケルセチン, ST: スタウロスポリン

ERKには42kDaと44kDaのアイソフォームが存在するために2本のバンド検出される。ERKのリン酸化は熱ショック単独では変化しなかったが、100µMケルセチンが存在することにより増強された。JNKには46kDaと56kDaのアイソフォームが存在するために2本のバンド検出される。JNKは熱ショックによりリン酸化され、100µMケルセチンが存在することにより熱ショックによるJNKのリン酸化は抑制された。スタウロスポリンは熱ショックによるJNKリン酸化を抑制しなかった。p38MAPKのリン酸化は熱ショックによりわずかに増加した。p38MAPKのリン酸化は100µMケルセチンにより影響されなかったが、スタウロスポリンにより抑制された。

3-3 スタスミンのリン酸化に対するケルセチンの効果

スタスミンのリン酸化は2次元電気泳動法により分離されるスポットの移動により検討することができる²¹⁾。図4に示すスポット1が、リン酸化されていないスタスミンである (等電点5.6, 分子量19kDa)。

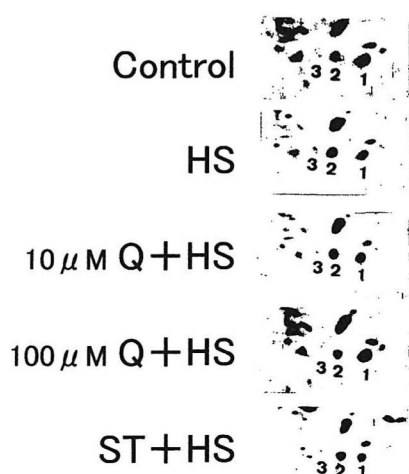


図4 スタスミンの2次元電気泳動像
HS:熱ショック, Q:ケルセチン, ST:スタウロスポリン

スポット2は、スタスミンが1ヶ所リン酸化されたために等電点が酸性側に移動したものである。スポット3は2ヶ所リン酸化されたスタスミンである。熱ショック(45°C, 30分間)により、スポット1が減少し、スポット2が著増、スポット3がわずかに増加している。このことは、熱ショックによりリン酸化されていないスタスミンの多くが1ヶ所リン酸化されたことを示している。10μMケルセチンはスタスミンのリン酸化を軽度抑制、100μMケルセチンはコントロールと同程度まで抑制した。スタウロスポリンは熱ショックによるスタスミンのリン酸化を抑制しなかった。

スタスミンは149個のアミノ酸からなる1本鎖のペプチドである。リン酸化部位として、セリン16, セリン25, セリン38, セリン63の4ヶ所が知られている²³⁾。今回、リン酸化されたセリン16, セリン25, セリン38に対する抗体を用いて、熱ショックによりどのセリンがリン酸化されるのか検討した。

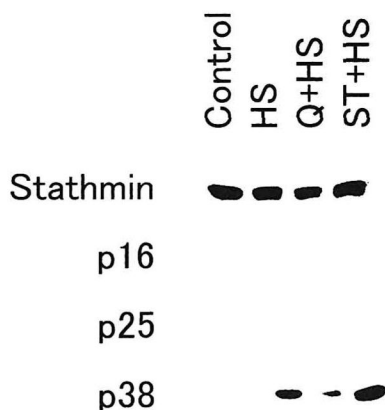


図5 スタスミンおよびリン酸化スタスミンのウェスタン・ブロッティング
HS:熱ショック, Q:ケルセチン, ST:スタウロスポリン
p16, p21, p38はそれぞれ, セリン16, セリン25, セリン38のリン酸化を表す。

図5に示すように、熱ショックはセリン38を特異的にリン酸化し、ケルセチンはそれを抑制した。スタウロスポリンは熱ショックによるセリン38のリン酸化を抑制しなかった。

4. 考察

HSPの発現は、HSP遺伝子のプロモーター領域に存在するHSE (Heat Shock Element) に特異的に結合して転写を促進する転写因子HSF (Heat Shock Factor) によって調節されている²⁾。HSFは不活性型として細胞質に存在しているが、熱ショックなどストレスによりリン酸化されることにより活性型となり、核内に移行して3量体となって、HSEに結合する⁴⁻⁶⁾。一方、HSFは多くのリン酸化部位を持ち、ERKによりリン酸化されると、その転写活性が低下するという報告がある²²⁾。ケルセチンによりHSP70の発現が抑制されたのは、熱ショックにより活性化され、HSFをリン酸化し活性型にするプロテイン・キナーゼをケルセチンが抑制したか、あるいはケルセチンの存在下で活性化されたERKがHSFをリン酸化し不活性化した可能性がある。

MAPKファミリーのERK, JNK, p38MAPKは、いずれも1本鎖のペプチドよりなるセリン・スレオニン・プロテイン・キナーゼであり、1つのアミノ酸は喜んで隣り合うスレオニンとチロシンがリン酸化されることにより活性化される特徴がある⁹⁾。ERK, JNK, p38MAPKをそれぞれ特異的にリン酸化して活性化するDual specificなMAPキナーゼ・キナーゼ、さらにその上流のMAPキナーゼ・キナーゼ・キナーゼの存在が知られており、特徴的なリン酸化カスケードを構成している。ERKは、主に増殖因子など細胞外からの生理的な刺激により活性化され、細胞の増殖に関与している。JNKは紫外線などのストレスで活性化され、転写因子であるJunのN端をリン酸化することにより特定の遺伝子の発現を調節する。p38MAPKは浸透圧などのストレスにより活性化されることが知られている。ケルセチンは、熱ショックによるJNKのリン酸化を抑制したことから、MAPキナーゼ・ファミリーのうちJNKのリン酸化にいたるリン酸化カスケードを特異的に抑制すると思われる。

スタスミンは19kDaの細胞質可溶性蛋白質である。ホルモン、サイトカイン、細胞接着など様々な細胞外からの刺激によりリン酸化される。スタスミンには4箇所(セリン16, セリン25, セリン38, セリン63)のリン

ン酸化部位があり²³⁾、これらをリン酸化するプロテイン・キナーゼとしてプロテイン・キナーゼA, プロテイン・キナーゼC, Ca-カルモデュリン依存性プロテイン・キナーゼ, ERK, CDK2などが報告されている^{23~28)}。我々は、熱ショックがスタスミンのリン酸化を引き起こすことを報告してきた²¹⁾。今回の結果より、熱ショックによりリン酸化される部位はセリン38であること、ケルセチンは熱ショックによるセリン38のリン酸化を抑制することが明らかになった。また、プロテイン・キナーゼCの阻害剤であるスタウロスポリンは、熱ショックによるスタスミンのセリン38のリン酸化を抑制しないことから、熱ショックによるスタスミンのリン酸化にはプロテイン・キナーゼCは関与しないと考えられた。図には示さないが、プロテイン・キナーゼCとERKの活性化剤であるPhorbol 12-myristate 13-acetateによるスタスミンのリン酸化は、スタウロスポリンにより抑制されたが、ケルセチンにより抑制されなかった。

以上、Jurkat細胞の熱ショック応答について、HSP70の発現、MAPキナーゼ・ファミリーのリン酸化、およびスタスミンのリン酸化を指標として、ケルセチンの効果を検討した結果、ケルセチンは様々な熱ショック応答を広く抑制することが示された。熱ショックにより多くのプロテイン・キナーゼが活性化されることが知られているが、それぞれのプロテイン・キナーゼの活性化にたる細胞内情報伝達機構は十分解明されていない。今回の結果は、ケルセチンが細胞のストレス応答を広く抑制することから、ケルセチンが個々の要素に個別に働くと考えるよりも、熱ショックを感知し、ストレス応答を引き起こすリン酸化カスケードの上流に作用する可能性を示した。このことは、ケルセチンが、細胞のストレス応答の機序を研究する上で有用なプローブになる可能性を示唆している。

本研究に際してご助言いただいた、山口大学医学部生化学第一講座中村和行教授に感謝いたします。実験の遂行にご協力いただいた平成11年度卒論生の木村祥子、坂本真由美、西岡千恵、馬場智子の諸氏に感謝いたします。本研究の一部は、第50回日本電気泳動学会（平成11年11月18~19日、宇部）で発表した。本研究は平成11年度山口県立大学大学院研究助成金の交付を受けた。

5. 文献

- 1) V.Y. Alexandrov, *Int. Rev. Cytol.* 148, 171 (1994)
- 2) V. Legagneux, M-F. Dubois, M. Morange, and O. Bensaude, *FEBS lett.* 231, 417 (1988)
- 3) J.N. Lavoie, H. Lambert, E. Hickey, L.A. Weber, and J. Landry, *Mol. Cell. Biol.* 15, 505 (1995)
- 4) D. Kim, H. Ouyang, and G.C. Li, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 2130 (1995)
- 5) A. Hoj, and B.K. Jakobsen, *EMBO J.* 13, 2617 (1994)
- 6) J.J. Cotto, M. Kline, and R.I. Morimoto, *J. Biol. Chem.* 271, 3355 (1996)
- 7) R.F. Duncan, and J.W.B. Hershey, *J. Cell. Biol.* 109, 1467 (1989)
- 8) 末永俊郎：社会心理学研究入門。東京大学出版会，pp.212-214,1988.
- 8) A. Venetianer, M-F. Dubois, V.T. Nguyen, S-J. Seo, and O. Bensaude, *Eur. J. Biochem.* 233, 83 (1995)
- 9) E. Cano and L.C. Mahadevan, *TIBS*, 20, 117 (1995)
- 10) P. Bendinelli, R. Piccoletti, P. Maroni, and A. Bernelli-Zazzera, *Biochem. Biophys. Res Commun.* 216, 54, (1995)
- 11) M.F. Dubois and O. Bensaude, *FEBS lett.* 324, 191 (1993)
- 12) D. Stokoe, K. Engel, D.G. Campbell, P. Cohen, and M. Gaestel, *FEBS lett.* 313, 307 (1992)
- 13) J.H. Kim, S.H. Kim, A.A. Alfieri, and C. W. Young, *Cancer Res.* 44, 102 (1984)
- 14) E.M. Suolinna, R.N. Buchsbaum, and E. Racker, *Cancer Res.* 35, 1865 (1975)
- 15) Y. Graziani and R. Chayoth, *Biochem. Pharmacol.* 28, 397 (1979)
- 16) Y. Graziani, R. Chayoth, N. Kamy, B. Feldman, and J. Levy, *Biochim. Biophys. Acta.* 714, 415 (1981)
- 17) Y. Kuriki and E. Racker, *Biochemistry* 15, 4951 (1976)
- 18) Y. Nagasaka and K. Nakamura, *Biochem. Pharmacol.* 56, 1151 (1998)
- 19) U.K. Laemmli, *Nature* 227, 680 (1970)

- 20) P.H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* 250, 4007 (1975)
- 21) M. Fujimoto, Y. Nagasaka, T. Tanaka, and K. Nakamura, *Electrophoresis* 19, 2515 (1998)
- 22) B. Chu, F. Soncin, and B.D. Price, *J. Biol. Chem.* 271, 30847 (1996)
- 23) L. Beretta, T. Dobransky, A. Sobel, *J. Biol. Chem.* 268, 20076 (1993)
- 24) L. Beretta, M.F. Dubois, A. Sobel, and O. Bensaude, *Eur. J. Biochem.* 227, 388 (1995)
- 25) U. Marklund, G. Brattsand, V. Shingler, and M. Gullberg, *J. Biol. Chem.* 268, 15039 (1993)
- 26) U. Marklund, G. Brattsand, O. Osterman, P. I. Ohlsson, and M. Gullberg, *J. Biol. Chem.* 268, 25671 (1993)
- 23) G. Brattsand, U. Marklund, K. Nylander, G. Roos, and M. Gullberg, *Eur. J. Biochem.* 220, 359 (1994)
- 23) H.M. Gradin, N. Larsson, and U. Marklund, and M. Gullberg, *J. Cell. Biol.* 140, 131 (1998)