

マウスにおける25kDa熱ショックmRNAの発現と細胞局在

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 若山, 友彦 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9372

マウスにおける25kDa熱ショック蛋白質 mRNA の発現と細胞局在

金沢大学医学部医学科解剖学第一講座 (主任: 井関尚一教授)

若山友彦

25kDa熱ショック蛋白質 (25kDa heat-shock protein, Hsp25) は、低分子量熱ショック蛋白質ファミリーの一員であるが、その機能についてはよくわかっていない。本研究では、マウスの全身の器官・組織について、特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロット法と遺伝子組織化学法を行い、生理的条件下、すなわち非ストレス下におけるマウス Hsp25 mRNA の発現と細胞局在を検討した。器官・組織レベルでは、Hsp25 mRNA は食道、皮膚、眼球、胃、肺、膀胱において高度に発現し、心臓、骨格筋、大動脈、副腎、卵巣、精巣、子宮、大腸、胸腺において中等度に発現していた。細胞レベルでは、平滑筋、心筋および骨格筋の筋細胞や、重層扁平上皮、移行上皮、卵管上皮の上皮細胞や、副腎皮質、黄体のステロイド内分泌細胞および精細管の精母細胞に Hsp25 mRNA の局在が認められた。対照的に、神経組織、リンパ系組織、消化管の円柱上皮、肝臓、膵臓、腎臓の実質細胞には、ほとんど Hsp25 mRNA は発現していなかった。これらの結果は、生理的条件下のマウスにおいて、Hsp25 がいくつかの重要な役割を果たすことを示唆した。

Key words heat-shock protein, Hsp25, mouse, Northern hybridization, *in situ* hybridization

原核生物からヒトにいたる多くの生物は、温度上昇をはじめアルコール、重金属などによる種々の生理的ストレスに反応して熱ショック蛋白質 (heat-shock protein, Hsp) を産生する。Hsp は種を通じて高度に保存された蛋白質であり、いくつかのファミリーに分類される。Hsp の主な役割は、こうしたストレスによって引き起こされる細胞内の蛋白質の凝集を阻止することにより細胞を保護することであると考えられている^{1)~3)}。しかしながら、たいいてい熱ショック蛋白質は、ストレスに反応して増加するだけでなく、生理的条件下においても構成的に発現している⁴⁾。マウス Hsp25 は、ヒトやラットで Hsp27 ないし Hsp28 と呼ばれる蛋白質のホモログであり、低分子量 (20~30kDa) 熱ショック蛋白質ファミリーの一員である⁵⁾。本論文においては、各動物種のホモログを総称して Hsp25 とする。Hsp25 はヒトの乳ガン細胞の細胞質から分子量 2万4千の蛋白質として初めて発見された⁶⁾。Hickey ら⁷⁾により初めてヒト Hsp25 遺伝子の塩基配列が報告され、それより遅れてマウス Hsp25 遺伝子の塩基配列も報告された^{8)~10)}。正常成獣動物において、ウエスタンブロット法や免疫組織化学法による研究から、骨格筋、心臓、大動脈、胃、腸管、肺、膀胱、眼球を含む様々な器官・組織に Hsp25 が存在することが報告されている^{11)~14)}。一方、生理的条件下における Hsp25 mRNA の発現と局在を報告したものはない。本研究において、正常成獣マウスの全身の Hsp25 mRNA の発現と細胞局在について、ノーザンブロット法と遺伝子組織化学法 (*in situ* hybridization, ISH) により解析し報告する。

材料および方法

I. 実験動物および組織の調整

動物は、8週齢の体重約35gの雌雄 ddY マウス (日本 SLC, 浜

松) を購入し、通常の実験室条件下で固形試料および水を自由に摂取させた。各マウスについて、50mg/kg 体重のペントバルビタールを腹腔内に注射し、麻酔下において右心房を切開し、左心室より全身に4℃の生理食塩水を灌流し脱血させた。ノーザンブロット法のために、脳、眼球、皮膚、顎下腺、心臓、大動脈、肺、胸腺、食道、胃、小腸、大腸、肝臓、膵臓、脾臓、腎臓、副腎、膀胱、精巣、骨格筋を5匹の雄マウスより採取し、卵巣と子宮を5匹の雌マウスより採取した。採取した22種類の器官・組織は、直ちに液体窒素により凍結し、RNA を抽出するまで-80℃で保存した。ISHのために、それぞれ雌雄5匹のマウスを4℃の生理食塩水で灌流後、4℃の4%パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.2) で灌流固定した。ノーザンブロット法の場合と同じ器官・組織を採取後、さらに4%パラホルムアルデヒド/0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.2) により4℃で4時間浸漬固定を追加した。固定後、4℃で一晩30%しょ糖を含んだ0.1 M リン酸緩衝液 (pH7.2) で置換した。

II. プローブ

ノーザンブロット法と ISH のため、合成オリゴヌクレオチドプローブを用いた。マウス Hsp25 cDNA^{9)~10)} に相補的な異なる2カ所のオリゴヌクレオチドを合成し、プローブとした (日本バイオサービス, 埼玉)。それぞれの塩基配列は、5'AAGAAGGGCACGCGGCGCTCGGTCATGTTC3' (#1, 30塩基) と5'GTATTTCCGGGTGAAGCACCGAGAGATGTAGCCGA3' (#2, 35塩基) とした。また対照実験のため、それぞれのプローブと相補的な配列を合成してセンスプローブとした。各オリゴヌクレオチドプローブは、ターミナルデオキシヌクレオチドトランスフェラーゼ (BRL, Gaithersburg, USA) を用いた3'末端標識法により、[α -³²P]dCTP (222 Tbq/mmol, Du Pont,

平成9年11月26日受付, 平成10年1月8日受理

Abbreviations: Hsp, heat shock protein; ISH, *in situ* hybridization

Wilmington, USA) で標識してノーザンブロット法に用い、また、 $[\alpha\text{-thio-}^{35}\text{S}]$ dATP (46.3Tbq/mmol, Du Pont, Wilmington, USA) で標識して ISH に用いた。各プローブとも、 $2\sim 3 \times 10^6$ cpm/ μg の特異的放射活性をもつこと確認した。

Ⅲ. ノーザンブロット法

凍結した各器官・組織サンプルから酸性グアニジン/フェノール/クロロフォルム法¹⁵⁾により総 RNA を抽出した。それぞれ $20\mu\text{g}$ の総 RNA は、Thomas の方法¹⁶⁾に従ってグリオキサールにより変性し、 100ng/ml の濃度の臭化エチジウムを含んだ 1% アガロースゲルにより電気泳動を行った。RNA マーカーとして、RNA ラダー (BRL, Gaithersburg, USA) を用いた。電気泳動後、UV イルミネーターにより各サンプルの rRNA の位置を確認した。引き続き RNA をアガロースゲルからナイロンメンブレン (Pall BioSupport, New York, USA) に一晩転写し、UV ストラタリナー 1800 (Stratagene, California, USA) を用いて 120 ミリジュールの波長 254nm の紫外線を照射してメンブレンに固着させた。このメンブレンについて、1M 塩化ナトリウム、50mM Tris-HCl 緩衝液 (pH7.5)、 $10\times$ デンハルト溶液 ($1\times$ デンハルト溶液は、0.02% ポリビニルピロリドン、0.02% フェイコール、0.02% ウシ血清アルブミン)、0.1% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、10mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA)、 $250\mu\text{g/ml}$ 熱変性サケ精子 DNA からなるプレハイブリダイゼーション溶液を用いて、 55°C で 2 時間のプレハイブリダイゼーションを行った。続いて、プレハイブリダイゼーション溶液に熱変性した ^{32}P 標識プローブを加え、 55°C で 16~24 時間のハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション後、メンブレンを $6\times$ SSC ($1\times$ SSC は 0.15M 塩化ナトリウム、 0.015M クエン酸ナトリウム) により室温で 10 分間 2 回洗浄し、ついで、0.1% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウムを含む $6\times$ SSC により 55°C で 15 分間 2 回洗浄した。洗浄後、X 線フィルム (Kodak, New York, USA) を用いて -80°C で 48 時間の感光を行った。

Ⅲ. ISH

^{35}S 標識したオリゴヌクレオチドプローブを用いて組織切片のハイブリダイゼーションを行った¹⁷⁾。雌雄それぞれ 5 匹のマウスより採取した組織片をクリオスタットにより $14\mu\text{m}$ の厚さで薄切し、ゼラチンを塗布したスライドガラス上に貼付した。風乾後の切片は、4% パラホルムアルデヒド/ 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.2) で 15 分間の後固定を行い、 2mg/ml のグリシンを含んだリン酸緩衝生理食塩水 (phosphate buffered saline, PBS) で洗浄し、0.25% 無水酢酸を含んだ 0.1M 四エタノールアミンでアセチル化した後、プレハイブリダイゼーションを室温で 2 時間行った。プレハイブリダイゼーション溶液は、50% 脱イオン化ホルムアミド、 $4\times$ SSC、 0.1M リン酸緩衝液 (pH7.2)、 $1\times$ デンハルト溶液、2% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウム、 20mM 2-メルカプトエタノール、 $250\mu\text{g/ml}$ 熱変性サケ精子 DNA からなるものを用いた。プレハイブリダイゼーション後、 $2\times$ SSC で洗浄し、エタノールで脱水して風乾した。その後、スライドガラス当たり $100\mu\text{l}$ のプレハイブリダイゼーション溶液に 1.0×10^6 cpm の ^{35}S 標識したプローブを加えて、ハイブリダイゼーションを行った。また同時に、2 種類の陰性対照実験を行った。1 つは、センスプローブを標識して同様にハイブリダイゼーションを行い、もう 1 つは、標識したアンチセンスプローブに対して 200 倍の未標識アンチセンスプローブを加えることにより競合阻害をさせてハイブリダイゼーションを行った。 37°C で 16 時間反応後、スライドガラスを、0.1% N-ラウリルサルコシン酸ナトリウムを含んだ $0.3\times$ SSC により 37°C で 1 時間ずつ 3 回、合計 3 時間洗浄した。洗浄後、 0.3M 酢酸アンモニウムを含んだエタノールで脱水、風乾した。スライドガラスを風乾した後、乳剤 NTB-2 (Kodak) を切片の表面に塗り、 4°C で 2 週間の感光を行った。感光後、現像液 D19 (Kodak) で現像し、ヘマトキシリン・エオジンで染色した。標本の観察は、明視野と暗視野の条件で光学顕微鏡 BH-2 (オリンパス、東京) により行った。

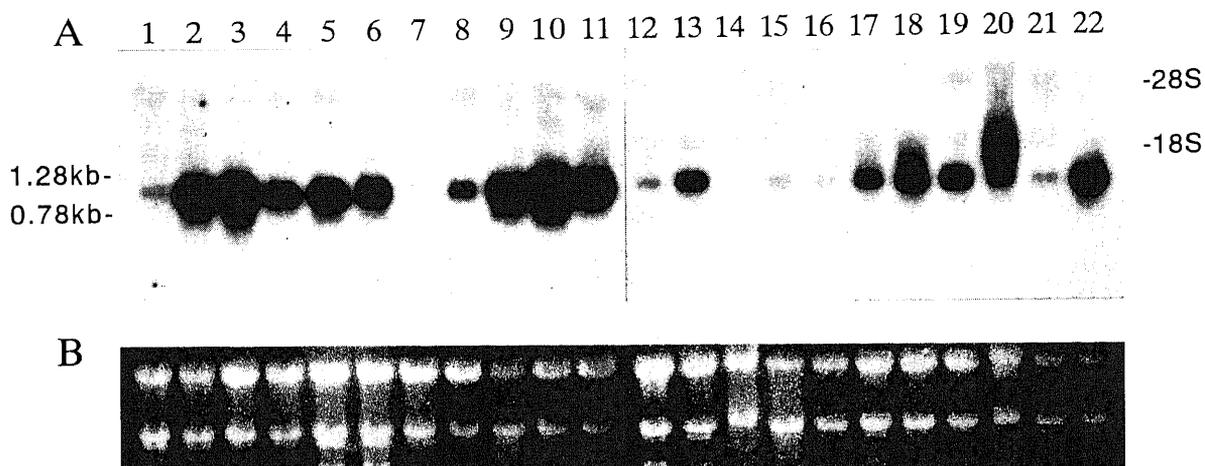


Fig. 1. Northern blotting analysis of the expression of Hsp25 mRNA in the mouse organs. (A) Total RNA samples from the brain (lane 1), eye (2), skin (3), skeletal muscle (4), heart (5), aorta (6), spleen (7), thymus (8), lung (9), esophagus (10), stomach (11), small intestine (12), large intestine (13), liver (14), pancreas (15), submandibular gland (16), testis (17), ovary (18), uterus (19), adrenal gland (20), kidney (21), and urinary bladder (22) were electrophoresed, blotted onto nylon membrane and hybridized with ^{32}P -labeled Hsp25 probe #1. The standard RNA sizes (kb) and the positions of 28S and 18S ribosomal RNAs are indicated. (B) Fluorescence of the total RNA samples stained with ethidium bromide. Analysis with probe #2 provided essentially the same result.

成 績

I. ノーザンプロット法

ノーザンプロット法によるハイブリダイゼーションにおいて、 ^{32}P で標識した2種類のHsp25オリゴヌクレオチドプローブ(#1, #2)はマウスRNAサンプルと反応し、ともに約900塩基の単一バンドが得られた(#1の結果を図1に示す)。これは報告されたマウスHsp25 mRNAの塩基長と一致し、実験に用いた2種類のプローブの特異性が示された。実験に用いた22の異なった器官と組織のうちで、食道にHsp25 mRNAが最も高く発現していた。比較的高い発現が、皮膚、眼球、胃、肺、膀胱に認められた。中等度のmRNAの発現は、心臓、骨格筋、大動脈、副腎、卵巣、精巣、子宮、大腸および胸腺に認められた。一方、脳、小腸、腎臓ではHsp25 mRNAの発現は低く、脾臓、肝臓、膵臓、顎下腺にはほとんど発現していなかった。

II. ISH

ノーザンプロット法の場合と同一のオリゴヌクレオチドプローブを用いてISHを行った。以下に記述するように、様々なマウスの器官と組織において、オートラジオグラフィーの銀粒子として示されるHsp25 mRNAのシグナルの細胞局在を検討した。Hsp25 mRNAの異なる2カ所に対するプローブ(#1と#2)によるISHの結果は同一であった。さらに、標識したセンスプローブを用いた陰性対照実験と過剰量の未標識アンチセンスプローブを加えて競合阻害させた陰性対照実験のいずれにおいても反応は陰性であり、2種類のアンチセンスプローブの特異性が確認された。したがって、本論文においてはプローブ#1によるISHの結果と過剰量の未標識プローブを加えた競合阻害の対照実験の結果について報告する。

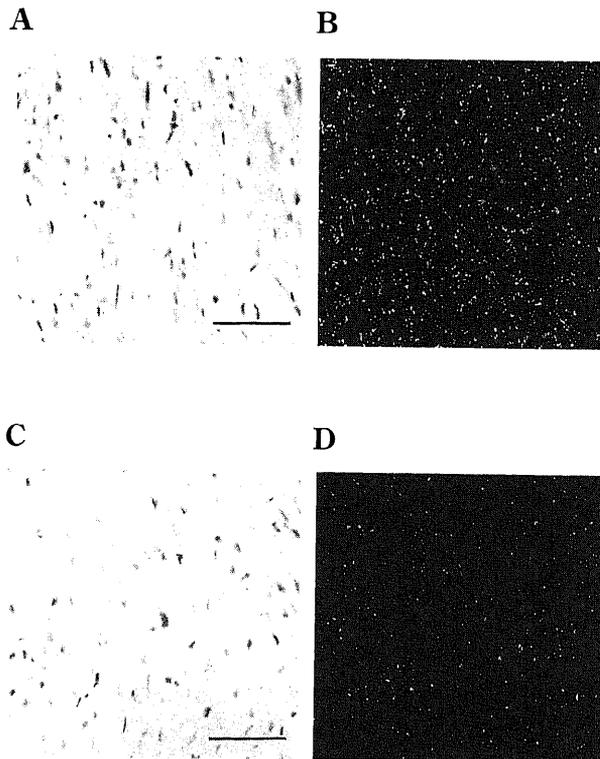


Fig. 2. Microscopic autoradiograms in bright field (A, C) and dark field (B, D) showing in situ hybridization of mouse heart with ^{35}S -labeled Hsp25 probe #1 in the absence (A, B) and presence (C, D) of a 200-fold excess of unlabeled probe. (A, B) The silver grains representing Hsp25 mRNA signal are distributed over all heart muscle cells. (C, D) The control section shows a markedly reduced number of silver grains. Bar = 50 μm .

ローブを加えて競合阻害させた陰性対照実験のいずれにおいても反応は陰性であり、2種類のアンチセンスプローブの特異性が確認された。したがって、本論文においてはプローブ#1によるISHの結果と過剰量の未標識プローブを加えた競合阻害の対照実験の結果について報告する。

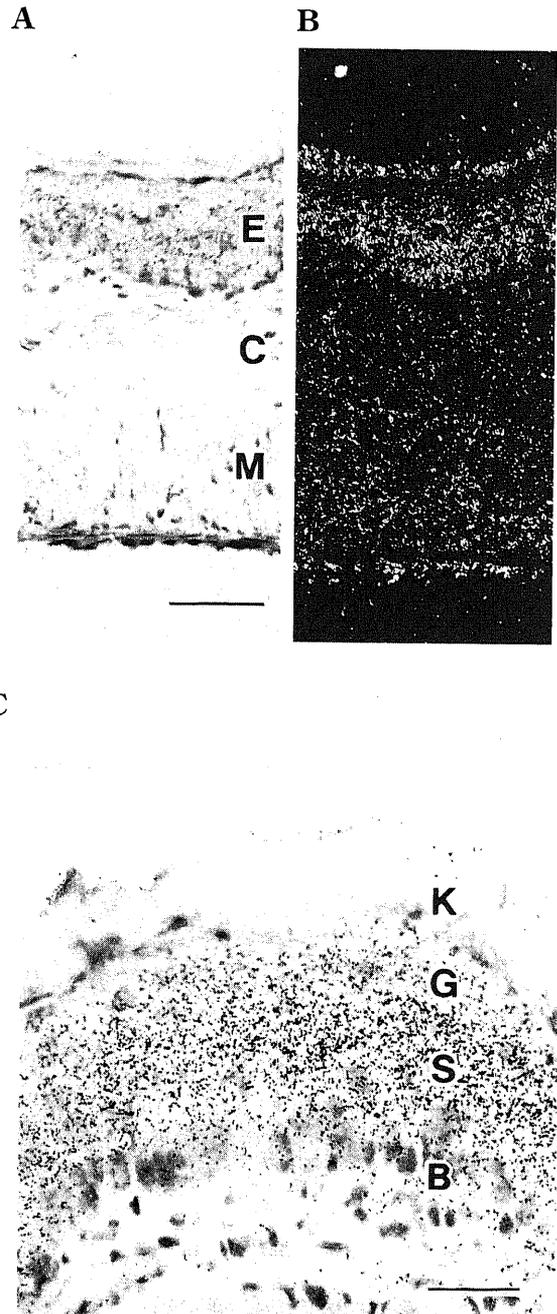


Fig. 3. Expression of Hsp25 mRNA in the forestomach shown in bright field (A, C) and dark field (B). (A, B) The signal for Hsp25 mRNA is located in the stratified squamous epithelium (E) and in the smooth muscle layer (M), whereas the connective tissue components (C) have no signal. Bar = 50 μm . (C) Higher magnification of the keratinized stratified squamous epithelium of forestomach. The cells of spinous (S) and granular (G) layers show an intense signal but those in the basal (B) and keratinized (K) layers are free of the signal. Bar = 25 μm .

1. 心臓

³⁵S標識Hsp25 アンチセンスプローブを用いたハイブリダイゼーションにより、心筋細胞全体にわたって強いHsp25 mRNAシグナルを示す銀粒子が認められた (図2A, B)。陰性対照の切片では、銀粒子の数が著明に減少し、スライドガラスのガラス面に非特異的に見られる銀粒子と同程度の密度となり、バックグラウンドのシグナルを示すものとみなされた (図2C, D)。

2. 骨格筋

中等度の強さのHsp25 mRNAシグナルが、骨格筋に認められた。シグナルは骨格筋細胞全体に均一に分布していた。また、それぞれの骨格筋細胞間でのシグナルの強さの違いは認められなかった (写真は示さない)。

3. 食道と胃

Hsp25 mRNAの強いシグナルは、食道の骨格筋層と重層扁平上皮層に認められた。一方、粘膜層や粘膜下層の結合組織成分には、バックグラウンド以上の強さのシグナルは認められなかった。

マウスの胃は、前胃部、胃体部、胃幽門部からなる。前胃部の上皮は食道の上皮と同様に、角化した重層扁平上皮からなる。前胃部において、Hsp25 mRNAシグナルは重層扁平上皮層の中で有棘層と顆粒層の細胞に見られ、基底層と角化層の細胞にはほとんど認められなかった (図3A, B)。筋層ではシグナルは平滑筋細胞全体に分布していた。一方、粘膜層や粘膜下層の結合組織成分には食道と同様にシグナルは認められなかった。また、胃体部と胃幽門部において、Hsp25 mRNAシグナルは平滑筋層

に強く認められたが、一方、表層の上皮、胃小窩の上皮、腺上皮を含めて円柱上皮細胞にはほとんど認められなかった。

4. 皮膚

強いHsp25 mRNAシグナルが、表皮と毛包の重層扁平上皮に認められた。一方、真皮層と皮下組織にはシグナルはほとんど認められなかった (写真は示さない)。

5. 膀胱

膀胱の粘膜は移行上皮をもつが、移行上皮細胞のすべてに強いHsp25 mRNAのシグナルが認められた (図4)。また、平滑筋細胞にも mRNAシグナルが見られたが、結合組織成分には mRNAシグナルは認められなかった。

6. 腸管

小腸と大腸を通じて、平滑筋細胞にのみHsp25 mRNAのシグナルが認められた。一方、円柱上皮と結合組織成分にはシグナルは認められなかった (図5)。

7. 副腎

Hsp25 mRNAシグナルは、副腎皮質と髄質の両方に認められたが、より皮質の方に強かった (図6)。副腎皮質において、mRNAシグナルは球状層よりも束状層と網状層の細胞に強く発現していた。また、副腎髄質では、弱いながらもシグナルがびまん性に認められた。

8. 卵巣と卵管

Hsp25 mRNAシグナルは、卵巣の黄体の細胞に中等度の強さで認められた。一方、卵胞の顆粒膜や卵胞膜の細胞にはバック

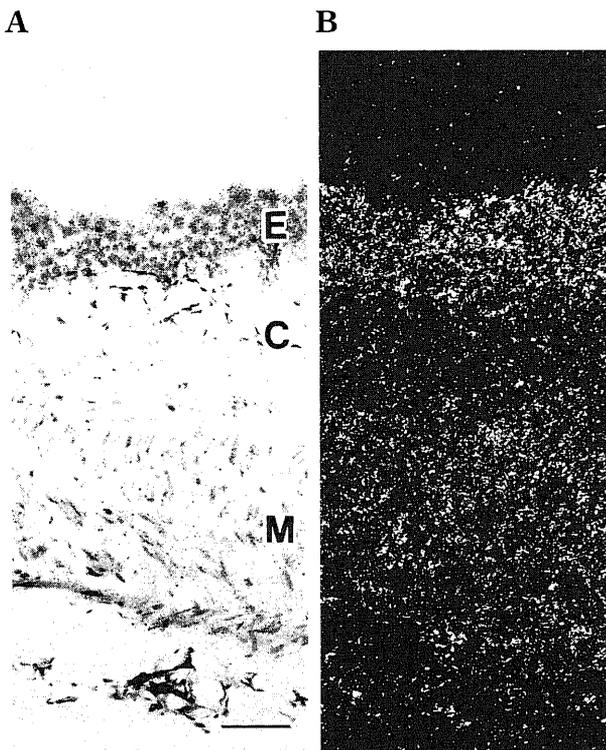


Fig. 4. Expression of Hsp25 mRNA in the urinary bladder shown in bright field (A) and dark field (B). The signal is localized in the transitional epithelial cells throughout the thickness of epithelium (E) as well as in the smooth muscle cells (M), whereas the connective tissue components (C) have little signal. Bar = 50 μ m.

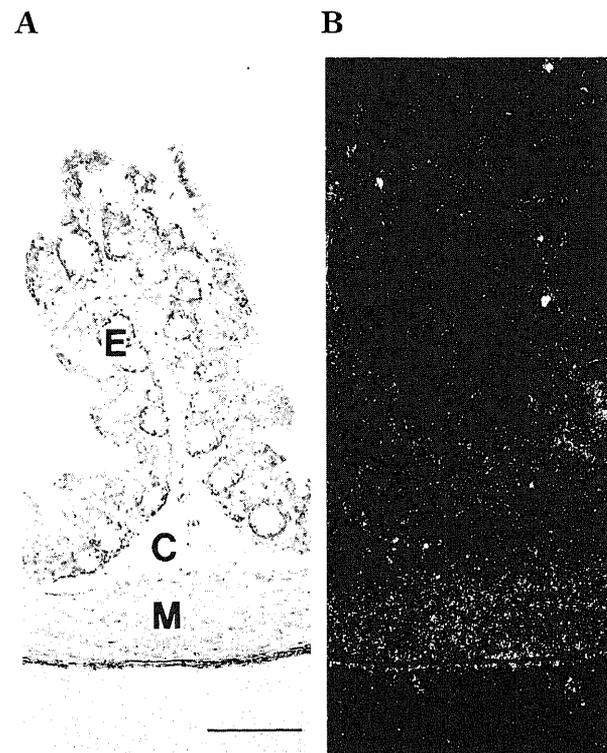


Fig. 5. Expression of Hsp25 mRNA in the large intestine shown in bright field (A) and dark field (B). The smooth muscle cells (M) have a high level of Hsp25 expression, whereas the columnar epithelial cells (E) and connective tissue components (C) are free of the signal. Bar = 100 μ m.

グランド以上のシグナルは認められなかった (図7AとB). 卵管の粘膜の上皮細胞には, 中等度の強さのHsp25 mRNAシグナルが認められた (図7CとD).

9. 精巣

精細管の部分によってHsp25 mRNAの発現量に違いがあり, 精子発生の特定のステージの精細管により強いmRNAシグナルが認められた (図8AとB). 精子原性細胞の構成にもとづいて, 最も強いシグナルの認められる精細管は, マウス精子発生におけるステージI-IIIとIX-XIの精細管であると判定された¹⁸⁾¹⁹⁾. ステージI-IIIにおいて, シグナルはパキテン早期の精母細胞に強く局在した (図8C). ステージIV-Vにおいて, パキテン中期の精母細胞のシグナルは, パキテン早期の精母細胞のシグナルよりも減弱していた (図8D). ステージVI-VIIIにおいて, パキテン後期の精母細胞のシグナルはさらに減弱していた (図8E). 一方, 精祖細胞から分化したプレレプトテン期の精母細胞にはバックグラウンドレベル以上のシグナルは認められなかったが, ステージVIIIあたりになって一部のレプトテン期に入ったと思われる精母細胞でシグナルが強くなった (図8F). ステージIX-XIにおいて, レプトテン, ジゴテン期の精母細胞に強いmRNA

シグナルが存在する一方で, パキテン後期の精母細胞にはほとんどシグナルが認められなかった (図8G). ステージXIIにおいて, 強いシグナルは, ジゴテンないしパキテン早期の精母細胞に優位に認められたが, 減数分裂中の細胞にはほとんどシグナルが見られなかった (図8H). 精子発生の各ステージを通じて, 精祖細胞, 精子細胞およびセルトリ細胞にはHsp25 mRNAのシグナルは認められなかった. また, ライディッヒ細胞にもシグナルは認められなかった. 以上のマウス精子発生ステージにおける各細胞でのHsp25 mRNAの発現の結果を表1にまとめた.

10. その他の器官・組織

脳・脊髄を含む神経組織, リンパ節・脾臓を含むリンパ性組織, 肝臓・顎下腺・膵臓・腎臓のような実質性器官の上皮組織, およびすべての結合組織にはバックグラウンド以上のHsp25 mRNAシグナルは認められなかった. 胸腺では弱いシグナルが

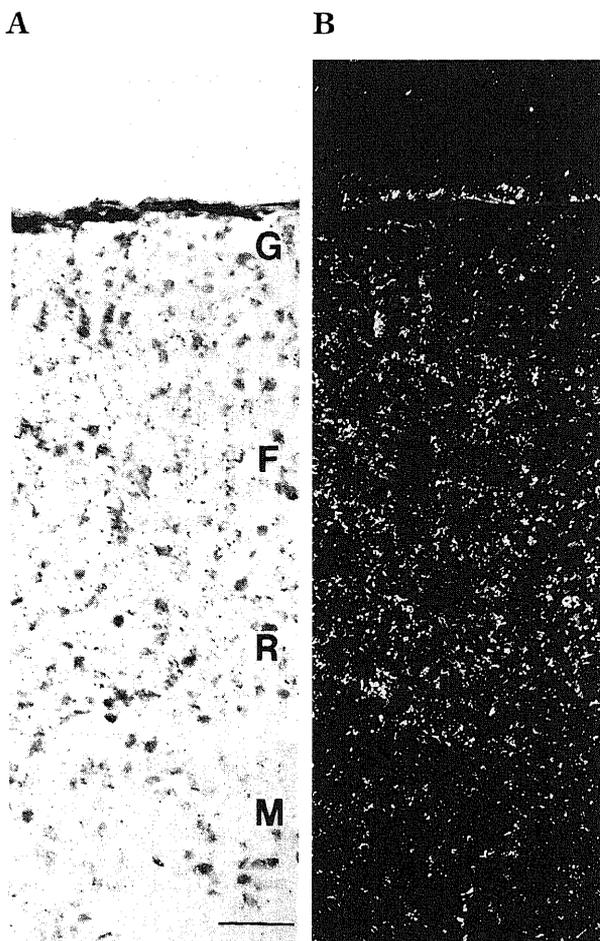


Fig. 6. Expression of Hsp25 mRNA in the adrenal gland shown in bright field (A) and dark field (B). The signal in the adrenal cortex is stronger than that in the adrenal medulla (M). Within the cortex, the signal is distributed more abundantly in the cells of fascicular (F) and reticular (R) zones than those of the glomerular (G) zone. Bar = 25 μ m.

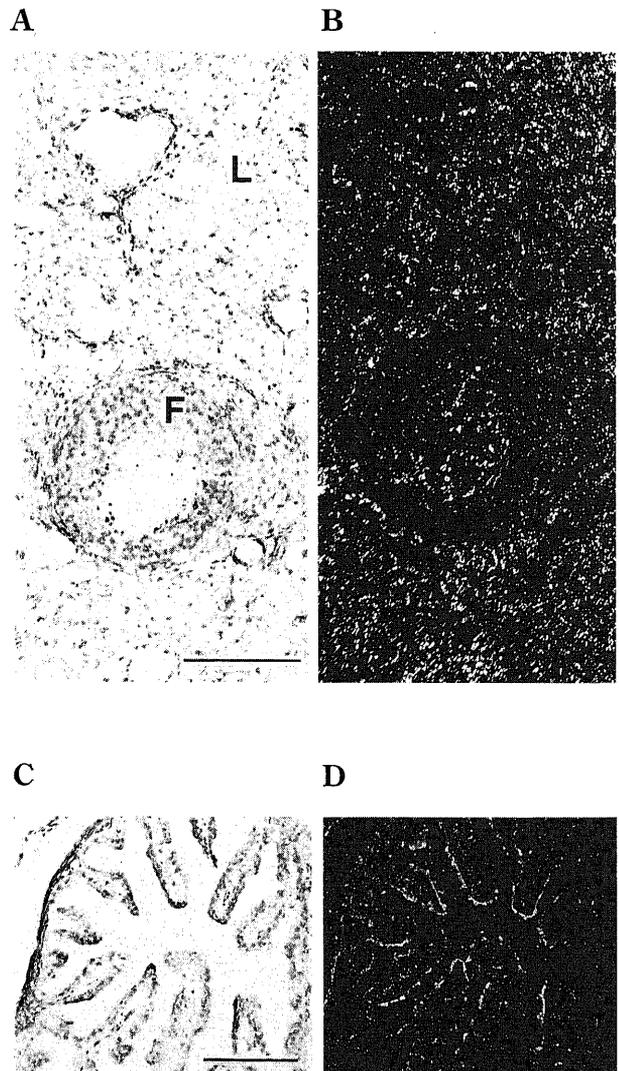


Fig. 7. Expression of Hsp25 mRNA in the ovary (A, B) and oviduct (C, D) shown in bright field (A, C) and dark field (B, D). (A, B) The signal is present in the cells of corpora lutea (L), whereas the granulosa cells of ovarian follicles (F) show no signal stronger than the background. Bar = 100 μ m. (C, D) The epithelial cells covering the mucosal surface of oviduct have a moderate level of signal. Bar = 100 μ m.

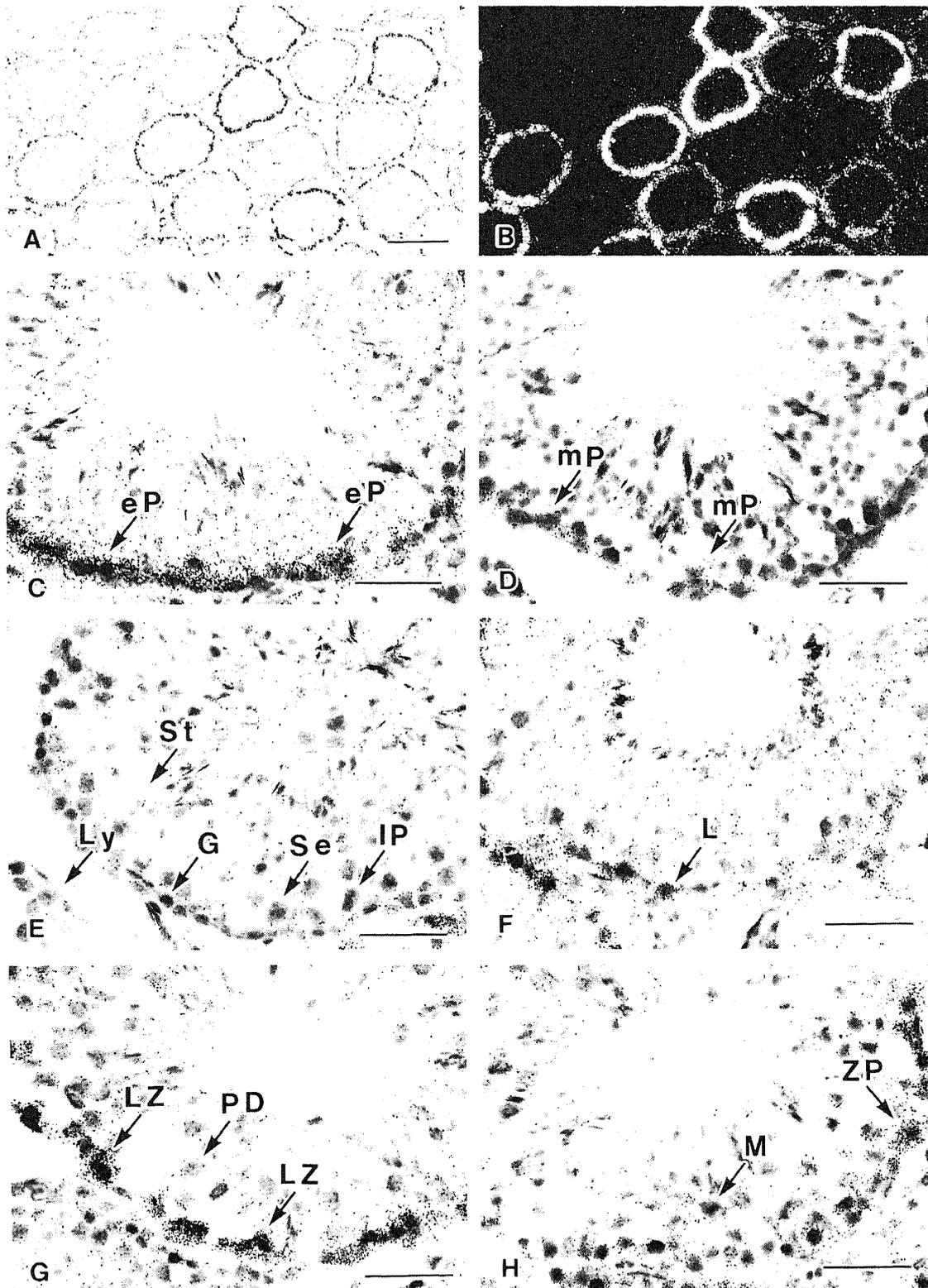


Fig. 8. Expression of Hsp25 mRNA in the testis shown in bright field (A, C, D, E, F, G and H) and dark field (B). (A, B) Various levels of signal are demonstrated in the seminiferous tubules. Bar = 150 μ m. (C) In the tubule at approximate stages I-III, the early pachytene spermatocytes (eP) have a strong signal. (D) In the tubule at approximate stages IV-V, the middle pachytene spermatocytes (mP) have a signal much weaker than that of the early pachytene spermatocytes. (E) In the tubule at approximate stages VI-VII, the late pachytene spermatocytes (IP) as well as spermatogonia (G), spermatids (St) and Sertoli cells (Se) show no appreciable levels of signal. The Leydig cells (Ly) are also devoid of the signal. (F) In the tubule at approximate stage VIII, the leptotene spermatocytes (L) have a moderate signal. (G) In the tubule at approximate stages IX-XI, the leptotene/zygotene spermatocytes (LZ) have a signal as strong as that of the early pachytene spermatocytes, whereas the late pachytene/diplotene spermatocytes (PD) have no signal. (H) In the tubule at approximate stage XII, the zygotene/early pachytene spermatocytes (ZP) have a strong signal, whereas the meiotic cells (M) have no signal. Bar = 25 μ m.

Table 1. Expression of mouse Hsp25 mRNA in the seminiferous epithelium

Cell type	Expression of mouse Hsp25				
	Stage of spermatogenesis in the mouse				
	I - III	IV - V	VI - VIII	IX - XI	XII
Spermatogonia	—	—	—	—	—
Spermatocytes					
Pre-leptotene	np	np	—	np	np
Leptotene	np	np	‡	np	np
Leptotene/zygotene	np	np	np	‡	np
Zygotene/early pachytene	np	np	np	np	‡
Early pachytene	‡	np	np	np	np
Middle pachytene	np	‡	np	np	np
Late pachytene	np	np	+	+	+
Diplotene/diakinesis	np	np	np	+	+
Spermatids	—	—	—	—	—
Sertoli cells	—	—	—	—	—

The relative intensity of the signal for mouse Hsp25 mRNA in each cell type present in each spermatogenic stage is arbitrarily expressed: —, negative; +, weakly positive; ‡, moderately positive; ‡, strongly positive; np, cell type not present.

びまん性に存在したが、特定の細胞への局在は判定できなかった。眼の水晶体では対照実験においても非特異的なプローブの吸着が著しく、シグナルの有無を判定できなかった。

考 察

Hspは大きく3つのグループ、すなわちHsp90 (80-90kDa), Hsp70 (68-75kDa), および低分子量Hsp (20-30kDa) に分けられる¹⁾。哺乳類の低分子量Hspファミリーの中で主要なものは、Hsp25と α B-クリスタリンである。Hsp90とHsp70ファミリーの分子機能については比較的よく理解されている。それらは細胞性ストレスにตอบสนองして発現が誘導されるだけでなく、多くの非ストレス状態の細胞においても発現していて、様々なペプチドおよび蛋白質に一時的に結合して蛋白質の会合および脱会合を仲介し細胞内輸送に関与する、いわゆる、分子シャペロンとして機能すると考えられる²⁰⁾。たとえば、Hsp70は新規に翻訳された蛋白質と複合体を形成し、その立体構造を変化させ、粗面小胞体やミトコンドリアのような細胞内小器官に移行させる²¹⁾²²⁾。また、Hsp90はステロイドホルモン受容体と複合体を形成し、その核への移行を阻害する²³⁾。一方、低分子量Hspの機能については、現在のところあまりよくわかっていない。試験管内において、Hsp25と α B-クリスタリンも分子シャペロンとして機能することが報告された²⁴⁾²⁵⁾。培養細胞を用いた実験系において、これらの低分子量Hspも熱ショックに対して反応し発現が誘導される²⁶⁾²⁷⁾。また、非ストレス下の組織における低分子量Hspの構成的発現は、ショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) においてはよく知られている²⁸⁾。一方、哺乳類においては、遺伝子レベルの発現の報告はないが、ウエスタンブロット法と免疫組織化学法により、マウスとラットの非ストレス下の組織におけるHsp25と α B-クリスタリンの分布についていくつかの研究が報告されている。すなわち、マウスの発生において、Hsp25と α B-クリスタリンは発達過程の神経系組織や眼球のほか、骨格筋、心筋、平滑筋の筋細胞に多く存在する¹²⁾。成獣マウスにおいて、Hsp25と α B-クリスタリ

ンは、眼球と心臓とともに多く存在する。Hsp25は α B-クリスタリンよりも広範な臓器・組織に分布している。多く存在する臓器は、胃、大腸、肺、膀胱であり、中等度に存在する臓器は、皮膚、小腸、精巣、卵巣、子宮である¹³⁾。ラットにおける研究では、Hsp25の免疫反応は、心筋や骨格筋の他に血管や管腔臓器の平滑筋に局在する¹⁴⁾。

本研究は、非ストレス下における成獣マウスのHsp25 mRNAの発現と細胞局在を全身において検討した初めての研究である。このうち筋組織におけるHsp25 mRNAの発現については、これまで報告された免疫組織化学の結果と一致する。しかしながら本研究により、骨格筋、心筋、平滑筋の筋細胞の他に、これまで報告されていない細胞種、すなわち重層扁平上皮細胞、移行上皮細胞、副腎皮質細胞、卵巣の黄体細胞、卵管の上皮細胞、精巣の精母細胞にHsp25mRNAが高度ないし中等度の発現をすることが明らかとなった。

筋組織において、心筋細胞と平滑筋細胞には骨格筋細胞よりHsp25 mRNAが多く局在している。ノーザンブロット解析で見られる、大動脈や肺のような血管豊富な器官および腸管や子宮のような管腔臓器でのHsp25 mRNAの発現は、平滑筋における発現と考えられる。筋細胞におけるHsp25の役割に関して、Hsp25がアクチンの重合に影響を与えるという報告がある。たとえば、七面鳥の平滑筋から分離抽出されたHsp25は、試験管内においてアクチンの重合を阻害する²⁹⁾。一方、Hsp25遺伝子を過剰発現させたチャイニーズハムスター線維芽細胞では、細胞膜直下の重合型(F)-アクチンが増加する³⁰⁾。さらに、Hsp25はCキナーゼを介する平滑筋の収縮において主としてリン酸化される蛋白質の1つとして同定されている³¹⁾。以上から推定すると、Hsp25はアクチン線維の構造を調節することにより、生理的な筋組織の機能に関与するものと考えられる。

本研究の注目すべき結果として、重層扁平上皮と移行上皮の細胞にHsp25 mRNAが多く局在することが明らかとなった。ノーザンブロット解析において皮膚、食道、胃や膀胱にHsp25 mRNAが強く発現しているのは、これらの器官が平滑筋細胞の

ほかに重層扁平上皮や移行上皮をもつためであろう。これらの上皮におけるHsp25の生理的な役割は、現在のところ不明である。一つの可能性として、低分子量Hspは、細胞の分化が終了した状態や最終分化が始まった時に発現するという報告がある。たとえば、Hsp25はヒトBリンパ球の最終分化の直前に、細胞の増殖の停止と一致して一過性に発現することが報告されている³⁰⁾。本研究において、Hsp25 mRNAの発現は、重層扁平上皮の基底層より上の細胞に強いが、基底細胞には認められない。このことは、Hsp25がケラチノサイトの分化と関連があることを示唆するかもしれない。しかしながら、腸管上皮にHsp25 mRNAが陰性であることから、細胞の増殖と分化だけでは重層扁平上皮のHsp25 mRNAの発現を説明できない。もう一つの可能性として、重層扁平上皮の基底層より上の細胞は基底膜から離れて存在しているので、酸素や栄養の供給が基底細胞に比べて徐々に減少してしまう。そこで細胞内の蛋白質成分が細胞死を防ぐためにHsp25の分子シャペロンとしての機能を必要とすることが考えられる。さらに有力な可能性として、Hsp25が重層扁平上皮細胞の細胞骨格に作用することも考えられる。ケラチノサイトの最終分化において、ケラチンフィラメントだけでなく、微小管やアクチンフィラメントのような細胞骨格成分の発現量や分布に大きな変化が生じると考えられている³⁰⁾。したがって、筋細胞で議論したように、Hsp25はケラチノサイトの分化過程において細胞骨格の再構成に関わっている可能性がある。次に、移行上皮は、基底細胞層、中間層および表層の細胞からなる。重層扁平上皮と異なり、移行上皮においては、基底層の細胞だけでなく中間層と表層の細胞、あるいは少なくとも中間層の細胞が基底膜と直接接触している³⁰⁾。本研究において、Hsp25 mRNAは移行上皮の全層にわたって認められる。それゆえ、この上皮におけるHsp25の発現は、酸素と栄養の供給との関連よりむしろ、たとえば膀胱の膨張と収縮にもなって生じるような、上皮細胞の形態、張力および細胞間接着の著しい変化に関連して発現している可能性がある。つまり、アクチンフィラメントは移行上皮にも多量に認められ³⁰⁾、細胞の形態、張力や接着の調節に重要な役割をもつと考えられている³⁰⁾。今回の結果はHsp25の機能と移行上皮の細胞骨格との関連で説明できるかもしれない。

本研究において、Hsp25 mRNAが副腎皮質に局在することが初めて示された。副腎皮質のうち、mRNAが多く発現しているのは球状層よりもむしろ束状層と網状層であり、この層の細胞は副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotrophic hormone, ACTH) の調節を受ける。拘束によるストレスが副腎のHsp70とHsp25の発現を誘導すること、この発現がACTHを介して生じることが報告されている³⁰⁾。本研究の結果は、非ストレス下においても副腎皮質のHsp25がACTHに依存して機能していることを示唆する。一方、卵巣の黄体にも中等度のHsp25 mRNAの発現がみられることは、Hsp25が、ゴナドトロピンにより調節される卵巣の機能に関与していることを示唆している。

Hsp25はエストロゲンで刺激されたヒトの乳癌細胞株から最初に単離され、続いてエストロゲンおよびプロゲステロン受容体を発現する細胞に発現することが報告された⁷⁾³⁰⁾。グルココルチコイド受容体と複合体を形成するHsp90²⁹⁾のように、Hsp25は性ホルモン受容体と複合体を形成するらしい。この考え方と一致する本研究の結果として、エストロゲン依存性と考えられている卵管の上皮細胞に、あまり強くないHsp25 mRNA

の発現が認められる。

最後に、本研究により精巣の精細管において、精子発生ステージに依存した様々の強さのHsp25 mRNAが発現することが明らかになった。細胞レベルにおいて、Hsp25 mRNAはレプトテン期からパキテン期にかけての精母細胞に局在しており、減数分裂との関連が示唆される。マウスやラットの精巣におけるHsp25の局在については、過去に免疫組織化学を用いた少数の相反する報告がある。ある報告では、Hsp25の免疫反応は精巣の血管にのみ存在して精細管には認められないとされ¹⁰⁾、また他の報告では、光学顕微鏡レベルでの局在の記述はなく、電子顕微鏡による検討からセルトリ細胞、精祖細胞、精母細胞および精子細胞の細胞質に局在しているとされた³⁰⁾。過去の報告と本研究の結果の不一致の理由は明確ではないが、免疫組織化学法と遺伝子組織化学法の検出感度の違いと、精子発生におけるHsp25の転写と翻訳のピークの時間的ずれにより説明できるかもしれない。

非ストレス状態のマウス精巣において、P70と呼ばれる精巣特異的なHsp70ファミリーの蛋白質があり⁴⁰⁾、その遺伝子Hsp70-2は精母細胞に全時期を通じて多く発現し、精子細胞でその発現が減少する^{41) 42)}。また、Hsc70tと呼ばれる他のHsp70ファミリー蛋白質のマウス遺伝子がクローニングされ、精子細胞に強く発現することが報告された⁴⁰⁾。さらに、Hsp90 mRNAとその蛋白質は、マウスとラットの精巣の精祖細胞と精母細胞に発現している^{43) 44)}。これらの結果と、Hsp25 mRNAが比較的早期の精母細胞に発現するという本研究の結果は対照的である。齧歯類の精巣において、異なる種類のHspの発現の仕方に差がみられることは、これらのHspが精子発生において明らかに異なる作用をもつことを示唆している。

本研究において、非ストレス下でのマウスの様々な組織の特定の細胞にHsp25 mRNAの発現と細胞局在が認められた。この結果は、生理的条件下におけるHsp25の機能を考える上で示唆を与えるものと思われる。

結 論

生理的条件下、すなわち非ストレス下におけるマウスの全身の器官・組織について、マウスHsp25の特異的オリゴヌクレオチドプローブを用いたノーザンブロット法と遺伝子組織化学法によりマウスHsp25 mRNAの発現と細胞局在を検討し、以下の結論を得た。

1. 器官・組織レベルでは、Hsp25 mRNAは食道、皮膚、眼球、胃、肺、膀胱において高度に発現し、心臓、骨格筋、大動脈、副腎、卵巣、精巣、子宮、大腸、胸腺において中等度に発現していた。
2. 心筋、平滑筋、骨格筋の筋細胞にHsp25 mRNAが発現し、骨格筋細胞より心筋および平滑筋細胞に多く局在していた。
3. 重層扁平上皮と移行上皮にHsp25 mRNAが多く発現していた。重層扁平上皮層ではmRNAは有棘層と顆粒層の細胞に局在し、基底層と角化層の細胞にはほとんど認められなかった。移行上皮ではすべての層の細胞にmRNAが局在していた。
4. 副腎皮質にHsp25 mRNAが発現していた。このうち、球状層よりも束状層と網状層の細胞に、より多くのmRNAが局在していた。
5. 卵巣の黄体細胞および卵管の上皮細胞に、中等度のHsp25 mRNAの発現が認められた。

6. 精巣の精細管において、精子発生のステージに依存した様々の強さのHsp25 mRNAが発現することがわかった。細胞レベルにおいて、Hsp25 mRNAはレプトテン期からパキテン期にかけての精母細胞に局在していた。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御指導と御校閲を賜りました恩師井関尚一教授に深甚なる謝意を捧げます。また、終始御協力を戴きました山崎秀一技官に深く感謝します。

なお本論文の一部は、日本解剖学会第56回中部地方会(1996, 山梨)および第102回日本解剖学会全国学術集会(1997, 愛知)において発表した。

文 献

- 1) Lindquist S, Craig EA. The heat-shock proteins. *Ann Rev Genet* 22: 631-677, 1988
- 2) Welch WJ. The mammalian stress response: Cell physiology and biochemistry of stress proteins. *In* RI Morimoto, A Tissières, C Georgopoulos (eds), *Stress Proteins in Biology and Medicine*, 1st ed., p223-278, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1990
- 3) Morimoto RI, Tissières A, Georgopoulos C. Progress and perspectives on the biology of heat shock proteins and molecular chaperones. *In* RI Morimoto, A Tissières, C Georgopoulos (eds), *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, 1st ed., p1-p30, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994
- 4) Frydman J, Hartl FU. Molecular chaperone function of hsp70 and hsp60 in protein folding. *In* RI Morimoto, A Tissières, A Georgopoulos (eds), *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones*, 1st ed., p251-p283, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1994
- 5) Ciocca DR, Oesterreich S, Chamness GC, McGuire WL, Fuqua SAW. Biological and clinical implications of heat shock protein 27000 (Hsp27): a review. *J Natl Cancer Inst* 85: 1558-1570, 1993
- 6) Edwards DP, Adams DJ, McGuire WL. Estradiol stimulates synthesis of a major intracellular protein in MCF-7 human breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* 1: 209-233, 1981
- 7) Ciocca DR, Adams DJ, Edwards DP, Bjercke RJ, McGuire WL. Distribution of an estrogen-induced protein with a molecular weight of 24,000 in normal and malignant human tissues and cells. *Cancer Res* 43: 1204-1210, 1983
- 8) Hickey E, Brandon SE, Sadis S, Smale G, Weber LA. Molecular cloning of sequences encoding the human heat-shock proteins and their expression during hyperthermia. *Gene* 43: 147-154, 1986
- 9) Fröhli E, Aoyama A, Klemenz R. Cloning of the mouse hsp25 gene and an extremely conserved hsp25 pseudogene. *Gene* 128: 273-277, 1993
- 10) Gaestel M, Gotthardt R, Müller T. Structure and organization of a murine gene encoding small heat-shock protein Hsp25. *Gene* 128: 279-283, 1993
- 11) Klemenz R, Andres AC, Fröhli E, Schäfer R, Aoyama A. Expression of the murine small heat shock proteins hsp25 and α B crystallin in the absence of stress. *J Cell Biol* 120: 639-645, 1993
- 12) Gernold M, Knauf U, Gaestel M, Stahl J, Kloetzel PM. Development and tissue-specific distribution of mouse small heat shock protein hsp25. *Dev Genet* 14: 103-111, 1993
- 13) Tanguary RM, Wu Y, Khandjian EW. Tissue-specific expression of heat shock proteins of the mouse in the absence of stress. *Dev Genet* 14: 112-118, 1993
- 14) Wilkinson JM and Rollard I. Immunohistochemical localization of the 25 kDa heat shock protein in unstressed rats: Possible functional implications. *Anat Rec* 237: 453-457, 1995
- 15) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162:156-159, 1987
- 16) Thomas PS. Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 77: 5201-5205, 1980
- 17) Wakayama T, Mizushima S, Hirose J, Iseki S. Urinary trypsin inhibitor: Production in the liver and reabsorption in the kidney of the rat. *Acta Histochem Cytochem* 29: 227-236, 1996
- 18) Oakberg EF. A description of spermiogenesis in the mouse and its use in analysis of the cell cycle of the seminiferous epithelium and germ cell renewal. *Am J Anat* 99: 391-409, 1956
- 19) Numata N, Ono T, Iseki S. Expression and localization of the mRNA for DNA (cytosine-5)-methyltransferase in mouse seminiferous tubules. *J Histochem Cytochem* 42: 1271-1276, 1994
- 20) Gething MJ and Sambrook J. Protein folding in the cell. *Nature* 355: 33-45, 1992
- 21) Chirico W, Waters M, Blobel G. 70K heat-shock related proteins stimulated protein translocation into microsomes. *Nature* 332: 805-810, 1988
- 22) Dashaies R, Koch B, Werner-Washburne M, Craig, Schekman R. A subfamily of stress proteins facilitates translocation of secretory and mitochondrial precursor polypeptides. *Nature* 332: 800-805, 1988
- 23) Catelli MG, Binart N, Jung Testas I, Renoir JM, Baulieu EE, Feramisco JR. The common 90-kd protein component of non-transformed "8S" steroid receptors is a heat-shock protein. *EMBO J* 4: 3131-3135, 1985
- 24) Jakob U, Gaestel M, Engel K Buchner J. Small heatshock proteins are molecular chaperones. *J Biol Chem* 268:1517-1520, 1993
- 25) Merck KB, Groenen PJ, Voorter CE, de Haard-Hoekman WA, Horwitz J, Bloemendal H, de Jong WW. Structural and functional similarities of bovine alpha-crystallin and mouse small heat-shock protein. A family of chaperones. *J Biol Chem* 268: 1046-1052, 1993
- 26) Landry J, Chrétien P, Lambert H, Hickey E, Weber LA. Heat shock resistance conferred by expression of the human Hsp27 gene in rodent cells. *J Cell Biology* 109: 7-15, 1989
- 27) Lavoie JN, Gingras-Breton G, Tanguay RM, Landry J. Induction of Chinese hamster Hsp27 gene expression in mouse cells confers resistance to heat shock. *J Biol Chem* 268: 3420-3429, 1993

- 28) Pauli D, Tonka CH, Tissières A, Arrigo AP. Tissue specific expression of the small heat shock protein hsp27 during *Drosophila melanogaster* development. *J Cell Biol* 111: 817-828, 1990
- 29) Miron T, Vancompernelle K, Vandekerckhove J, Wilchek M, Geiger B. A 25-kD inhibitor of actin polymerization is a low molecular mass heat shock protein. *J Cell Biology* 114: 255-261, 1991
- 30) Lavoie JN, Hickey E, Weber LA, Landry J. Modulation of actin microfilament dynamics and fluid phase pinocytosis by phosphorylation of heat shock protein 27. *J Biol Chem* 268: 24210-24214, 1993
- 31) Bitar KH, Kaminski MS, Hailat N, Cease KB, Strahler JR. Hsp27 is a mediator of sustained smooth muscle contraction in response to bombesin. *Biochem Biophys Res Commun* 181: 1192-1200, 1991
- 32) Spector NL, Samson W, Ryan C, Gribben J, Urba W, Welch WJ, Nadler LM. Growth arrest of human B lymphocytes is accompanied by induction of the low molecular weight mammalian heat shock protein (Hsp28). *J Immunol* 148: 1668-1673, 1992
- 33) Kubler MD, Jordan PW, O'Neill CH, Watt FM. Changes in the abundance and distribution of actin and associated proteins during terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci* 100: 153-165, 1991
- 34) Petry G, Amon H. Licht- und Elektronen-Mikroskopische studien über Struktur und Dynamik des Übergangsepithels. *Z Zellforsch* 69: 587-612, 1966
- 35) Hicks RM. The fine structure of the transitional epithelium of rat ureter. *J Cell Biol* 26: 25-48, 1965
- 36) Kabsch W, Vandekerckhove J. Structure and function of actin. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 21: 49-76, 1992
- 37) Blake MJ, Udelsman R, Feulner GT, Norton DD, Holbrook NJ. Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 9873-9877, 1991
- 38) Fuqua SAW, Blum-Salingaros M, McGuire WL. Induction of the estrogen-regulated "24K" protein by heat shock. *Cancer Res* 49: 4126-4129, 1989
- 39) Biggiogera M, Tanguay RM, Marin R, Wu Y, Martin TE, Fakan S. Localization of heat shock proteins in mouse male germ cells: an immunoelectron microscopical study. *Exp Cell Res* 229: 77-85, 1996
- 40) Allen RL, O'Brien DA, Eddy EM. A novel hsp70-like protein (P70) is present in mouse spermatogenic cells. *Mol Cell Biol* 8: 828-832, 1988
- 41) Zakeri ZF, Wolgemuth DJ, Hunt CR. Identification and sequence analysis of a new member of the mouse Hsp70 gene family and characterization of its unique cellular and developmental pattern of expression in the male germ line. *Mol Cell Biol* 8: 2925-2932, 1988
- 42) Rosario MO, Perkins SL, O'Brien DA, Allen RL, Eddy EM. Identification of the gene for the developmentally expressed 70 kDa heat-shock protein (p70) of mouse spermatogenic cells. *Dev Biol* 150: 1-11, 1992
- 43) Dix DJ, Rosario-Herrle M, Gotoh H, Mori C, Goulding EH, Barrett CV, Eddy EM. Developmentally regulated expression of Hsp70-2 and Hsp70-2/lacZ transgene during spermatogenesis. *Dev Biol* 174: 310-321, 1996
- 44) Matumoto M, Fujimoto H. Cloning of a hsp70-related gene expressed in mouse spermatids. *Biochem Biophys Res Commun* 166: 43-49, 1990
- 45) Lee SJ. Expression of Hsp86 in male germ cells. *Mol Cell Biol* 10: 3239-3242, 1990
- 46) Gruppi CM, Zakeri ZF, Wolgemuth DJ. Stage and lineage-regulated expression of two Hsp90 transcripts during mouse germ cell differentiation and embryogenesis. *Mol Reprod Dev* 28: 209-217, 1991
- 47) Ohsaka S, Bunick D, Hayashi Y. Immunocytochemical observation of the 90 KD heat shock protein (Hsp90): High expression in primordial and pre-meiotic germ cells of male and female rat gonads. *J Histochem Cytochem* 43: 67-76, 1995

Expression and Cellular Localization of the mRNA for 25kDa Heat-Shock Protein in the Mouse Tomohiko Wakayama, Department of Anatomy, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 106, 710 — 720 (1997)

Key words heat-shock protein, Hsp25, mouse, Northern hybridization, in situ hybridization

Abstract

The 25kDa heat-shock protein (Hsp25) is a member of the small heat shock protein family but its function remains largely unknown. In the present study we examined the expression and cellular localization of Hsp25 mRNA in the mice under physiological, unstressed conditions using Northern blot and in situ hybridization analyses with specific oligonucleotide probes. At the organ level, high amounts of Hsp25 mRNA were detected in the esophagus, skin, eye, stomach, lung and urinary bladder, and moderate amounts in the heart, skeletal muscle, aorta, adrenal gland, ovary, testis, uterus, large intestine and thymus. At the cellular level, intense to moderate signals for Hsp25 mRNA were localized in the muscle cells of smooth, heart and skeletal types, in the epithelial cells of stratified squamous and transitional types and of the oviduct, in the steroid endocrine cells of adrenal cortex and corpus luteum, as well as in the spermatocytes of testis. In contrast, the signal was scarcely detectable in the nervous tissues, lymphatic tissues, columnar epithelial cells of digestive tract, or parenchymal cells of the liver, pancreas and kidney. These results suggested some significant role for Hsp25 in distinct mouse cell populations under physiological conditions.