



# HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	高温に晒されたホタテガイに誘導される熱ショックタンパク質の特定
Author(s)	小熊, 寛; OGUMA, Hiroshi; 清水, 幹博 他
Citation	北海道大學水産學部研究彙報, 49(2), 71-83
Issue Date	1998-08
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/24170">https://hdl.handle.net/2115/24170</a>
Type	departmental bulletin paper
File Information	49(2)_P71-83.pdf



高温に晒されたホタテガイに誘導される熱ショックタンパク質の特定

小熊 寛<sup>1,2)</sup>・清水 幹博<sup>1)</sup>・伊藤 義三<sup>3)</sup>・麦谷 泰雄<sup>1)</sup>

Induction and Identification of Heat Shock Proteins in Scallops,  
*Patinopecten yessoensis*, Exposed to High Temperatures

Hiroshi OGUMA<sup>1,2)</sup>, Motohiro SHIMIZU<sup>1)</sup>, Yoshimi ITO<sup>3)</sup>  
and Yasuo MUGIYA<sup>1)</sup>

Abstract

Scallops, *Patinopecten yessoensis*, were exposed to high water temperatures (22, 27, 27-32, 32 and 30-35°C) and proteins extracted from their various organs were electrophoretically examined to identify stress-induced proteins. The extracted proteins were fractionated to 18-36 protein bands by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. A specific protein was induced by heat shocks at the 70 kDa position in the mantle lobe; this induction was transitory for 30 minutes at 22°C, but stable for 12 hours at 27°C. This heat-induced protein reacted immunologically with anti-heat shock protein 70 (HSP70, DnaK) antibody in Western blotting, but this and other protein bands also reacted with anti-HSP60 antibody in the mantle. These results suggest that the occurrence of 70 kDa protein in the mantle is a useful marker for temperature-related physiological disturbances in scallops.

**Key words:** Heat shock proteins, Western blotting, 70 kDa protein, Mantle lobe, *Patinopecten yessoensis*

結 言

ホタテガイ *Patinopecten yessoensis* は鰓の繊毛運動, 心臓心拍数, 酸素消費量などから, 生理的代謝活性の低温限界が0°C付近に, 高温限界が22-23°Cにあると考えられている(丸, 1985)。特に23°C以上の高水温では心拍数の急激な減少が報告されている(中西, 1977; 対馬, 1989)。これらの事実は0°C付近の低温および23°C以上の高温が自然界に生息するホタテガイの生理活性の低下を誘起する可能性を示している。

熱ショックタンパク質 (Heat shock protein; HSP) は細菌類から哺乳類に至る種々の生物で, 熱ストレスにより一過性に発現するタンパク質である (Yamamoriら, 1978; Landryら, 1989; Gellnerら, 1992; Michelら, 1994; Yokotaら, 1994; Nunamakerら, 1996)。HSPは熱以外の

<sup>1)</sup> 北海道大学水産学部機能生物学講座  
(Laboratory of Comparative Physiology, Department of Biology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University)

<sup>2)</sup> (現在) 北海道大学大学院地球環境科学研究科環境分子生物学講座  
(Laboratory of Environmental Molecular Biology, Graduate School of Environmental Earth Science, Hokkaido University)

<sup>3)</sup> 北海道立函館水産試験場  
(Hokkaido Hakodate Fisheries Experimental Station)

要因, 例えば高浸透圧, 低酸素などの物理化学的ストレス, あるいは拘束や他生物種との関係 (共存あるいは敵対) などによる心理的ストレスによっても発現することから, ストレスタンパク質とも呼ばれている (Blake ら, 1991; 坂内, 1994)。また, 哺乳類では虚血状態の心臓あるいは肺癌, 喘息, および急性肺炎患などの病的状態でストレスタンパク質の発現が報告されている (Ovelgönne ら, 1996; Wong・Wispe, 1997)。現在約 18 種の HSP が知られており, 分子構造 (特に分子量) と機能の面から 3 族 (HSP60, HSP70, HSP90 の各ファミリー) とほか数種 (HSP28, ユビキノンなど) に分類され, HSP70 ファミリーに属する分子量 7 万前後の HSP は, 熱ストレスにより発現する真核生物での最も代表的 HSP である (Oda ら, 1991; 伊藤, 1994; Moseley ら, 1994; 坂内, 1994)。HSP70 はタンパク質の折りたたみ構造や解離, 会合などで重要な役割を担い (Becker・Craig, 1994), 生体を細胞レベルでストレスから守ると考えられている (Arai ら, 1994)。

したがって, ホタテガイにおいても高温ストレス (熱ショック) による HSP の発現が予想され, ひいてはこのタンパク質がホタテガイの生理状態を知る一つの指標となる可能性も考えられる。しかし, ホタテガイを含め軟体動物での HSP に関する報告はまだ無い。

本研究では高温処理によりホタテガイに誘導されるタンパク質の特定とそのタンパク質と既知 HSP との関連を調べた。

## 実 験

### 供試貝

実験には, 噴火湾にて垂下養殖していたホタテガイ *Patinopecten yessoensis* (湿重量 55-130 g) を用い, 採取後北海道大学水産学部の水槽施設内恒温室にて簡易循環濾過装置を備えたガラス水槽 (60×30×30 cm) で飼育した。なお, 海水温 12°C で 14 日間以上順化させた後, 各高温処理実験に供した。

### 高温処理方法

30-35°C 処理: ホタテガイ 1 個体 (湿重量 80 g) を水温 30°C の水槽へ移し, 2 時間浸漬した。その後, この個体を水温 12°C の水槽に移して 2 時間浸漬し, さらに水温 35°C の水槽で 2 時間処理した。その後, 水温 12°C の水槽に戻し 1 時間後に取り上げた。この個体を 30-35°C 実験個体とし, 対照として 12°C 処理個体 (湿重量 75 g) を用いた (Fig. 1A)。

27-32°C 処理: 3 個体 (湿重量 55-75 g) を水温 27°C の水槽へ移し, 2 時間浸漬した。その後これらを水温 12°C の水槽に戻し 2 時間後さらに水温 32°C の水槽で 2 時間処理した。これらを再び 12°C 水槽に戻し 1 時間後に取り上げた (27-32°C 実験群)。また, 2 個体 (湿重量 55-65 g) を 32°C 水槽で 2 時間処理した後, 12°C 水槽に戻して 1 時間後に取り上げた (32°C 実験群)。対照群として 12°C で処理した 3 個体 (湿重量 70-80 g) を用いた (Fig. 1B)。

27°C 処理: 18 個体 (湿重量 70-130 g) を 27°C 水槽へ移し, 0.5, 1, 2, 4, 6 および 12 時間後にそれぞれ 3 個体づつ取り出し, 経時的 27°C 実験群を得た。対照として 12°C 水槽の 3 個体 (湿重量 100-110 g) を 12 時間後に取り出し用いた (Fig. 1C)。

22°C 処理: 18 個体 (湿重量 60-100 g) を 22°C 水槽へ移し, 0.5, 1, 2, 4, 6 および 12 時間後にそれぞれ 3 個体づつ取り出し, 経時的 22°C 実験群を得た。対照としては 12°C 水槽の 3 個体 (湿重量 70-100 g) を 12 時間後に取り出し用いた (Fig. 1D)。

なお, それぞれの高温処理実験では各水槽の水温を一定に保つとともに, 約 12 時間前からあらかじめ通気しておいた。また, ホタテガイ投入による水温低下をできるだけ防ぐ目的で, 水槽中にヒーター (200 W×3 本) およびサーモスタット (IC サーモ KMS-600, SUNART) を準備し必

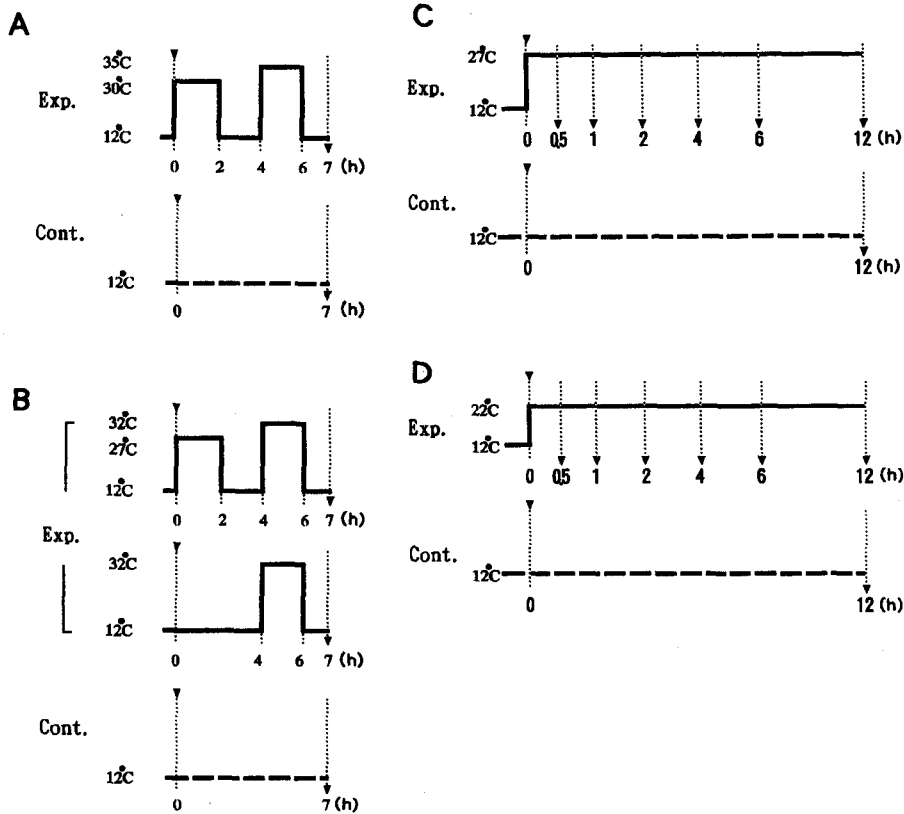


Fig. 1. Experimental procedure of high temperature treatments. A, 30-35°C; B, 27-32°C; C, 27°C; D, 22°C.

要に応じ使用した。

#### 組織の採取と分析試料の作製

各熱処理終了後、ただちに各個体の湿重量を測定し、殻を除去したのち外套膜、肝臓、後閉殻筋、腎臓および脳神経節を摘出した。これらの臓器をそれぞれ分析まで $-40^{\circ}\text{C}$ で保存した。試料調製に際し、各臓器を解凍後リン酸緩衝生理的塩類溶液 (PBS: 2.7 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 3.7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 73 mM  $\text{NaCl}$ , pH 7.4) で3回以上洗浄した。その後組織0.1 gあたり0.1-0.3 mlのPBSを加えてガラス製またはテフロン製ホモジナイザーを用いて1,500または3,000 rpm/minで2分間ホモジナイズした。得られた各組織の懸濁液を遠心分離 ( $8,800 \text{ g} \times 30$  分間) し、上清を電気泳動用試料とした。

#### タンパク質の定量

各組織試料のタンパク質量の定量は、2.5 mlの0.01%クマジーブリリアントブルー (CBB) 溶液 [0.003 mM Coomassie Brilliant Blue G-250 (半井化学), 40% 酢酸, 10% エタノール] に対し、試料50  $\mu\text{l}$ を加え発色させた後、分光光度計 (日立 U-2000 型) を用い、595 nmで吸光度を測定し

た(志村・笠井, 1990)。なお, 牛血清アルブミン (BSA) を標準タンパク質として用い検量線を作成した。

#### SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) 解析

各試料を試料用緩衝液[4%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS), 20%グリセロール, 1.15%トリス (Tris-aminomethane, Tris), 10% 2-メルカプトエタノール, 0.002%ブロムフェノールブルー (BPB)]に1:1-1:4の割合で混合し, 沸騰水中で2分間処理した後, SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE) をゲル濃度5-20%または9.8%, ゲル1枚あたり30 mAの電流で行った(宮崎ら, 1994)。泳動後, CBB染色溶液[3.03 mM CBB R-250 (Fluka Chemical), 40%エタノール, 10%酢酸]で90分間染色した。染色後, 脱色液(20%エタノール, 5%酢酸, 2.5%グリセロール)で脱色した。また, 一部の泳動ゲルについては後述のウエスタンブロットを施した。

分子量 (MW) マーカーとして, 炭酸脱水酵素 (MW 29,000), 卵アルブミン (MW 45,000), ウシ血清アルブミン (MW 66,000), ウサギ筋肉ホスホリラーゼ B (MW 97,400), 大腸菌  $\beta$ -ガラクトシターゼ (MW 116,000) およびウサギ筋肉ミオシン (MW 205,000) を含むキット (MW-SDS-200kit, Sigma) を用いた。分画されたタンパク質の分子量は泳動像をデンシトメータ (BioImage, 日本ミリポア・リミテッド) にかけて, マーカーの移動度を基に算出した。

#### ウエスタンブロット法

SDS-PAGE によって分離されたタンパク質画分はセミドライ式転写装置 (AE6670, アトー) を用い, 15 V で70分間処理してポリビニリデンフルオライド転写膜 (PVDF, ミリポア) 上に転写した(紀平ら, 1994)。5%スキムミルクで12時間ブロッキングを行った後, 1:1000に希釈した一次抗体[抗HSP70 (DnaK) 大腸菌ポリクローナルウサギ抗体 (Dako) または抗HSP60 (GroEL 相同体) ピロリ菌抗体<sup>1)</sup>]で3時間反応させた。反応後, 転写膜をTween 20を加えたトリス緩衝生理食塩水 [TBST: 10 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 8.0), 150 mM NaCl, 0.05% Tween 20] で3回洗浄した。続いて1:2000に希釈した二次抗体[アルカリホスファターゼ結合抗ウサギ IgG (FC) 抗体 (Promega Biotec.)] で2時間反応させた。反応後, 転写膜をTBSTで3回洗浄した。抗原抗体結合物質は発色液[100 mM トリス-塩酸緩衝液 (pH 9.5), 100 mM NaCl, 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.66% ニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 基質および0.33% 5-プロモ-4-クロロ-3-インドリルホスフェイト (BCIP) 基質] で10分間処理し発色させた。なお, 陽性対照としてキンギョ脳抽出物を一部に用いた。

#### 泳動画分の定量および統計検定

SDS-PAGE により得られたタンパク質画分をデンシトメーター (BioImage, 日本ミリポアリミテッド) によって吸光度の積分相対値 Integrated optical density (IOD, %) を測定した。測定値は平均値±標準誤差で表し, 有意差検定は一元配置分散分析による Fisher の PLSD テストで行い, 有意差を  $P < 0.05$  とした。

<sup>1)</sup> HSP60 抗体は岡山大学医学部細菌学教室, 横田憲治博士が作製されたものであり, 札幌医科大学微生物学教室, 藤井暢弘教授のご厚意により使用させていただいた。

結 果

高温処理により発現するタンパク質の特定

はじめに、12°C 飼育個体を対照として、30-35°C 実験個体、5 器官（後閉殻筋、腎臓、肝臓、外套膜および脳神経節）の組織タンパク質を SDS-PAGE で分画し、高温処理による各臓器の画分の変化、つまり分画状態（画分数）および染色濃度（タンパク質の相対量）の変化を比較検討した。

後閉殻筋では 34 の主要画分が得られた。しかし、実験個体と対照個体との間で分画状態および各画分の染色濃度に明確な違いは認められなかった (Fig. 2A)。腎臓でも 33 の画分が認められたが、同様に両個体間で違いは認められなかった (Fig. 2B)。脳神経節は約 18 の主要画分に分画され、70 kDa および 120 kDa の両画分、特に後者が実験群で強く染色されていた (Fig. 2C)。外套膜では最も多くの画分が得られ、主なもので 36 に分画された (Fig. 2D)。そのうち、70 kDa および 120 kDa の画分、特に後者が実験個体で濃く染色されていた。肝臓でも約 20 の主要画分のうち、120 kDa 画分で実験個体に染色強度の増加傾向が認められた。

種々の高温処理によるタンパク質発現の経時的変化

上記 30-35°C 熱処理で外套膜の 70 および 120 kDa 画分に変化がみられたことから、この外套膜の 2 画分に注目し、他の高温処理群についても詳しく検討した。

各高温処理 (22, 32, 27, 27-32°C) 個体から分画された外套膜タンパク質のうち、100 kDa 以上および 30 kDa 以下の成分は個体差が大きく対照との間で明確な変化を見出せなかった。一方、27-32°C および 32°C 実験群で対照群に比べ濃染した 70 kDa 画分が認められた (Fig. 3A)。IOD 値でもこの画分は有意に高い値を示すことが確認された (Fig. 3B)。さらに、27°C 処理群でも処理時間 30 分、1 時間および 12 時間でこの画分が濃染しており (Fig. 4A)、IOD 値でも上記処理時間の実験群で有意に高い値を示していた (Fig. 4B)。この処理群では約 75 kDa に相当する画分もしばしば認められた (Fig. 4A)。22°C 処理群の外套膜では処理 30 分後に濃染した 70 kDa 画分が認め

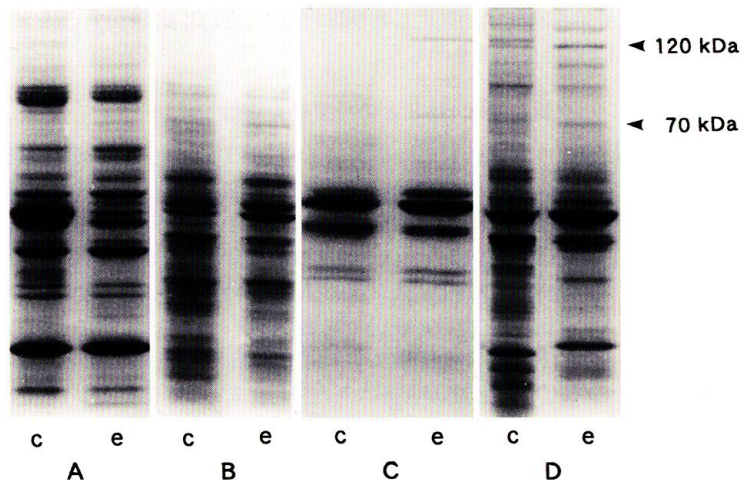


Fig. 2. SDS-PAGE of proteins extracted from various organs of scallops exposed to 30-35°C. A, posterior adductor muscle; B, kidney; C, cerebral ganglion; D, mantle lobe; c, control (12°C); e, experimental (30-35°C).

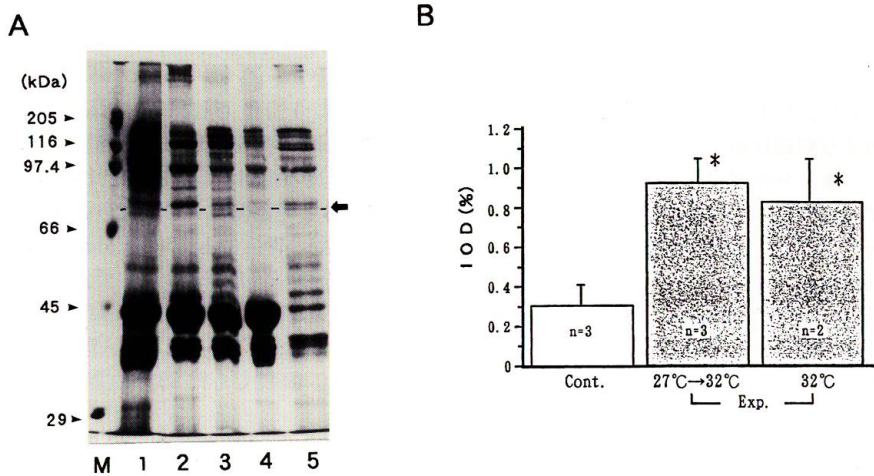


Fig. 3. A. SDS-PAGE of proteins of the scallop mantle after 32 and 27-32°C treatments. Arrow indicates 70 kDa protein. lane M, marker; lane 1, control; lanes 2 and 3, 27-32°C; lanes 4 and 5, 32°C. B. Relative amount of 70 kDa protein in A. Vertical bars represent SE for two or three individuals (n). \*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

られ、その IOD 値は対照群の値より有意に高かった。しかし、1 時間後以降にはそのような高い IOD 値を示す 70 kDa 画分は認められなかった (Fig. 5)。

脳神経節では 27°C 処理個体のものについてのみ泳動したが、100 kDa 以上の高分子画分は外套膜と同様に個体差が大きく比較することが不可能であった。また、70 kDa 画分も熱処理、対照の全個体でほぼ同様の泳動状態を示し (Fig. 6A), IOD 値でも両群間および処理時間による有意な変化は認められなかった (Fig. 6B)。

なお、全ての高温処理で処理時間中に死亡した個体はなく、27°C, 12 時間処理後 12°C に戻して 10 日間飼育した場合、72.7% の生存率を示した。

#### ホタテガイ 70 kDa タンパク質と既知 HSP との免疫的相同性

ウエスタンブロット法において、陽性対照のキンギョ脳 70 kDa 画分は抗 HSP 70 (DnaK) 抗体に強い反応を示し (Fig. 7A), ホタテガイ脳神経節および外套膜の 70 kDa 画分でも陽性反応が認められた (Fig. 7B, C)。しかし、110 kDa, 40 kDa など複数の画分でも同様に陽性反応が認められた (Fig. 7B, C)。一方、肝臓の 70 kDa 画分ではこの抗体に対する反応は認められなかった (Fig. 7D)。22°C あるいは 27°C で外套膜の 70 kDa タンパク質を経時的に追った実験でも、70 kDa 以外に約 120, 75, 50, 40 および 30 kDa など複数の画分で陽性反応が観察され、そのうち特に低分子量のもので強い反応が見られた (Fig. 8)。抗 HSP60 抗体を使用した場合、ホタテガイ脳神経節および外套膜の 70 kDa タンパク質で陽性反応が確認された (Fig. 9A, B)。しかし、DnaK 抗体の場合と同様に 110 および 40 kDa 画分でも反応が認められた。一方、キンギョ脳 (Fig. 9C) およびホタテガイ肝臓では HSP60 抗体に反応する画分は認められなかった。

これらの抗体に対するホタテガイのタンパク質画分の反応は、いずれも一次抗体を使用しなかった場合は全く認められなかった。

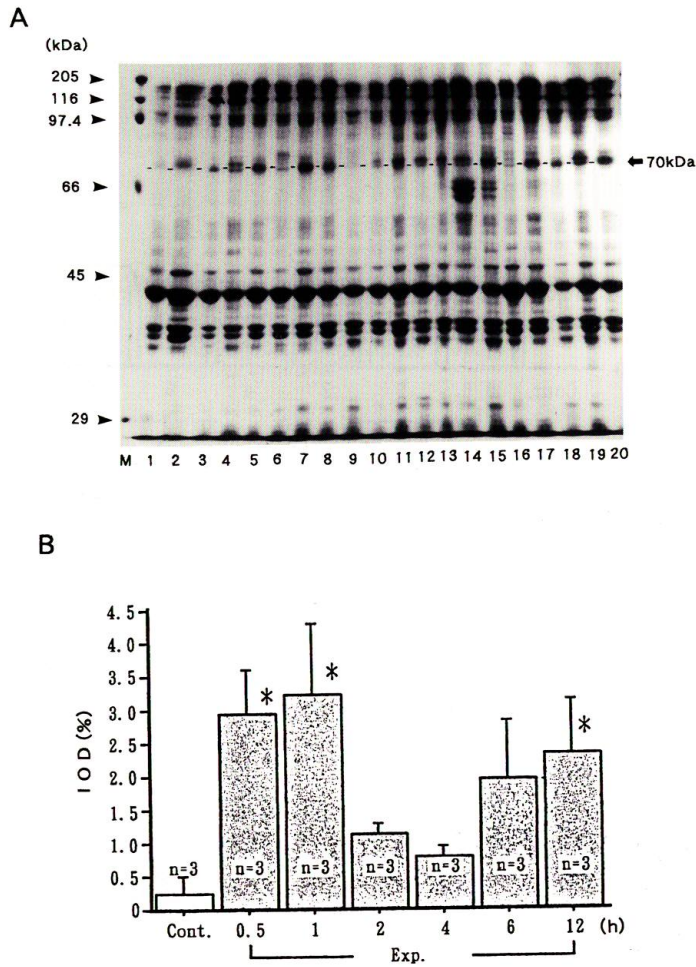


Fig. 4. A. SDS-PAGE of proteins of the scallop mantle after various lengths of exposure to 27°C. Arrow indicates 70 kDa protein. lane M, marker; lanes 1 and 2, control; lanes 3-5, 0.5 h; lanes 6-8, 1 h; lanes 9-11, 2 h; lanes 12-14, 4 h; lanes 15-17, 6 h; lanes 18-20, 12 h. B. Relative amount of 70 kDa in A. Vertical bars represent SE for three individuals (n). \*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

### 考 察

ホタテガイの外套膜, 脳神経節, 閉殻筋, 肝臓および腎臓の組織構成タンパク質は SDS-PAGE により, 主要なもので 18-32 成分に分画され, その分子量は 30 kDa から 200 kDa 以上にわたっていた。本実験では 22°C から 35°C とホタテガイにとっては高温域の熱ショックを与えたが個体差が大きく, 特に 100 kDa 以上および 30 kDa 以下の分子量の画分群は変異が大きく, 熱ショックによる反応は明確でなかった。しかし, 約 70 kDa の分子量を有する画分で対照個体と実験個体との

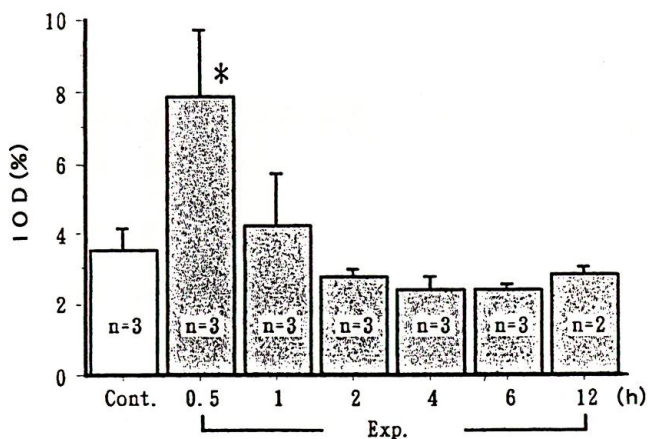


Fig. 5. Relative amount of 70 kDa mantle proteins after various lengths of exposure to 22°C. Vertical bars represent SE for two or three individuals (n). \*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

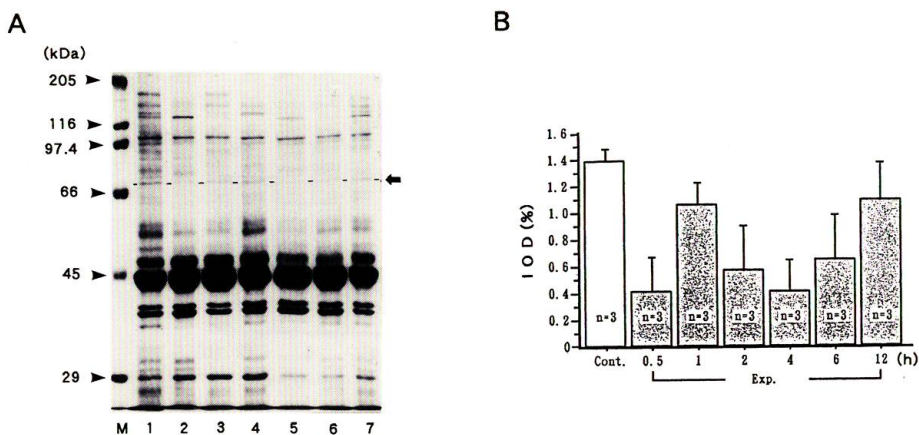


Fig. 6. A. SDS-PAGE of proteins of the scallop cerebral ganglion after various lengths of exposure to 27°C.

Arrow indicates 70 kDa protein. lane M, marker; lane 1, control; lane 2, 0.5 h; lane 3, 1 h; lane 4, 2 h; lane 5, 4 h; lane 6, 6 h; lane 7, 12 h.

B. Relative amount of 70 kDa proteins in A. Vertical bars represent SE for three individuals (n). \*Significantly different from the control at  $P < 0.05$ .

間に違いが認められた。この成分は通常状態でもホタテガイには存在すると思われるが、泳動パターンから判断し通常は極微量にしか存在しないと考えられる。いっぽう、高温処理個体、つまり熱ショックを受けた個体の外套膜でこの成分は増加していた。それゆえ、このタンパク質は熱ショックタンパク質の概念に相当すると考えられる (以後ホタテ 70 タンパクと呼ぶ)。また、この 70 kDa 画分のすぐ上に位置する約 75 kDa のタンパク質も熱ショック処理で類似の発現傾向を示していることから (Figs. 4A, 8), この画分も熱ショックタンパク質の可能性がある。しかし、本実

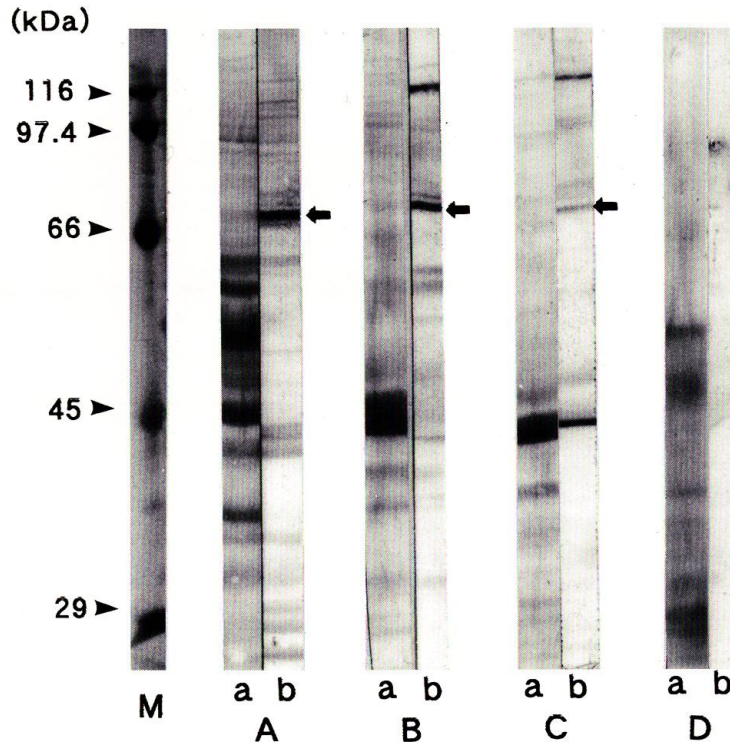


Fig. 7. Western blot patterns of proteins of various scallop organs and goldfish brain using anti HSP 70 (DnaK) antibody.

Arrows indicate 70 kDa bands positive for the antibody. M, marker (CBB stain); A, goldfish brain; B, scallop cerebral ganglion; C, scallop mantle; D, scallop liver; a, CBB stain; b, reaction for the antibody.

験ではこの画分が熱ショックタンパク質に属するか否かを詳しく検討しなかった。

二枚貝類の外殻膜は眼および神経が多数存在するとともに、殻の形成および呼吸にも関与する重要な器官である。短時間の熱ショックに関する実験では、細胞への熱伝達が問題となり、メダカの尾鰭表皮などのように薄く、細胞への熱伝達のよいと考えられるものでは、その表皮細胞での熱ショックタンパク質 (HSP70) の合成が報告されている (Oda ら, 1991)。ホタテガイ外殻膜は他の器官組織に比べて構造的に薄く、外環境に接する最前線に位置している。それゆえ、細胞に容易に熱が伝導され、熱ショックの影響を受ける可能性が大きいと判断される。

培養細胞を用いた他生物の実験では、致死的热ショックにより HSP70 が短時間に誘導されている (Arai ら, 1994; Becker・Craig, 1994; Moseley ら, 1994)。また、30°C で培養していた大腸菌を亜致死的热度の 42°C で培養すると、一時的に HSP が誘導され (Yamamori ら, 1978), 45°C 以上で培養した場合にはその誘導は持続される (坂内, 1994)。本実験でも 22°C で処理されたホタテガイの外殻膜では短時間 (30 分) で一過性のホタテ 70 タンパクの発現 (増加) が認められ、1 時間後には見られなかった。一方、27°C では 12 時間後でもこの画分が確認された。22°C 処理では 12°C からの急激な相対温度の上昇 (相対温度的要因) がホタテ 70 タンパクの一過性的発現を促したと考えられる。それに比べ、27°C (生存率から判断してホタテガイにとって亜致死的热なもの

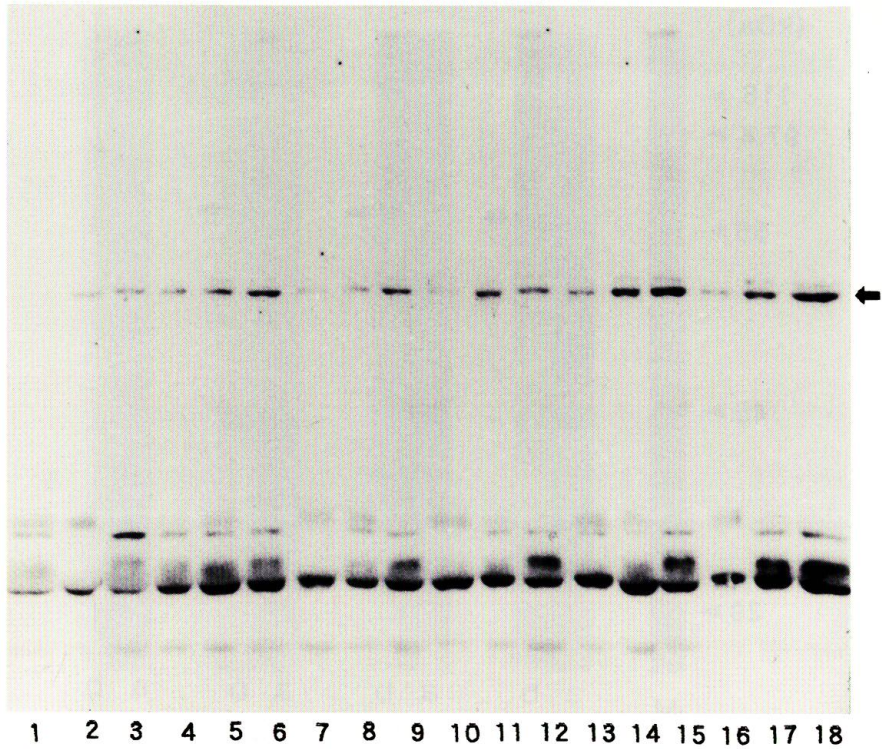


Fig. 8. Western blot patterns (anti HSP70 antibody) of the mantle proteins in the scallop exposed to 27°C for various lengths of time.

Arrow indicates 70 kDa bands positive for antibody. lane 1, control; lanes 2 and 3, 0.5 h; lanes 4-6, 1 h; lanes 7 and 8, 2 h; lanes 10-12, 4 h; lanes 13-15, 6 h; lanes 16-18, 12 h.

あったと考えられる) はより高温であり, 加えて積算温度的要因がホタテ 70 タンパクの持続的発現につながった可能性がある。

外套膜のホタテ 70 タンパクがウエスタンブロット法で HSP70 の一員である大腸菌 DnaK (Schmid ら, 1992) の抗体に陽性反応を示したことは, このホタテタンパク質が HSP70 と共通抗原を有すること, つまり HSP70 に属することを示している。なお, 哺乳類などの HSP には熱ストレス (熱ショック) により発現する HSP70 (72 kDa) と恒常的に存在する HSC70 (73 kDa) があると考えられている (大塚, 1989; Welch, 1989)。本実験で使用した大腸菌 DnaK はアミノ酸配列で脊椎動物の HSP70 と約 48% の相同性を保ち, 真核生物の HSP, HSC のいずれとも反応する。また, 本実験では 72 kDa と 73 kDa を明確に分離していないため, ホタテ 70 タンパクはこれらの両成分を含んでいる可能性がある。それゆえ, ホタテ 70 タンパクが HSP, HSC のいずれに相当するのか明らかではない。なお, 既知の HSP, HSC でも両者間の生化学的および生物学的相違はまだ十分解明されていない (Welch, 1989)。

ホタテ 70 タンパクは別のストレスタンパク質, HSP60 (ピロリ菌) の抗体とも反応し, 他のいくつかのホタテガイの主要タンパク質も同様に DnaK および HSP60 抗体と反応を示した。これらの DnaK および HSP60 抗体に対するホタテガイタンパク質の反応は一次抗体を使用しない場合には全く認められないことから, 二次抗体反応以後に起因する非特異的結合とは考えられない。

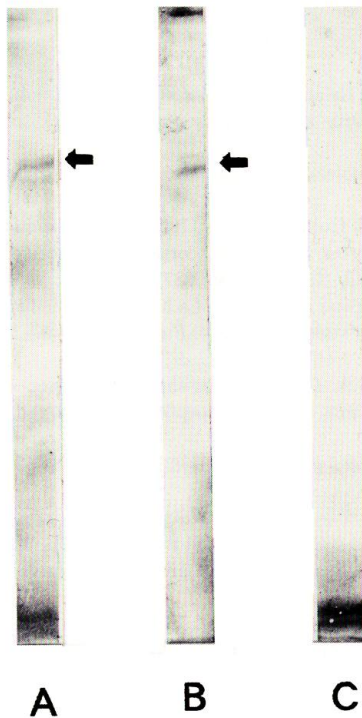


Fig. 9. Western blot patterns (anti HSP60 antibody) of the proteins from the scallop organs and goldfish brain. Arrows indicate 70 kDa bands positive for the antibody. A, scallop mantle; B, scallop cerebral ganglion; C, goldfish brain

本実験で使用した抗体はいずれもポリクローナル抗体であり、理論的には複数の抗原基質と免疫交差反応を生ずる可能性がある。それゆえ、ホタテ 70 タンパクが DnaK, HSP60 の両抗体のどの部位を認識しているかが問題であり、今後モノクローナル抗体、例えば抗大腸菌 HSP70 モノクローナル抗体を用いた詳しい解析が必要である。

ホタテ 70 タンパクと既知 HSP との免疫学的相同性に関しては不明な点がまだ残されているが、このタンパク質の発現あるいは増加は、ある温度がホタテガイにストレスを与えているか否か、あるいはそのストレスの程度を知る一指標となると思われる。さらに、ホタテガイ組織の培養細胞を用いた熱ショック実験を行うことにより、ホタテガイにおけるストレスタンパク質のより詳細な知見が得られると思われる。また、HSP は熱ストレス以外の要因、例えば低酸素状態 (Guttman ら, 1980)、高浸透圧状態 (Sheikh-Hamad ら, 1994)、およびウイルス感染 (Michel ら, 1994) などの物理化学的および生物学的ストレスによっても誘導される。それゆえ、HSP を利用してホタテガイの生理活性を判定するには、これらの要因とホタテ 70 タンパクとの関係についても検討する必要がある。

## 謝 辞

本研究を行うにあたり、ウエスタンブロット法のご指導を賜った札幌医科大学藤井暢弘教授ならびに林俊治助手に深謝いたします。さらに、終始ご協力頂いた加川 尚氏をはじめ当学部生理学生態学講座の大学院生、4 年目学生諸氏に深くお礼申しあげます。また、ホタテガイの入手にご協力をいただいた八雲町漁業協同組合の関係者および菊池照雄氏に厚くお礼申しあげます。

文 献

- Arai, A., Mitani, H., Naruse, K. and Shima, A. (1994). Relationship between the induction of proteins in the HSP70 family and thermosensitivity in two species of *Oryzias* (Pisces). *Comp. Biochem. Physiol.*, **109B**, 647-654.
- Becker, J. and Craig, E.A. (1994). Heat-shock proteins molecular chaperones. *Eur. J. Biochem.*, **219**, 11-23.
- Blake, M.J., Udelsman, R., Feulner, G.J., Norton, D.D. and Holbrook, N.J. (1991). Stress-induced heat shock protein 70 expression in adrenal cortex: An adrenocorticotropic hormone-sensitive, age-dependent response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **88**, 9873-9877.
- Gellner, K., Praetzel, G. and Bosch, T.C.G. (1992). Cloning and expression of a heat-inducible hsp70 gene in two species of *Hydra* which differ in their stress response. *Eur. J. Biochem.*, **210**, 683-691.
- Guttman, S.D., Glover, C.V.C., Allis, C.D. and Gorovsky, M.A. (1980). Heat shock, deciliation and release from anoxia induce the synthesis of the same set of polypeptidase in starved *T. pyriformis*. *Cell*, **22**, 299-307.
- 伊藤維昭 (1994). (分子シャペロンとしてのストレス蛋白質, p. 49-61, 永田和宏 (編), ) ストレス蛋白質—基礎と臨床. 中外医学社, 東京.
- 紀平安則, 斎藤 拓, 下山嘉子, 掘尾武一 (1994). (ウェスタンブロッティングによる蛋白の特異的検出法, p. 515-525, 掘尾武一 (編),) 蛋白質・酵素の基礎実験 (改訂第2版). 南江堂, 東京.
- Landry, J., Chretien, P., Lambert, H., Hickey, E. and Weber, L.A. (1989). Heat shock resistance conferred by expression of the human HSP27 gene in rodent cells. *J. Cell. Biology*, **109**, 7-15.
- 丸 邦義 (1985). ホタテガイの発育初期におよぼす温度と比重耐性. 北水試報告, (27), 55-64.
- Michel, R.M., Favre, D., Studer, E., Arrigo, A. and Kempf, C. (1994). Modulation of thermoprotection and translational thermotolerance induced by Semiliki Forest virus capsid protein. *Eur. J. Biochem.*, **223**, 791-797.
- 宮崎 香, 萩原秀昭, 佐伯和彦, 斎藤 拓, 松本邦夫 (1994). (ポリアクリルアミドゲルを用いる種々の電気泳動, p. 325-418, 掘尾武一 (編), ) 蛋白質・酵素の基礎実験法 (改訂第2版). 南江堂, 東京.
- Moseley, P.I., Gapen, C., Wallen, E.S. and Peterson, M.W. (1994). Thermal stress induces epithelial permeability. *Am. J. Physiol.*, **267**, C425-C434.
- 中西 孝 (1977). 貝類の心拍におよぼす環境の影響—I. ホタテガイの心拍数におよぼす水温, 低塩分および低酸素の影響. 北水研報告, (42), 65-73.
- Oda, S., Mitani, H., Naruse, K. and Shima, A. (1991). Synthesis of heat proteins in the isolated fin of the medaka, *Oryzias latipes*, acclimatized to various temperatures. *Comp. Biochem. Physiol.*, **98B**, 587-591.
- 大塚健三, 林 康司, A. Laszlo (1989). 熱ショック蛋白質の細胞内局在, 実験医学, **7**, 53-58.
- Ovelgönne, J.H., Van Wijk, R., Verkleij, A.J. and Post, J.A. (1996). Cultured neonatal rat heart cells can be preconditioned by ischemia, but not heat shock. The role of stress proteins. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **28**, 1617-1629.
- 坂内四郎 (1994). ストレス探求—分子レベルでみると—. 化学同人, 京都.
- Schmid, D., Jaussi, R. and Christen, P. (1992). Precursor of mitochondrial aspartate aminotransferase synthesized in *Escherichia coli* is complexed with heat-shock protein DnaK. *Eur. J. Biochem.*, **208**, 699-704.
- Sheikh-Hamad, D., Garcia-Perez, A., Ferraris, J.D., Peters, E.M. and Burg, M.B. (1994). Induction of heat shock versus osmotic stress. *Am. J. Physiol.*, **267**, F28-F34.
- 志村清仁, 笠井献一 (1990). (蛋白質の定量, p. 87-107, 日本生化学会 (編), ) 新化学実験講座 1 タンパク質. 分離・精製・性質. 東京化学同人, 東京.
- 対馬廉介 (1989). ホタテガイの生理的活力の判定に関する研究 (水温負荷による心拍動の変動). 青水増事業報告, (18), 133-135.
- Welch, W.J. (1989). 高等動物ストレス (熱ショック) 蛋白質の構造と機能 (中井 彰訳) 実験医学, **7**, 33-44.
- Wong, H.R. and Wispe, J.R. (1997). The stress response and the lung. *Am. J. Physiol.*, **273**, L1-L9.

小熊ら：ホタテガイの熱ショックタンパク質の特定

- Yamamori, T., Ito, K., Nakamura, Y. and Yura, T. (1978). Transient regulation of protein synthesis in *Escherichia coli* upon shift-up of growth temperature. *J. Bacteriol.*, **134**, 1133-1140.
- Yokota, K., Hirai, Y., Haque, M., Hayashi, S., Isogai, H., Sugiyama, T., Nagamichi, E., Tsukada, Y., Fujii, N. and Oguma, K. (1994). Heat shock protein produced by *Helicobacter pylori*. *Microbiol. Immunol.*, **38**, 403-405.