

脳虚血耐性現象への転写因子 CREB 活性化の関与

北川 一夫 佐々木 勉 寺崎 泰和 八木田佳樹 望月 秀樹

(臨床神経 2012;52:904-907)

Key words : 虚血耐性, グルタミン酸受容体, CREB特異的コアクチベータ, 塩誘導性キナーゼ, 選択的脆弱性

はじめに

脳とくに神経細胞は虚血侵襲に対して脆弱であるが、内在性防御機構を有していることが明らかになっている。予め軽度の虚血負荷を加えておくと次に加わる本来致死的な虚血侵襲に対して抵抗性を獲得する現象を虚血耐性現象¹⁾または虚血プレコンディショニングと呼ばれているが、動物脳虚血モデルでは虚血耐性の保護効果は低体温療法と並んでもっとも再現性の高い事が示されている²⁾。これまでグルタミン酸受容体拮抗薬をはじめ多くの脳保護候補薬が基礎実験では有効性が示されながら臨床試験で有効性が確認されていないが、虚血耐性にかかわるもっとも主要な分子機構を解明し治療に活用できれば脳保護薬の開発に繋がる事が期待される。われわれはこれまで内在性神経細胞防御機構として転写因子 CREB を介した遺伝子発現の関与に注目して研究を進めてきたのでその研究成果を紹介する。

1 : 虚血脳における CRE 遺伝子発現

Cyclic AMP responsive element 結合蛋白 (CREB) は脳に豊富に存在する転写因子で、神経細胞の生存維持シナプス可塑性軸索伸展など重要な生理機能にかかわっている。従来 CREB 活性化の指標としてセリン 133 のリン酸化が指標とされてきたが後述するように CREB リン酸化と CRE 遺伝子発現は必ずしも一致しない場合がある³⁾。われわれは CREB 活性化を遺伝子発現の観点から検討するため CRE-LacZ トランスジェニックマウスに脳虚血負荷を加えて検討してきた⁴⁾⁵⁾。その結果、両側総頸動脈閉塞再灌流モデルでは海馬神経細胞で CREB リン酸化亢進を示す神経細胞の一部に CRE を介した遺伝子発現をみとめ、中大脳動脈閉塞モデルでは梗塞周辺部の神経細胞に CRE を介した遺伝子発現を観察した。以上の結果から虚血侵襲後神経細胞では CREB 活性化が遺伝子発現の面からもおこっており、細胞保護的にかかわっていることが示唆された。

2 : 培養神経細胞の低酸素低グルコース負荷に際する CRE 遺伝子発現への CRTC1 の関与

虚血侵襲後の CREB 活性化の分子機構を検討するため培養神経細胞の低酸素低グルコース (Oxygen Glucose Derivation : OGD) 負荷モデルを使用した (Fig. 1)⁶⁾。培養神経細胞では OGD 負荷後 CREB リン酸化について CRE 遺伝子発現亢進が観察されるが、CREB 活性は CREB の C 末端の basic ZIP ドメインを欠損させると消失することから、CREB 活性化にはキナーゼドメインにあるセリン 133 のリン酸化以外に basic ZIP ドメインが必要であることが示された。CREB regulated transcription coactivator : CRTC (Tranducer of regulated CREB activity : TORC とも呼ばれる) は CREB の Basic Leucine Zipper (bZIP) ドメインに結合する因子として同定されたものであるが、神経細胞では CRTC1 が豊富に存在し OGD 負荷後細胞質から核内へ移行することが確認された (Fig. 2)。CRTC1 活性は核内移行にともなって亢進することも確認した。CRTC1 のドミナントネガティブ体を導入

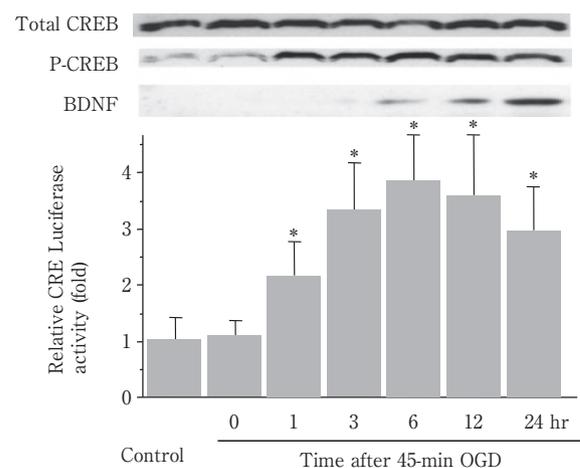


Fig. 1 低酸素低グルコース負荷後の CREB リン酸化 CRE 遺伝子発現 BDNF 発現.
OGD : Oxygen glucose deprivation, CREB : Cyclic AMP responsive element binding protein, BDNF ; Brain-derived neurotropic factor

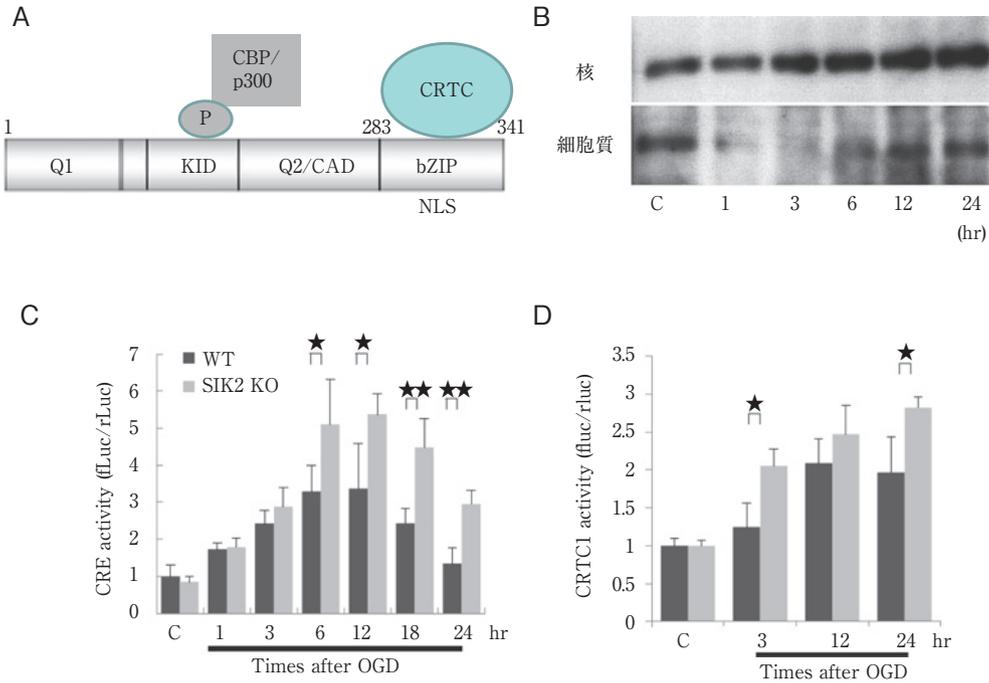


Fig. 2 CRTC1, 塩誘導性キナーゼ 2 の CRE 遺伝子発現への関与.

A : CREB 蛋白模式図 : キナーゼドメイン (KID) の 133 番目のセリンがリン酸化を受けるとコアクチベータである CREB binding protein (CBP) P300 が動員される。一方 C 末端側の basic ZIP ドメイン (bZIP) に CREB-regulated transcription coactivator (CRTC) が結合することも CRE 転写活性に必要である。

B : OGD 負荷後の CRTC1 の細胞内分布 : コントロールでは CRTC1 は細胞質にも多く分布しているが、OGD 負荷後 CRTC1 は細胞質から核内へ移行する。C, D : 塩誘導性キナーゼ 2 (SIK2) 欠損マウス (SIK2 K/O) と野生型マウス (WT) での OGD 負荷後の CRE 転写活性 (C), CRTC1 活性 (D) の比較。

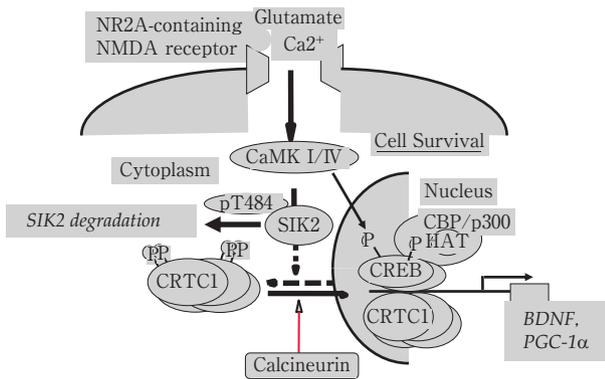


Fig. 3 虚血負荷に際する神経細胞での CREB 活性化の分子機構.

NMDA : N-methyl-D-aspartate, NR2A : NMDA receptor subunit 2A, CaMK : calmodulin dependent kinase, SIK2 : salt-inducible kinase 2, CRTC1 : CREB-regulated transcription coactivator, CBP : CREB binding protein, BDNF : brain-derived neurotropic factor, PGC-1 α : PPAR-gamma coactivator 1 α , HAT : histone acetyltransferase

しておくと OGD 負荷後の CREB 活性, CRE 遺伝子発現亢進が抑制され, 虚血負荷に際する CREB 活性化には CRTC1 が関与することが明らかになった。

3 : CREB 活性化への塩誘導性キナーゼの関与

CRTC1 はリン酸化による制御を受けていると考えられ, 生理的状态では塩誘導性キナーゼ (Salt inducible kinase : SIK) によるリン酸化により主として細胞質に分布している。しかし OGD 負荷後には SIK の主要な構成要素 SIK2 が分解し CRTC1 の脱リン酸化が進み細胞質から核への移行を促進する。SIK2 を microRNA をもちいて発現抑制すると OGD 負荷後の CRE 転写活性が亢進し細胞障害が軽減する。SIK2 欠損マウスから作成した培養神経細胞では野生型由来神経細胞に比し OGD 負荷後の CRTC1 活性, CRE 転写活性が亢進し (Fig. 2) OGD 負荷後の細胞障害が軽減する。また成熟マウスの中大脳動脈閉塞再灌流モデルをもちいた検討では虚血側大脳皮質で SIK2 の分解, CRTC1 の細胞質から核への移行が観察され, SIK2 欠損マウスに中大脳動脈閉塞再灌流を負荷すると野生型マウスに比し梗塞体積が有意に縮小した。以上の結果より, OGD および虚血再灌流では SIK2 が分解し

CTRC1 活性化, CRE 転写活性亢進を介した細胞防御機構が作動していると考えられた。

4 : シナプス NMDA 受容体を介した細胞内カルシウム流入とカルモジュリンキナーゼの関与

OGD に際する SIK2 分解の分子機構については, SIK2 が分解する前に 484 番目のスレオニン残基のリン酸化が生じていることが明らかになった。SIK2 リン酸化にかかわる酵素としてカルモジュリンキナーゼ (CaMK) I および IV が関与していることが免疫沈降法, 野生型およびドミナントネガティブ型 CaMK の遺伝子導入実験から明らかにした。OGD に際する CaMK 活性化の機構としては NMDA 受容体とくにシナプス NMDA 受容体を介していることが NR2A 選択的拮抗薬, ビククリン・4 アミノピリジンによるシナプス刺激実験から明らかになった。CaMK は CREB133 をリン酸化することも知られており, CaMKI または IV を介した細胞内情報伝達が CREB Ser133 リン酸化による CBP の動員, SIK2 リン酸化とそれともなう分解, CRTCI の核内移行, CREB bZIP ドメインへの結合を介して CRE 転写活性亢進に寄与していると考えられる。

5 : 虚血耐性獲得への転写因子 CREB 活性化の関与

OGD および中大脳動脈閉塞においてシナプス NMDA 受容体を介した刺激が CREB 転写活性を亢進し細胞保護に関与していることが示されたが, この経路が培養神経細胞の虚血耐性の実験系で関与しているかどうか検討した⁸⁾。培養神経細胞で虚血耐性を誘導する軽度 OGD 負荷でも SIK2 分解 CREB リン酸化 CRE 転写活性亢進が確認されたが, CREB の 133 番目のセリンをアラニンに置換したドミナントネガティブ型の遺伝子導入を投与すると軽度 OGD 負荷による虚血耐性誘導効果が消失すること, NR2A 選択的拮抗薬の投与により軽度 OGD 負荷後の CRE 配列を有する BDNF プロモーター活性亢進が抑制され虚血耐性の誘導も抑制されることが明らかになった⁷⁾。

おわりに

脳虚血に対する内在神経細胞防御機構として転写因子 CREB 活性化の関与とその分子機構について検討した。われわれの実験結果から想定される虚血負荷から転写因子 CREB

活性化までの分子機構を Fig.3 にまとめた。虚血負荷により遊離されるグルタミン酸がシナプス NMDA 受容体を活性化し細胞内への Ca 流入を促進する。細胞内 Ca 濃度の上昇は CaMKI または IV を活性化し CREB リン酸化を亢進させるとともに SIK2 をリン酸化ついで分解を生ずる。SIK2 の分解により CRTCI が脱リン酸化状態となり核内への移行 CREB basicZIP ドメインに結合し CRE 転写活性を亢進する。BDNF をはじめ多くの神経細胞保護作用を有する因子が CREB による転写制御を受けており虚血に対する神経細胞防御作用を発揮すると想定される。虚血耐性獲得には神経細胞以外にもグリア細胞血管内皮細胞の負荷応答現象も関与していると考えられるが⁸⁾ 神経細胞での CREB を介した遺伝子発現は神経細胞での虚血耐性獲得の重要な要因と考えられる。

※本論文に関連し, 開示すべき COI 状態にある企業, 組織, 団体はいずれもありません。

文 献

- 1) Kitagawa K, Matsumoto M, Tagaya M, et al. Ischemic tolerance phenomenon found in the brain. *Brain Res* 1990; 528:21-24.
- 2) Yenari M, Kitagawa K, Lyden PD, et al. Metabolic down regulation: A key to successful neuroprotection? *Stroke* 2008;39:2910-2917.
- 3) Kitagawa K. CREB and CRE-mediated gene expression in the ischemic brain. *FEBS Journal* 2007;274:3210-3217.
- 4) Mabuchi T, Kitagawa K, Kuwabara K, et al. Phosphorylation of CREB in hippocampal neurons as a protective response after exposure to glutamate and ischemia in vivo. *J Neurosci* 2001;21:9204-9213.
- 5) Sugiura S, Kitagawa K, Omura-Matsuoka E, et al. CRE-mediated gene transcription in the peri-infarct area after focal cerebral ischemia in mice. *J Neurosci Res* 2004;75: 401-407.
- 6) Sasaki T, Takemori H, Yagita Y, et al. SIK2 is a new key regulator for neuronal survival after ischemia through TORC1-CREB. *Neuron* 2011;69:106-119.
- 7) Terasaki Y, Sasaki T, Yagita Y, et al. Activation of NR2A receptors induces ischemic tolerance through CREB signaling. *J Cerebral Blood Flow Metab* 2010;30:1441-1449.
- 8) Kitagawa K. Ischemic Tolerance in the Brain—Endogenous Adaptive Machinery against Ischemic Stress—. *J Neurosci Res* 2012.

Abstract**CREB activation is a key player for ischemic tolerance in the brain**

Kazuo Kitagawa, M.D., Tsutomu Sasaki, M.D., Yasukazu Terasaki, M.D.,
Yoshiaki Yagita, M.D. and Hideki Mochizuki, M.D.
Department of Neurology, Osaka University Graduate School of Medicine

Ischemic tolerance is as powerful and reproducible for neuro-protection as hypothermia. Several pathways could be involved in acquisition of ischemic tolerance. CREB is an abundant transcription factor in the brain and plays critical role on synaptic plasticity and neuronal survival. CREB activation has been also shown to be involved in ischemic tolerance. Ischemia or oxygen-glucose deprivation leads to release of glutamate, which binds to synaptic NMDA receptor. Then, influx of calcium ions into intracellular space activates calcium-calmodulin dependent protein kinase (CaMK). CaMK I/IV phosphorylates Ser 133 of CREB, and Thr 484 of salt-inducible kinase (SIK). Phosphorylation of SIK2 at Thr 484 triggers degradation of SIK2 through ubiquitin proteasome system. SIK2 maintains the phosphorylation level of CREB-regulated transcriptional co-activator (CRTC). Degradation of SIK2 induces dephosphorylation of CRTC1, and moves CRTC1 from cytoplasm into nucleus. Thus CRTC1 binds to basic ZIP domain of CREB. Both Ser133 phosphorylation and CRTC1 bound to the basic ZIP domain of CREB enhances CRE-mediated transcription, induces gene expression of survival factors, and renders the neurons resistant to subsequent severe ischemia.

(Clin Neurol 2012;52:904-907)

Key words: ischemic tolerance, Glutamate receptor, CREB-regulated transcription co-activator, salt-inducible kinase, selective vulnerability
