

総 説

脳虚血とプロテインキナーゼ
Cerebral ischemia and the related protein kinases

松 本 晶 平 室 園 美 智 博 渡 辺 省 五
一 色 淳

Shohei MATSUMOTO, Michihiro MUROZONO, Seigo WATANABE
Atsushi ISSHIKI

東京医科大学麻酔科学講座
Department of Anesthesiology, Tokyo Medical University

はじめに

1980年以前、脳蘇生の研究は脳血流、脳代謝を中心に行われていた。他臓器に比べ脳はとりわけ虚血に脆弱である事が知られていたが、それは脳がグルコースからしかエネルギーを得られないこと、脳神経細胞には再生力がないこと、頭蓋容量が限られ頭蓋内圧が亢進しやすく、灌流障害が起きやすい性質を持つこと等が原因とされていた。脳保護とは脳のエネルギー需要を減少させるもの、あるいは酸素供給や血流を増加させるものを意味していた。麻酔薬も脳保護作用を有するとして研究され、たとえばバルビツレートは脳代謝を抑制するため、臨床で広く使用されており、また逆に現在は *N*-methyl-D-aspartic acid (NMDA) レセプターのアンタゴニストで脳保護作用があると認識されるケタミン²⁾などは、血圧上昇により頭蓋内圧を上昇させるとして脳障害のある患者には禁忌であった。しかし1982年に遅発性神経細胞死という現象が報告され³⁾、状況が一変する。5分から10分の一過性前脳虚血後数日を経て海馬のCA1細胞などに見られるこの現象は、脳血流やエネルギー代謝の障害だけでは

説明することが出来ず、脳虚血研究のトピックスは細胞カルシウム代謝、プロテイン合成など、分子細胞レベルへと移っていく。1990年代、米国では「脳の10年」とされ、豊富な資金投入とゲノム研究の成果により、脳研究はさらに進化する。生物学の新しい概念であるアポトーシスや細胞内情報伝達が注目を浴び、脳虚血の研究においても細胞内シグナルを研究の中心とするものが散見されるようになる。筆者らの研究も脳虚血を細胞内情報伝達という観点から捉えたもので、その成果はまだ脳虚血の全容を明らかにするには程遠いものであるが、脳虚血再灌流時のグルタメート・カルシウム仮説を全く別の観点から裏付けるものとなった。本稿では、代表的な細胞内情報伝達分子であるプロテインキナーゼと脳虚血の関係について、筆者らの結果を中心に概説する。

細胞内情報伝達と虚血による脳障害

細胞内情報伝達という概念の始まりは、1958年のSutherlandによるcAMPの発見⁴⁾であるといわれている。この発見により、細胞膜受容体が、細胞外シグナルを細胞内シグナルへ転換するという機能が明ら

2006年9月26日受付、2006年11月16日受理

キーワード：脳虚血、プロテインキナーゼ、細胞内情報伝達

(別冊請求先：〒160-0023 東京都新宿区新宿6-7-1 東京医科大学医科大学病院 麻酔科学講座 松本 晶平)

かにされた。一般的には、受容体とリガンドがはじめて結合してから、細胞の最終応答との間に細胞内で起こる事象が細胞内シグナル (情報) 伝達である。細胞はその周囲から何百という種類のシグナルに曝され、これらはまた、細胞へのコンタクトの違いによって更に何百万という組み合わせへと拡がってゆく。細胞はこの状況に対応し、発生の過程で獲得した特性に従って特定のシグナルに選択的に応答する。

脳虚血時はノルアドレナリン⁵⁾やドーパミン⁶⁾、セロトニン、グルタメート⁷⁾、アデノシン⁸⁾など、一般的なリガンドの過剰な放出が起こる。細胞内情報伝達の内容から見れば、脳障害はこれらの物質とその受容体により引き起こされる脳神経細胞の異常 (結果が病的という意味で) 応答と考えられる。また、一方では Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)、Nerve growth factor (NGF) のような増殖因子の投与は神経細胞の障害を和らげ⁹⁾¹⁰⁾、インターロイキン 1 β は障害を増幅する¹¹⁾ 事が知られている。これらのリガンドも受容体を通して脳虚血を修飾する。受容体と一対になった細胞内信号は、セカンドメッセンジャーと呼ばれ、cAMP、cGMP、イノシトール 3リン酸 (IP₃)、ディグリセリド、セラミド、NO、カルシウムイオンといった幅広い分子群を含んでいる。また、NO、過酸化水素、スーパーオキシドアニオン等のフリーラジカルも転写因子活性の調節にあずかる¹²⁾ ことから、上に挙げた分子群とともにセカンドメッセンジャーと捉えることが可能である。これらセカンドメッセンジャーのほとんどは、脳虚血中と虚血後に上昇する。セカンドメッセンジャーは受容体のような機能的プロテインと直接結合するか、あるいはプロテインキナーゼのような特別な調節プロテインと結合し、シグナルをターゲットプロテインまで伝達する。そこでプロテインのリン酸化、酸化還元電位の変化や分解を引き起こし、虚血障害に至らしめる。セカンドメッセンジャーのシグナルは瞬間的なものが多く、組織病理学的な変化を見つけるのは困難である。そのため、細胞情報伝達の変化を継続的に調べるには、セカンドメッセンジャーのターゲットとなるプロテインの研究が適している。

プロテインのリン酸化

プロテインキナーゼとフォスファターゼは細胞情報伝達の中心である¹³⁾。プロテインキナーゼはスレオニン、セリンおよびチロシン残基を ATP を使ってリン酸化する酵素で、一方フォスファターゼはリン酸エ

ステル結合を加水分解して逆の反応を触媒する。

プロテインのリン酸化はターゲットプロテインの特性と機能を変え、構造的にも大きな変化を引き起こす。リン酸基はプロテインのセリン残基、スレオニン残基そしてチロシン残基とエステル結合する。これらアミノ酸に対する特性によって、キナーゼはセリン・スレオニンプロテインキナーゼとチロシンキナーゼに分類される。リン酸基はフォスファターゼによって加水分解され、プロテインの機能的変化は還元する¹⁴⁾。フォスファターゼはキナーゼに比べ、基質に対する特異性は少ない。プロテインのリン酸化は、フォスファターゼがなければ安定した共有結合である。したがって、リン酸化で生じた機能変化は、リン酸化したプロテインが活性化フォスファターゼに脱リン酸化されるまで続く。

通常の脳でも、long time potentiation (LTP) の間はプロテインのリン酸化が継続して起こる¹⁵⁾。しかし、プロテインキナーゼとフォスファターゼのターンオーバーが障害されたり、それらの活性化が長く続いて活性が変化したり、ニューロンの興奮性が継続的に変化したりすると、細胞機能の変化が起こる可能性があり、それが不可逆的なものであれば細胞死につながる可能性がある。

プロテインキナーゼ C (PKC)

本稿の主役のひとつである PKC は、カルシウムイオンおよびリン脂質依存性セリン・スレオニンプロテインキナーゼで、1970年代後半に西塚らによって発見された¹⁶⁾¹⁷⁾。PKC の発見が重要だったのは、当時のトピックであったホスホリパーゼ C (PLC) が引き金となるホスファチジルイノシトール (PI) ターンオーバーのエフェクター分子であることが判明したからである。つまり、PLC が膜由来の PI をイノシトールリン酸 (IP) とディアシルグリセロール (DG) に分解し、IP が細胞内カルシウムイオン貯蔵部位からカルシウムイオンを動員し、最終的に DG とカルシウムイオンが PKC を活性化する。その後種々のリン脂質関連分子も PKC を活性化することが報告され、PKC はカルシウムイオンシグナルと各種脂質メディエーターの中心的な分子として認識されている。

PKC はその分子クローニングにより、哺乳類では少なくとも 11 種類のサブタイプがあることが解っている。その制御ドメインの一次構造の違いから、cPKC (classical PKC)、nPKC (novel PKC)、aPKC (atypical

PKC) の3種に大別される¹⁸⁾。cPKCは共通のドメインとしてC1とC2ドメインを持つ。C1ドメインはDG等の脂質やホルボールエステルが結合するドメインで、C2ドメインはカルシウムイオンが結合するドメインであると考えられている。cPKCは、PKC α 、PKC β 、PKC γ のサブタイプが存在し、いずれもDGとカルシウムイオンによって活性化される。

脳虚血とPKC

脳虚血によるATPの低下により細胞膜の脱分極が起り、電位依存性のイオンチャンネルが開き、細胞内のカルシウム濃度が上昇する。能動輸送によるカルシウムの細胞外への排出も低下する。細胞膜の加水分解によりアラキドン酸、フォスファチジルセリン、DGが遊離する。これらの条件下にPKCは細胞質から細胞膜へ転移し、細胞膜と強い結合をする¹⁹⁾²⁰⁾。虚血後の再灌流では、細胞膜に転移したPKCは約24時間で分解されるが、その間転移したPKCは活性化されて、何らかの情報伝達を行っていると考えられる(図1)。

プロテインキナーゼCの阻害薬であるスタウロsporinは、ラットとスナネズミにおいて虚血による神経細胞死を抑制する²¹⁾。神経細胞中に豊富に存在するスフィンゴ糖脂質であるGM1ガングリオシドは、神経細胞死を抑制すると同時にPKCの転移を抑制する²²⁾。虚血中の低体温は強い神経保護作用を示すが、虚血によるPKCの転移も抑制する²³⁾。虚血プレコンディショニングにより、海馬CA1において転移したPKCはプレコンディショニングを行っていないコントロールに比べ速やかに分解される²⁴⁾。これらの事実は、PKCの転移の抑制は神経細胞死を減少させる事を示唆している。筆者が在籍したLund大学のグループはPKCのサブタイプのうち、PKC γ の転移が脳虚血侵襲とよく相関することを明らかにした。

脳虚血とカルシウムカルモジュリン依存性キナーゼII (CaMKII)

本稿で紹介するもう一つのプロテインキナーゼであるカルシウムカルモジュリン依存性プロテインキナーゼはPKCと同じくセリン・スレオニンプロテインキナーゼで、動物細胞でのカルシウムの作用のほとんどを仲介していると考えられる。なかでもCaMKIIは脳で高濃度に存在し、カルモジュリンと結合し²⁵⁾、カルシウムイオンによって活性化される。それによりCaMKIIは自己リン酸化 (autophosphorylation) し、カルシウム非依存性になる²⁶⁾。こうしてCaMKIIは活性状態に切り替わった後、カルシウムシグナルが減衰した後も活性を保つことで分子レベルの記憶装置として働く。この特性から神経系での記憶や学習に重要な役割を果たすとされている。

虚血中にCaMKIIは細胞膜に転移する。とりわけシナプス部位に多い²⁷⁾²⁸⁾(図2)。海馬CA3、歯状回そして新皮質といった脳虚血に強い部位では、転移は再灌流後24時間で回復するが、海馬CA1のシナプス部位においては転移が継続し、虚血後24時間以上続く。これは、カルシウムイオンの流入やフリーラジカルフォーメーションといった有害事象が細胞障害から死に至るまでの間ずっと続いていることを示している。

局所脳虚血モデルによる研究

動物実験の脳虚血モデルは、前脳虚血モデルと局所脳虚血モデルの2つに分類される。前脳虚血モデルは心停止による脳虚血をモデル化したもので、海馬CA1領域など、未だ不明な点が多い脳細胞の選択的脆弱性の研究に適している。局所脳虚血モデルは脳血管を選択的に閉塞させ、脳梗塞をモデル化したものである。モデル動物を問わず、多くが左右どちらかの中大脳動脈を閉塞させ、一定時間の後に閉塞を解除して再灌流

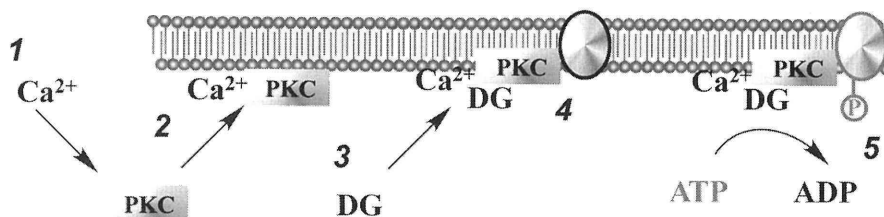


図1 PKC γ の脳虚血における細胞膜への転移の様子
1 カルシウムイオンの流入、2 細胞膜との弱い結合、3 DG (diacylglycerol)が結合、4 細胞膜との強い結合、5 ATP存在下に基質をリン酸化、6 異常なシグナル伝達

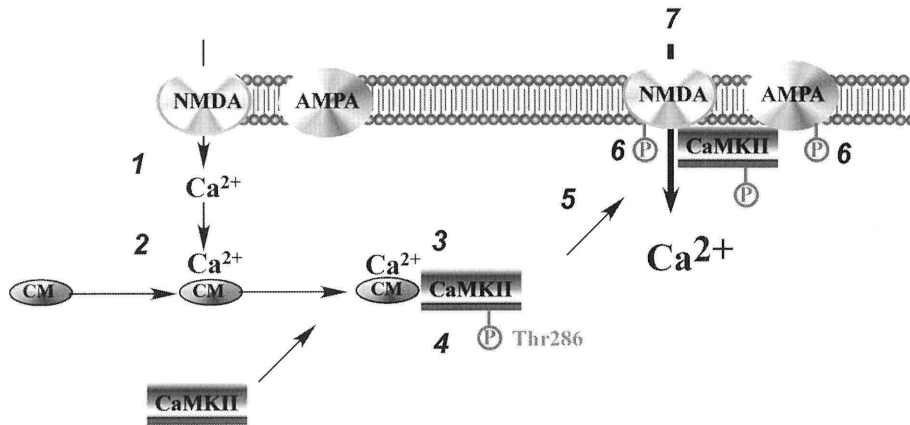


図2 CaMKII- α の脳虚血における細胞膜への転移の様子

1 カルシウムイオンの流入、2 カルモジュリンがカルシウムイオンと結合し複合体となる、3 複合体が CaMKII と結合、4 Thr286 がリン酸化 (autophosphorylation) し、カルシウム非依存性になる、5 リン酸化 CaMKII が細胞膜 (シナプス部位) に転移、6 レセプターをリン酸化、7 異常なシグナル伝達

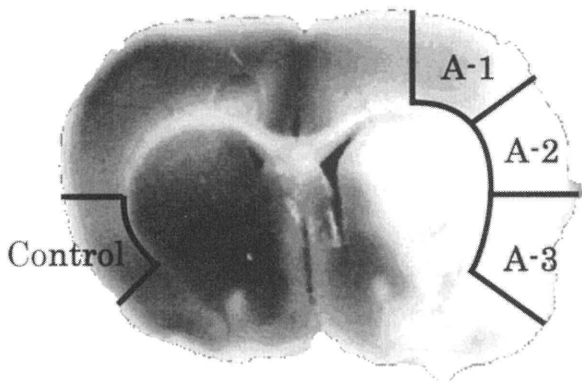


図3 ラット中大脳動脈閉塞モデルで、2時間虚血後48時間の再灌流を行い、塩化テトラゾリウムで染色した脳スライスと、実験で用いたサンプル領域を示す。梗塞部分は白く残されている。実験では対側の健常部分をコントロールとし、梗塞の度合いにより A-1 から A-3 までに分けた。A-1 は弱いペナンプラ、A-2 は強いペナンプラ、A-3 は虚血の中心部である。実際のサンプルは1時間から2時間の虚血と2時間の再灌流のため、染色しても梗塞部位はこれほど明らかではない。(文献 31 より)

を行えるよう工夫されている。このモデルで特徴的なのはペナンプラ²⁹⁾³⁰⁾と呼ばれる領域で、血流低下が中等度であって直ちに神経細胞死は発生しないものの、神経細胞の電気的活動が障害される領域が存在することである。一定時間強度な虚血におかれた部位は、その後の治療によっても神経細胞死は免れないが、その周辺に生じたペナンプラ領域はその後の治療によっては回復が可能であると考えられている。しかしながらペナンプラ領域といっても、障害が強度な部位から正常組織に近い部位まで連続的に存在する。筆者はラット局所脳虚血および再灌流モデルを用いて、虚血の中心部位とペナンプラ領域との PKC γ と

CaMKII- α の変動を調べ、虚血に関連する細胞内情報伝達の一端を明らかにした³¹⁾。研究の概略は図3~8に示すとおりである。これらの結果から、虚血中心部位の A-3 において、シナプス膜分画 (P2) と小胞体などオルガネラを含む分画 (P3) には著明な PKC の上昇が認められ、細胞質分画 (S3) では逆に PKC の減少が認められた (図6)。これは虚血により過大な細胞内カルシウムイオンの流入が起きたためと考えられる³²⁾。また、虚血の比較的弱いペナンプラ領域である A-1 と、虚血の強いペナンプラ領域である A-2 においては、2時間の中大脳動脈閉塞 (MCAO) によっても P2 の明らかな PKC レベルの上昇は認められず、P3、S3 では減少している (図6)。さらに、分画前のホモジネートにおいても A-1 と A-2 の PKC レベルは減少している (図8)。このことは、ペナンプラ領域で PKC γ が分解されていることを示している。カルシウムイオン濃度は、おそらく虚血中心でもペナンプラ領域でも最大限に上昇していると考えられ、PKC の分解は、カルシウム依存性に PKC を分解することで知られているカルペイン³³⁾ によるものではなく、ATP 依存性のプロテイン分解 (proteolysis) によるものと考えられる。一方で PKC は 26S プロテオソームの基質であることが知られており³⁴⁾、プロテオソームがアポトーシスを引き起こすこと³⁵⁾ や、プロテオソーム複合体の抑制に神経保護作用が認められること³⁶⁾ から、我々は、ペナンプラ領域ではプロテアーゼ複合体が活性化され神経細胞死と深く関わっている可能性を推測している。2時間の再灌流により PKC のトランスクレーションはさらに著明となり、A-1、A-2 のペナンプラ

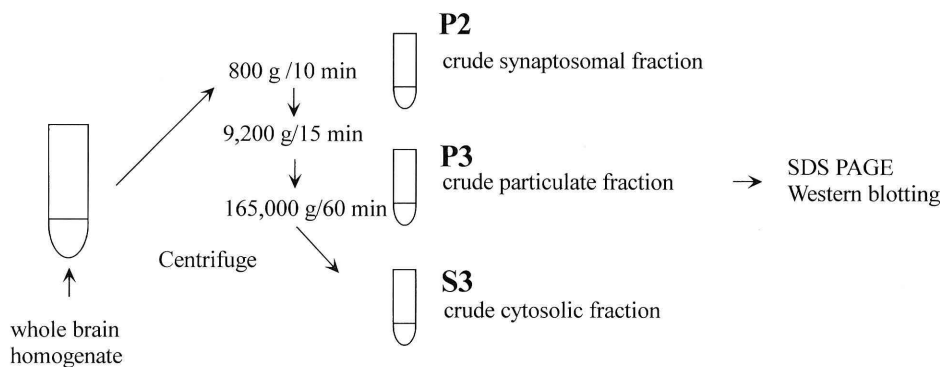


図4 凍結された各サンプルは、ホモジナイズ後、遠心分離によりシナプス部位の膜成分を含む分画 P2 (synaptosomal fraction)、小胞体等の細胞内小器官とシナプス膜部位以外の膜性分を含む分画 P3 (particulate fraction)、細胞質成分を含む P3 (cytosolic fraction) に分け、ウェスタンブロットを行った。

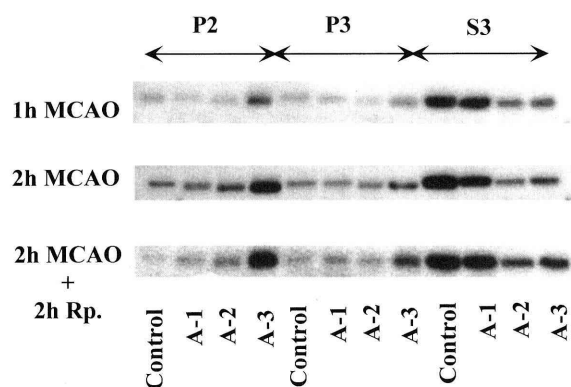


図5 図3に示した各虚血領域の抗 PKC γ 抗体によるウェスタンブロット。P2、P3、S3 各分画ごとに表している。それぞれ、1時間の中大脳動脈閉塞 (MCAO)、2時間の MCAO、そして2時間の MCAO および2時間の再灌流を行っている。(文献 31 より)

ブラ領域でも P2 の PKC レベルが上昇する。これはまさに時間とともにペナンプラの障害が不可逆的になっていくことと一致している。

PKC と同様に CaMKII も虚血により細胞質から細胞膜へ転移する。しかしながら、虚血侵襲、虚血再灌流時間によって、PKC の場合ほど差異が認められない (図 7)。CaMKII は PKC に比べ、より虚血に対して敏感に反応することがわかった。

局所脳虚血により、CaMKII と PKC は細胞膜に転移し、これらの反応は病的に増加したカルシウムイオンレベルにより引き起こされる³⁷⁾³⁸⁾。また、この転移はグルタメートレセプターの過剰なリン酸化を惹起し、活性化されたレセプターからのカルシウムイオン流入増加といった細胞死へと連なる一連のプロセスにつながる可能性がある³⁹⁾ (図 1、2)。

In vitro の研究では、プロテインキナーゼの酵素活性の測定は行っても、詳細な活性状態を調べることは

できない。近年新たに開発されたリン酸化プロテインキナーゼに対する抗体により、プロテインのリン酸化状態を把握し、生体におけるプロテインキナーゼとフォスファターゼの働きを捉えることが可能となった⁴⁰⁾。筆者らは、チロシン残基のリン酸化したプロテイン (PTyr) 特に NMDA レセプターの NR2A/B サブユニットと関連する 180kd のプロテインと、リン酸化した CaMKII- α (P-CaMKII) を測定し、虚血、再灌流による細胞内情報伝達について知見を得た⁴¹⁾。虚血モデルとサンプルは図 3、4、結果は図 9~12 に示す。

これらの結果からわかるとおり、虚血により ATP の供給が限られるため、プロテインのチロシンリン酸化も限定的である (図 10、12)。我々の局所脳虚血モデルでは、1~3 時間の虚血で、A-1 の血流は 40%、A-2 では 18%、A-3 では 10% まで低下する。ATP レベルは A-1 から A-3 まで段階的に、35% から 70% の低下が認められる⁴²⁾。A-1 はいわゆるペナンプラ²⁹⁾であり、虚血時にエネルギーレベルは維持されているが、我々のモデルでは 48 時間後には脳梗塞領域に含まれてしまう⁴³⁾。A-2、A-3 は強い虚血領域であり、虚血中の ATP レベルが低いためプロテインキナーゼの作用も限定的となる。

強い虚血領域である A-3 のチロシンリン酸化は減少しており、これもやはり ATP の減少によるものと推察される。対照的に A-1 のチロシンリン酸化は増加しており、受容体と神経伝達物質のアンバランスがプロテインキナーゼを活性化したのかもしれない (図 10、12)。再灌流後にはすべての虚血領域でチロシンリン酸化が増加しており、なおかつそれが P2 (シナプス膜部位) のみで認められ、P3 (plasma 膜、小胞体) と、S3 (細胞質) のプロテインには認められていないこと

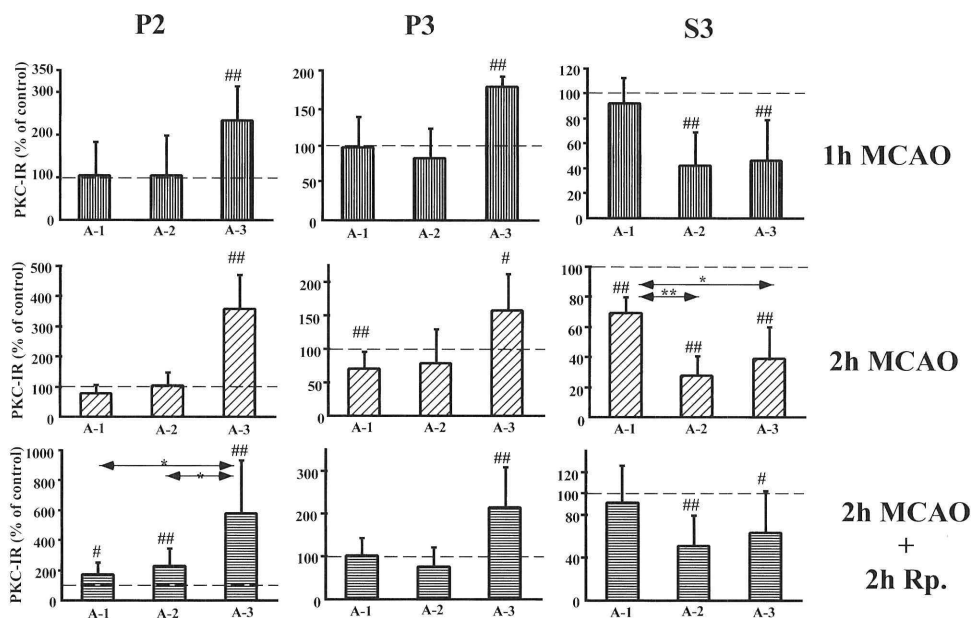


図6 図5で示した1時間、2時間のMCAO、2時間のMCAOおよび2時間の再灌流における、P2、P3、S3各分画の虚血エリアごとのPKC γ の変化を、コントロールを100としたパーセントチェンジで表している。値は平均値±標準偏差で表し、コントロールに対し信頼区間 (confidence intervals) 95% (#)、99% (##) をもって、また、Dunn-Bonferroni testにより $*p < 0.05$ 、 $**p < 0.01$ をもって有意とした。(文献31より)

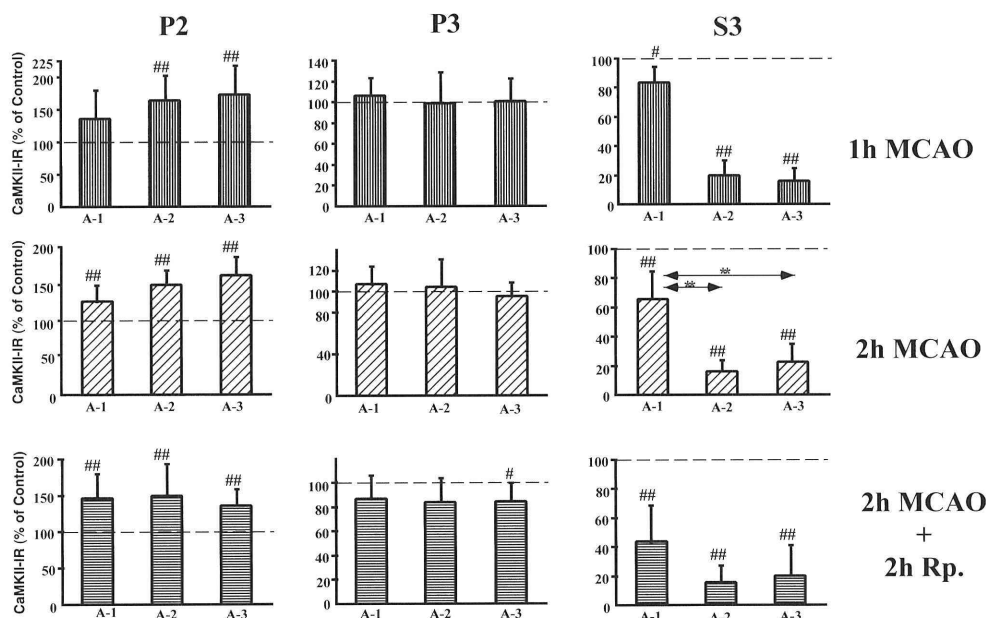


図7 1時間、2時間のMCAO、2時間のMCAOおよび2時間の再灌流における、P2、P3、S3各分画の虚血エリアごとのCaMKII- α の変化をコントロールを100としたパーセントチェンジで表している。値は平均値±標準偏差で表し、コントロールに対し信頼区間 (confidence intervals) 95% (#)、99% (##) をもって、また、Dunn-Bonferroni testにより $**p < 0.01$ をもって有意とした。(文献31より)

は、このリン酸化がシナプスで起きている現象を反映していることを強く示唆している (図10)。これは、細胞情報伝達がシナプス部位で増強され、受容体、イオンチャンネル、細胞骨格などの細胞膜プロテインに影響を及ぼしている証拠といえる。ラット前脳虚血モデルでも、脆弱なCA1領域で持続的なチロシンリン酸化

の増加が認められている。また、180-kdのリン酸化プロテインは、NMDAレセプターのNR2A/Bサブユニットとして知られており⁴⁴⁾、このチロシンリン酸化の持続的な増加は、細胞膜のイオン透過性を変化させ、細胞の恒常性を崩し、細胞死を引き起こすと考えられる⁴⁵⁾。

先にも触れたが、カルシウムイオンがカルモジュリンと結合し²⁵⁾、この複合体が CaMKII- α とさらに結合することで CaMKII- α の Thr286 が自己リン酸化 (autophosphorylation) される²⁶⁾。我々の結果は、リン酸化 CaMKII は細胞質には存在せず、P2、P3 の膜分画のみに存在していることを示している (図9)。つま

り、この自己リン酸化は細胞膜で起こっていることが明らかになった。さらに、すべての虚血領域の細胞膜でリン酸化 CaMKII レベルは増加を認め、特に虚血の強い領域で顕著である (図9、11)。これにより、虚血侵襲が CaMKII の情報伝達経路を活性化していることが考えられる。一方この結果は、虚血中に増加を見ないチロシンリン酸化とは対照的である。あくまで推測であるが、CaMKII の自己リン酸化は、ATP に対する Km が低い可能性、あるいはフォスファターゼがリン酸化部位に何らかの理由で到達しない可能性などが考えられる。しかしタンパクのチロシンリン酸化と同様に、リン酸化-CaMKII の増加は再灌流時にも継続し、細胞情報伝達のバランスに悪影響を与え続けるのであろう。

こうして、虚血再灌流により細胞情報伝達は過剰な受容体の活性化や、細胞内セカンドメッセンジャーの恒常性の乱れによって異常に活発となる。続いてシナプスの CaMKII- α の自己リン酸化と、シナプス膜部位の膜プロテインのチロシンリン酸化が増加し、これら過剰なリン酸化がシグナルとなり、さらなる悪循環を引き起こし、細胞死へ至らしめる。これを裏付けるものとして、虚血後の再灌流で CaMKII- α による alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) と NMDA の過剰なリン酸化が、グルタミン酸に対するこれら受容体の感受性増加をもたらす事が報告されている³⁸⁾⁴⁶⁾ (図2)。

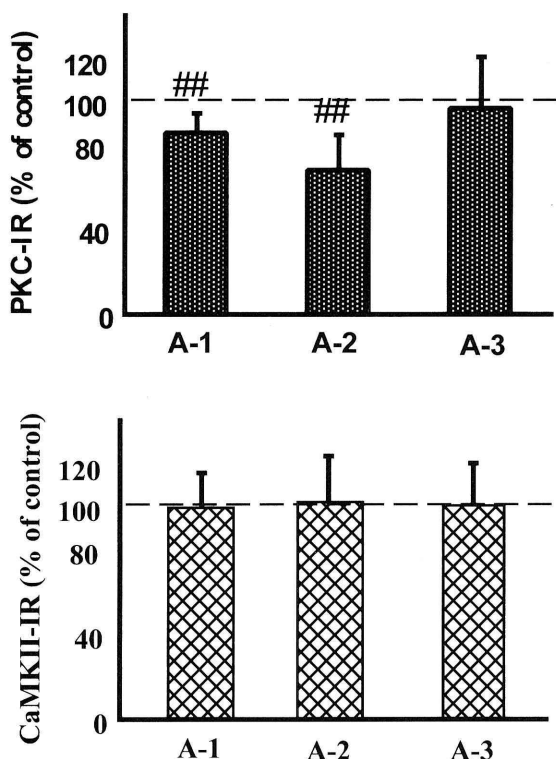


図8 2時間のMCAO後の各虚血領域のPKC γ およびCaMKIIの総量をウェスタンブロットで求めたグラフ。値は平均値±標準偏差で表し、コントロールに対し信頼区間 (confidence intervals)、99% (##) をもって有意差とした。(文献31より)

吸入麻酔薬の脳保護作用

筆者らは、PKCとCaMKIIが脳虚血時に転移する

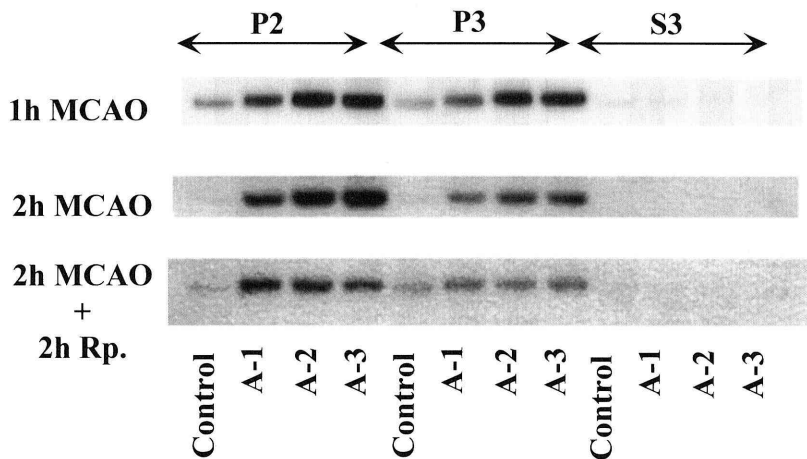


図9 図3に示した各領域の抗リン酸化CaMKII抗体によるウェスタンブロット。P2、P3、S3各分画ごとに表している。それぞれ、1時間の中大脳動脈閉塞 (MCAO)、2時間のMCAO、そして2時間のMCAOおよび2時間の再灌流を行っている。S3にはバンドが認められない。(文献41より)

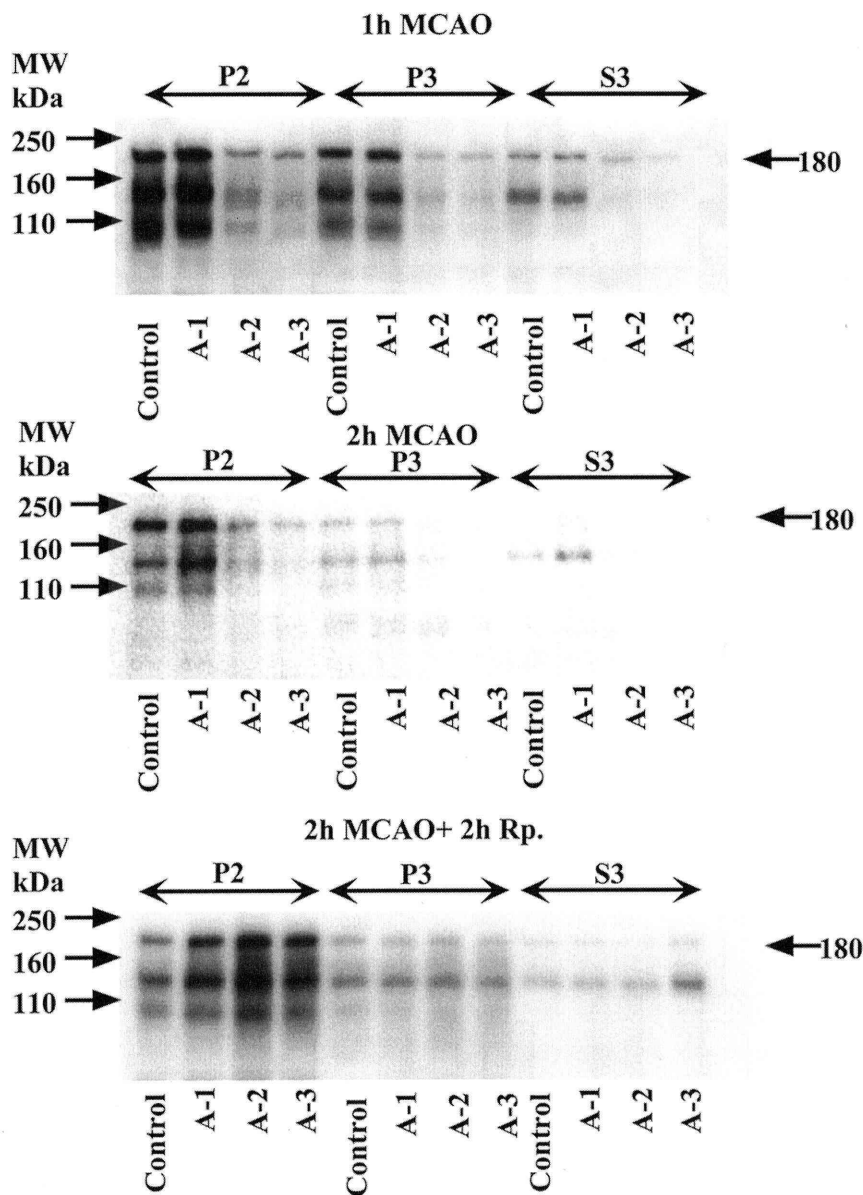


図10 図3に示した各領域の抗リン酸化チロシン抗体によるウェスタンブロット。P2、P3、S3各分画ごとに表している。それぞれ、1時間の中大脳動脈閉塞 (MCAO)、2時間の MCAO、そして2時間の MCAO および2時間の再灌流を行っている。(文献41より)

ことにより、吸入麻酔薬の脳保護作用を検証する研究を行っている。無麻酔状態をコントロールとする必要性から、マウスの断頭モデルを用いた。1 minimum alveolar concentration (MAC)、2MACのイソフルレンは、2分虚血で起こる CaMKII- α のトランスロケーションを有意に抑制した。前述のごとく、リン酸化した CaMKII は細胞質にほとんど認められず、細胞膜、特にシナプス部位に転移するという筆者らの結果を考慮すると、CaMKII の転移を抑えるということは、CaMKII のリン酸化つまり、Thr286 のリン酸化を抑制することである。従って、イソフルレンは、CaMKII の

リン酸化抑制により脳保護作用を持つことが示唆された⁴⁷⁾。この手法を用いることにより、種々の麻酔薬の脳保護作用を検証できる可能性があり、今後の結果が期待されている。

受容体とプロテインキナーゼとの相互作用 (インタラクション)

我々はまた、麻酔薬の脳保護作用を解明するため、マウス脳虚血時の NMDA レセプターサブユニット NR2A、NR2B のチロシンリン酸化、および、それらサブユニットと CaMKII をはじめとする虚血関連プ

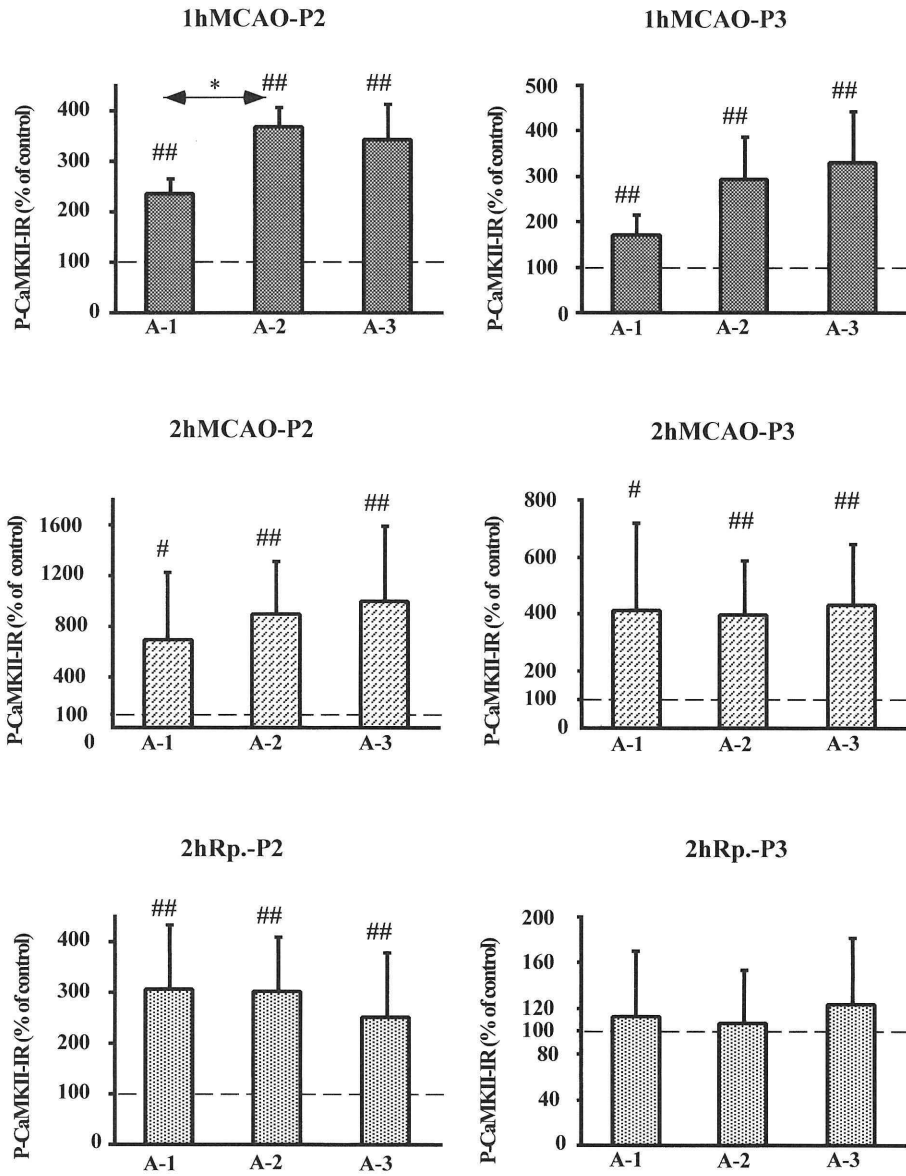


図 11 1時間、2時間のMCAO、2時間のMCAOおよび2時間の再灌流における、P2、P3、S3各フラクシオンの虚血エリアごとのリン酸化CaMKIIの変化をコントロールを100としたパーセントチェンジで表している。値は平均値±標準偏差で表し、コントロールに対し信頼区間 (confidence intervals) 95% (#)、99% (##) をもって、また、Dunn-Bonferroni testにより * $p < 0.05$ をもって有意とした。(文献 41 より)

ロテインキナーゼとのインタラクションを、ウェスタンブロットング法および免疫沈降法を用い、イソフルレン、セボフルレンなどの麻酔条件下で測定している。NMDA レセプターの活性化は、脳虚血による神経細胞死の主要なメカニズムと認識されている。最近の知見によれば、NMDA レセプターチャネルはそのチロシン基のリン酸化で制御されており、サブユニットのNR2A および NR2B のリン酸化が虚血による神経細胞死と深く関わっていることが示されている⁴⁸⁾。ラットの前脳虚血および再灌流において、海馬 CA1 の NR2A、NR2B サブユニットはリン酸化され、特に

NR2A において顕著であったという報告がある⁴⁴⁾。筆者らの結果も、前述したとおりラット脳梗塞モデルの虚血領域およびペナンプラ領域で、虚血再灌流時に NR2 サブユニットに相当する pp180 でのチロシンリン酸化が著明であり、これはリン酸化を受けた CaMKII が細胞質からシナプス部位に転移し、NR2 サブユニットをリン酸化している可能性がある。筆者らはイソフルレンによる CaMKII のトランスロケーション抑制が、リン酸化した CaMKII と NR2 サブユニットのインタラクションを低下させ、チロシンリン酸化を減少させることによって NMDA レセプターの活性

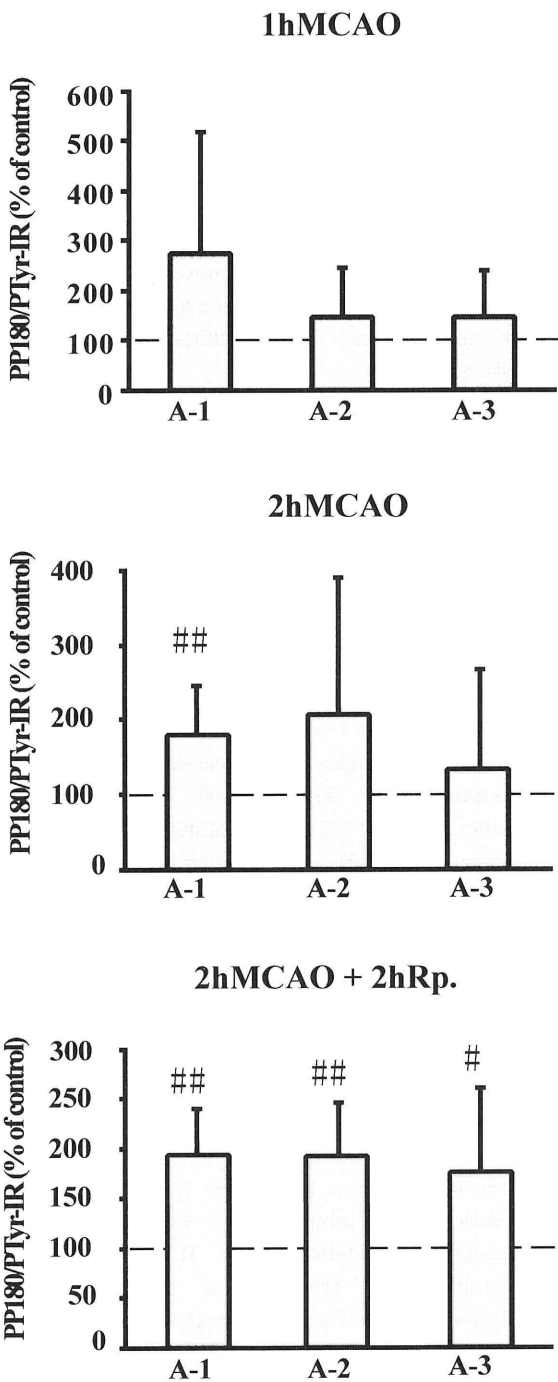


図 12 1 時間、2 時間の MCAO、2 時間の MCAO および 2 時間の再灌流における、P2 のチロシンリン酸化タンパク (pp180) の変化を、コントロールを 100 としたパーセントチェンジで表している。値は平均値±標準偏差で表し、コントロールに対し信頼区間 (confidence intervals) 95% (#)、99% (##) をもって有意とした。P3、S3 はリン酸化が少ないため P2 のみのグラフとした。(文献 41 より)

化を抑え、脳保護作用をもたらしていると推測している。また、種々の吸入麻酔薬の脳保護作用を NR2 サブユニットのリン酸化により定量することで、脳機能維持を目標とする麻酔法の確立に寄与すると考えてい

る。

ま と め

脳虚血とプロテインキナーゼについて、筆者らの結果を中心として概説した。

脳虚血、再灌流により、脳神経細胞のダメージは分子レベルで刻一刻と進行するが、臨床に於いてその様子を把握するのは困難である。動物実験に於いてさえ、光学顕微鏡で in vivo の形態学的変化がとらえられるのは早くても数時間後であろう。しかし、脳虚血の細胞内シグナルを測定することにより、in vivo であっても虚血早期からの細胞内イベントを明確に把握することが可能である。虚血によりシナプス近傍で起きるカルシウムの流入、それにより生じる受容体のリン酸化、さらにカルシウムが流入し悪循環を形成する。それらはプロテインキナーゼの転移や、チロシンリン酸化の程度などから分単位で分析することができる。そしてそれらの引き起こすシグナルにより、虚血後数分から数時間で脳細胞の生死は決定してしまうことになる。

細胞内シグナルは、暗闇で光る銃口と弾丸の光跡のように、起きたイベントを生々しく知らせてくれる。これらのシグナルを抑制、制御することが、脳保護の新しい道しるべとなるに違いない。

文 献

- 1) Yatsu FM, Diamond I, Graziano C, Lindquist P: Experimental brain ischemia: protection from irreversible damage with a rapid-acting barbiturate (methohexital). *Stroke* **3**: 726-732, 1972
- 2) Hoffman WE, Pelligrino D, Werner C, Kochs E, Albrecht RF, Schulte am Esch J: Ketamine decreases plasma catecholamines and improves outcome from incomplete cerebral ischemia in rats. *Anesthesiology* **76**: 755-762, 1992
- 3) Kirino T: Delayed neuronal death in the gerbil hippocampus following ischemia. *Brain Res* **239**: 57-69, 1982
- 4) Sutherland EW, Rall TW: Fractionation and characterization of a cyclic adenosine ribonucleotide formed by tissue particles. *J Biol Chem* **232**: 1077-1091, 1958
- 5) Gustafson I, Westerberg EJ, Wieloch T: Extracellular brain cortical levels of noradrenaline in ischemia: effects of desipramine and postischemic administration of idazoxan. *Exp Brain Res* **86**: 555-561, 1991
- 6) Globus MY, Busto R, Dietrich WD, Martinez E, Valdes I, Ginsberg MD: Effect of ischemia on the

- in vivo release of striatal dopamine, glutamate, and gamma-aminobutyric acid studied by intracerebral microdialysis. *J Neurochem* **51**: 1455-1464, 1988
- 7) Takagi K, Ginsberg MD, Globus MY, Dietrich WD, Martinez E, Kraydieh S, Busto R: Changes in amino acid neurotransmitters and cerebral blood flow in the ischemic penumbral region following middle cerebral artery occlusion in the rat: correlation with histopathology. *J Cereb Blood Flow Metab (United States)* **13**: 575-585, 1993
 - 8) Hagberg H, Andersson P, Lacarewicz J, Jacobson I, Butcher S, Sandberg M: Extracellular adenosine, inosine, hypoxanthine, and xanthine in relation to tissue nucleotides and purines in rat striatum during transient ischemia. *J Neurochem (United States)* **49**: 227-231, 1987
 - 9) Beck T, Lindholm D, Castren E, Wree A: Brain-derived neurotrophic factor protects against ischemic cell damage in rat hippocampus. *J Cereb Blood Flow Metab (United States)* **14**: 689-692, 1994
 - 10) Pechan PA, Yoshida T, Panahian N, Moskowitz MA, Breakefield XO: Genetically modified fibroblasts producing NGF protect hippocampal neurons after ischemia in the rat. *Neuroreport (England)* **6**: 669-672, 1995
 - 11) Rothwell NJ, Relton JK: Involvement of interleukin-1 and lipocortin-1 in ischaemic brain damage. *Cerebrovasc Brain Metab Rev (United States)* **5**: 178-198, 1993
 - 12) Sen CK, Packer L: Antioxidant and redox regulation of gene transcription. *FASEB J (United States)* **10**: 709-720, 1996
 - 13) Walaas SI, Greengard P: Protein phosphorylation and neuronal function. *Pharmacol Rev (United States)* **43**: 299-349, 1991
 - 14) Shenolikar S, Nairn AC: Protein phosphatases: recent progress. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res (United States)* **23**: 1-121, 1991
 - 15) Pasinelli P, Ramakers GM, Urban IJ, Hens JJ, Oestreicher AB, de Graan PN, Gispen WH: Long-term potentiation and synaptic protein phosphorylation. *Behav Brain Res (Netherlands)* **66**: 53-59, 1995
 - 16) Takai Y, Kishimoto A, Iwasa Y, Kawahara Y, Mori T, Nishizuka Y: Calcium-dependent activation of a multifunctional protein kinase by membrane phospholipids. *J Biol Chem* **254**: 3692-3695, 1979
 - 17) Nishizuka Y: Studies and perspectives of protein kinase C. *Science* **233**: 305-312, 1986
 - 18) Shirai Y, Saito N: Activation mechanisms of protein kinase C: maturation, catalytic activation, and targeting. *J Biochem (Tokyo)* **132**: 663-668, 2002
 - 19) Wieloch T, Cardell M, Bingren H, Zivin J, Saitoh T: Changes in the activity of protein kinase C and the differential subcellular redistribution of its isozymes in the rat striatum during and following transient forebrain ischemia. *J Neurochem* **56**: 1227-1235, 1991
 - 20) Domanska-Janik K, Zablocka B: Protein kinase C as an early and sensitive marker of ischemia-induced progressive neuronal damage in gerbil hippocampus. *Mol Chem Neuropathol (United States)* **20**: p. 111-123, 1993
 - 21) Hara H, Onodera H, Yoshidomi M, Matsuda Y, Kogure K: Staurosporine, a novel protein kinase C inhibitor, prevents postischemic neuronal damage in the gerbil and rat. *J Cereb Blood Flow Metab* **10**: 646-653, 1990
 - 22) Vaccarino F, Guidotti A, Costa E: Ganglioside inhibition of glutamate-mediated protein kinase C translocation in primary cultures of cerebellar neurons. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**: 8707-8711, 1987
 - 23) Cardell M, Boris-Moller F, Wieloch T: Hypothermia prevents the ischemia-induced translocation and inhibition of protein kinase C in the rat striatum. *J Neurochem* **57**: 1814-1817, 1991
 - 24) Shamloo M, Wieloch T: Rapid decline in protein kinase C γ levels in the synaptosomal fraction of rat hippocampus after ischemic preconditioning. *Neuroreport* **10**: 931-935, 1999
 - 25) Soderling TR: Calcium/calmodulin-dependent protein kinase II: role in learning and memory. *Mol Cell Biochem* **127-128**: 93-101, 1993
 - 26) Miller SG, Patton BL, Kennedy MB: Sequences of autophosphorylation sites in neuronal type II CaM kinase that control Ca²⁺(+)-independent activity. *Neuron* **1**: 593-604, 1988
 - 27) Aronowski J, Grotta JC, Waxham MN: Ischemia-induced translocation of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II: potential role in neuronal damage. *J Neurochem* **58**: 1743-1753, 1992
 - 28) Hu BR, Kurihara J, Wieloch T: Persistent translocation and inhibition of Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II in the crude synaptosomal fraction of the vulnerable hippocampus following hypoglycemia. *J Neurochem* **64**: 1361-1369, 1995
 - 29) Astrup J, Siesjo BK, Symon L: Thresholds in cerebral ischemia - The ischemic penumbra. *Stroke* **12**: 723-725, 1981
 - 30) Memezawa H, Minamisawa H, Smith ML, Siesjo BK: Ischemic penumbra in a model of reversible middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Brain Res* **89**: 67-78, 1992
 - 31) Matsumoto S, Shamloo M, Matsumoto E, Isshiki A, Wieloch T: Protein kinase C- γ and calcium/calmodulin-dependent protein kinase II- α are persistently translocated to cell membranes of the rat brain during and after middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **24**: 54-61, 2004
 - 32) Silver IA, Erecinska M: Ion homeostasis in rat

- brain in vivo : intra- and extracellular $[Ca^{2+}]$ and $[H^{+}]$ in the hippocampus during recovery from short-term, transient ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* **12** : 759-772, 1992
- 33) Saido TC, Mizuno K, Suzuki K : Proteolysis of protein kinase C by calpain : effect of acidic phospholipids. *Biomed Biochim Acta* **50** : 485-489, 1991
- 34) Favit A, Grimaldi M, Nelson TJ, Alkon DL : Alzheimer's-specific effects of soluble beta-amyloid on protein kinase C-alpha and -gamma degradation in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* **95** : 5562-5567, 1998
- 35) Naujokat C, Hoffmann S : Role and function of the 26S proteasome in proliferation and apoptosis. *Lab Invest* **82** : 965-980, 2002
- 36) Philips MF, Mattiasson G, Wieloch T, Bjorklund A, Johansson BB, Tomasevic G, Martinez-Serrano A, Lenzlinger PM, Sinson G, Grady MS, McIntosh TK : Neuroprotective and behavioral efficacy of nerve growth factor-transfected hippocampal progenitor cell transplants after experimental traumatic brain injury. *J Neurosurg* **94** : 765-774, 2001
- 37) Barria A, Derkach V, Soderling T : Identification of the Ca^{2+} /calmodulin-dependent protein kinase II regulatory phosphorylation site in the alpha-amino-3-hydroxyl-5-methyl-4-isoxazole-propionate-type glutamate receptor. *J Biol Chem* **272** : 32727-32730, 1997
- 38) Soderling TR : Modulation of glutamate receptors by calcium/calmodulin-dependent protein kinase II. *Neurochem Int* **28** : 359-361, 1996
- 39) Wieloch T, Hu BR, Boris-Moller A, Cardell M, Kamme F, Kurihara J, Sakata K : Intracellular signal transduction in the postischemic brain. *Adv Neurol* **71** : 371-387, 1996
- 40) Hu BR, Wieloch T : Tyrosine phosphorylation and activation of mitogen-activated protein kinase in the rat brain following transient cerebral ischemia. *J Neurochem* **62** : 1357-1367, 1994
- 41) Matsumoto S, Shamloo M, Isshiki A, Wieloch T : Persistent phosphorylation of synaptic proteins following middle cerebral artery occlusion. *J Cereb Blood Flow Metab* **22** : 1107-1113, 2002
- 42) Folbergrova J, Memezawa H, Smith ML, Siesjo BK : Focal and perifocal changes in tissue energy state during middle cerebral artery occlusion in normo- and hyperglycemic rats. *J Cereb Blood Flow Metab* **12** : 25-33, 1992
- 43) Memezawa H, Smith M-J, Siesjo BK : Penumbra tissue salvaged by reperfusion following middle cerebral artery occlusion in rats. *Stroke* **23** : 552-559, 1992
- 44) Takagi N, Shinno K, Teves L, Bissoon N, Wallace MC, Gurd JW : Transient ischemia differentially increases tyrosine phosphorylation of NMDA receptor subunits 2A and 2B. *J Neurochem* **69** : 1060-1065, 1997
- 45) Shamloo M, Wieloch T : Changes in protein tyrosine phosphorylation in the rat brain after cerebral ischemia in a model of ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab* **19** : 173-183, 1999
- 46) Barria A, Muller D, Derkach V, Griffith LC, Soderling TR : Regulatory phosphorylation of AMPA-type glutamate receptors by CaM-KII during long-term potentiation. *Science* **276** : 2042-2045, 1997
- 47) 松本恵理子、松本晶平、室園美智博、渡辺泰雄、一色 淳 : イソフルレンがマウス脳虚血時のプロテインキナーゼ C とカルシウムカルモジュリン依存性プロテインキナーゼ II のトランスロケーションに与える影響。 *蘇生* **23** : 1-7, 2004
- 48) Wang YT, Salter MW : Regulation of NMDA receptors by tyrosine kinases and phosphatases. *Nature* **369** : 233-235, 1994