

脳虚血耐性現象における SUMO 化修飾機構の役割に関する研究

渡邊正知

福山大学 薬学部

【研究の背景】

虚血耐性は、非侵襲的虚血などにより侵襲的虚血あるいは再灌流障害に対する耐性を獲得する現象であるが、その詳細は未だ不明である。それゆえ、虚血耐性の分子メカニズム解明に基づく、内因性の神経保護作用の腑活化は、新たな脳梗塞の治療戦略として期待されている。これまで多くの報告¹⁾がなされているが、未だ、神経保護薬の開発には至っていない。我々は、寒冷環境適応行動の一つである冬眠に着目した。冬眠は、著しい血流量の低下(正常脳の 5%以下の低血流量)かつ低体温(6℃)と通常では死に至らしめるような状況を経るにもかかわらず、脳や神経細胞に全くダメージを与えない。それゆえ、自然の虚血耐性モデルと考えられている²⁾。冬眠動物における虚血耐性の分子メカニズムは未だ不明だが、エネルギーを消費する *de novo* タンパク合成³⁾よりも、制限されたエネルギーを有効活用するタンパク質翻訳後修飾によって制御されていることが容易に推測される。

【目 的】

近年、一過性脳虚血後の神経保護作用に、タンパク質翻訳後修飾の一つである small ubiquitin-related modifier (SUMO) 化修飾レベルの増加が、関与していることが示唆された⁴⁾。そこで本研究では、自然の虚血耐性モデルの冬眠における SUMO 化修飾の関連性を明らかにすることを目的とした。

【方 法】

全ての動物実験は、福山大学実験動物倫理部会承認のもと行った。シリアンハムスター (*Mesocricetus auratus* : 以下ハムスター) の冬眠は、環境温度 5℃、短日周期(明期 8 時間、暗期 16 時間)で飼育することにより誘発した。比較対象には、常温飼育したコントロール群、および 1 ヶ月寒冷・短日周期環境下で飼育した寒冷暴露群を用いた。脳摘出後、大脳皮質・海馬・視床・視床下部・中脳・小脳に分割し、各組織中の SUMO 化およびユビキチン(Ub)化修飾レベルを免疫ブロット法にて解析した。薬物は、すべてガイドカニューレを介して側脳室内に 5 μ L の容量で投与した。また、ハムスターの体温は、腹腔内にデータロガー(サーモクロン)を埋め込み、非拘束下で連続的に測定した。

【結 果】

冬眠におけるユビキチン関連分子群(SUMO1、SUMO2/3、Ub)の関与を明らかにするために、各翻訳後修飾レベルに関して検討した。SUMO2/3 化修飾レベルは、全ての脳部位において冬眠群で有意に増加した。中でも、体温調節中枢の視床下部をはじめ海馬や小脳では、SUMO2/3 化が数倍から数十倍にも増加することが明らかとなった。一方、SUMO1 化修飾レベルは、いずれの脳部位においても冬眠群において僅かな増加が認められた。また、Ub 化修飾レベルは、視床下部では冬眠時に減少する傾向が認められたが、海馬では変化は認められず、部位差が認められた(Figure 1)。

次に、脳内 SUMO2/3 化修飾レベルの制御機構と体温低下との関連性を薬理学的に検討したところ、体温低下レベルに伴い、SUMO2/3 化修飾レベルが相関して増加することが明らかとなった。さらに、冬眠導入期の体温低下を制御するアデ

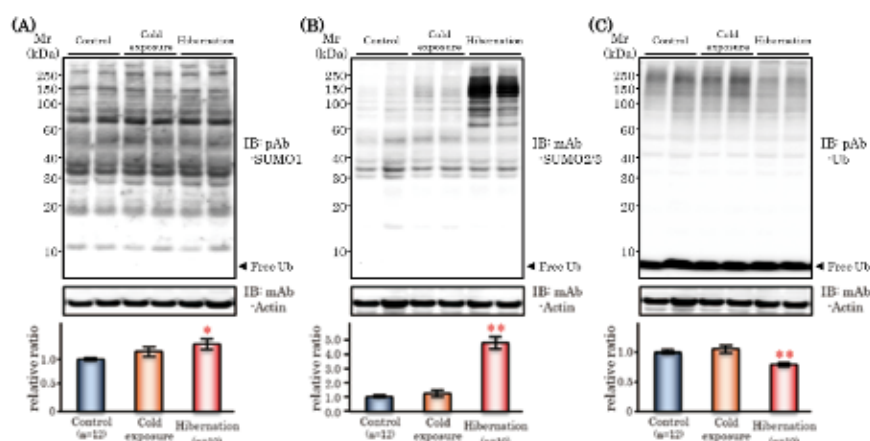


Figure 1. Effects of body temperature during the hibernation bout on the pattern of ubiquitin-related modifiers conjugated proteins in the hypothalamus of hamster. Total lysate extracted from hypothalamus were analyzed by IB with pAb-SUMO1 (A). Panel (B) and (C) show SUMO2/3-conjugated proteins and ubiquitin-conjugated proteins, respectively. Hypothermia during the hibernation bout induced marked increase in the levels of SUMO2/3-conjugated proteins in hypothalamus.

ノシン A₁ 受容体アゴニスト (*N*⁶-Cyclohexyladenosine: CHA) や、冬眠維持期の低体温を制御するオピオイド μ 受容体アゴニスト ([D-Ala², NMe-Phe⁴, Gly-ol⁵]-enkephalin: DAMGO)、あるいはペントバルビタール麻酔による体温低下、いずれの条件においても同様の SUMO2/3 化シグナルの増強が認められた。これらの結果から、SUMO2/3 化修飾レベルの増加は体温低下によって誘導される現象であることが明らかとなった。また SUMO2/3 化修飾の標的分子は、核分画に多く存在し、分子量 150kDa 付近、pI6 付近の複数の分子からなることが明らかとなり、現在いくつかの候補が挙がっている。

【考 察】

本研究において、冬眠時の体温低下により脳組織全体での SUMO2/3 化修飾が著しく誘導されることが明らかとなった。SUMO 化修飾は、様々なストレスに応答して活性化されるが、中でも低酸素や低グルコースを伴う脳虚血状態では SUMO1 化よりも SUMO2/3 化が著しく増加する^{5,6)}ことが報告されており、SUMO2/3 の増加が神経保護作用の一端を担うことが示唆されている⁴⁾。さらに、低温処理による SUMO2/3 化修飾の増加は、酸素グルコース欠乏負荷により誘導される神経細胞死を抑制する⁷⁾。これらのことから、本研究で見出された体温低下によって誘導された SUMO2/3 化修飾の増加は、神経保護作用を有することが示唆された。しかし、SUMO2/3 化修飾を介したそのメカニズムは未だ不明である。今回、冬眠時の SUMO2/3 化標的分子には、分子量や局在などから glucocorticoid receptor や heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs) などが推測された。これらの分子はいずれも SUMO 化修飾によってその機能が制御される^{8,9)}。しかしながら、低体温あるいは神経保護作用におけるそれらの役割は不明であり、今後の更なる解析が必要である。

【臨床的意義・臨床への貢献度】

本研究では、冬眠動物を解析することにより体温低下によって誘導される SUMO2/3 化修飾が神経保護作用、つまり、脳虚血耐性現象を担っている可能性を示唆した。SUMO 化誘導による内因性の虚血耐性現象(神経保護作用)の腑活化は、脳梗塞の治療薬開発の新たな戦略になると期待される。

【参考・引用文献】

1. Dirnagl U, et al., *Lancet Neurol.* 2009;8:398-412.
2. Carey HV, et al., *Physiol Rev.* 2003;83:1153-81.
3. Storey KB, *Adv Exp Med Biol.* 2003;543:21-38.
4. Guo C, et al., *EMBO J.* 2013;32:1514-28.
5. Yang W, et al., *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:892-6.
6. Yang W, et al., *J Cereb Blood Flow Metab.* 2008;28:269-79.
7. Lee YJ, et al., *Front Cell Neurosci.* 2014;8:416.
8. Davies L, et al., *Mol Endocrinol.* 2008;22:1331-44.
9. Li T, et al., *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:8551-6.