

アンジオテンシン II と cAMP responsive element binding protein (CREB)

市来 俊弘

要 旨 : cAMP responsive element binding protein (CREB) は種々の細胞外の刺激によって活性化される転写因子である。CREB は T リンパ球やニューロンの生存、記憶や学習に重要な役割を果たすことが報告されているが、心血管系における役割は充分には解明されていない。我々はアンジオテンシン II (AII) による CREB の活性化を検討した。AII は AII タイプ 1 受容体を介して CREB を活性化した。優勢抑制型変異 CREB は AII による平滑筋細胞へのロイシンの取り込みをほぼ完全に抑制した。CREB 依存性の遺伝子発現は血管平滑筋細胞の増殖や肥大に重要な役割を担うことが示唆される。(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; 43: 53-57)

Key words : CREB, Angiotensin II, Vascular smooth muscle cells, Hypertrophy

はじめに

cAMP responsive element binding protein (CREB) は細胞外の種々の刺激によって活性化される転写因子であり、細胞の増殖や分化、適応の過程などにおいて重要な役割を果たすと考えられている。トランスジェニックマウスなどの検討から、CREB は T リンパ球の分化や増殖、成長ホルモンの産生や発育などに重要な役割を果たすことが報告されている。また中枢神経においては学習と記憶に関与する分子と考えられている。しかしながら CREB が心・血管系において果たす役割については、十分には検討されていない。

CREB の構造

CREB はソマトスタチン遺伝子の cAMP 応答性配列 (cAMP responsive element: CRE, TGACGTCA) に結合する 43 kDa の蛋白として精製された¹⁾。遺伝子は 11 個のエクソンからなり alternative splicing により、 α 、 Δ 、 β の 3 種類のアイソフォームが作られることが知られている。これらのアイソフォームはほとんどの組織において発現しているが機能的な違いは明確ではない。

CREB のクローニング後、構造の似た、activating transcription factor-1 (ATF-1) と cAMP response element modulator (CREM) がクローニングされた。ATF-1 は

CREB と 65% の相同性を有し種々の組織において発現している。CREM は alternative splicing により α 、 β 、 γ 、 τ の四つのアイソフォームが産生される。興味深いことに CREM α 、 β 、 γ は cAMP による遺伝子発現を抑制するのに対し、CREM τ は CRE 依存性の遺伝子発現を活性化させる。

CREB は二量体として標的の DNA 配列に結合する。二量体化は C 端の leucine zipper domain (ZIP) と、ZIP のすぐ N 端側にあるリジンやアルギニンなどの塩基性アミノ酸に富む領域 (basic domain) によって生じる (総称して bZIP domain と呼ばれる) (図 1)。

CREB の活性化

CREB は 133 番目のセリン残基がリン酸化されると活性化される²⁾。CREB のセリン 133 をリン酸化する代表的なキナーゼは cAMP によって活性化される cAMP-dependent kinase (PKA) である³⁾。cAMP が PKA の regulatory subunit に結合すると catalytic subunit が遊離し核へ移行する。そして CREB をリン酸化すると考えられている。また CREB の不活化に関しては protein phosphatase-1 と 2A の 2 種類の脱リン酸化酵素が知られている。CREB がリン酸化されている時間の長さは CREB 依存性の遺伝子発現を誘導する効率と相関すると考えられている。

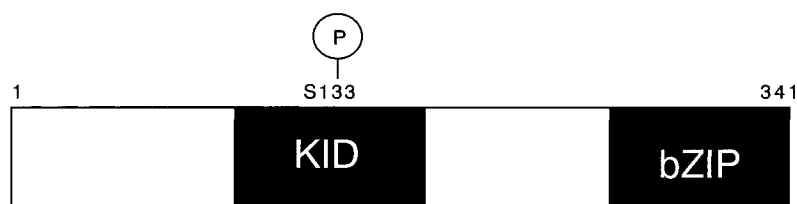


図 1 CREBの構造
 CREBは341アミノ酸からなり133番目のセリン残基がリン酸化されると活性化する。
 KID: kinase inducible domain
 bZIP: basic domain+leucine zipper

当初CREBはアデニルサイクラーゼの活性化などcAMPの細胞内濃度を上昇させる刺激によってのみ活性化されると考えられていた。CREによって駆動されるレポーター遺伝子はチロシンキナーゼを活性化するリガンドには反応しないことも報告されていた。しかしCREBのセリン133のリン酸化を認識する抗体の開発によってCREBはいろいろな細胞外の刺激によって活性化されることが明らかになってきた(図2)。多くの実験からCREBを活性化するキナーゼが新たに同定されてきた。その一つがp90RSKである⁴⁾。p90RSKはribosomal protein S6をリン酸化する酵素と考えられていたが、実際はS6蛋白はリン酸化せずCREBなどの転写因子が主な基質であることが明らかとなってきた。p90RSKはextracellular signal-regulated protein kinase (ERK)とよばれるmitogen-activated protein kinase (MAPK)によって活性化される。また別のMAPKであるp38MAPKもMAPK activated protein kinase-2 (MAPKAPK-2)を介してCREBをリン酸化する⁵⁾。さらにERKとp38MAPKによって活性化されるMSK-1 (Mitogen- and Stress-activated protein kinase-1)がCREBを活性化することが報告されている。

細胞内Ca²⁺の上昇はcalmodulin dependent protein kinase (CaMK)を活性化しCREBのリン酸化およびCREB依存性の遺伝子発現を活性化する⁶⁾。さらに、最近phosphatidylinositol 3 kinaseによって活性化されるAkt/protein kinase Bとよばれるserine/threonine kinaseもCREBをリン酸化することが報告されている⁷⁾。

CREBの機能

CREBの機能を調べるためにCREBの優勢抑制型の変異体(dominant negative mutant)が開発されている。現在

までに3種類の変異体が報告されている。セリン133をアラニンに置換しリン酸化を受けないようにした変異体がCREB M1と呼ばれている。この変異体はリン酸化を受けないがCRE領域には結合できるので、CREに結合し正常のCREBのCREへの結合を妨げることによりその機能を発揮する。DNA結合領域のリジン287をロイシンに置換したK-CREBやbZIP domainの塩基性アミノ酸を酸性アミノ酸に置換したA-CREBなども優勢抑制型の変異体として働くことが報告されている。

CREBの生体内での役割を調べるためにCREBの欠損マウスや前述の優勢抑制型変異CREBの組織特異的過剰発現トランスジェニックマウスが作成されている。成長ホルモン遺伝子のプロモーターを用いてCREBM1を下垂体特異的に発現させると、成長ホルモン産生細胞が欠損し下垂体の萎縮とともに発育不全を示す⁸⁾。CD2遺伝子プロモーターを用いてTリンパ球にCREBM1を過剰発現させると、コンカナバリンAや抗CD3抗体による増殖やインターロイキン2の産生などが抑制される⁹⁾。これらのTリンパ球は増殖刺激を受けても細胞周期のG1に停止しアポトーシスに陥る。神経系においてCREBはニューロンの生存、記憶や学習に重要な役割を果たすことが報告されている¹⁰⁾。興味深いことにジーンターゲティングによりCREB遺伝子を欠損するマウスは正常に発達、成長し明らかな異常を認めないと報告されている¹¹⁾。このマウスではCREM ϵ の発現が増加しておりCREBの欠損を代償していると考えられる。

心血管系におけるCREBの機能

α myosin heavy chainプロモーターを用いて心筋細胞にCREBM1を過剰発現させると拡張型心筋症と似た心

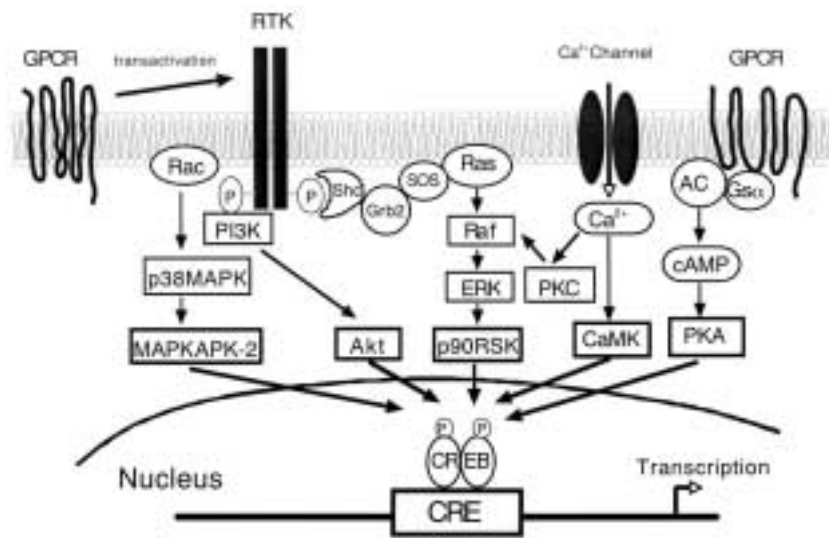


図2 CREB活性化の経路

CREBをリン酸化するkinaseとしてPKA (protein kinase A), calmodulin dependent protein kinase (CaMK), p90RSK, Akt, MAPKAPK-2 (mitogen-activated protein kinase activated protein kinase)が知られている。MAPK: mitogen-activated protein kinase, PI3K: phosphatidylinositol 3 kinase, ERK: extracellular signal-regulated protein kinase, PKC: protein kinaseC, AC: adenylyl cyclase, RTK: receptor tyrosine kinase, GPCR: G protein coupled receptor.

臓の拡張と収縮不全を引き起こすことが報告されている¹²⁾。しかしこのトランスジェニックマウスの心筋ではTリンパ球に見られたようなアポトーシスの増加は観察されなかった。また心臓の虚血モデルにおいてCREBがPKA依存性に活性化されることが報告されている¹³⁾。このモデルでは心筋虚血によりCa非依存性 phospholipaseA2とアデニルサイクラーゼの活性化を介してPKAが活性化すると報告されている。しかしながら虚血心筋におけるCREBの役割は現在のところ明らかではない。

血管におけるCREBの役割は十分には解明されていない。Linらは α 1アドレナリン受容体のノルエピネフリンによる活性化がPKA依存性にCREBを活性化することを報告している¹⁴⁾。また血管内皮細胞において、vascular endothelial growth factorはPKCおよびp38MAPK依存性にCREBを活性化することが報告され、CREBがangiogenesisに関与する可能性が示唆されている¹⁵⁾。

アンジオテンシンIIによるCREBの活性化

我々はアンジオテンシンII(AII)によるインターロイキン6遺伝子プロモーターの活性の上昇がCRE領域に

変異を導入することにより消失することを報告している¹⁶⁾。そこで抗リン酸化CREB抗体を用いて培養血管平滑筋細胞においてAIIがCREBを活性化するかを検討した。AIIは5～10分をピークに濃度依存性にCREBのリン酸化を誘導した(図3)。この効果はAIIタイプ1受容体(AT1)の拮抗剤であるCV11974により阻害されるのでAT1を介した効果と考えられる。AIIによるCREBのリン酸化はPD98059やSB203580によって抑制されることから、 α 1アドレナリン受容体とは異なりERKやp38MAPKを介した経路がリン酸化に重要と考えられる。またepidermal growth factor receptor(EGF-R)の阻害剤であるAG1478もAIIによるCREBのリン酸化を抑制するので、AT1を介したEGF-Rのtransactivationが重要な役割を果たすと考えられる。またアデノウイルスを用いてCREBM1を血管平滑筋細胞に過剰発現させるとAIIによるロイシンの取り込みをほぼ完全に抑制した(図4)。以上よりCREB依存性の遺伝子発現は血管平滑筋細胞の増殖や肥大に重要な役割を担うことが示唆される。しかしCREB依存性に活性化される遺伝子のうち、どのような遺伝子が平滑筋細胞の増殖や肥大において中心的な役割を担うのかは現在のところ不明である。

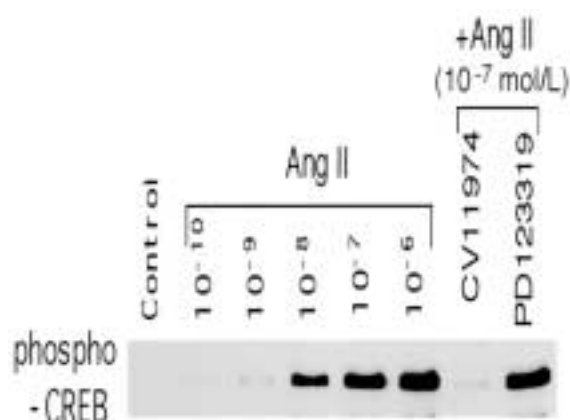


図3 アンジオテンシンIIによるCREBのリン酸化
アンジオテンシンIIは濃度依存性にCREBのリン酸化を誘導した。アンジオテンシンIIによるCREBのリン酸化はアンジオテンシンIIタイプ1受容体拮抗時のCV11974でブロックされたがタイプ2受容体の拮抗剤であるPD123319ではブロックされなかった。

我々はほぼ同様の現象が平滑筋細胞をトロンピンで刺激した際にも認められることを報告している¹⁷⁾。これらの結果からCREBには交感神経系、レニン・アンジオテンシン系そして凝固系などからのシグナルが収束し、そのシグナルを遺伝子発現へと変換する重要な転写因子と考えられる。

おわりに

CREBは平滑筋細胞の増殖や肥大に関与する重要な転写因子であることが示唆された。しかし心血管系におけるCREBの機能は十分には解析されておらず、さらなる研究が必要と考えられる。特にどのような遺伝子発現の制御に関与するのかを明らかにすることが重要と考えられる。また、cAMP系が平滑筋細胞の増殖を抑制するのに対して、同じようにCREBを活性化するトロンピンなどは増殖を促進する。どのような機序によってこのような違いが生じるかなどを明らかにする必要があると考えられる。

文 献

- 1) Montminy MR, Sevarino KA, Wagner JA et al: Identification of a cyclic-AMP-responsive element within the rat somatostatin gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1986, **83**: 6682-6686.
- 2) Yamamoto KK, Gonzalez GA, Biggs WH 3rd, Montminy MR:

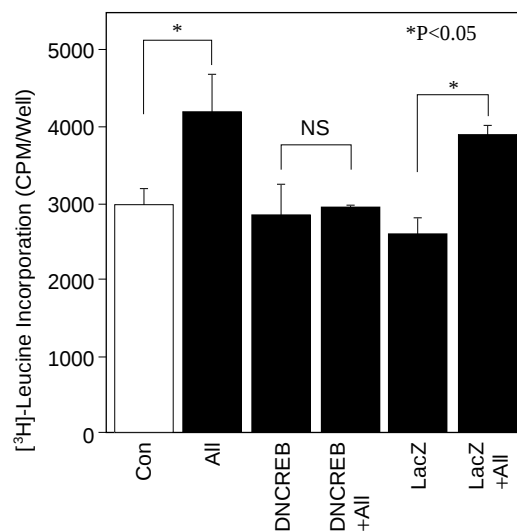


図4 アンジオテンシンIIによる蛋白合成に対するdominant negative CREBの影響。

Control: 培養平滑筋細胞をアンジオテンシンIIで24時間刺激した際の[³H]-leucineの取り込みを測定した。

ADCREBM1: 培養平滑筋細胞にdominant negative CREBを発現するアデノウイルス(AdCREBM1)を感染させた後にアンジオテンシンIIで24時間刺激した際の[³H]-leucineの取り込みを測定した。LacZ: LacZを発現するアデノウイルス感染後に同様の実験を行った。

*P<0.05

Phosphorylation-induced binding and transcriptional efficacy of nuclear factor CREB. *Nature*, 1988, **334**: 494-498.

- 3) Gonzalez GA, Montminy MR: Cyclic AMP stimulates somatostatin gene transcription by phosphorylation of CREB at serine 133. *Cell*, 1989, **59**: 675-680.
- 4) Xing J, Ginty DD, Greenberg ME: Coupling of the RAS-MAPK pathway to gene activation by RSK2, a growth factor-regulated CREB kinase. *Science*, 1996, **273**: 959-963.
- 5) Tan Y, Rouse J, Zhang A et al: FGF and stress regulate CREB and ATF-1 via a pathway involving p38 MAP kinase and MAPKAP kinase-2. *EMBO J*, 1996, **15**: 4629-4642.
- 6) Sheng M, Thompson MA, Greenberg ME: CREB: a Ca(2+)-regulated transcription factor phosphorylated by calmodulin-dependent kinases. *Science*, 1991, **252**: 1427-1430.
- 7) Du K, Montminy M: CREB is a regulatory target for the protein kinase Akt/PKB. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 32377-32379.
- 8) Struthers RS, Vale WW, Arias C et al: Somatotroph hypoplasia and dwarfism in transgenic mice expressing a non-

- phosphorylatable CREB mutant. *Nature*, 1991, **350**: 622-624.
- 9 〃Barton K, Muthusamy N, Chanyangam M: Defective thymocyte proliferation and IL-2 production in transgenic mice expressing a dominant-negative form of CREB. *Nature*, 1996, **379**: 81-85.
 - 10 〃Silva AJ, Kogan JH, Frankland PW, Kida S: CREB and memory. *Annu Rev Neurosci*, 1998, **21**: 127-148.
 - 11 〃Hummler E, Cole TJ, Blendy JA et al: Targeted mutation of the CREB gene: compensation within the CREB/ATF family of transcription factors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1994, **91**: 5647-5651.
 - 12 〃Fentzke RC, Korcarz CE, Lang RM et al: Dilated cardiomyopathy in transgenic mice expressing a dominant-negative CREB transcription factor in the heart. *J Clin Invest*. 1998, **101**: 2415-2426.
 - 13 〃Williams SD, Ford DA: Calcium-independent phospholipase A(2) mediates CREB phosphorylation and c-fos expression during ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2001, **281**: H168-176.
 - 14 〃Lin RZ, Chen J, Hu ZW, Hoffman BB: Phosphorylation of the cAMP response element-binding protein and activation of transcription by alpha1 adrenergic receptors. *J Biol Chem*, 1998, **273**: 30033-30038.
 - 15 〃Mayo LD, Kessler KM, Pincheira R et al: Vascular endothelial cell growth factor activates CRE-binding protein by signaling through the KDR receptor tyrosine kinase. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 25184-25189.
 - 16 〃Funakoshi Y, Ichiki T, Ito K, Takeshita A: Induction of interleukin-6 expression by angiotensin II in rat vascular smooth muscle cells. *Hypertension*, 1999, **34**: 118-125.
 - 17 〃Tokunou T, Ichiki T, Takeda T et al: Thrombin-induced interleukin-6 expression through cAMP response element in vascular smooth muscle cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2001, **21**: 1764-1769.

Angiotensin II and cAMP Responsive Element Binding Protein (CREB)

Toshihiro Ichiki

Department of Cardiovascular Medicine,
Kyushu University Graduate School of Medical Sciences, Fukuoka, Japan

Key words: CREB, Angiotensin II, Vascular smooth muscle cells, Hypertrophy

Although cyclic AMP response element binding protein (CREB) plays an important role for the survival of neuronal cells and T lymphocytes, the role of CREB in vascular smooth muscle cells (VSMC) has not been determined. We examined the role of CREB in angiotensin II (AngII)-stimulated VSMC. Activation of CREB was examined by Western blot analysis with an antibody that specifically recognizes the phosphorylation of serine 133, a critical marker for the activation of CREB. AngII induced phosphorylation of CREB, which was blocked by CV11974, an AngII type I receptor (AT1-R) antagonist, suggesting that AT1-R mediates the phosphorylation of CREB. Inhibition of ERK kinase by PD98059 or inhibition of p38MAPK by SB203580 partially inhibited AngII-induced CREB phosphorylation. Inhibition of epidermal growth factor-receptor (EGF-R) by AG1478 suppressed the AngII-induced CREB phosphorylation. Overexpression of dominant negative form of CREB by an adenovirus vector suppressed AngII-induced incorporation of [³H]-leucine to VSMC and neointimal formation by balloon injury of rat carotid artery. These findings suggest that CREB is a novel redox-sensitive transcription factor activated through transactivation of the EGF receptor and MAPK pathways. The activation of CREB plays an important role in the hypertrophy and proliferation of VSMC, and may be involved in the cardiovascular remodeling process.

(J. Jpn. Coll. Angiol., 2003; **43**: 53-57)