

2020年8月12日

ストレス応答に重要な神経活動を調節する因子の スクリーニング法を開発

名古屋大学環境医学研究所・大学院医学系研究科の山中章弘教授らの研究グループは、東北大学の井樋慶一教授との共同研究で、ストレス応答に重要な神経（視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出因子（CRF）産生神経、以下 PVN-CRF 神経）の活動を調節する因子のスクリーニング法を開発し、15 種類の生理活性物質が実際に活動を調節することを明らかにしました。

生体はストレスを受けると、ストレス応答と呼ばれる様々な生理的機能によって、自らを防御し正常な体内環境を保とうとします。PVN-CRF 神経はストレスを受けた際に活性化することで、ストレス応答を開始させる役割を担っています。PVN-CRF 神経の活動を調節する因子の候補は数多くあるため、その全てを検証することは、これまで技術的に困難でした。

本研究では、一度に数十個の神経活動を同時に測定できる手法を取り入れました。そして候補因子を作用させ、それぞれの因子による PVN-CRF 神経活動への影響を調べるスクリーニング法を開発しました。本研究では候補因子として、63 種類の生理活性物質を調べました。その結果、PVN-CRF 神経は 12 種類の物質により活性化され、3 種類の物質により抑制されることを確認しました。

今回開発したスクリーニング法は、PVN-CRF 神経のみでなく、あらゆる種類の神経細胞に応用可能です。本スクリーニング法を活用して、今後様々な種類の神経活動を調節する因子の解明が進むことが期待されます。

この研究成果は、2020年8月12日付（日本時間 18 時）英国科学雑誌 Scientific reports に掲載されました。

この研究は、日本学術振興会による特別研究員奨励費の支援のもとで行われたものです。

【ポイント】

- ・ ストレス応答に重要な神経（PVN-CRF 神経）の活動を調節する因子のスクリーニング法を開発
- ・ 15 種類の生理活性物質が PVN-CRF 神経の活動を調節することを確認
- ・ 3 種類の生理活性物質（コレシストキニン（CCK8S、CCK4）、チラミン）が、PVN-CRF 神経を活性化することを発見
- ・ 3 種類の生理活性物質（アンジオテンシン II、ヒスタミン、カルバコール）は、一部の PVN-CRF 神経を強く活性化することを発見

【研究背景と内容】

生体はストレスを受けると、ストレス応答と呼ばれる様々な生理的機能によって、自らを防御し正常な体内環境を保とうとします。PVN-CRF 神経 (用語解説1) はストレスを受けた際に活性化することで、ストレス応答を開始させる役割を担っています。このため、PVN-CRF 神経の活動を調節する因子を同定することは、ストレス応答の開始を理解する上で重要です。しかし PVN-CRF 神経の活動を調節する因子の候補は数多くあるため、その全てを検証することは、これまで技術的に困難でした。

そこで本研究では、一度に数十個の神経活動を同時に測定できる、「カルシウムイメージング」 (用語解説2) という手法を用いました。この手法では、神経活動の指標の一つであるカルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度を可視化します。本研究では可視化のために、yellow cameleon-Nano50 (YC) (用語解説3) という蛍光カルシウム指示タンパク質を用いました。遺伝子改変マウス (CRF-*iCre* マウス。東北大の井樋慶一教授が作出。用語解説4) の視床下部室傍核 (PVN) に、アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) (用語解説5) を注射し、PVN-CRF 神経のみで YC を発現するマウスを作出しました (図1)。

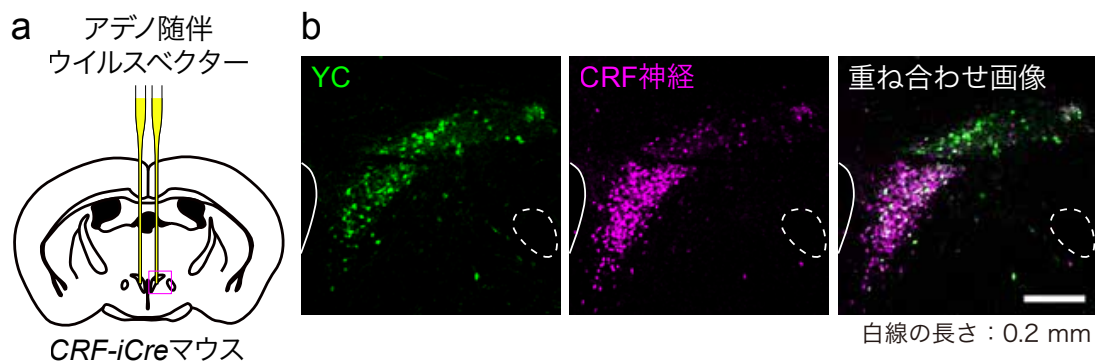


図1. (a) AAV 注射位置の脳の冠状断面図 (b) CRF 神経における YC の発現確認

実験では、作出したマウスから脳を摘出してスライスを作製し、顕微鏡でプローブからの Ca^{2+} シグナルを記録しました。そして活動制御に関与する候補因子として、計 63 種類の生理活性物質 (6 アミン、3 アミノ酸、1 コリン、2 脂質、2 核酸、49 ペプチド) を投与し、それぞれの物質による Ca^{2+} シグナルの変化を測定しました (図2)。

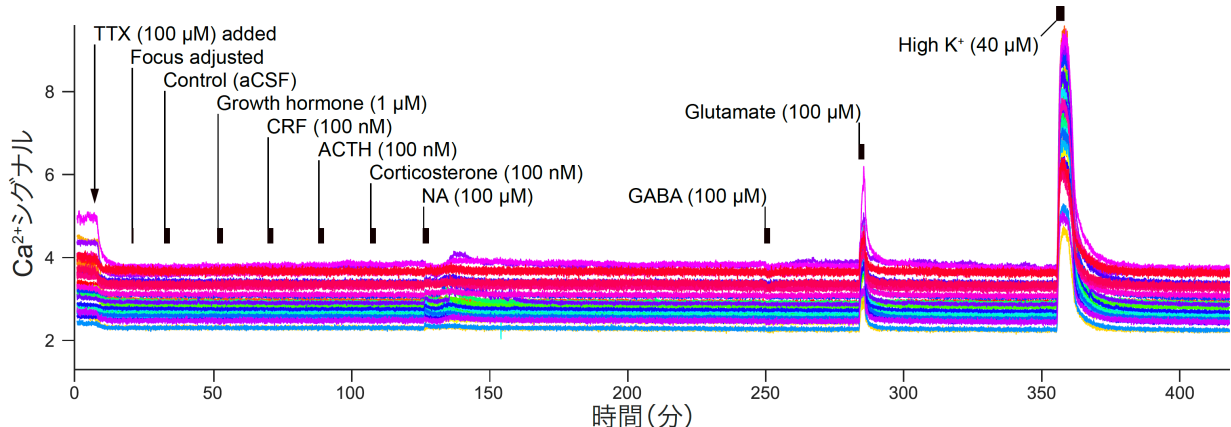


図2. スクリーニング実験の Ca^{2+} シグナル変化の例

色のついたグラフは、それぞれ単一神経のシグナルを示します。黒いバー (■) のタイミングで、それぞれ 2 分間候補物質を投与しました。

スクリーニングの結果、PVN-CRF 神経活動は 12 種類の物質により活性化され、3 種類の物質により抑制されることを確認しました (図 3)。

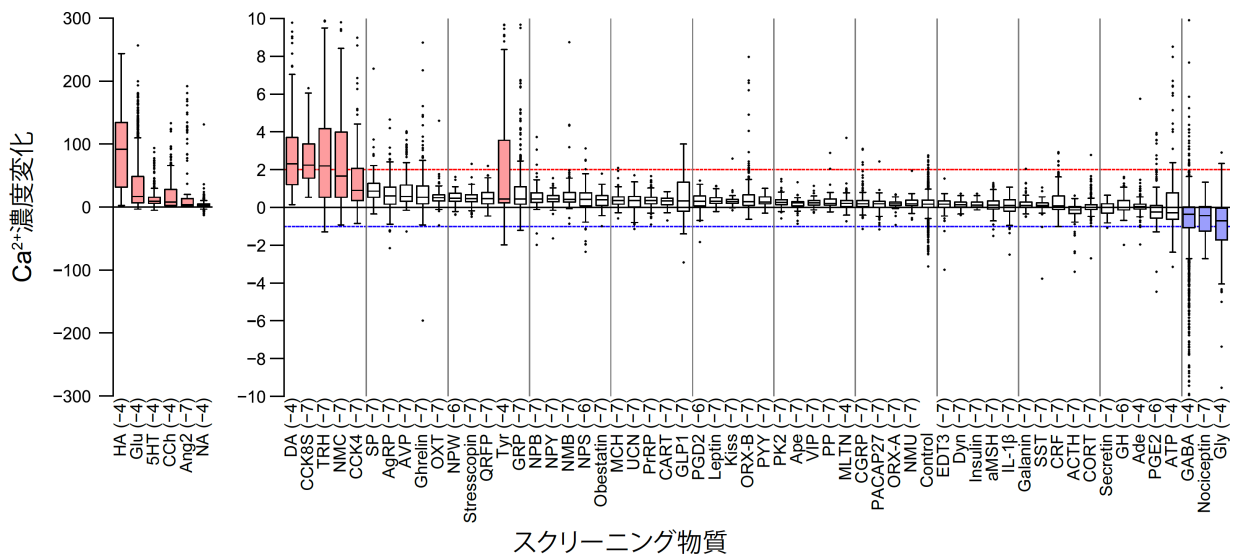


図 3. スクリーニング実験の結果一覧

各スクリーニング物質を投与した際の、細胞の Ca^{2+} 濃度変化の大きさ (上昇および低下) を箱ひげ図で示しています。赤色で塗りつぶされた物質は活性化、青色で塗りつぶされた物質は抑制に關与する物質でした。

また、3 種類 (コレシストキニン (CCK8S、CCK4)、チラミン) は、過去に報告のない新規物質でした (図 4)。

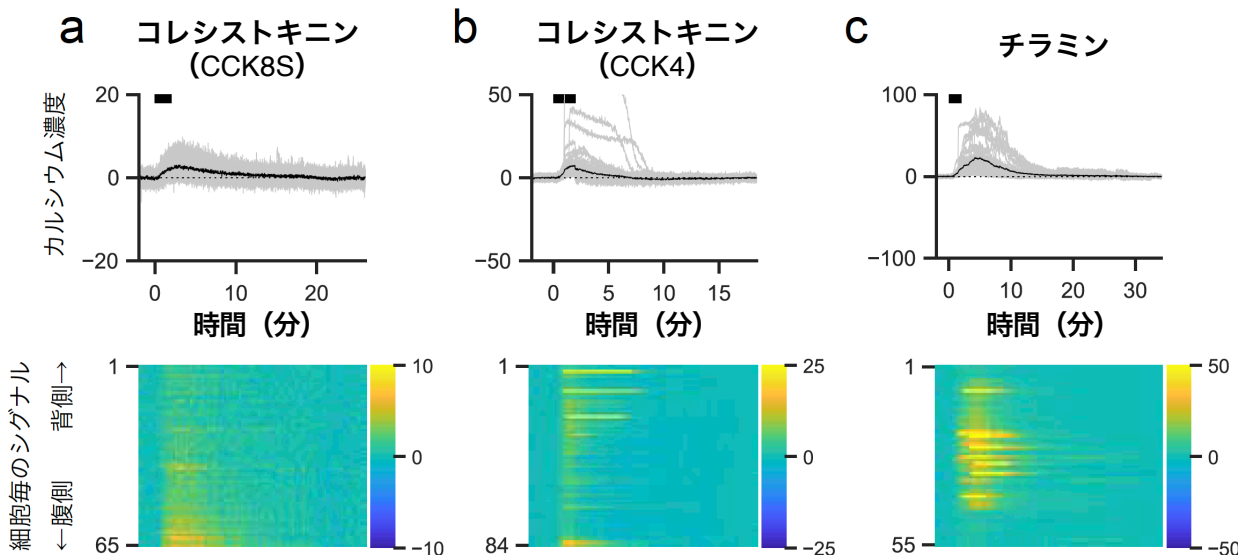


図 4. 新規 3 物質によって引き起こされたカルシウム濃度変化の例

上のグラフの黒いバー (■) のタイミングで、2 分間物質を投与しました。下のグラフは細胞毎のシグナルを、グラフ右側に示した色で示します。

さらに、別の 3 種類の物質（アンジオテンシン II、ヒスタミン、カルバコール）では、PVN-CRF 神経の背側と腹側のグループ間で活性化の大きさが異なることを発見しました（図 5）。

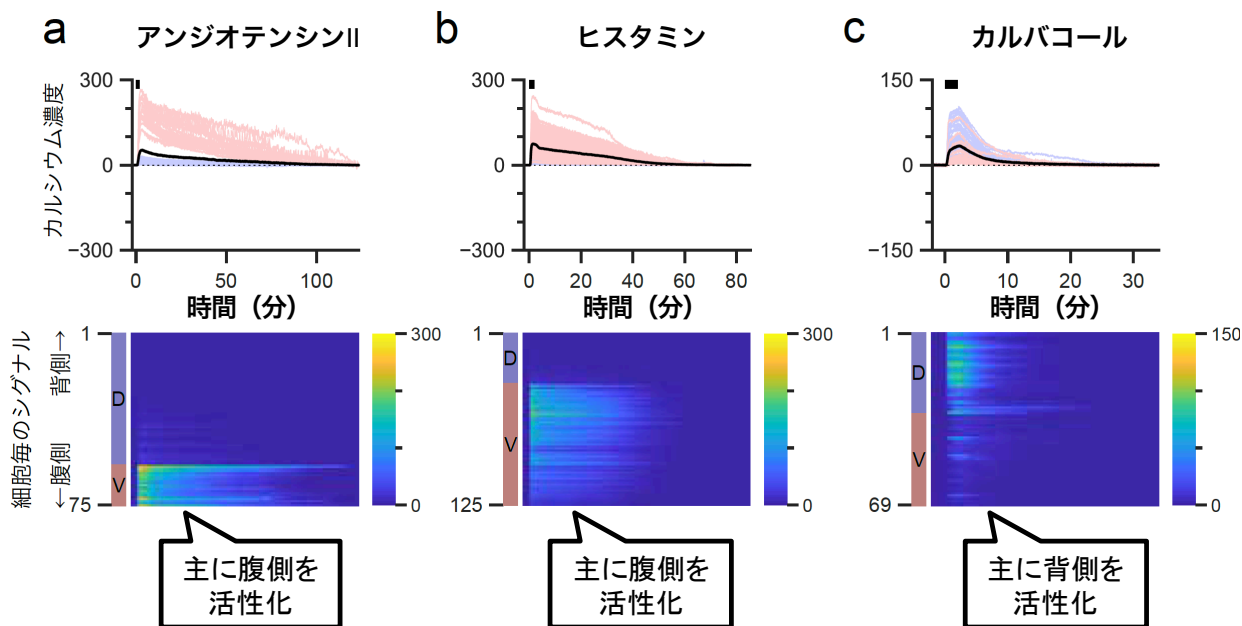


図 5. 背側と腹側のグループ間で活性化の大きさが異なった例

上のグラフの黒いバー（■）のタイミングで、2 分間物質を投与しました。下のグラフは細胞ごとのシグナルを、グラフ右側に示した色で示します。上が背側、下が腹側になるように並んでいます。(a)アンジオテンシン II、(b)ヒスタミンの 2 物質は主に腹側を活性化した一方、(c)カルバコールは主に背側を活性化しました。

【成果の意義】

本研究により、PVN-CRF 神経の活動を制御する因子の影響を評価する、厳密で信頼性の高いスクリーニング法を確立できました。本スクリーニングによって 15 物質が PVN-CRF 神経の活動を調節することが示されました。この成果は、今後それぞれの物質の生理的機能を解明する手がかりになると期待されます。そして将来、生体におけるストレス応答機構の解明、創薬や治療の糸口になることが期待されます。

また今回開発したスクリーニング法は、PVN-CRF 神経のみでなく、あらゆる種類の神経細胞に応用可能です。本スクリーニング法を活用して、今後様々な種類の神経活動を調節する因子の解明の進むことが期待されます。

【用語解説】

1. PVN-CRF 神経 [\(本文に戻る\)](#)

視床下部室傍核 (PVN) において、副腎皮質刺激ホルモン放出因子 (CRF) を作る神経。生体がストレスを受けると、PVN-CRF 神経は下垂体門脈と呼ばれる血管に CRF を放出します。その後 CRF は脳下垂体前葉の副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) を作る細胞 (産生細胞) に作用して ACTH の合成と分泌を促進し、ACTH は身体全体を巡る血流にのって副腎皮質に到達します。そして ACTH は副腎皮質におけ

る糖質コルチコイドの合成と分泌を促進し、最終的に分泌された糖質コルチコイドがストレス応答を引き起こします。この視床下部 (CRF) →下垂体 (ACTH) →副腎皮質 (糖質コルチコイド) の系列は、視床下部-下垂体-副腎 (HPA) 系と呼ばれ、ストレス応答に重要なことが知られています。

2. カルシウムイメージング [\(本文に戻る\)](#)

カルシウムイオン (Ca^{2+}) 濃度によって明るさの変化する物質 (化合物やカルシウム指示タンパク質など) を用いて、細胞内 Ca^{2+} 濃度を可視化する手法。神経細胞内の Ca^{2+} 濃度は、一般的に神経が活性化されると上昇し、抑制されると低下します。

3. Yellow cameleon-Nano50 (YC) [\(本文に戻る\)](#)

カルシウムイメージングに用いられるカルシウム指示タンパク質の一つ。YC は、黄色蛍光タンパク質 (YFP) と水色蛍光タンパク質 (CFP) が、 Ca^{2+} と結合すると構造変化する性質を持つカルモジュリン (CaM) と呼ばれるタンパク質によってつながった構造をしています (図 6)。青色の光 (励起光) を照射すると、水色と黄色の光 (蛍光) を発します。 Ca^{2+} が CaM に結合すると構造が変わり、YFP と CFP の 2 色の蛍光の明るさが変化します。2 色の蛍光の明るさの比によって、 Ca^{2+} 濃度を測定します。

カルシウム指示タンパク質 Yellow cameleon-Nano50 (YC)

Horikawa et al. (2010) Nature Methods

*YFP = 黄色蛍光タンパク質
*CFP = 水色蛍光タンパク質
*CaM = カルモジュリン
*FRET = Förster共鳴エネルギー移動

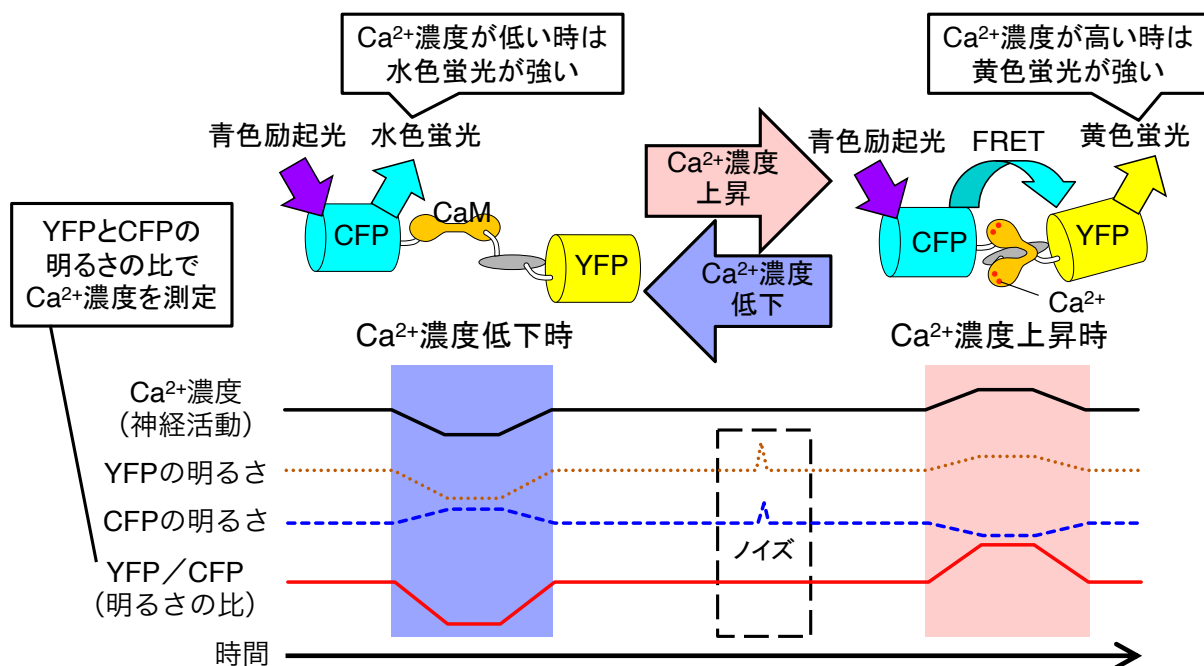


図 6. Yellow cameleon-Nano50 (YC) の模式図

4. CRF-iCre マウス [\(本文に戻る\)](#)

CRF を作る神経 (CRF 神経) で、「iCre」と呼ばれるタンパク質を作るように遺伝子改変されたマウス。「iCre」は組み換え酵素という種類のタンパク質で、ある決まった配列の DNA を認識して、2 箇所 DNA 配列を入れ替えることができます。

この性質を利用して、アデノ随伴ウイルスベクター ([用語解説 5](#)) と組み合わせて、CRF 神経のみで目的のタンパク質を作らせることができます。

5. アデノ随伴ウイルスベクター (AAV) ([本文に戻る](#))

目的の遺伝子を人工的に発現させるために用いられる、病原性のないウイルス。このウイルスに目的の遺伝子を載せ、細胞に感染させると、感染した細胞で目的の遺伝子を発現させることができます。本研究では、YC の遺伝子を載せて、感染した細胞で YC のタンパク質を作らせました。この際、組み換え酵素の iCre ([用語解説 4](#)) によって DNA 配列が入れ替えられた場合にのみ、YC を作れるようにしました。このため本研究では、CRF 神経のみで YC を作らせることができました。

【論文情報】

雑誌名：Scientific reports

論文タイトル：Identification of substances which regulate activity of corticotropin-releasing factor-producing neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus (視床下部室傍核の副腎皮質刺激ホルモン放出因子産生神経の活動を制御する因子の同定)

著者：[Yasutaka Mukai \(向井康敬\)](#), [Ayako Nagayama \(永山綾子\)](#), [Keiichi Itoi \(井樋慶一\)](#) & [Akihiro Yamanaka \(山中章弘\)](#)

DOI：[10.1038/s41598-020-70481-5](https://doi.org/10.1038/s41598-020-70481-5)

【研究者連絡先】

名古屋大学環境医学研究所・大学院医学系研究科

教授 山中 章弘 (やまなか あきひろ)

TEL：052-789-3864 FAX：052-789-3889

E-mail: yamank@riem.nagoya-u.ac.jp