

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06759

研究課題名（和文）メラトニン代謝産物AMKによる加齢性記憶障害改善の神経分子機構の解明

研究課題名（英文）Molecular and neural mechanism of age-related memory impairment improved by melatonin metabolic product AMK

研究代表者

松本 幸久（Matsumoto, Yukihiisa）

東京医科歯科大学・統合教育機構・助教

研究者番号：60451613

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：代表者はフタホシコオロギの長期記憶形成におけるメラトニン代謝産物AMKの作用機序を行動薬理実験や培養実験により調べた。その結果、メラトニン/AMKシグナル系は、糖代謝を調整してニューロンを活性化するのではなく、長期記憶の形成機構においてNMDA系やインスリン系の下流で働いていることが示唆された。さらにLC-MS/MSを用いた実験から、老齢コオロギの脳では若齢コオロギに比べてメラトニン関連物質の量が有意に低いことがわかった。また、RNA-seqを用いた実験より、老齢コオロギの脳では複数の記憶関連遺伝子の発現量が若齢コオロギに比べて低下していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究より、メラトニン/AMKシグナル系がコオロギの長期記憶の形成機構において様々なシグナル伝達経路の下流で働いていることや、加齢に伴い脳内のメラトニン関連物質量が減少することがわかった。これらの知見は、加齢に伴う記憶力低下を改善する薬の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要（英文）：In the present study, I investigated the functional mechanisms of AMK, a melatonin metabolite, in long-term memory formation in crickets (*Gryllus bimaculatus*) by behavioral-pharmacological experiments and primary tissue culture. The results suggest that within the long-term memory formation process, the melatonin/AMK signaling pathway functions downstream of the NMDA pathway and insulin pathway, rather than activation of neurons by glycometabolic regulation. Moreover, the use of LC-MS/MS revealed that the amounts of melatonin-related substances in the brain of aged crickets were significantly less compared to those in young adult crickets. The results obtained by RNA-sequencing indicated that expression levels of various memory-related genes in the brain decreased in aged crickets compared to young adult crickets.

研究分野：神経行動学

キーワード：AMK メラトニン 加齢性記憶障害 長期記憶 フタホシコオロギ 嗅覚学習

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢に伴う記憶能力の低下(加齢性記憶障害)はヒトを含む哺乳類だけでなく、昆虫などの無脊椎動物でも見られる現象である。代表者は昆虫のフタホシコオロギ(以下コオロギ)において、長期記憶の形成に加齢性記憶障害が見られることや、メラトニン及びその脳内代謝産物であるN-アセチル-5-メトキシキヌラミン(AMK)がこの加齢性記憶障害を改善することや、AMKが若いコオロギの長期記憶形成に重要な働きをしていることを発見した。ただし、AMKが長期記憶形成の分子機構や加齢性記憶障害の改善の分子機構においてどのような働きをしているのかは全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、長期記憶の形成過程におけるAMKの作用機序を行動薬理実験などで明らかにすることと、AMKを含むメラトニンシグナルなどの加齢に伴う脳内の動態変化を高速液体クロマトグラフ質量分析器(LC-MS/MS)やRNAシーケンス(RNA-seq)法を用いて調べることである。

3. 研究の方法

(1) 材料: 研究にはフタホシコオロギ(*Gryllus bimaculatus*)を用いた。コオロギは研究室内で7年以上継代飼育している。研究で使用する若齢コオロギとは成虫脱皮約1週齢のもので、老齢コオロギとは成虫脱皮約3週齢のものである。

(2) 学習実験: 学習訓練では、匂い(ペパーミント)の条件刺激(conditioned stimulus: CS)と水の無条件刺激(unconditioned stimulus: US)を対提示(CS-US)した。コオロギの水への欲求を高めさせるために、実験の前に2-3日絶水させた。匂いの嗜好性テストを訓練前と訓練後に行い、それらの結果を比較して学習訓練の効果を評価した。

(3) 薬理: メラトニン、6-ヒドロキシメラトニン(6-HM)、N-アセチル-N-フォルミル-5-メトキシキヌラミン(AFMK)、N-アセチル-5-メトキシキヌラミン(AMK)、2デオキシグルコース(2DG)、PI3Kの阻害剤(wortmannin)、NMDA型GluR拮抗剤(MK-801)、NMDA型GluR作動剤(NMDA)などをコオロギの血中に投与し、学習や長期記憶に与える影響について調べた。

(4) LC-MS/MSによる定量解析: 低温麻酔したコオロギから脳を取り出しホモジェナイズし、遠心分離して試料を作成し、高速液体クロマトグラフ質量分析器(LC-MS)でメラトニン関連物質(メラトニン、AFMK、AMK)、糖代謝産物の2DG-6リン酸(2DG-6P)、酸化ストレスマーカー(8-ヒドロキシグアノシン、グルタチオン)などの量を測定した。

(5) RNA-seq法: コオロギの脳において、加齢に伴う発現変動遺伝子(Differentially Expressed Genes: DEGs)を調べるために、老齢コオロギと若齢コオロギの脳からRNAを抽出してRNA-seq解析を行い、DEGsをKEGG pathway解析、Gene Set Enrichment Analysisにて評価した。

4. 研究成果

(1) 糖の取り込みはコオロギの長期記憶形成に重要である: 長期記憶の形成過程におけるAMKの働きとして、AMKがシナプス伝達の制御因子などを含む長期記憶形成にかかわるシグナル伝達経路において直接作用する可能性と、AMKがグルコース代謝(糖代謝)などを調節して細胞内のエネルギー状態を制御することで間接的に神経細胞の活性を変化させている可能性が考えられる。後者の可能性を検証するために、まずは細胞内への糖の取り込みがコオロギの長期記憶形成に関与するかどうかを、グルコース取り込み阻害剤の2デオキシグルコース(2DG)を用いた行動薬理実験で調べた。嗅覚報酬条件付け後に頭部に2DGを投与したコオロギでは、嗅覚報酬条

件付け訓練 1 時間後の短期記憶は正常であった一方で、訓練 1 日後の長期記憶が完全に阻害された。すなわち、コオロギにおいて糖の取り込みが嗅覚学習の長期記憶の形成に重要であることが示唆された。ただし、学習訓練後に 2DG とメラトニンまたは AMK の共投与を行ったコオロギでは、いずれも長期記憶が正常に形成された。この結果は、糖の取り込みを阻害してもメラトニンや AMK で長期記憶が誘導されることを示唆している。

(2) 組織培養系を用いたコオロギ脳の糖の取り込み作用：コオロギの脳で実際に糖の取り込みが起きているかどうかを組織培養した脳を使って調べた。2DG はグルコースと同様にグルコーストランスポーターを介して細胞内に取り込まれ、比較的安定な 2DG-6 リン酸 (2DG-6P) となる。そこで、コオロギから単離した脳を 30 分間組織培養し、培地に 2DG を投与した後に取り出してホモジェナイズし、LC-MS/MS で 2DG-6P 量を測定した。その結果、2DG の投与濃度と暴露時間依存的に 2DG-6P 量が上昇し、コオロギの脳が糖を取り込んでいることがわかった。ただし、培地に 2DG と同時にメラトニンまたは AMK を投与した脳において、2DG だけを投与した場合と比べて、糖の取り込み量に有意な差が見られなかった。すなわち、メラトニンや AMK による糖の取り込みの促進効果がみられなかったといえる。これら培養実験と行動薬理実験の結果から、メラトニンや AMK は糖代謝を介さないルートで長期記憶の形成に関わっていることが示唆された。

(3) 脳のニューロンの初代培養：上記実験において糖を取り込んでいる細胞がニューロンなのかグリアなのかはわかっていない。それを調べるのに先立ち、コオロギの脳ニューロンの初代培養を試みた。成虫脱皮 1 週目のコオロギから脳を取り出し細胞を解離した後、ライボピッツ L-15 培地にまいて 30 分で培養した。培養数日後にはニューロンの神経突起がみられ、培養 6 週目まで軸索の伸長が観察できた。

(4) 長期記憶形成に関わるシグナル伝達経路におけるメラトニン/AMK シグナル系：上記の一連の実験より、AMK による長期記憶の誘導作用は糖代謝を介さない機構によるものであると結論した。そこでメラトニン/AMK シグナル系は長期記憶形成に重要なシグナル伝達系 (NO-cGMP 系など) に関わることで長期記憶を誘導していると考えた。まず、脊椎動物の学習・記憶において重要な働きが知られているインスリン受容体シグナル系と NMDA 型グルタミン酸受容体 (NMDA 型 GluR) シグナル系がコオロギの長期記憶に関与するかを、インスリン系の PI3K 阻害剤 (wortmannin)、NMDA 型 GluR の拮抗剤 (MK-801) と作動剤 (NMDA) を用いた行動薬理で調べた。その結果、コオロギの長期記憶の形成にインスリン系と NMDA 型 GluR 系が関与することが示唆された。さらに NO-cGMP 系、インスリン系、NMDA 型 GluR 系、メラトニン/AMK 系との関係を調べるために各シグナル系の阻害剤と促進剤の共投与実験を行った。その結果、長期記憶の形成機構において NMDA 系は NO-cGMP 系の上流で働き、メラトニン/AMK 系は NO-cGMP 系やインスリン系の下流で働いていることが示唆された。

(5) コオロギ脳内のメラトニン関連物質および酸化ストレスマーカーの測定：代表者は、「コオロギの加齢性記憶障害は長期記憶の形成にかかわるメラトニンとその代謝産物 (AFMK, AMK) の脳内量の加齢に伴う低下に起因する」という仮説を立て、高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS/MS) を用いた定量実験によりその仮説を検証した。その結果、老齢コオロギは若齢コオロギに比べて、脳のメラトニン量および AFMK 量が有意に低かった一方で、AMK は若齢コオロギと老齢コオロギともに検出限界以下だった。また、酸化ストレスマーカーである 8-ヒドロキシグア

ノシン（8-OHdG）およびグルタチオンの量を LC-MS/MS で測定したところ、老齡コオロギは若齡コオロギと比べ、脳内の 8-OHdG 量が多く、逆にグルタチオン量が少ない傾向が見られた。

（6）RNA-seq 法による加齡に伴う発現変動遺伝子の解析：コオロギの脳において、加齡に伴う発現変動遺伝子（DEGs）を調べるために、老齡コオロギと若齡コオロギの脳から RNA を抽出して RNA-seq 解析を行った。その結果、若齡コオロギと比べて老齡コオロギで発現量が低下した遺伝子群には、カルチニン膜貫通トランスポーター、グルタチオン生合成系関連酵素群、糖転移酵素、チューブリンチロシンリガーゼ、脂質代謝関連酵素など、老化関連遺伝子や記憶関連遺伝子が含まれていた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Terao Kanta, Matsumoto Yukihiisa, Alvarez Beatriz, Mizunami Makoto	4. 巻 12
2. 論文標題 Spontaneous recovery from overexpectation in an insect	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-13800-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Matsumoto Yukihiisa	4. 巻 47
2. 論文標題 Learning and memory in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Physiological Entomology	6. 最初と最後の頁 147-161
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/phen.12387	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Iwashita Hikaru, Matsumoto Yukihiisa, Maruyama Yusuke, Watanabe Kazuki, Chiba Atsuhiko, Hattori Atsuhiko	4. 巻 70
2. 論文標題 The melatonin metabolite N1 acetyl 5 methoxykynuramine facilitates long term object memory in young and aging mice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pineal Research	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/jpi.12703	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kanta Terao, Yutaka Kosaki, Yusuke Maruyama, Atsuhiko Hattori, Yukihiisa Matsumoto
2. 発表標題 Effects of social isolation in crickets <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 日本動物心理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺尾勲太・神前裕・服部淳彦・松本幸久
2. 発表標題 社会的隔離が連合学習や報酬への応答に与える影響
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 寺尾勲太・神前裕・服部淳彦・松本幸久
2. 発表標題 単独性動物における社会的隔離の連合学習能への影響
3. 学会等名 日本動物学会・関東支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Yukihisa Matsumoto
2. 発表標題 Parental ages affect the memory formation ability of offspring in crickets
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第43回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanta Terao, Yukihisa Matsumoto, Yutaka Kosaki
2. 発表標題 Extinction learning in crickets
3. 学会等名 日本比較生理生化学会第43回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kanta Terao, Yukihisa Matsumoto, Beatritz Lvarez, Makoto Mizunami
2. 発表標題 Overexpectation and its spontaneous recovery in crickets.
3. 学会等名 Symposium Comparative Psychology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺尾勘太・Beatritz LVAREZ・松本幸久・水波誠
2. 発表標題 予測誤差理論のさらなる検証：コオロギの連合学習におけるoverexpectation現象
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 寺尾勘太・Beatritz LVAREZ・松本幸久・水波誠
2. 発表標題 過剰予測効果をコオロギの連合学習で検証する
3. 学会等名 日本基礎心理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松本幸久
2. 発表標題 フタホシコオロギの匂い学習・記憶におけるアセチルコリン受容体の役割
3. 学会等名 日本比較内分泌学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Matsumoto
2. 発表標題 Olfactory memory in the crickets
3. 学会等名 The 10th International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------