

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17520

研究課題名（和文）メラトニン代謝産物であるAMKによる長期記憶形成促進作用と機序

研究課題名（英文）Study on the long-term memory-promoting effect of AMK, a metabolite of melatonin

研究代表者

岩下 洸（IWASHITA, Hikaru）

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：90802489

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：概日リズムの調整において重要な役割を果たすメラトニンは学習記憶能力を増強する作用を持つ。本研究では、この増強作用がメラトニン代謝産物であるAMKの作用に起因していることを示し、AMKをたった1回投与するだけで作業記憶、物体認識記憶、空間記憶といった多様な記憶を増強できることを、若齢マウスだけでなく老齢マウスも用いて示した。また、内因性のAMKについても学習記憶の形成を調節している可能性を示した。これらのAMKによる学習記憶の増強作用は、ERKとCaMKの活性化を介したCREBの活性化に起因している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本における高齢者人口の増加は著しく、認知機能低下の予防や改善をもたらす新たなアプローチの開発が持つ重要性は増している。本研究では、メラトニン代謝産物であるAMKが多様な記憶を増強することを示し、老齢個体においても有効であることを確認した。メラトニンは生体内で元々分泌されているホルモンであり、長期にわたる利用や高濃度の利用においても高い安全性が報告されていることから、その代謝産物であるAMKも比較的安全であることが予想され、ヒトへ応用できる可能性は高い。今後さらなる研究を経て、AMKの臨床応用が進めば、認知機能の低下に苦しむ人々のQOL向上に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：Melatonin, which plays an important role in regulating circadian rhythms, has an enhancing effect on learning and memory. In this study, we demonstrated that this potentiation is attributed to the effect of AMK, a melatonin metabolite, and that a single administration of AMK can enhance various types of memory, including working memory, object recognition memory, and spatial memory, using not only young but also old mice. We also showed that endogenous AMK may modulate the formation of learning and memory. These AMK-mediated potentiation of learning and memory may be due to the activation of CREB via activation of ERK and CaMKII.

研究分野：行動神経内分泌

キーワード：AMK Melatonin 学習 記憶 抗加齢 行動 内分泌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) メラトニンには神経保護作用や老化の主要因である酸化ストレスを抑制する効果があり、抗加齢効果を持つことが知られている(Rodriguez, et al, J Pineal Res 2004; 36: 1-9)。実際に、長期的に投与することで、加齢による学習・記憶の低下が抑制されることを我々も確認している。一方最近では、メラトニンはたった1回の投与であっても学習・記憶を改善する効果があることが報告されている。しかし、このメラトニンの急性効果の作用機序については殆ど分かっていなかった。これまで我々の研究グループでは、メラトニン代謝産物である AMK に強力な長期記憶形成を促進する作用があることをつきとめ、メラトニンの学習・記憶の改善効果は AMK の作用に起因している可能性が高いことを報告してきた。

(2) しかし、先行研究では、AMK の生理的な役割や作用機序については殆ど報告されておらず、受容体が存在するののかも不明である。また、我々のこれまでの研究では、AMK の長期記憶誘導作用を薬理的な作用として解析したに過ぎない。しかし、内因性のメラトニン代謝産物としての AMK が長期記憶形成において生理的な役割を実際に果たしているのか否か、ということは検証すべき大切な課題として残されている。さらに、我々のこれまでの研究では、物体認識記憶以外の記憶については解析していない。これまでと異なる学習試験系においても AMK の作用を評価し、物体認識記憶以外の記憶についても AMK が長期記憶形成を促進するか否か、検証する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では3つのテーマに取り組んだ。

(1) 1つ目のテーマでは、内因性の AMK が学習・記憶に与える影響を調べることで、学習・記憶の過程における AMK の生理的な役割を調べることを目的とした。

(2) 2つ目のテーマでは、AMK がこれまで用いてきた学習試験系以外の系においても長期記憶誘導作用を示すか調べることを目的とした。

(3) 3つ目のテーマでは、AMK による長期記憶誘導の作用機序に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) これまでに、C3H マウスにおいてメラトニンおよび AMK の分泌が夜間に高まり、昼間と比べて夜間の方が長期記憶形成能力は高いことを確認している。よって、夜間に分泌されている AMK の作用により、夜間の学習・記憶能力が高まっている可能性が考えられた。メラトニンは N1-acetyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine (AFMK) を経て AMK に代謝されることが知られており、メラトニンから AFMK への代謝は Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) という酵素によって行われる。よって、IDO の拮抗阻害薬である 1-L-MT (1-methyl-L-tryptophan) や Norharman (NHM) の投与によりメラトニンから AMK への代謝は阻害される(León J, et al, J Neurochem 2006; 98: 2023-33)。メラトニン合成能を持つ C3H マウスを用いて、1-L-MT や NHM による AMK の合成阻害が夜間の長期記憶形成に与える影響を調べることで、内因性の AMK が長期記憶形成に与える影響を調べた。学習・記憶能力の評価にはストレスや報酬といった強化因子を必要とせず、純粋な記憶への影響を想定しやすい物体認識試験(ORT)を用いた(Murai T, et al, Physiol Behav 2007; 90: 116-124)。

(2) メラトニン合成能を持たない ICR マウスを用いて、作業記憶の意見系である Y-maze 試験と空間記憶の試験系である位置認識試験(OLT)を使用し、メラトニンと AMK の作用を調べた。学習前後で投与のタイミングを様々に設定し、記憶形成のどの過程に影響しているかを詳細に調べた。

(3) メラトニンや AMK の投与時に活性化される記憶関連のシグナル経路を探索するために、試薬投与後 30 分から 4 時間にかけて ICR マウスから脳組織をサンプリングし、記憶関連タンパク質とそのリン酸化タンパク質の量をウェスタンブロット法により測定した。記憶関連タンパク質としては、cAMP responsive element binding protein (CREB) や Calcium/calmodulin-dependent protein Kinase Type II (CaMKII)、CaMKIV、Extracellular signal-Regulated Kinase (ERK)、Protein Kinase A (PKA)、Protein Kinase B (AKT)、protein kinase C (PKC) を対象とした。

4. 研究成果

(1) C3H マウスは Pde6rd1 (rd1) に変異を持ち、発生過程で網膜における光受容体の喪失をきたすため、資格による物体の認識が困難である。そのため、本研究では明確に形状の異なる物体を触覚によって識別させることで、物体認識試験の応用を試みた。結果、目が見えない系統のマウスに対しての記憶能力の評価や暗所における記憶能力の評価が物体認識試験によって可能であることが確認された。

この試験系を用いて、昼夜における C3H マウスの学習記憶能力を評価したところ、メラトニン分泌量が少ない ZT8 において (図 1a) 記憶形成には 4 回の学習が必要であるのに対し (図 1b)、メラトニン分泌量の多い ZT20 では (図 1a)、3 回の学習で記憶が形成された。よって、メラトニン分泌量の高い夜間の方が学習記憶能力は高いことが示された。

次に NHM 投与による内因性 AMK の合成阻害を行った (図 2a)。結果、24 時間後の長期記憶の形成は阻害される一方で (図 2b) 短期記憶の形成は阻害されなかった (図 2c)。また、1-L-MT による阻害によっても同様の結果が得られた。よって、メラトニンは AMK の作用を介して生理的条件化で学習記憶能力を調整していると考えられる。

そして、メラトニンおよび AMK を学習記憶能力の低い昼間に投与することで、若齢マウスのみならず老齢マウスにおいても記憶形成を増強することが確認された。

(2) ICR マウスに対してメラトニンまたは AMK を投与し、Y-maze 試験によって作業記憶を評価した結果、作業記憶が増強されることが示された (図 3a)。さらに、位置認識試験によって空間記憶を評価したところ、対照群は 24 時間後に記憶が残っていなかった一方で (図 3b)、メラトニンと AMK の学習前後における投与によって長期記憶の形成が確認された (図 3c, d)。よって、これまで確認していた物体認識記憶以外にも作業記憶や空間記憶においてもメラトニンと AMK は記憶形成を促進する作用があることが確認された。

(3) 次にメラトニンと AMK を投与してから 30 分または 1 時間、2 時間、4 時間後に海馬 (空間記憶と関連) と嗅周囲皮質 (物体認識記憶と関連)、前頭前皮質 (作業記憶と関連) をサンプリングし、ウェスタンブロット法による測定を試みた。結果、今回取り扱った記憶関連タンパク質の内、ERK と CaMKII のリン酸化が投与後 30 分で促進され、遅れて 2 時間後に CREB のリン酸化が促進されることが分かった。CaMKII のリン酸化促進は作業記憶を増強されることが知られており、ERK のリン酸化は長期記憶の形成に必須である CREB のリン酸化を引き起こすことが知られている。よって、メラトニンと AMK は、CaMKII を活性化することで作業記憶を増強し、ERK/CREB 経路の活性化により長期記憶の形成を促進している可能性が示唆された。また、これらの活性化は主に前頭前皮質において確認されたことから、作業記憶の賦活が学習記憶能力の亢進を引き起こしている主要因である可能性も示唆された。

(4) 日本における高齢者人口の増加は著しく、認知機能低下の予防や改善をもたらす新たなアプローチの開発が持つ重要性は増している。本研究では、メラトニン代謝産物である AMK が多様な記憶を増強することを示し、老齢個体においても有効であることを確認した。メラトニンは生体内で元々分泌されているホルモンであり、長期にわたる利用や高濃度の利用においても高い安全性が報告されていることから、その代謝産物である AMK も比較的安全であることが予想され、ヒトへ応用できる可能性は高い。今後さらなる研究を経て、AMK の臨床応用が進めば、認知機能の低下に苦しむ人々の QOL 向上に資することが期待される。

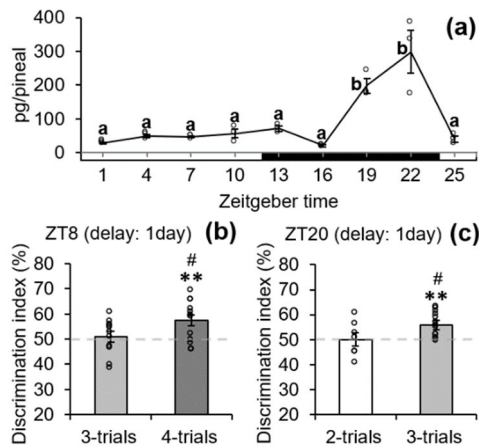


図1 学習記憶能力の昼夜における比較

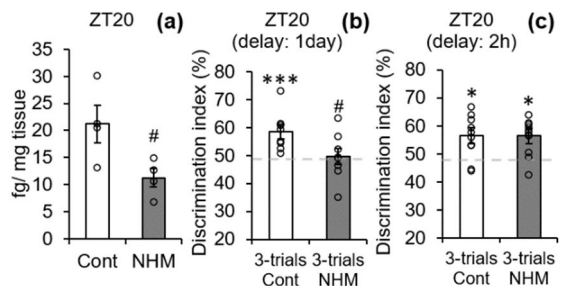


図2 NHMによるAMK合成の阻害

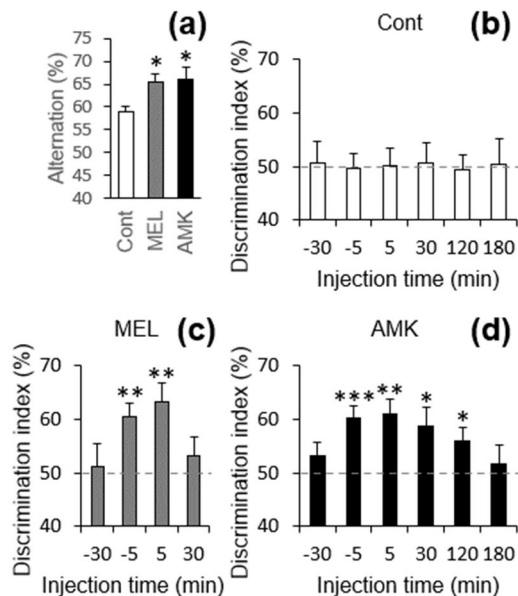


図3 作業記憶と空間記憶の評価

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Watanabe Kazuki, Maruyama Yusuke, Iwashita Hikaru, Kato Haruyasu, Hirayama Jun, Hattori Atsuhiko	4. 巻 76
2. 論文標題 N1 Acetyl 5 methoxykynuramine, which decreases in the hippocampus with aging, improves long term memory via CaMKII/CREB phosphorylation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of Pineal Research	6. 最初と最後の頁 e12934
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jpi.12934	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Sano Masahiro, Iwashita Hikaru, Suzuki Chihiro, Kawaguchi Mari, Chiba Atsuhiko	4. 巻 34
2. 論文標題 Effects of melatonin on phosphorylation of memory-related proteins in the hippocampus and the perirhinal cortex in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 NeuroReport	6. 最初と最後の頁 457 ~ 462
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001911	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 -
1. 著者名 Iwashita H, Sano M, Atsuhiko C	4. 巻 34(3)
2. 論文標題 Diazepam induces retrograde facilitation of object recognition and object location memory in male mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroreport	6. 最初と最後の頁 137-143
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001869	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 -
1. 著者名 Iwashita H, Sano M, Atsuhiko C	4. 巻 150
2. 論文標題 Effects of endogenous and exogenous N-acetyl-5-methoxy kynuramine on object recognition memory in male C3H mice	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Horm Behav	6. 最初と最後の頁 105329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yhbeh.2023.105329	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 -

1. 著者名 Iwashita H, Sano M, Atsuhiko C	4. 巻 34(5)
2. 論文標題 N-acetyl-5-methoxykynuramine enhance object location and working memory performances via modulating CaMKII, ERK and CREB phosphorylation	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Neuroreport	6. 最初と最後の頁 299-307
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/WNR.0000000000001893	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 -

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 2021年
3. 雑誌名 Journal of Pineal Research	6. 最初と最後の頁 1
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 オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 岩下洗、佐野真広、北田容章、千葉篤彦
2. 発表標題 メラトニンおよびその代謝産物N-acetyl-5-methoxy kynuramine (AMK) による学習記憶能力の増強作用と作用機序の研究
3. 学会等名 第23回日本抗加齢医学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岩下洗、佐野真広、千葉篤彦
2. 発表標題 AMKが制御する学習記憶関連因子と学習記憶能力に与える影響
3. 学会等名 第48回日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岩下 洸
2. 発表標題 空間記憶に対するメラトニン代謝産物N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)の長期記憶誘導作用
3. 学会等名 第47回 日本神経内分泌学会学術集会
4. 発表年 2021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