

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：82401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2011～2013

課題番号：23687010

研究課題名(和文) 哺乳類におけるメラトニンおよびその前駆体の生理学的意義の解明

研究課題名(英文) Physiological significance of melatonin and its precursor in mammals

研究代表者

笠原 和起 (Kasahara, Takaoki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究センター・副チームリーダー

研究者番号：50344031

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 21,400,000円、(間接経費) 6,420,000円

研究成果の概要(和文)：マウスをモデル動物としてメラトニンの生理学的な役割を明らかにするために、メラトニンを合成できるマウス、メラトニンを作れないが前駆体のN-アセチルセロトニン(NAS)は合成できるマウス(NAS+)、どちらも作れないマウスを作製することに成功した。これらのマウスの概日時計に関わる行動を調べたが、違いがなかった。また、寿命にも劇的な違いはないことが判明した。行動学的解析では、特にNAS+のマウスにおいて尾懸垂試験で無動時間が短い、記憶の保持が良くないこと、などのいくつかの違いを見出した。NAS+では神経新生が亢進しているデータも得ることができ、これで説明できるだろう。

研究成果の概要(英文)：To clarify the physiological role of melatonin, we developed melatonin-proficient, N-acetylserotonin (NAS; a precursor of melatonin)-proficient, and both-deficient B6 congenic mice. We examined the circadian rhythm-related behaviors in these mice and found no significant difference. Further, there is no dramatic differences in the life span was found in these mice. In behavioral analysis, we detected several significant difference in NAS+ mice, in particular; such as short immobility time in the tail suspension test and worse memory retention. It is possible to be explained by our immunohistochemical data showing enhanced neurogenesis in NAS+ mice.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・動物生理・行動

キーワード：メラトニン マウス アセチルセロトニン 松果体

1. 研究開始当初の背景

メラトニンは松果体において夜間に合成されるホルモンであり、光周性の制御やおそらくは概日時計の時刻調節などにかかわっている。それに加え、抗酸化、抗加齢、抗ガンなどの作用をメラトニンが有することを指摘する報告も存在するが、その真偽は「はなはだ怪しく」まったく明らかではない。メラトニンの研究が遅れている最大の理由は、主たる実験動物であるマウスを用いた研究が困難だったためであろう。多くの実験用マウスの系統(C57BL/6、BALB/c、129など)は、人間が何百年もの間、飼育している過程で、メラトニン合成能を失ってしまった。そのため、メラトニンの投与実験は行えるが、内在性のメラトニンの役割を研究することは難しかった。

メラトニンを作る系統も存在するが(C3HやCBA)作れない系統と比較してメラトニンの効果を調べることは、遺伝的な背景が異なるため容易ではない。メラトニンを作らない系統を用いた実験の結果などに基づいた「はなはだ怪しい」研究のせいで、マウスのメラトニンは、触れてはならない問題のように長年扱われてきた。

マウスを用いたメラトニンの研究を困難にしていた更なる要因として、合成酵素の遺伝子が未同定だったことが挙げられよう。メラトニンは、セロトニンから2段階の酵素反応によって生合成されるが、その2番目の酵素をコードする *HioMt* 遺伝子が、マウスゲノムの解読プロジェクトが完了してもなおマウスからは見つかっていなかった。そのような状況において、研究代表者らはマウス *HioMt* 遺伝子のクローニングに成功し、ようやくマウスにおけるメラトニンの研究を推進できるようになった。

2. 研究の目的

本研究によって、メラトニンの抗加齢効果など「はなはだ怪しい」事象についても、科学的に正確に答えることができるだろう。また、メラトニンは精神医学の分野からも注目されている。抗うつ薬の増強療法としてメラトニンや甲状腺ホルモン(メラトニンのシグナリング下流で光周性をコントロールしている)が使用されているだけでなく、メラトニン受容体の作動薬が抗うつ薬として欧米では認可された。さらに、NASがTrkB(脳由来成長因子BDNFの受容体とされている)を活性化することが最近報告されたが、TrkBの活性化によって神経新生が促されると考えられる。神経新生の異常と精神疾患の関連は幾度となく指摘されていることから、本研究の成果は、精神疾患、特に気分障害(うつ病や双極性障害)の病態の解明につながるだ

らう。

3. 研究の方法

マウスをモデル動物としてメラトニンの生理学的な役割を明らかにするために、C57BL/6系統(メラトニン合成にかかわるAANAT、HIOMTとも活性を欠損)とMSM/Ms系統(両酵素とも活性があってメラトニンを合成する)のマウスを掛け合わせ、メラトニンを合成できるマウス(MEL+)、メラトニンを作れないが前駆体のN-アセチルセロトニン(NAS)は合成できるマウス(NAS+)、どちらも作れないマウス(None)を作出する。

この3種のコンジェニックマウスを用いて、これまでにメラトニンが関わっていると考えられていた生理機能を調べる。具体的には、概日リズムに関する行動、また、網羅的な行動解析バッテリー試験によって、これまで知られていなかったメラトニンやNASが関わる機能を調査する。概日リズムに関する行動を解析する際は、明期12時間:暗期12時間(LD12:12)の光条件下だけでなく、恒暗条件、恒明条件、長日条件(LD16:8)、短日条件(LD8:16)など種々の光条件下における輪回し行動量を測定し、わずかな違いも見逃さないように丁寧に解析を行う。

マウスの神経新生に与えるメラトニンやNASの効果調べるために、チミジンアナログの一つであるエチニルデオキシウリジン(EdU)を腹腔内投与し、その後、脳試料を得て、海馬の歯状回などを精査する。

4. 研究成果

C57BL/6J系統とMSM/Ms系統のマウスを掛け合わせ、メラトニンを合成できるマウス(MEL+)、メラトニンを作れないが前駆体のNASは合成できるマウス(NAS+)、どちらも作れないマウス(None)を作製した。遺伝的な背景が均一となるように、C57BL/6J系統またはMSM/Ms系統にコンジェニック化を行った。10回以上のバッククロスを行い、ゲノムワイドに設定した約100カ所のマーカーを調べて、コンジェニック化が完了したことを確認した。

得られた各種の遺伝子型のマウスから、夜間に松果体をサンプリングしてメラトニンを測定した。その結果、想定通り、遺伝子型によってメラトニンが生合成できる/できないことを確認した。ただし、想定外の結果として、C57BL/6J系統が有している *Aanat* 遺伝子アレルからも弱いながらも活性のあるAANAT酵素が発現することが判明し、そのために、マウスの遺伝子型の組み合わせに注意しなくてはならないことが判明した。 *Aanat* および *HioMt* ともヘテロ状態のオスマウスとメスマウスを交配させて仔マウスを得るこ

とを当初は計画していたが、それでは、実験に使用できない仔マウスが多数生まれることになり、実験動物愛護の観点からも、交配の方法、コロニーの維持の方法を変更した。すなわち、MEL+のオスとメスを交配させてMEL+のコロニーを、NAS+のオスとメスを交配させてNAS+のコロニーを、そしてNoneのオスとメスを交配させてNoneのコロニーを樹立することにした。

その結果、再び想定外の現象に遭遇した。すなわち、この3種のコロニーでは、繁殖効率に大きな違いがあり、MEL+とNAS+の繁殖効率がNone（やC57BL/6J系統を用いた他の研究の繁殖成績）に比べて悪い。オスマウスとメスマウスを同居させてもなかなか交配しないし、また、新生仔の生存率が低いことが明らかになった。

C57BL/6J系統にバッククロスしたコンジェニックマウスに関しては、世界中の多くの研究者に利用してもらえるよう、理化学研究所のバイオリソースセンターに寄託した（これまでに5件の分与希望があり、すでに分与したか、分与準備中である）。

3群のマウス（MEL+、NAS+、None）の輪回し行動解析を行い（合計30匹）明暗周期下における行動パターン、恒暗条件下における概日時計のフリーラン周期等を調べた。予想通りであるが、メラトニン合成能は影響を与えないことが分かった。

メラトニンの抗加齢効果を検証するために、3群のマウスの寿命を測定した。どの群のマウスも2歳以上まで生存し、そのため現在も測定を続けているが、劇的に寿命が変化する（特に短くなる）ことはないことがわかった。

行動学的解析のバッテリー試験では、特にNAS+のマウスにおいていくつかの違いを見出した。NAS+マウスは、尾懸垂試験では無動時間が有意に短かった。また、社会性接触の亢進や、記憶の保持が良くないことを示唆するデータを得ることができた。多くの実験マウスの系統は長い間、飼育されてきた中で、NASを合成する能力を失ってしまった（*Aanat* 遺伝子に変異が生じて固定された）が、NASが多く分泌されることは、馴化・愛玩化に邪魔だったかもしれない。

チミジンアナログであるEduを用いて神経新生を調べたところ、MEL+マウスやNAS+マウスの海馬の歯状回において神経新生が更新していた。この結果は、NAS+がTrkB受容体のアゴニストとして働くという報告に合致する。また、NAS+マウスの行動学的な差異を説明できる結果である。

上述したように、行動学的あるいは組織化学的な解析からは、NAS+マウスやMEL+マウスがNoneマウスとは異なることが分かったが、MEL+マウスなどにおける血中メラトニン濃度をさまざまな時間帯でサンプリングして調べたところ、想定外の結果が得られた。夜間に松果体中にはメラトニンが十分に存在する（十分に生合成されている）にもかかわらず、血中の濃度は非常に低いレベルであった。（ただし、検出・定量は可能であり、メラトニン合成能を失っているC57BL/6Jマウスとは大きく異なる）。今後の課題として、血中のメラトニンの分解が速いのか、松果体から血中に分泌されにくいのかなど、調べる必要があるだろう。どちらの可能性も、これまでほとんど研究されていない領域であり、重要な新しい知見を得ることができるかもしれない。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計1件)

笠原 和起. 松果体. 分子精神医学 13, 212-217 (2013). 査読無し

<http://mol.medicalonline.jp/library/journal/abstract?GoodsID=ae6mopsb/2013/001303/009&name=0212-0217j>

〔学会発表〕(計6件)

Takaoki Kasahara, Kuniya Abe, Tadafumi Kato. Molecular and genetic characterization of the mouse pseudoautosomal region. Mouse Molecular Genetics 2013. 英国・ケンブリッジ (2013年9月20日)

Takaoki Kasahara. Development and characterization of a mouse model for mood disorder. Infrafrontier/IMPC Korea Meeting. 韓国・ソギョポ(2012年9月26日) (招待講演)

Takaoki Kasahara, Kuniya Abe, Kazuyuki Mekada, Atsushi Yoshiki, Shigeharu Wakana, Tadafumi Kato. Identification of mouse Hiomt gene and development of melatonin-proficient congenic C57BL/6J mice. Gordon Research Conference: Pineal Cell Biology. 米国・ガルベストーン (2012年2月1日)

笠原 和起. マウス偽常染色体領域のDNAシーケンシング. 第25回モロシヌス研究会. 新潟県 (2011年7月9日)

Takaoki Kasahara, Kuniya Abe, Tadafumi Kato. Sequencing of mouse pseudoautosomal region. Mouse Genetics 2011. 米国・ワシ

ントン DC (2011 年 6 月 24 日)

笠原 和起。マウスの飼育舎内「進化」～
メラトニン合成能を例に～。実験動物学会
第 58 回総会。東京都(2011 年 5 月 25 日)招
待講演)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.brain.riken.go.jp/labs/mdmd/>

理化学研究所のバイオリソースセンター

・活性型 *Anat* アリールを持つ C57BL/6J コ
ンジェニックマウスの詳細ページ:

http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC05556

・活性型 *Hiomt* アリールを持つ C57BL/6J コ
ンジェニックマウスの詳細ページ:

http://www2.brc.riken.jp/lab/animal/detail.php?brc_no=RBRC05557

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笠原 和起 (KASAHARA, Takaoki)

独立行政法人理化学研究所・脳科学総合研究
センター・副チームリーダー

研究者番号:

50344031