

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：12602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07434

研究課題名(和文)メラトニンによる加齢性記憶障害改善の分子機構の解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of age-related memory impairment improved by melatonin

研究代表者

松本 幸久 (Yukihisa, Matsumoto)

東京医科歯科大学・教養部・助教

研究者番号：60451613

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究で代表者はフタホシコオロギの長期記憶形成過程におけるメラトニンの作用機序および加齢性記憶障害に対するメラトニンによる改善効果について調べた。その結果、長期記憶の形成機構においてメラトニンの脳内代謝産物であるAMKが重要であること、またメラトニン/AMK系は、長期記憶の形成過程においてすでに報告されているNO-cGMP系の下流で働いていることが示唆された。また、コオロギの長期記憶形成能には昼期よりも暗期の方が高くなるという日内変動があり、それにはメラトニン/AMK系が関与していることがわかった。また、AMKには加齢性記憶障害の改善効果があることも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた、「メラトニンの脳内代謝産物が記憶の形成に重要であり、また加齢性記憶障害を改善する」という結果はすべての生物種において初めての報告である。またこれらの現象は代表者らのグループによるマウスを使った実験系でも再現することができた。よって本研究で得られた知見は、ヒトの加齢性記憶障害を改善する新薬の開発にもつながると期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, I investigated functional mechanisms of melatonin in long-term memory formation and whether melatonin improves age-related memory impairment. The results suggest that AMK, a melatonin metabolite within the brain, is crucial in the long-term memory formation process, and that melatonin/AMK signaling pathway functions downstream of NO-cGMP pathway which has already been reported to be involved in the process. The capability of long-term memory formation in crickets shows daily fluctuation, higher in the night than during the daytime. From the results, melatonin/AMK signaling pathway is suggested to also play a role in this circadian variation. In addition, I demonstrated that AMK improves age-related memory impairment.

研究分野：神経行動学

キーワード：メラトニン 加齢性記憶障害 長期記憶 フタホシコオロギ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

加齢性記憶障害 (Age-related Memory Impairment) はヒトを含む様々な動物で見られる現象で、これまでにいくつかの物質が加齢性記憶障害を改善するという報告がある。代表者は、成虫脱皮して 1 週間後 (1 週齢) のフタホシコオロギ (*Gryllus bimaculatus*、以下コオロギ) がげっ歯類に引けを取らない高い学習能力を持つことを明らかにしている。さらに行動薬理などにより、コオロギの匂い学習の記憶が短期記憶、長期記憶などに分けられること、長期記憶の形成には一酸化窒素 (NO) 系や PKA 系などいくつかのシグナル伝達系の働きが必要不可欠であることを示した。また代表者は、平均寿命を超えた 3 週齢の加齢コオロギでは、短期記憶が正常に作られるが長期記憶が全く作れなくなることを、すなわち長期記憶のみに加齢性記憶障害がみられることを見つけ、さらに上記のシグナル伝達系の活性化剤がコオロギの加齢性記憶障害を完全に回復できることを見出した。そして近年では抗酸化物質であるメラトニンもこの加齢性記憶障害を改善できることを発見している。ただし、その作用機序については全く分かっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、コオロギの長期記憶形成過程におけるメラトニンの作用機序およびメラトニンによる加齢性記憶障害改善の神経分子機構を、行動薬理、LC-MS による定量解析を用いて明らかにすることである。

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。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。

(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。匂いの嗜好性テストを訓練前と訓練後に行い、その結果を比較して学習訓練の効果を評価した。成虫脱皮 1 週齢の若齢コオロギでは、訓練 1 日後の長期記憶の形成には 4 回の訓練 (試行内間隔 5 分間) が必要である。

(3) 薬理：L-NAME (NO 合成酵素阻害剤)、シクロヘキシミド (タンパク質合成阻害剤)、メラトニン、6-ハイ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)、1-メチル-L-トリプトファン (1-MT)、ルジンドール (メラトニン受容体アンタゴニスト)、ラメルテオン (メラトニン受容体アゴニスト) 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 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、5-HT、AFMK、AMK) や記憶関連物質 (cGMP、cAMP、オクトパミン、ドーパミン) などの量を測定した。

4. 研究成果

(1) 長期記憶形成における既知のシグナル伝達経路とメラトニン：代表者の先行研究からメラトニンがコオロギの嗅覚報酬学習の長期記憶の形成機構に直接働いていることが示唆されている。そこで若齢コオロギを用いて、メラトニンと長期記憶形成で重要な働きをすることが分かっている NO-cGMP シグナル伝達経路との関係を明らかにするために、メラトニ

ンと NO-cGMP 系阻害剤 (NOS 阻害剤、sGC 阻害剤) との共投与を行い、訓練 1 時間後の長期記憶を調べた。その結果、メラトニンが NO-cGMP 系の下流で作用していることが分かった。

(2) 長期記憶形成においてメラトニンの下流で働く分子の同定：メラトニンの下流で働く分子の候補としてメラトニンの脳内代謝産物である AFMK, AMK と、肝臓内代謝産物の 6-HM に注目し、これらがメラトニン同様に若齢コオロギの嗅覚報酬学習の長期記憶を誘導できるかどうかを行動薬理で調べた。その結果、AFMK, AMK では長期記憶の誘導効果が見られたが、6-HM には長期記憶の誘導効果が見られなかった。さらに AFMK, AMK の投与濃度を変えた実験を行ったところ、それぞれメラトニンの 50 分の 1、125 分の 1 の低濃度でも長期記憶を誘導できることが分かった。また、メラトニンを AFMK に代謝する酵素 (IDO) の阻害剤である 1-MT は若齢コオロギの長期記憶の形成を阻害した。さらに IDO 阻害剤とメラトニン代謝産物との共投与実験から、コオロギの長期記憶の形成にはメラトニンが AMK に代謝されることが重要であることが分かった。

(3) 長期記憶の日内リズムとメラトニン経路：メラトニンは様々な動物において生体リズムの調節にかかわることが知られているが、コオロギの日内リズムにおけるメラトニンや AMK の働きについては全く分かっていない。そこで、コオロギの長期記憶形成能が日内リズムにどのような影響を受けるかを調べた。まず明期と暗期において、報酬連合学習の訓練回数と長期記憶形成の関係を調べたところ、暗期の方が明期よりも少ない訓練回数で長期記憶を形成できることが分かった。次に、メラトニンや AMK による長期記憶の誘導効果が薬物投与時刻により異なるかどうかを調べたところ、メラトニンと AMK のどちらも暗期の方が明期よりも低濃度で長期記憶を誘導できることが分かった。以上の結果から、コオロギの長期記憶形成能には暗期の方が明期よりも高いという日内変化が存在し、それにはメラトニン脳内代謝産物の AMK が関与していることが示唆された。次にコオロギの記憶形成能の日内変化が概日時計に支配されているかどうかを調べた。恒明条件下または恒暗条件下で飼育したコオロギに嗅覚条件付けを行い、訓練 1 日後の長期記憶のスコアを調べたところ、長期記憶形成能が概日時計に支配されている可能性が示唆された。

(4) 昼行性コオロギにおける長期記憶の日内リズム：フタホシコオロギの成虫個体は 27 の通常飼育環境下では夜行性の活動リズムを示すが、飼育温度を 20 に下げると昼行性になることが知られている。そこで昼行性個体を用いて長期記憶の形成能の日内変化を調べたところ、暗期では明期よりも少ない訓練回数で長期記憶が形成できた。すなわち、昼行性個体の長期記憶形成能も夜行性個体と同様に暗期の方が高いことが示唆された。

(5) メラトニン受容体とメラトニン/AMK との関係：メラトニンは受容体を介して長期記憶を形成しているのかを調べるために、まずメラトニン受容体アンタゴニストのルジンドールを投与したコオロギの記憶を調べた。その結果、訓練 1 時間後の短期記憶は影響なかったが、1 日後の長期記憶は完全に阻害された。そこで、長期記憶の形成におけるメラトニン受容体とメラトニン、AMK との関係を調べるために薬物の共投与実験を行い、以下のことがわかった。1) メラトニン受容体アゴニストのラメルテオンの投与により長期記憶が誘導された。2) ラメルテオンの長期記憶誘導効果はルジンドールとの共投与により阻害された。これらの結果からメラトニン受容体が長期記憶の形成に関与していることが示唆された。さらに、3) メラトニンによる長期記憶の誘導はルジンドールの共投与により

完全に阻害されたのに対し、AMKによる長期記憶の誘導はルジンドールの共投与による影響を受けなかった。この結果から、長期記憶の形成にはメラトニン受容体を介するルートと、メラトニン受容体を介さないAMK依存的なルートがあることが示唆された。

(6) 加齢コオロギと若齢コオロギの頭部における記憶関連物質の比較：コオロギの加齢性記憶障害は「メラトニンやAMKなどの記憶関連物質の量が加齢に伴い低下することに起因する」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)を用いた定量実験によりその仮説を検証した。加齢コオロギ(成虫脱皮3週齢)と若齢コオロギ(1週齢)の頭部における長期記憶関連物質(メラトニン, AMK, cGMP, cAMP, octopamine, dopamine, serotoninなど)をLC-MSで定量し比較したところ、加齢コオロギは若齢コオロギに比べて頭部のAMK量が有意に低かったが、メラトニン量は両者で有意な差がみられなかった。

(7) 学習パラダイムの違いによるメラトニンの効果：メラトニンが学習記憶に対し促進的に働くことがげっ歯類などを使った研究でも多く報告されている一方で、逆に抑制的に働く報告も存在する。代表者は、前者には報酬連合学習や強化子を必要としない学習が多いのに対し、後者には罰連合学習や消去学習が多いことに注目し、「メラトニン系は報酬学習では促進的に鈍落が、罰学習では促進的には働かない」という仮説を立て、それを行動薬理で検証した。メラトニン受容体アンタゴニストのルジンドールを投与したコオロギに食塩水を罰刺激として用いる嗅覚罰学習を行ったところ、長期記憶が全く阻害されなかった。一方、報酬学習の長期記憶は同量のルジンドールの投与により完全に阻害された。また、報酬学習では長期記憶を誘導できる量のメラトニンやAMKを投与したコオロギに3回の罰学習を行ったところ、長期記憶は全く誘導されなかった。これらの結果から、メラトニン系は罰学習では促進的には働かないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Matsumoto Y, Matsumoto CS, Mizunami M.	4. 巻 9
2. 論文標題 Signaling pathways for long-term memory formation in the cricket	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Front. Psychol.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpsyg.2018.01014. eCollection 2018.	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 Mizunami M, Hirohata S, Sato A, Arai R, Terao K, Sato M, Matsumoto Y.	4. 巻 286
2. 論文標題 Development of behavioural automaticity by extended Pavlovian training in an insect	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proc. Biol. Sci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1098/rspb.2018.2132.	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 M. Mizunami and Y. Matsumoto	4. 巻 8
2. 論文標題 Roles of octopamine and dopamine neurons for mediating appetitive and aversive signals in Pavlovian conditioning in crickets	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Frontier in Physiology	6. 最初と最後の頁 1027
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） doi: 10.3389/fphys.2017.01027. eCollection 2017.	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 M. Mizunami, C. S. Matsumoto and Y. Matsumoto	4. 巻 67
2. 論文標題 Searching for cognitive processes underlying insect learning	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 The Japanese Journal of Animal Psychology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 H. Awata, R. Wakuda, Y. Ishimaru, Y. Matsuoka, K. Terao, S. Katata, Y. Matsumoto, Y. Hamanaka, S. Noji, T. Mito and M. Mizunami	4. 巻 6: 29696
2. 論文標題 Roles of OA1 octopamine receptor and Dop1 dopamine receptor in mediating appetitive and aversive reinforcement revealed by RNAi studies.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/srep29696.	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 Y. Matsumoto, C. Sato, T. Takahashi and M. Mizunami	4. 巻 10: 166
2. 論文標題 Activation of NO-cGMP signaling rescues age-related memory impairment in crickets.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Front. Behav. Neurosci.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) doi: 10.3389/fnbeh.2016.00166. eCollection 2016.	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 S. Sugimachi, Y. Matsumoto, M. Mizunami and J. Okada	4. 巻 33
2. 論文標題 Effects of caffeine on olfactory learning in crickets.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Zool. Sci.	6. 最初と最後の頁 513-519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 S. Hosono, Y. Matsumoto and M. Mizunami	4. 巻 23
2. 論文標題 Interaction of inhibitory and facilitatory effects of conditioning trials on long-term memory formation.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Learn. Mem.	6. 最初と最後の頁 669-678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/lm.043513.116.	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16件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

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

1. 発表者名 岩下洸・松本幸久・丸山雄介・張賢・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 内因性メラトニン代謝産物N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)による長期記憶誘導作用
3. 学会等名 日本抗加齢医学会第18回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩下洸・丸山雄介・張賢・松本幸久・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 マウスの長期記憶形成に関する内因性のメラトニン代謝産物N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)
3. 学会等名 日本比較内分泌学会第43回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松本幸久・丸山雄介・松本千尋・影近弘之・増野弘幸・岩下洸・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 メラトニン代謝産物N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)とその類似物質による長期記憶の誘導効果 -コオロギをモデル動物として
3. 学会等名 日本抗加齢医学会第17回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩下洸・松本幸久・丸山雄介・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 メラトニンの脳内代謝産物N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)による老齡マウスにおける長期記憶誘導作用
3. 学会等名 日本抗加齡医学会第17回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤紀之・松本幸久・服部淳彦
2. 発表標題 メラトニンによる長期記憶の誘導効果は投与時刻により異なる コオロギにおいて
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩下洸・松本幸久・丸山雄介・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 記憶力が低下した加齡マウスにおけるメラトニン脳内代謝産物の長期記憶誘導作用
3. 学会等名 日本動物学会第88回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤紀之・松本幸久・丸山雄介・服部淳彦
2. 発表標題 コオロギにおける長期記憶形成能の概日変化とメラトニン及びその脳内代謝産物の長期記憶誘導効果
3. 学会等名 第24回日本時間生物学会学術大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 佐藤紀之・松本幸久・丸山雄介・服部淳彦
2. 発表標題 コオロギの長期記憶形成能の日内および概日変化と昼夜で異なるメラトニン脳内代謝産物の長期記憶誘導効果
3. 学会等名 日本比較内分泌学会第42回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 岩下洗・松本幸久・丸山雄介・張賢・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 メラトニン産生能を持つマウスにおけるメラトニンの脳内代謝産物N-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)の長期記憶誘導作用
3. 学会等名 日本比較内分泌学会第42回大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 K. Terao, Y. Matsumoto, M. Mizunami
2. 発表標題 Prediction error theory in insects; blocking experiment and pharmacological evaluation.
3. 学会等名 The 44th Naito Conference: Decision Making in the Brain Motivation, Prediction, and Learning
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 松本幸久・丸山雄介・松本 佐藤千尋・岩下洗・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 メラトニンには単回投与でも長期記憶を誘導する効果がある -コオロギをモデル動物として
3. 学会等名 日本抗加齢医学会第16回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岩下洗・松本幸久・丸山雄介・服部淳彦・千葉篤彦
2. 発表標題 メラトニンには単回投与でも長期記憶を誘導する効果がある - マウスを用いて
3. 学会等名 日本抗加齢医学会第16回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松本幸久・丸山雄介・松本 佐藤千尋・岩下洗・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 Melatonin metabolites rescue age-related memory impairment in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i>
3. 学会等名 The 22th International Congress of Zoology (国際学会)
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 松本幸久・丸山雄介・松本 佐藤千尋・岩下洗・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 メラトニンの脳内代謝産物であるN-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)はコオロギの長期記憶形成に重要である
3. 学会等名 比較内分泌学会第41回大会
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 岩下洗・松本幸久・丸山雄介・千葉篤彦・服部淳彦
2. 発表標題 メラトニンの脳内代謝産物であるN-acetyl-5-methoxykynuramine (AMK)の Maus における長期記憶誘導作用
3. 学会等名 比較内分泌学会第41回大会
4. 発表年 2016年

〔図書〕 計3件

1. 著者名 M. Mizunami and Y. Matsumoto	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 12
3. 書名 Crickets as a model organism: development, regeneration and behavior. Chapter 9, Learning and memory.	

1. 著者名 M. Sakai, M. Kumashiro, Y. Matsumoto, M. Ureshi and T. Otsubo	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 25
3. 書名 Crickets as a model organism: development, regeneration and behavior. Chapter 16, Reproductive behavior and physiology in the cricket <i>Gryllus bimaculatus</i> .	

1. 著者名 Y. Matsumoto, C. S. Matsumoto and M. Mizunami	4. 発行年 2017年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 12
3. 書名 Crickets as a model organism: development, regeneration and behavior. Chapter 17, Protocols for olfactory conditioning.	

〔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