

令和元年6月1日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14780

研究課題名(和文) 松果体ホルモン・メラトニンの挙動を制御する分子機構

研究課題名(英文) Molecular mechanisms underlying control of melatonin physiology

研究代表者

笠原 和起 (Kasahara, Takaoki)

国立研究開発法人理化学研究所・脳神経科学研究センター・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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：血液中のメラトニン濃度を測定する方法として、酵素免疫測定法ELISAなどの酵素抗原反応を利用した方法が昔から用いられてきたが、液体クロマトグラフィー質量分析法(LC/MS/MS)による測定の方が高精度で、血中内の阻害物質の影響を受けずに安定的に定量できることがわかった。この方法で、我々が開発したメラトニンを合成できる実験用マウスは、夜間に十分なメラトニンを合成・分泌していることを確認し、体重や生殖腺が軽いなどの変化が生じることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LC/MS/MSを用いた高精度の定量法を確立し、メラトニンの前駆体であるNASも同時に測定できるようになった。その結果、野生由来系統MSMマウスやメラトニンを合成できる実験用系統B6マウスでは、メラトニンよりも約10倍の高濃度のNASが夜間には血中に含まれていることがわかった。また、メラトニン合成できるB6マウスは普通のB6マウスと比べて体重や生殖腺も軽かった。産後数も有意に少なく、実験室環境において、メラトニン合成能を失ったことは理にかなっていた。しかし、野生環境に生きるマウスはメラトニン合成能を有していることから、我々がいまだに知らないメラトニンの役割が考えられた。

研究成果の概要(英文)：As a method of measuring melatonin concentration in blood, methods using enzyme-antigen reaction such as ELISA have long been used. In this study, however, we found that a method by liquid chromatography mass spectrometry (LC/MS/MS) was more accurate and could stably quantified without being affected by other molecules in the blood. We confirmed, using this method, that melatonin-synthesizing laboratory mouse line (C57BL/6J) we developed contained enough melatonin at night in blood. The melatonin-proficient mice had significantly decreased body and gonad weights.

研究分野：神経科学

キーワード：メラトニン 松果体 N-アセチルセロトニン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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セロトニンから合成されるホルモンであるが、実験用マウスの多くの系統(Balb/c や C57BL/6 など)はメラトニンの合成能を失っている。合成系(図1)の2酵素(AANATとHIOMT)の活性が両方とも欠損している。

我々は、ゲノム解読プロジェクトが完了後もクローニングされていなかった *Hiomt* 遺伝子を同定し、その知見をもとに、メラトニン合成能を持つような C57BL/6(B6)マウスを作成した。具体的には、B6系統とメラトニン合成能を有する MSM 系統とを交配し、*Aanat*と *Hiomt* のアリルが MSM 型であることを確認しながら B6 の遺伝的背景になるように戻し交配した。ゲノムワイドの約 80 マーカーがすべて B6 型になってから更に 5 世代以上の戻し交配を行った。

松果体に含まれる夜間のメラトニンを ELISA 法によって測定すると、期待通り、MSM 系統マウスとほぼ同じ量であったが(次ページ図 2A)、血漿中にはメラトニンはほとんど検出されなかった。主要な分解酵素 CYP1A2 の阻害剤を投与しても血中量は増加しなかった(未発表)。このことから、松果体からの分泌のステップかどこかに未知の制御因子が存在することが示唆された。

2. 研究の目的

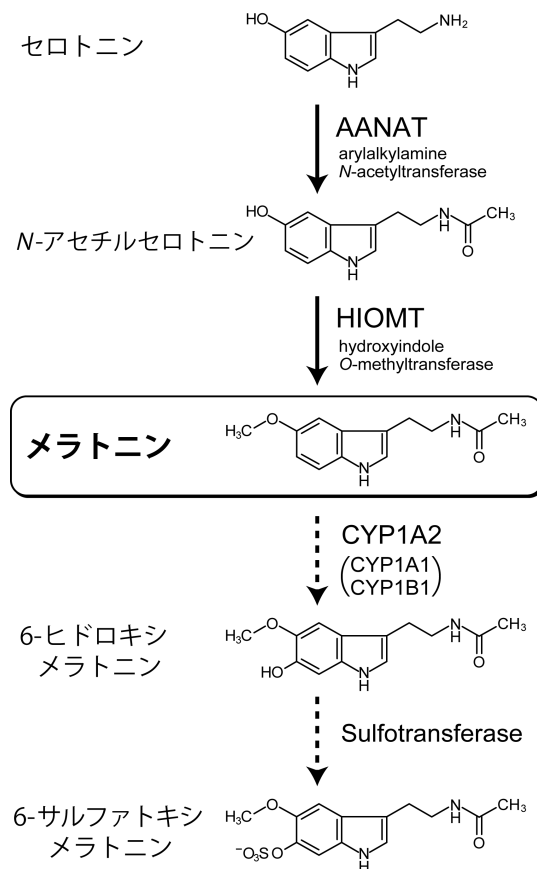
本研究では、この未知の制御因子の同定を目的とする。メラトニンの分泌や動態に関する論文を読み漁っても、血中のメラトニンを極めて低くする可能性のある分子機序を具体的に想定することができない。メラトニンに関しては一般的なマウスを用いた動物実験ができないため、メラトニンの生体内動態に関する解析や知識は、他のホルモンなどの生体物質と比較すると極めて乏しい。仮説に基づかず原因遺伝子を同定できる連鎖解析などの手法を用いて、これまで知られていないメラトニンの挙動を制御する分子機序を明らかにする。

3. 研究の方法

メラトニン合成能を持つ野生由来 MSM 系統(*Aanat*(+/+);*Hiomt*(+/+))と合成能を持たない B6 系統(*Aanat*(mut/mut);*Hiomt*(mut/mut))を交配させた F2 あるいは N2 マウスを作製し、その血中メラトニン濃度を測定してゲノム解析を行うことを計画した。当初は Mouse Diversity Genotyping Array(623,000 SNP マーカー)を用いてタイピングを行い、QTL 解析をする予定であった。この解析に供するためのマウス(予定では適切な遺伝子型を持つマウスの組み合わせで合計 60 匹)を増やす間に、松果体中・血漿中のメラトニンおよび NAS の濃度を精密にかつ同時に測定するために液体クロマトグラフィー質量分析器(LC/MS/MS)による定量法を確立した。これまでは ELISA 法を用いていたため、バラツキが大きく、また NAS については測定することもできなかった。

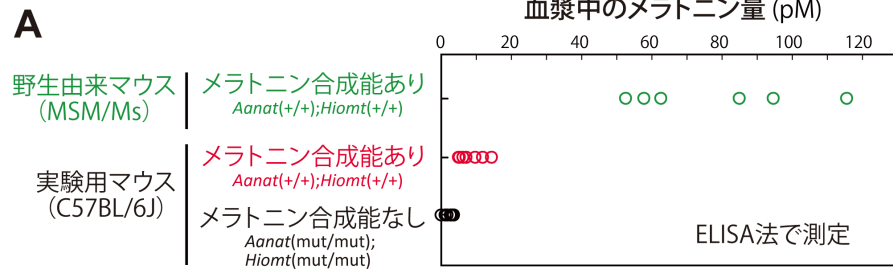
4. 研究成果

LC/MS/MS 法による血中のメラトニンおよび NAS の同時測定法を確立した。この定量法には、安定同位体ラベルしたメラトニンおよび NAS を用いることによって、精度の高い定量が可能になった。その

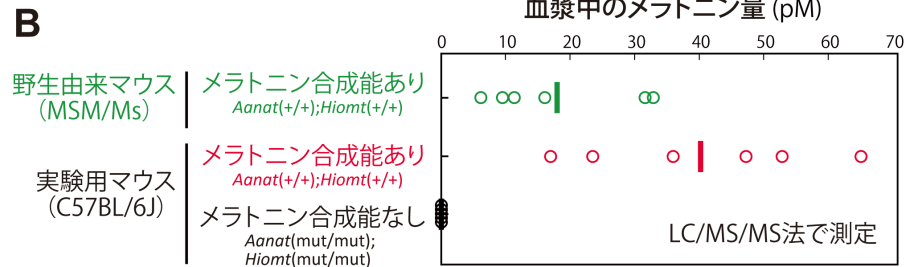


【図1】メラトニンの合成・分解系

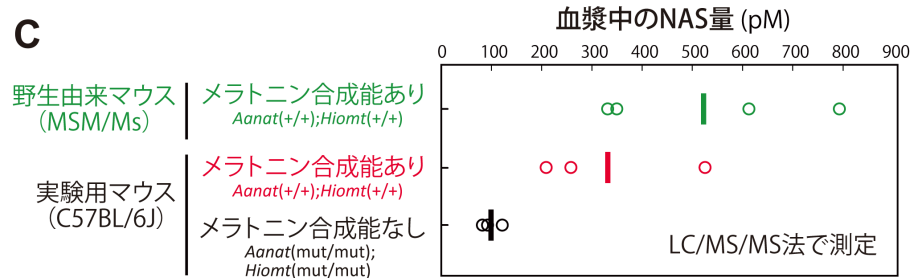
【図 2A】
ELISA 法によって測定した血漿メラトニン濃度



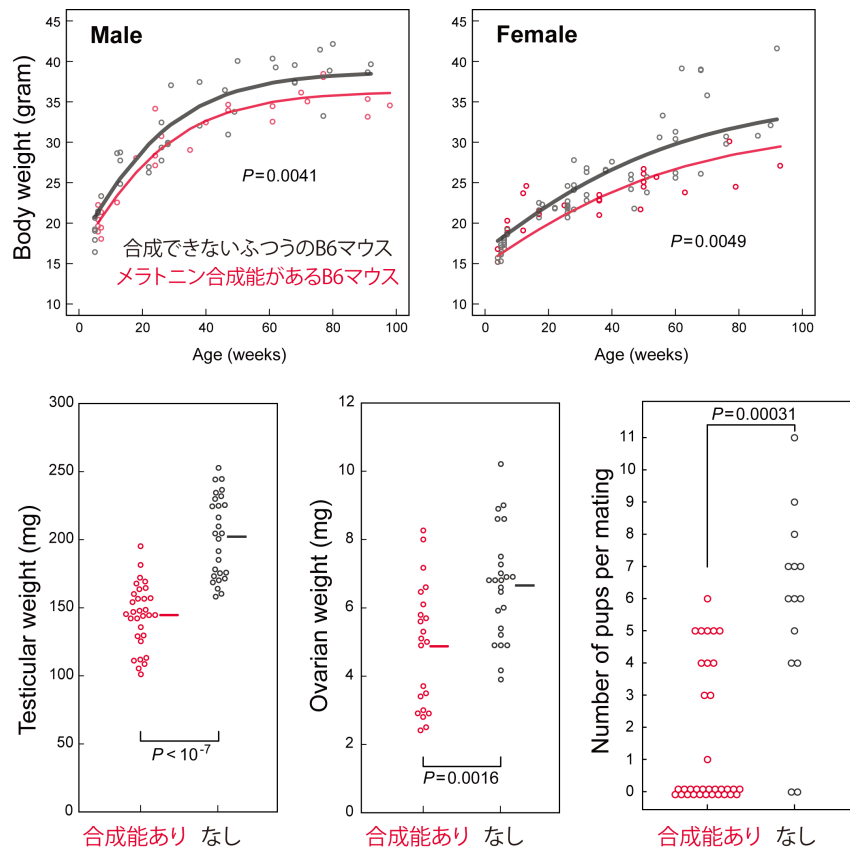
【図 2B】
LC/MS/MS 法によって測定した血漿メラトニン濃度



【図 2C】
LC/MS/MS 法によって測定した血漿 NAS 濃度



結果、本研究のきっかけとなったメラトニンを合成できる B6 マウス (*Aanat (+/+);Hiomt(+/+)*) の血中メラトニン濃度は LC/MS/MS 法で測定すれば、MSM マウスと同様かそれ以上に高いことが明らかになった (図 2B)。このことから、本研究の当初の研究目的が誤りであったことが判明した。LC/MS/MS を用いた定量法では NAS も同時に測定することができ、MSM マウスやメラトニンを合成できる B6 マウスでは、メラトニンよりも約 10 倍の高濃



【図 3】

メラトニンを合成できる B6 マウスと合成できない普通の B6 マウスの体重、生殖腺の重量、および通常交配による産仔数の比較

度のNASが夜間には血中に含まれていることがわかった(図2C)。また、メラトニン合成能がないB6マウス(=ふいつうのB6マウス)では、メラトニンは検出されなかったが(図2B)、NASは微量ではあるが検出された。B6マウスの*Aanat*の変異は完全な機能喪失型ではないと考えられていたが、それを裏づけるデータであった。

当初の研究計画に基づく実験のために、メラトニンを合成できるB6コンジェニックマウスと合成できない普通のB6マウスの個体数を増やしていたので、それらの体重、生殖腺の重量、および通常交配による産仔数を測定した(図3)。その結果、メラトニン合成能のあるB6マウスは体重や生殖腺が軽かった。また、メラトニンを合成できるB6マウスの産後数は有意に少なく、実験室環境において、メラトニン合成能を失ったことは理にかなっていると考えられた。しかし、野生環境に生きるマウスはメラトニン合成能を有していることから、我々がいまだに知らないメラトニンの役割が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計0件)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。