

立教大学学術推進特別重点資金(立教 S F R)  
共同プロジェクト研究  
2024年度研究(経過・成果)報告書

研究代表者	所属部局・職名	氏名			
	立教大学・スポーツウエルネス学部・教授	加藤 晴康			
研究課題	長期記憶誘導物質である AMK の合成経路の解明と長期間の高脂肪食摂取による影響				
研究組織 (研究代表者・研究分担者) 2025年3月現在	所属研究機関・部局・職名	氏名			
	立教大学・スポーツウエルネス学部・教授	加藤 晴康			
	立教大学・スポーツウエルネス学部・特任教授	服部 淳彦			
	立教大学・スポーツウエルネス学部・教授	館川 宏之			
	立教大学・スポーツウエルネス学部・助教	丸山 雄介			
全研究期間	2024年度 ~ 2025年度				
研究経費※ (上段:支出金額)	2024年度	2025年度	年度	総計	
	4,000,000	0,000,000	0,000,000	4,000,000	円
(下段:採択金額)	4,000,000	2,000,000	0,000,000	6,000,000	円

※1円単位で記入

## 研究の概要 (200~300字で記入、図・グラフ等は使用しないこと。)

当該研究の研究目的を含むこと。

【以下、報告書全体について】他の研究分野の委員が評価することも想定し、わかりやすく記載すること。

我々は認知症の原因や治療法を明らかにするための研究を行っており、メラトニンの脳内代謝産物である AMK を老齢マウスに投与すると、長期記憶が誘導されることや、加齢性記憶障害の原因が海馬における AMK の激減であることを見出している (*J Pineal Res*, 2024)。本 SFR 研究において、生活習慣の悪化によって生じる記憶障害が、AMK により予防できる可能性を調べる。本年度は、ヒト培養細胞および酵母に AMK 変換酵素の可能性のある遺伝子を導入して、その発現を確認した。また、マウスにおける物体認識試験の条件検討を行い、記憶形成の評価系を確立することで高脂肪食マウスへの施行準備まで到達した。

キーワード (研究内容をよく表しているものを3項目以内で記入。)

[AMK] [認知症] [生活習慣病]

**研究【経過・成果】の概要** (図・グラフ等は使用しないこと。)

以下の視点を含めて記載のこと。

- ・当該研究は何をどこまで明らかにできたのか (できなかったのか)。
- ・何をもちて研究成果 (経過) を達成できた (できなかった) と考えられるのか。  
自身が設定した研究目的・目標に照らして、その根拠がわかるよう記載のこと。
- ・どのような点において、当該研究分野の学術研究推進の高度化に寄与できたのか。

本研究は、2年間で以下の「メラトニンから AMK の合成経路の解明」と「長期間の高脂肪食摂取 (脂質及び糖代謝異常) によるマウスの記憶力低下に対する AMK の関与」に焦点を当てて行う。本年度の研究経過と成果を下記に記す。

**A) AMK の合成経路の解明**

メラトニンを AFMK・AMK に変換する酵素を明らかにするため下記の実験を行う。現在までに、類似の反応を触媒することから、変換酵素の候補として細胞質に局在する Indoleamine 2,3-dioxygenase 1 (IDO1), Indoleamine 2,3-dioxygenase 2 (IDO2), Tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO), Myeloperoxidase (MPO) が考えられるので、これらについて検討する。また、合わせて学習後のシナプス形成時にミトコンドリアの酸素消費量が有意に増加すること、その時同時に ROS (Reactive Oxygen Species) が産生されることが報告されているので、ミトコンドリアで発生する ROS が変換酵素の肩代わりをしているかどうかを明らかにする (なお、AFMK は不安定な物質であり、容易に AMK に変換される)。下記にはこの1年間で行った主な実験内容を記す。

**1 ヒト培養細胞での発現系を用いた検討**

IDO1 と TDO についてその配列をもとにプライマーをデザインし、複数のヒト細胞由来 cDNA を用いて Nested PCR を行うことにより cDNA を取得した。それぞれについて得られた cDNA 断片を、pEGFP-C1 にクローニングした。塩基配列を決定したところ、TDO の cDNA 断片にはまだイントロンが1箇所残っていることが明らかになったので、Inverse PCR によりイントロンを除去した。次に、作製された発現プラスミド pEGFP-C1-IDO1 と pEGFP-C1-TDO を、ヒト培養細胞に導入して、GFP 融合タンパク質の発現の確認を行った。蛍光顕微鏡観察の結果、いずれの融合タンパク質を発現させた場合も細胞質に GFP の蛍光が観察された。以上より、ヒト培養細胞における、GFP-IDO1 と GFP-TDO の発現系の構築に成功した。

これらを用いて、メラトニンを AFMK・AMK に変換する酵素活性の検出を試みた。pEGFP-C1-IDO1 と pEGFP-C1-TDO を、ヒト培養細胞に導入して、GFP 融合タンパク質を発現させ、培地に  $10^{-6}$  M になるようにメラトニンを加えて培養し、2時間と24時間で回収し、培地と細胞に分けた。回収された細胞は、ソニケーターを用いて破碎した後、アセトンによる抽出操作を行い、生成された AFMK および AMK の量を LC-MS によって定量し比較した。その結果、pEGFP-C1-IDO1 と pEGFP-C1-TDO の両方において細胞からメラトニンと AFMK が検出された。このことからメラトニンが細胞内に取り込まれ、AFMK に変換された可能性が考えられる。しかし、AFMK の量に差は見られず、AMK も検出できなかったため、どちらの酵素活性が強いかが現段階では明らかにできなかった。今後、基質であるメラトニンの導入効率をあげた場合の比較や経時的な変化を調べる必要がある。

**2 酵母での発現系を用いた検討**

pEGFP-C1-IDO1 と pEGFP-C1-TDO を鋳型として PCR を行い、IDO1 と TDO の cDNA を増幅した。得られた DNA 断片を、pRS426-TEFpr-GFP および pRS316-TEFpr-GFP にクローニングした。得られたプラスミドを野生型出芽酵母 AN120 に導入し、融合タンパク質を発現させ、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、いずれも酵母の細胞質で GFP の蛍光が観察され、IDO1-GFP, TDO-GFP が酵母の細胞質に発現されていることがわかった。ただし、pRS426-TEFpr-TDO2-GFP を用いた場合、マルチコピーのため、アグリゲーション様の構造が観察されたため、次の実験には pRS316 系のベクターを用いた。

動物細胞と同様に培地にメラトニンを加えて培養し、3時間と6時間で回収し、培地と細胞に分けた。回収された細胞は、ソニケーターを用いて破碎した後、アセトンによる抽出操作を行い、生成する AFMK および AMK の量を LC-MS によって定量し比較した。その結果、IDO1-GFP, TDO-GFP, N 末 GFP のすべてにおいて細胞から MEL と AFMK が検出された。このことからメラトニンは細胞内に取り込まれ、AFMK に変換されていることが分かった。しかし、酵母においてもメラトニン導入効率が低く、この点が次年度の検討課題である。

**研究【経過・成果】の概要 (つづき)**

ネガティブコントロールである N 末 GFP でも AFMK が検出されたことから、酵母自体がもともとメラトニンを AFMK に変換する酵素をもつ可能性や、非特異的な酵素による変換が考えられる。しかし、添加 3 時間において AFMK の量は TDO-GFP で IDO1-GFP や N 末 GFP の 2 倍程度多く検出されたため、TDO にメラトニンを AFMK に変換する活性がある可能性が考えられる。AFMK の代謝産物である AMK については LCMS の検出限界以下のサンプルがほとんどであったため、次年度は細胞数や基質の濃度を調整するなり導入効率を上げて検討を行い、あわせて、残りの 2 つの酵素についても検討する予定である。

**3 ミトコンドリアで発生する ROS (Reactive Oxygen Species) が AMK への合成に関与するか検討**

学習後のシナプス形成時にミトコンドリアの酸素消費量が有意に増加すること、その時同時に ROS が産生されることが報告されている。また最近、記憶形成障害にミクログリアの関与が報告されているが、AMK 産生の ROS の発生源としてニューロン以外にミクログリアの関与も十分に考えられる。そこで、発生する ROS を消去するために誘導される細胞内のグルタチオンの合成を阻害することによって、ROS の発生を誘導した各細胞 (上記実験 1 の細胞に加えてミクログリア細胞株である MG 6 も追加) に、メラトニンを添加して培養し、AFMK・AMK を定量することで細胞内で産生される ROS による AMK 合成への関与を明らかにする。本年度は、この実験は行うことができなかったので次年度に行う予定である。

これらの実験により、いずれの酵素かあるいはミトコンドリアで発生する ROS が、メラトニンの AFMK・AMK への変換に関わるのかを明らかにする。

**B) 高脂肪食の長期間摂取による記憶力低下とその原因としての AMK の可能性**

メラトニンはヒトにおいて加齢と共に分泌量が低下することが広く知られており (Bubenik GA and Kontureket SJ, *J Physiol Pharmacol*, 2011), 特にアルツハイマー型認知症では、同年齢の高齢者よりも有意に低下していることが報告されている (Wu YH *et al.*, *Clin Endocrinol Metab*, 2003). ヒトにおいても内因性の AMK が加齢により低下し、認知機能へ影響を与えていると予想されるものの、その関連に関する報告は未だ皆無である。我々は、マウスにおいて加齢性記憶障害の原因の一つとして、海馬における AMK の激減にあることを明らかにした (*J Pineal Res*, 2024). しかし、生活習慣悪化による記憶力低下 (障害) に関しても AMK の低下が関係しているかどうかは分かっていない。そこで、本研究では認知症のリスクファクターでもある高脂肪食の長期にわたる摂取が、糖代謝や脂質代謝異常を引き起こし、その結果生じる記憶形成障害マウスを作成し、同様に海馬における AMK 減少が原因かどうか、またその時に研究テーマ A) で明らかにした AMK 合成酵素も低下しているかどうかを調べる。さらに、記憶力が低下した高脂肪食摂取マウスに AMK を単回あるいは連続投与することにより、記憶力が改善するかどうかを調べる。合わせて、記憶形成に関連したどのタンパク質やどの遺伝子の発現を AMK の投与が上昇させるか調べる。

この実験を新たにできた本学部の動物実験室にて成功裏に行うために、まず通常 (正常) マウスを用いて、記憶力試験 (物体認識試験) が成立する条件を探った。物体認識試験に用いた物体は、全部で 11 種類である。すなわち、黒薬瓶、バイアル (A)、バイアル (B)、白陶器、赤コップ、デカブロック角、デカブロック丸、レゴ十字、レゴ四角、ヒヨコ、白ギザ容器であり、それらを 2 物体ずつ組み合わせて、嗜好性に差が無い物体の組み合わせを探し出した。次いで、新奇性を好むマウスの性質を利用した物体認識試験に使える物体の組み合わせを検討した。その結果、物体によっては記憶できないものがあること、2 つの物体間で差が出ない組み合わせなど、条件設定に時間を取られた。そのため、高脂肪食マウスを使った実験は、残念ながら本年度は実施できなかった。

**研究発表** (研究によって得られた研究経過・成果を発表した①~④について、該当するものを記入してください。該当するものが多い場合は主要なものを抜粋してください。)

- ①雑誌論文 (著者名、論文標題、雑誌名、巻号、発行年、ページ)
- ②図書 (著者名、出版社、書名、発行年、総ページ数)
- ③シンポジウム・公開講演会等の開催 (会名、開催日、開催場所)
- ④その他 (学会発表、研究報告書の印刷等)

### ① 雑誌論文

- ・ Suzuki, N., Kakikawa, M., Oda, Y., Kobayashi-Sun, J., Yamada, S., Kuroda, K., Kobayashi, I., Honda, M., Matsubara, H., Tabuchi, Y., Shimizu, N., Watanabe, K., Hirayama, J., Hattori, A. "Bone regeneration-enhancing effects of extremely low-frequency electromagnetic fields: Analysis using fish scales as a bone model.", *Biomedical Research*, vol.45, no.5, 2024 Oct, pp.187-195.
- ・ Suda, Y., Tachikawa, H., Suda, T., Kurokawa, K., Nakano, A., Irie, K. "Remodeling of the secretory pathway is coordinated with *de novo* membrane formation in budding yeast gametogenesis.", *iScience*, Vol. 27, no.10, 2024 Oct, 110855.
- ・ Watanabe, K., Hattori, A. "Aging-induced memory loss due to decreased N1-acetyl-5-methoxykynuramine, a melatonin metabolite, in the hippocampus: a potential prophylactic agent for dementia.", *Neural Regeneration Research*, vol.20, no.6, Epub 2024 Jul, pp.1705-1706.
- ・ Watanabe, K., Maruyama, Y., Mikami, R., Komatsu, K., Kikuchi, K., Hotta, K., Yoshikawa, T., Ogasawara, K., Hattori, A., Arakawa, S. "Highly purified hypochlorous acid water facilitates glucose metabolism and memory formation in type 2 diabetic mice associated with altered-gut microbiota.", *Scientific Reports*, vol.14, no.1, 2024 Jul, Article number:16107.
- ・ Nakagawa, K., Watanabe, K., Mizutani, K., Takeda, K., Takemura, S., Sakaniwa, E., Mikami, R., Kido, D., Saito, N., Kominato, H., Hattori, A., Iwata, T. "Genetic analysis of impaired healing responses after periodontal therapy in type 2 diabetes: Clinical and in vivo studies.", *Journal of Periodontal Research*, vol.59 no.4, 2024 Aug, pp.712-727.

### ③ シンポジウム・公開講演会等の開催

- ・ 服部 淳彦「メラトニンの新たな知見」第 22 回日本更年期と加齢のヘルスケア学会学術集会 & 第 11 回日本サプリメント学会学術集会 合同学会, 2024 年 10 月 27 日, オンライン開催 (招待講演) .

### ④ その他

- ・ 舘川宏之「出芽酵母前孢子膜の MCS 再編成を介した伸長の分子機構解明」, IFO Research Communications, No. 38, 2024, p.167.