

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

2025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) <u>2026年3月現在</u>	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		舘川 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) (下段：採択金額)	2024 年度		2025 年度		年度		総計	
	4,000,000	円	2,000,000	円	0,000,000	円	6,000,000	円
	4,000,000		2,000,000		0,000,000		6,000,000	

※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、老齢マウスにメラトニンの脳内代謝産物であるAMKを投与すると、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研究では、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た。倫理審査の承認が遅れたために現段階では、複数の物体を用いた物体認識試験の条件検討と高脂肪食を長期間摂取させる途中段階に留まっている。また、ヒト培養細胞および酵母にAMK変換酵素の候補遺伝子を導入して発現系を構築し、メラトニンの代謝経路の一端を再現できる段階にまで至っている。

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)。
- ・何をもって研究成果(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」に焦点を当てて行った。これまでの研究成果を下記に記す。

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った。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を行ってきている。

1年目は、主に IDO1 および TDO に着目し、ヒト培養細胞および酵母を用いた発現系の構築と機能解析を行った。具体的には、両遺伝子の cDNA を取得し、発現ベクターにクローニングした後、ヒト培養細胞および出芽酵母に導入して GFP 融合タンパク質として発現させた。蛍光顕微鏡観察により、いずれも細胞質に局在することを確認した。これらの発現系にメラトニンを添加し、細胞および培地中の代謝物を LC-MS で解析した結果、いずれの系においてもメラトニンの代謝産物である AFMK が検出され、メラトニンが細胞内に取り込まれ AFMK へ変換されることが示唆された。一方で、ネガティブコントロールでも AFMK が検出されたことから、内在性あるいは非特異的な反応の関与も考えられた。また、TDO 発現系においては AFMK 量が相対的に高い傾向が見られたものの、AMK はほとんど検出されず、基質導入効率や検出感度に課題が残された。

2年目は、残る候補酵素である IDO2 および MPO の検討を進めるとともに、IDO1 および TDO については大腸菌発現系を用いた解析へと展開した。

1 IDO2 と MPO についての検討

前年度は、IDO1 と TDO についての検討を行ったので、本年度は主に残りの2つである IDO2 と MPO について検討を試みた。IDO2 と MPO についてその配列をもとにプライマーをデザインし、3種類のヒト細胞由来 cDNA (ヒト結腸がん由来 HCT116 細胞の cDNA, ヒト胚腎由来 HEK293 細胞の cDNA, 網膜色素上皮由来 RPE 細胞の cDNA) を用いて Nested PCR を行った。さまざまな条件を検討して、最終的に2段階の PCR の後に、IDO2 のプライマーと RPE 細胞由来 cDNA および MPO のプライマーと HEK293 細胞の cDNA の組み合わせで、目的サイズの特異的バンドが検出された。得られた断片のクローニングを目指したが、残念ながら目的の cDNA 断片のクローニングには至らなかった。今後は、他の cDNA を用いることや、遺伝子の供与を受けることを検討する。それ以降の実験系は整備されているので、速やかに結果が得られると考えている。

2 IDO1 と TDO についての検討

前年度は、IDO1 と TDO について、動物細胞と酵母の発現系を用いて検討を行った。本年度は、大腸菌の発現系を用いた解析の準備を行った。最初のクローニングで、大腸菌のタンパク質発現誘導にも利用可能なベクターに IDO1 と TDO の遺伝子をクローニングしていた。これらを導入した大腸菌をそれぞれ培養し、タンパク質を SDS PAGE に供した。その結果、タグを付加したサイズのバンドが誘導されることが確認された。今後は、タグを用いて精製を行い、IDO1 および TDO のタンパク質が AFMK・AMK に変換する活性を持つかを検討する予定である。

研究【経過(成果)】の概要(つづき)

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間にわたる摂取が, 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 減少が原因であるかどうか, 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計画を立てた.

まず1年目はこの研究期間の途中で, 新たに施設が承認された本学部の動物実験室において, 学習記憶試験を成功裏に行うために, 通常(正常)マウスを用いて記憶力試験(物体認識試験)が成立する条件を整えた. 新たにできた動物室は温度管理に問題があり, その修繕を依頼するなどを行った結果, 使用できるレベルまでになった. 次に, 物体認識試験に用いることができる物体の組み合わせを調べた. 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, 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決定した.

2年目は実験目的である5ヶ月間高脂肪食を摂取させたマウスを作成し, この物体認識試験を用いて記憶力が低下していることを確認後, 合わせて AMK の投与実験を計画した. しかしながら倫理審査に時間が取られ, 承認されたのは10月10日(承認番号: LS25004A)であり, 報告書を提出する現段階では高脂肪食を4ヶ月間しか与えられておらず, 残念ながら記憶試験などは実施できていない. これまで得られている結果は, 4週齢のマウス(対照群: 20.82 g+1.06 g / 高脂肪食群: 20.84 g+1.13 g)に4ヶ月間高脂肪食(HFD32, 日本クレア株式会社, 粗脂肪分 32.0%; 総カロリーに占める脂肪由来カロリー比率, 約 60%)を与えると, 対照群が 28.25 g+1.97 g に対して, 高脂肪食群は 38.29 g+1.75 g まで増加し, 高脂肪食群の方が約 1.36 倍の体重まで増えていた. 採血を行い, 脂質関連物質や血糖関連物質を測定したところ, 総コレステロールは有意に増加していたが, トリグリセリドや遊離脂肪酸, グルコース濃度にはまだ変化が認められなかった. 今後, さらに高脂肪食を与え続け, 体重変化の測定および血液の生化学データの解析を行うとともに, 物体認識試験によって記憶力の低下を確認したうえで, 合わせて AMK の投与実験を予定している.

※この(様式2)に記入の【経過・成果】の公表を見合わせる必要がある場合は, その理由及び差控え期間等を記入した調書(A4縦型横書き1枚・自由様式)を添付すること。

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、論文タイトル、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

- ・ 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.
- ・ 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.
- ・ 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.

③ シンポジウム・公開講演会等の開催

- ・ 服部 淳彦「メラトニンとその関連物質の新たな知見」第 25 回日本抗加齢医学会総会, 2025 年 6 月 15 日 (シンポジウム) .
- ・ 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

- ・ Kazuki Watanabe, Atsuhiko Hattori, Kouetsu Ogasawara. A melatonin metabolite N1-acetyl-5-methoxykynuramine regulates memory-related factors on SH-SY5Y human neuroblastoma cells; the mechanisms on facilitating memory formation. 19th International Congress of Comparative Endocrinology 2025 年 7 月 9 日
- ・ 吉田成仁, 丸山雄介, 加藤晴康, 服部 淳彦「骨格筋内で産生されるメラトニン及びその関連物質の加齢変化とその役割に関して」第 25 回日本抗加齢医学会総会, 2025 年 6 月 13 日 (大阪) .
- ・ 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.