

学 位 論 文 題 名

Elucidation of mechanism for abnormal catecholamine
synthesis in the cerebral cortex of the senescence
accelerated mouse P10

（老化促進モデルマウスP10系の大脳皮質におけるカテコールアミン
合成異常の機構解明）

学位論文内容の要旨

〔要 旨〕

The purpose of this study was to clarify the mechanism of abnormal catecholamine synthesis in the cerebral cortex of the senescence-accelerated mouse prone 10 (SAMP10), which shows brain atrophy and dysfunctions in learning and memory with advancing age. The present study comprised male SAMP10 and the control mice (SAMR1) at 3 months and 12 months of age.

Firstly, we determined the protein levels of tyrosine hydroxylase (TH) as well as TH phosphorylated at Ser19 or Ser40 and cAMP-dependent protein kinase (PKA) and calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) by Western blot analysis. The level of TH phosphorylation at Ser40 in SAMP10 was significantly lower than that in SAMR1, but no significant difference was observed in the levels of TH, TH phosphorylated at Ser19 at 12 months of age. The amount of PKA, which regulates the phosphorylation of TH at Ser40, was significantly lower in SAMP10 than in SAMR1. These results suggest that impairments of catecholamine synthesis are considered to be caused by downregulation of TH phosphorylation at Ser40 as a result of PKA deficiency.

Next, we focused on iron (Fe) concentration and Fe metabolic pathway, because Fe^{2+} is an essential factor for TH activity. Fe concentration was determined using an inductively coupled plasma mass spectrometer. The protein levels of the ferritin, divalent metal transporter-1 (DMT1), hepcidin, transferrin, transferrin receptor and ferroportin were determined by Western blot analysis. The present study showed that Fe and ferritin levels in SAMP10 mice were significantly lower than that in SAMR1 at 12 months of age in the cerebral cortex. DMT1 and hepcidin levels, however, did not differ significantly between SAMP10 and SAMR1. Given that Fe is necessary for TH activity, and our results suggest that decreases in Fe and ferritin cause the decline of TH activity in the cerebral cortex of SAMP10.

Next, we determined concentrations of 6*R*-L-erythro-5,6,7,8-tetrahydrobiopterin (BH4) as a

cofactor in catecholamine synthesis, and enzymes in BH4 synthesis; guanosine triphosphate cyclohydrolase-1 (GCH), 6-pyruvoyltetrahydropterin synthase (PTPS) and sepiapterin reductase (SPR) or Dihydrofolate reductase (DHFR) in the cerebral cortex. The concentrations of BH4 were measured by HPLC, and the protein levels of enzymes in BH4 synthesis were measured by Western blot analysis.

BH4 concentration in SAMP10 showed significantly higher value as compared with SAMR1 at 12 months of age. And, the protein level of SPR in SAMP10 was significantly higher than in SAMR1 at 12 months of age. In contrast to SPR, the protein level of DHFR in SAMP10 was significantly lower than in SAMR1 at 12 months of age. The similar results of protein level of SPR and DHFR were observed at 3 months of age. These results suggest that abnormal BH4 metabolism occurs in the cerebral cortex of SAMP10 in which activity of DHFR in converting BH2 to BH4 is very low and thus the low level of BH4 may cause an increase in BH4 synthesis through the *de novo* pathway.

Firstly, the present study indicates that TH activation may be inhibited by decline of Ser40 phosphorylation by PKA deficiency in the cerebral cortex of SAMP10. Although the mechanism for PKA deficiency is unclear, a decrease in the level of TH phosphorylated at Ser40 may inhibit not only the activation of TH due to an increase in affinity of TH for BH4, but also substantial re-activation of TH due to the reduction of Fe^{3+} to Fe^{2+} by BH4.

Secondly, TH activity may be inhibited by the decline of Fe concentration and the lower level of ferritin in the cerebral cortex of SAMP10 as compared with SAMR1. As Fe^{2+} is an essential cofactor for TH activity, deficiency of Fe^{2+} and Fe storage protein may induce serious reduction of TH activity.

Thirdly, the present study showed that increases in concentration of BH4 and the levels of enzymes in the *de novo* synthesis of BH4 and a decrease in the level of enzyme in the salvage pathway were observed in the cerebral cortex in SAMP10 as compared with SAMR1. It is well known that TH activity is inhibited by the ability of all of the catecholamines to compete with BH4 for binding of Fe^{3+} at the catalytic site of enzymes thus inhibiting cofactor interaction. Changes of BH4 metabolism in SAMP10 may alter regulatory processes of TH activation and interaction with other factors. In addition, the higher protein level of SPR and the lower protein level of DHFR were observed in the cerebral cortex of SAMP10 from young age as compared with SAMR1. These results indicate a possibility that abnormal regulation of synthetic enzymes of BH4 may be related to the features of SAMP10 mice including age-dependent, inherited cerebral atrophy with cognitive dysfunction.

The present study demonstrated that the abnormal catecholamine synthesis observed in the cerebral cortex of SAMP10 was closely related to the decline of TH activity caused by impairments of TH activation processes.

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 千 葉 仁 志
副 査 教 授 齋 藤 健
副 査 教 授 田 中 俊 逸

学 位 論 文 題 名

Elucidation of mechanism for abnormal catecholamine synthesis in the cerebral cortex of the senescence accelerated mouse P10

(老化促進モデルマウスP10系の大脳皮質におけるカテコールアミン
合成異常の機構解明)

近年の高齢社会において、老化予防に関する研究がさまざまな分野で行われている。生活習慣や栄養学の視点から老化の予防をめざす視点が多いが、中枢神経系における神経伝達物質の動態から脳の老化予防を検討する分野は、更なる研究が必要とされ発展が待たれている状況にある。

本論文は、加齢に伴い大脳前部の委縮、学習記憶機能の低下を示し、短命を特徴とする老化促進モデルマウス (SAMP10) を用いて、予防医学的観点から脳の老化機構について研究し、老化および老化関連疾患に伴うカテコールアミンの低下メカニズムを解明することを目的としている。特に、本研究では、カテコールアミン合成の律速酵素、Tyrosine hydroxylase (TH) に着目し、SAMP10 の大脳皮質中における TH 量の変動、活性化や再活性化、TH 調整因子の鉄や Tetrahydrobiopterin (BH4) に焦点を当てて研究を行っている。

TH の関連因子の動態を網羅的に解析していくことで、カテコールアミン合成の低下が TH 量の低下ではなく、TH 活性の低下が原因であることを突き止め、その機構として、Ser40 におけるリン酸化 TH が低下することを明らかにし、その低下には PKA 量の低下が密接に関与していることを明らかにした。さらに、PKA 量の低下が、TH の Ser40 におけるリン酸化を介した TH の直接的な活性化を抑制するだけでなく、TH の再活性化経路も抑制している可能性を示した。次に、TH 活性に必須の鉄量および鉄貯蔵蛋白フェリチンが、12 ヶ月齢の SAMP10 の大脳皮質で低下していることを明らかにし、TH 活性低下の一因として、脳への鉄供給不足があることを示した。以上本論文では、SAMP10 の大脳皮質中における TH の活性低下機構として3つの要因を見いだした。

一方、TH 活性に必須の BH4 量が 12 ヶ月齢の SAMP10 において増加していたことを明らかにし、その増加機構の一つとして、TH 活性の低下が招くカテコールアミン合成低下の代償として増加した可能性を示唆した。さらに、BH4 の合成酵素の詳細な検討から、若年期から de novo 経路の SPR 量が増加し、salvage 経路 DHFR 量が低下していることを明らかにし、BH4 の合成経路の異常が SAMP10 の先天的異常であり、この異常が、SAMP10 の特徴である学習記憶機能の低下や脳委縮に密接に関与している可能性を示唆した。

口頭試問では、主査である千葉からの実験方法や信頼できるデータに必要な再現性に関する質問に的確に答えた。また、発表用スライドの表現方法、記述方法に関する指摘内容は公開発表時には改善されていた。副査の田中教授からの鉄の測定方法や鉄代謝に関する質問に的確に答え、また副査の齋藤教授から指摘された新知見が伝わりやすい発表方法への改善について公開発表時には改善されており、今後の検討内容に関する質問にも的確に答えた。

これを要するに、著者は、脳の老化や老化関連疾患の原因であるカテコールアミンの低下の原

因は、TH の活性化と再活性の抑制機構と鉄の供給不足による TH 活性低下であるという新知見を得たものであり、これらの原因酵素や関連蛋白をターゲットとした研究による老化予防の新たな切り口を示し、近い将来、予防医学分野における新たな発展に貢献することが見込まれる。よって著者は、北海道大学博士（保健科学）の学位を授与される資格あるものと認める。