

論文 / 著書情報
Article / Book Information

題目(和文)	チロシン水酸化酵素のチオール基を介する活性制御機構の解析
Title(English)	Analysis of thiol group-mediated activity regulatory mechanism of tyrosine hydroxylase
著者(和文)	犬飼駿弥
Author(English)	Syunya Inukai
出典(和文)	学位:博士(理学), 学位授与機関:東京工業大学, 報告番号:甲第11719号, 授与年月日:2022年3月26日, 学位の種別:課程博士, 審査員:一瀬 宏,久堀 徹,林 宣宏,村上 聡,清尾 康志
Citation(English)	Degree:Doctor (Science), Conferring organization: Tokyo Institute of Technology, Report number:甲第11719号, Conferred date:2022/3/26, Degree Type:Course doctor, Examiner:,,,,
学位種別(和文)	博士論文
Type(English)	Doctoral Thesis

2021 年度 博士論文

チロシン水酸化酵素のチオール基を
介する活性制御機構の解析

東京工業大学 生命理工学院
生命理工学系 生命理工学コース

犬飼駿弥

指導教員 一瀬 宏 教授

目次

略語表.....	4
第 1 章 序論	6
1.1. ドパミン	6
1.2. チロシン水酸化酵素	8
1.3. 本研究の目的	11
第 2 章 ドパミンバイオセンサーの開発	12
2.1. 背景・目的	12
2.1.1. 細胞外 DA の動態	12
2.1.2. 細胞外 DA の測定方法	12
2.1.3. バイオセンサー	12
2.1.4. 目的	13
2.2. 方針	14
2.3. 方法	17
2.3.1. TH への変異導入	17
2.3.2. 発現	19
2.3.3. 粗精製	19
2.3.4. アフィニティー精製	20
2.3.5. OGM 反応	21
2.3.6. ゲル濾過精製	21
2.3.7. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)	22
2.3.8. ラベル率測定	24
2.3.9. 活性測定	24
2.3.10. 蛍光強度測定	28
2.4. 結果	32
2.4.1. TH 変異体タンパク質の蛍光ラベル率	32
2.4.2. TH 変異体タンパク質の活性測定	33
2.4.3. 蛍光強度測定	38

2.5. 考察	48
第3章 システイン残基を介するチロシン水酸化酵素の活性調節機構の解析.....	56
3.1. 背景	56
3.1.1. DA 酸化物.....	56
3.1.2. DA 酸化物と神経毒性	58
3.1.3. TH のシステイン残基への修飾.....	59
3.2. 目的	60
3.3. 方法	61
3.3.1. TH の調製.....	61
3.3.2. 活性測定	62
3.3.3. MALDI-TOF MS	63
3.3.4. 擬一次速度定数の算出	63
3.3.5. DA 酸化物の調製・分析.....	64
3.4. 結果	66
3.4.1. システイン残基への修飾剤の検討	66
3.4.2. 修飾されるシステイン残基の特定	67
3.4.3. システイン残基への修飾の確認.....	68
3.4.4. NEM の修飾による速度論的パラメータの変化	70
3.4.5. DA 結合がシステイン残基への修飾に与える影響	72
3.4.6. S40E 変異がシステイン残基への修飾に与える影響.....	75
3.4.7. 制御ドメイン欠失変異とシステイン残基への修飾.....	77
3.4.8. DA 酸化物の調製と分析.....	79
3.4.9. DA 酸化物が TH に与える影響	81
3.5. 考察	84
第4章 総括	91
参考文献.....	93
研究業績.....	97
謝辞	98

略語表

2-ME	2-mercaptoethanol
AADC	aromatic amino acid decarboxylase
AC	aminochrome
ALDH	aldehyde dehydrogenase
BH4	<i>6R-L-erythro</i> -5,6,7,8-tetrahydrobiopterin
CBB	coomassie brilliant blue
cpGFP	circularly permuted green fluorescent protein
DA	dopamine
DAQ	dopamine quinone
DAT	dopamine transporter
DHI	5,6-dihydroxyindole
DHIQ	5,6-Dihydroxyindole quinone
DL	desolvation line
DOPAC	3,4-dihydroxyphenylacetic acid
DOPAL	3,4-dihydroxyphenylacetaldehyde
DTNB	5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)
DTT	dithiothreitol
ECD	electrochemical detector
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
EOS	glutamate optical sensor
FSCV	fast scan cyclic voltammetry
Gpx4	glutathione peroxidase 4
GRAB _{DA}	GPCR-activation-based-DA
GSH	glutathione
GSNO	nitrosoglutathione
GSSG	oxidized glutathione
H ₂ O ₂	hydrogen peroxide
HPLC	high Performance Liquid Chromatography
IPTG	isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside

LAC	leukoaminochrome
LB	Luria-Bertani
LC	liquid chromatograph
L-DOPA	L-3,4-dihydroxyphenylalanine
MALDI	matrix assisted laser desorption/Ionization
MAO	monoamine oxidase
MS	mass spectrometer
NEM	N-ethylmaleimide
NMR	nuclear Magnetic Resonance
OD	optical density
OGM	oregon green maleimide
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PAH	phenylalanine hydroxylase
PCA	perchloric acid
PDB	protein data bank
ROS	reactive oxygen species
RPM	revolutions per minute
SAXS	small Angle X-ray Scattering
SB	sample buffer
SDS	sodium dodecyl sulfate
SOD2	superoxide dismutase 2
TH	tyrosine hydroxylase
TOF	time of flight
TPH	tryptophan hydroxylase
Tween 20	polyoxyethylene sorbitan monolaurate
VMAT2	vesicular monoamine transporter 2
WT	wild type
α -m-DOPA	3-(3,4-dihydroxyphenyl)-2-methyl-L-alanine

第1章 序論

1.1. ドパミン

ドパミン(DA)は神経伝達物質の一つであり、ドパミン作動性ニューロン(DAニューロン)で合成されている。DAは運動制御、報酬系、学習、記憶の制御に関係しており、DAニューロンの変性やDAの恒常性の破綻は複数の神経疾患と関係があることが報告されている¹。例えば、振戦、無動、筋固縮などの運動障害を伴うパーキンソン病では黒質-線条体経路のDAニューロンの変性を伴うDA欠乏状態が症状の主な原因であると考えられており、パーキンソン病の治療は補充療法としてのDA前駆体であるエルドパ(L-DOPA)の投与が行われている²。

DAの生合成はL-tyrosineの水酸化から始まる(Fig. 1)。チロシン水酸化酵素(TH)によってL-tyrosineからDAの前駆体であるL-DOPAが合成され、芳香族アミノ酸脱炭酸酵素(AADC)によってL-DOPAからDAが合成される。細胞質内で合成されたDAは速やかにモノアミントランスポーター(VMAT2)によってシナプス小胞に取り込まれる。シナプス小胞内はpH 5.6程であり、細胞質内よりも低いpHはDAをより安定に存在させることができる³。DAニューロンの活性化に伴いシナプス間隙へDAは放出され、DA受容体に認識されることでポストシナプス側へシグナル伝達が行われる。一方でシナプス間隙のDAの一部はドパミントランスポータ(DAT)によってプレシナプス側に再取り込みされる⁴。細胞内に取り込まれたDAはVMAT2によってシナプス小胞に取り込まれ、神経伝達物質として再利用される。もしくはミトコンドリア外膜上に存在するモノアミンオキシダーゼ(MAO)によりDOPALへと変換され、続いてアルデヒド脱水素酵素(ALDH)によってDOPACへと代謝されていく⁵。

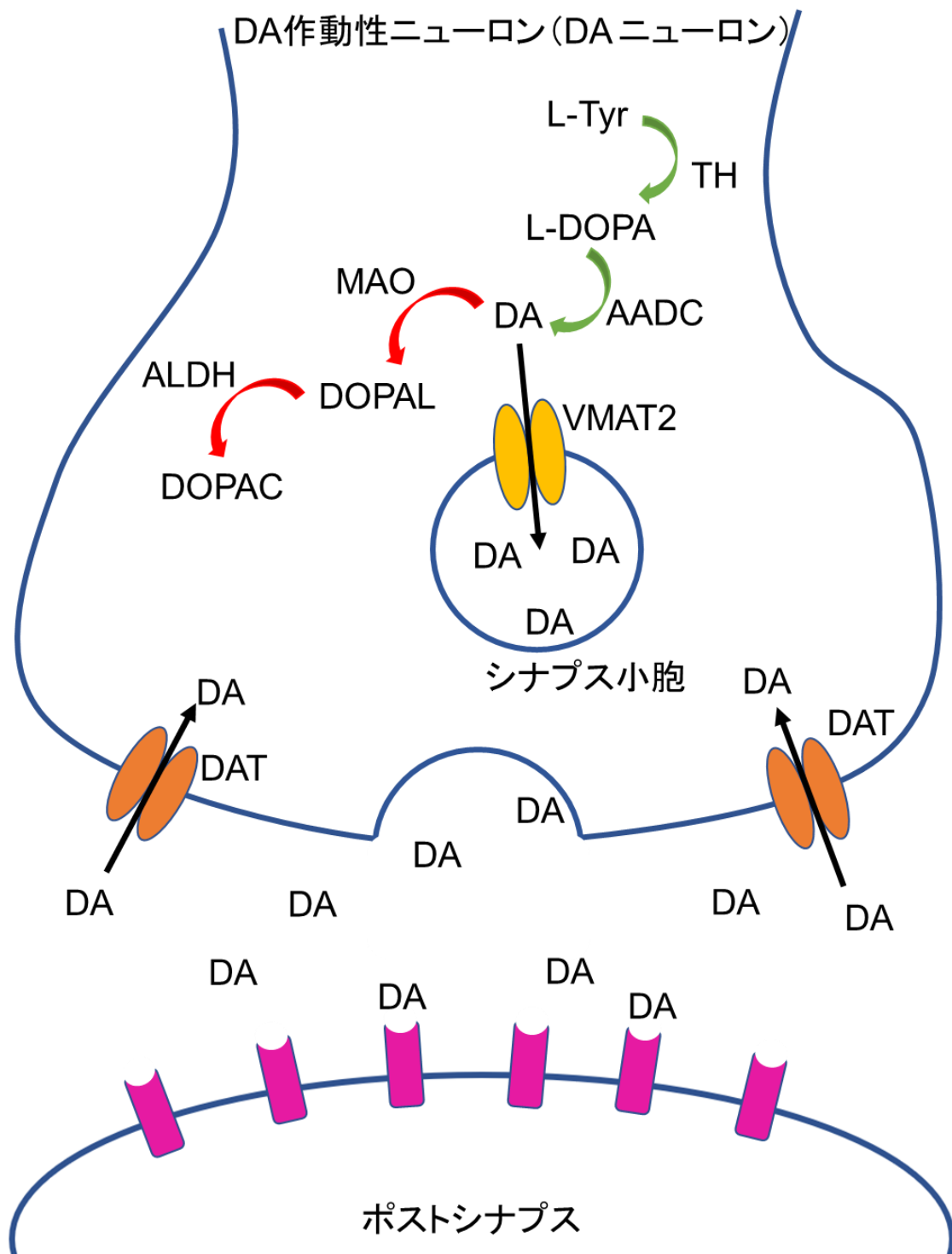


Fig. 1. 生体内でのドパミン (DA) の生合成と動態、代謝

DA の合成経路を緑色の矢印で示した。DA はシナプス小胞に取り込まれたのちに神経伝達物質としてシナプス間隙に放出される。DA ニューロンに再取り込みされた DA は赤色の矢印で示した経路で代謝されていく。

1.2. チロシン水酸化酵素

チロシン水酸化酵素 (TH) は DA 生合成経路の第一段階で働く酵素であり、テトラヒドロbiopterin (BH4) を補酵素として用いて L-tyrosine から L-DOPA を合成する⁶。この反応は DA 生合成経路の律速段階であることが報告されており、生体内の DA 量の調節には TH の活性が大きく影響を与えると考えられる⁷。生体内には TH の活性を制御する機構がいくつか存在しており、最も主要なものとして DA 合成経路の最終産物である DA の結合によるフィードバック阻害と制御ドメインに存在する Ser40 のリン酸化による DA 結合の抑制が知られている⁸ (Fig. 2)。DA は TH の触媒部位に存在する鉄に結合し、補酵素である BH4 と活性部位への結合を競合的に阻害する⁹。また、DA 結合は制御ドメインの一部が活性部位を覆いかぶさるような構造変化を引き起こし、DA の結合アフィニティーの増加と TH の熱力学的な安定性をもたらすことが知られている¹⁰⁻¹²。一方で、Ser40 のリン酸化は DA 結合によりもたらされる制御ドメインの構造変化を抑制し、結果として DA の解離定数の増大を介して DA 結合による活性阻害を抑制する¹³。

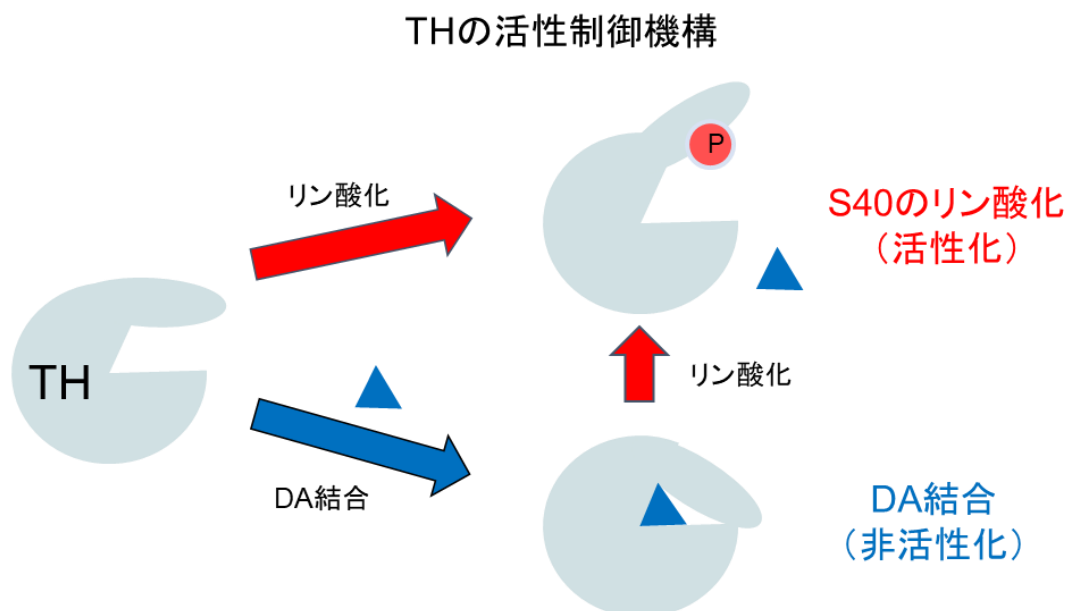


Fig. 2. TH の活性制御機構

TH は DA 生合成経路の最終産物の DA 結合により制御ドメインの構造変化を引き起こし、活性減少を引き起こす。制御ドメインに存在する 40 番目セリン残基のリン酸化は DA 結合を抑制し、結果として TH を活性化させる。

ヒトの TH には 4 つのアイソフォームがあることが知られている¹⁴。本研究では DA ニューロンに存在するアイソフォームであるヒトの TH アイソフォーム 1 を使用し、本稿に表記されるアミノ酸残基の番号はすべてこのアイソフォームでのアミノ酸残基の番号で表している。

TH の制御ドメインには Ser40 をはじめとした活性制御機構に重要と考えられている部位が複数存在している。しかし、現在報告されている TH の結晶構造 (PDB ID: 2XSN) は制御ドメインが欠失しており、完全長の TH の結晶構造は未だ解かれていない。そのため、TH の活性制御機構の全容は構造学的に理解することが困難となっている。TH はフェニルアラニン水酸化酵素 (PAH) やトリプトファン水酸化酵素 (TPH) を含む芳香族アミノ酸水酸化酵素ファミリーの一つである。PAH では完全長の結晶構造が解かれているため触媒反応や活性制御機構に対する構造学的な理解が進んでいる¹⁵。そのため、TH においても PAH の構造との比較や制御ドメインが欠失したヒト TH の X 線結晶構造、NMR による制御ドメインの構造解析、X 線小角散乱 (SAXS) による構造解析などにより構造予測が行われている^{16,17}。また、2022 年にはクライオ電子顕微鏡による制御ドメインの一部を含めたヒト TH の構造 (40-497 a.a.) が報告されている¹⁸。これらの結果によれば、TH は四量体を形成するタンパク質であり、サブユニットの構造は大きく分けて N 末端領域に存在する制御ドメイン (1-156 a.a.)、中央領域に存在する触媒ドメイン (156-472 a.a.)、C 末端領域に存在する四量体形成ドメイン (472-497 a.a.) の 3 つのドメインに分けることができる (Fig. 3)。制御ドメインはさらに天然変性領域 (1-40 a.a.)、アラニン残基リッチな α ヘリックス (制御ヘリックス) 領域 (40-60 a.a.)、ACT ドメイン (74-156 a.a.) に分けることができる。ACT ドメインは転写制御やアミノ酸代謝を行うタンパク質などで見られる 2 つの α ヘリックスと 4 つの β シートで構成される構造モチーフであり、タンパク質の構造形成やリガンド結合などに関わっていると考えられる¹⁹。ACT ドメインは PAH にも存在しており、活性制御機構や二量体化などの役割を担っていると考えられているが、TH における役割についてははっきりしていない²⁰。

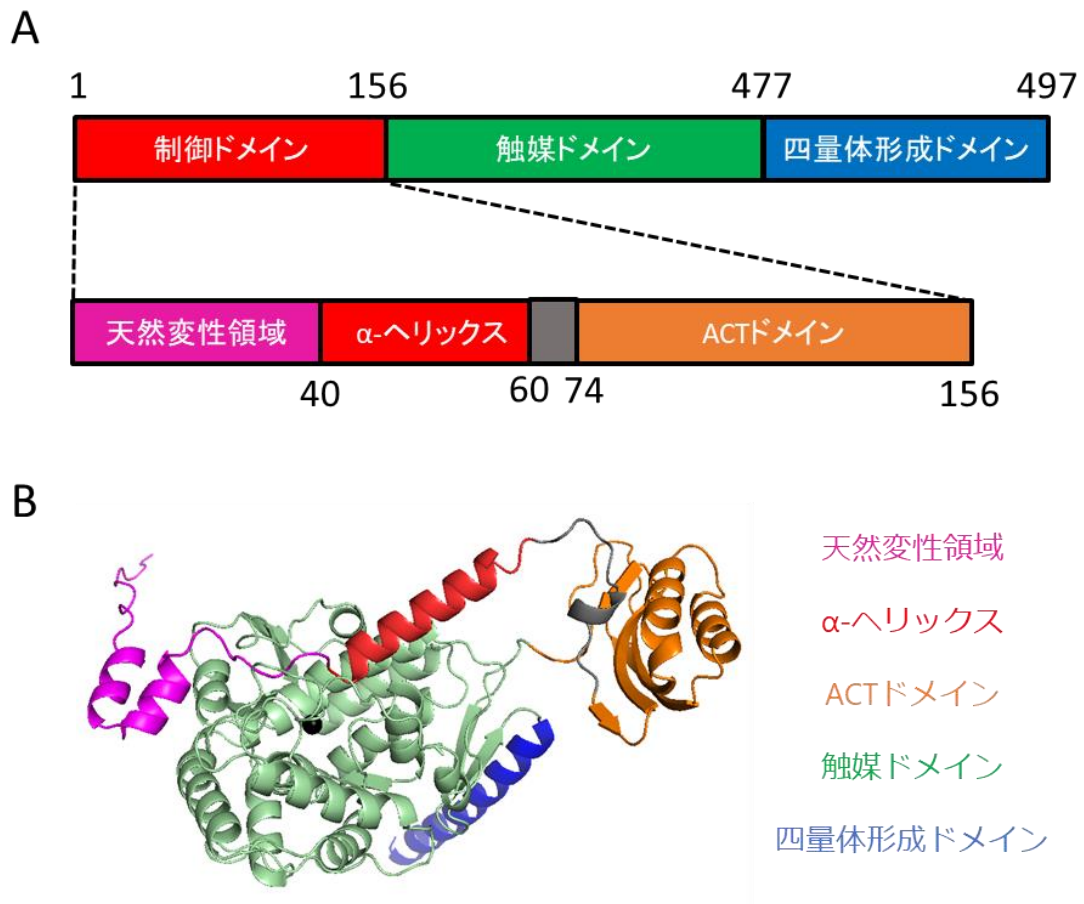


Fig. 3. TH の一次配列 (A) と三次構造 (B)

三次構造は AlphaFold 2 を用いて TH 一次配列から予測した構造を示した。

1.3. 本研究の目的

本稿では二つの TH および DA に関する研究（DA バイオセンサーの開発とシステイン残基を介するチロシン水酸化酵素の活性調節機構の解析）について記載した。第 2 章では細胞外の DA の検出ができる新しいツールとして時空間分解能が高いバイオセンサーを開発することを目的としている。そこで、TH の DA 結合により生じる構造変化を利用した DA バイオセンサーの開発を試みた。結果として、実用的な DA バイオセンサーは開発できなかったものの、その過程でシステイン残基への蛍光物質の修飾によって TH の活性が減少することを発見した。TH の翻訳後修飾による活性制御機構としては、DA 結合によるフィードバック阻害を抑制する Ser40 のリン酸化について研究されることが多い。一方で、システイン残基への修飾による活性制御機構に関する報告はあるものの、その分子メカニズムについては詳しく調べられていない。そこで、第 3 章ではシステイン残基への修飾による TH の活性制御の分子メカニズムについて明らかにすることを目的とした。

第2章 ドパミンバイオセンサーの開発

2.1. 背景・目的

2.1.1. 細胞外 DA の動態

DA はプレシナプスの活性化に伴いシナプス間隙に放出され、ポストシナプス側の受容体に認識されることによって神経伝達物質として作用する。DA により制御される脳機能は報酬シグナル、強化学習、注意、運動制御など多岐にわたる。また、細胞外に放出された DA はシナプス間隙内でのみ作用するわけではなく、むしろその多くはシナプス外に存在している DA 受容体に対してシグナル伝達をしている²¹。そのため、DA のシグナル伝達は DA 放出部位から離れた領域に対しても行われていると考えられている。このような細胞外 DA の動態と脳機能との関係はその重要性に反して詳しくわかっていない。

2.1.2. 細胞外 DA の測定方法

細胞外の DA 濃度を測定する手法として「マイクロダイアリス法」と「Fast Scan Cyclic Voltammetry (FSCV) 法」が主に知られている^{22,23}。マイクロダイアリス法は脳内にプローブを差し込み、メンブレンを通して回収したサンプルを HPLC などで分離、定量を行う。DA 特異的な検出ができる一方で、細胞外 DA の空間分布を調べることができず、時間分解能も低いためミリ秒単位で起こる生体内のシグナル変化を追うことができない問題点がある。FSCV は電極を測定したい箇所へ刺し、電極先端で生体内の各化合物の酸化還元電位と電流値から分析、定量を行う。時間分解能は高い一方で、生体内に存在する夾雑物が測定に影響を与えるため DA 特異的な検出が難しいという問題点がある。

2.1.3. バイオセンサー

近年、生体内の物質の定量やモニタリングにおいてバイオセンサーを用いた研究が報告されている。バイオセンサーとは酵素などの生体由来の材料を用いて作製された化学センサーの総称であり、物質特異性が高いことが特徴である。例えば、グルタミン酸受容体に蛍光物質であるオレゴングリーンマレイミド (OGM) を修飾させたグルタミン酸センサー (EOS) やカルモジュリンに cpGFP を導入したカルシウムイオンセンサー (G-Camp) などが存在する^{24,25}。

EOS はグルタミン酸受容体のグルタミン酸結合部位近傍にシステイン残基を導入し、そのシステイン残基に対して蛍光物質を修飾させることで作製されている。グルタミン酸が EOS に結合するときに生じるタンパク質の構造変化は蛍光物質の周囲の環境を変化させ、蛍光強度の変化を引き起こす。この蛍光強度の変化をグルタミン酸の存在量として定量することで EOS はグルタミン酸センサーとしての機能を持つ。また、EOS は G-Camp をはじめとしたバイオセンサーと異なり、細胞内で発現させて利用することはできない。そのため、ビオチン-ストレプトアビジンを介して細胞膜表面上に配置させることによって、細胞外のグルタミン酸濃度の測定を行う必要がある。

2.1.4. 目的

細胞外 DA の動態を詳しくモニタリングするためには物質特異性、空間、時間分解能を同時に満たす測定方法が求められている。そこで、私は TH の DA の結合に伴う構造変化に着目した。TH への DA 結合は制御ドメインが活性部位を覆うような構造変化を引き起こすと考えられており、DA を認識する機構とそれに伴う大きな構造変化が DA バイオセンサーとして利用できるのではないかと考えた。通常、TH は生体内において細胞質内に存在しており、細胞外膜上には存在していない。そのため、EOS のようにバイオセンサーとして調製されたものを細胞表面上に配置させることで、細胞外の DA を検出できるような DA バイオセンサーの開発を目指すことにした。

2.2. 方針

本研究では、EOS を参考に OGM を TH に標識する蛍光物質として使用し、DA 結合による構造変化によって蛍光強度が変化する変異体タンパク質を作製することを目指した²⁴。OGM はフルオロセイン骨格にマレイミド基が付加された構造である。マレイミドはチオール基に特異的に反応し、化学修飾によく使われており、TH の任意の部位にシステイン残基を変異導入することで、部位特異的な蛍光標識が可能となると考えた (Fig. 5)。

野生型 TH (WT) には 7 つのシステイン残基がある。このうち、176、248、379、402 番目のシステイン残基が TH タンパク質表面上に露出していることを TH の結晶構造 (PDB ID : 2XSN) から予測した (Fig. 4)。TH 表面上に存在するシステイン残基は任意の場所へ OGM を付加する際に非特異的な付加を引き起こすと考えられる。そのため、これらのシステイン残基を除去したのちに任意の部位にシステイン残基を導入することにした。

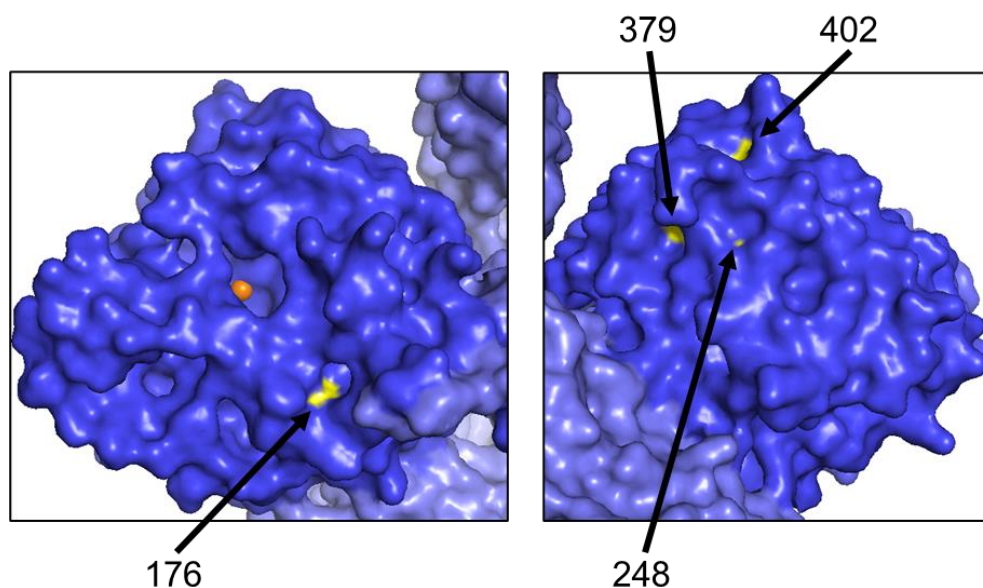


Fig. 4. TH 表面上に存在するシステイン残基

PyMOL を用いて TH の結晶構造 (PDB ID : 2XSN) の表面上に存在するシステイン残基を予測した。各システイン残基は黄色で表示した。

システイン残基導入部位として 59 番目アラニン残基 (Ala59)、176 番目システイン残基 (Cys176)、230 番目のアラニン (Ala230)、295 番目のシステイン残基 (Ser295)を選択した。Ala59 は制御ドメインの一つとして選択した。Cys176 は WT に存在しているシステイン残基の中で制御ドメインに最も近いシステイン残基であるため選択した。Ala230 は TH タンパク質表面上に存在している触媒ドメインの部位の一つとして選択した。Ser295 は重水素置換の研究において DA 結合に伴う制御ドメインの構造変化により重水素置換速度が減少した(すなわち制御ドメインが DA 結合により覆いに来る)触媒ドメインの領域の一つとして選択した¹⁰。

TH の 40 番目セリン残基からグルタミン酸残基への置換 (S40E) の変異は Ser40 のリン酸化を模倣し、Ser40 のリン酸化と同様の作用を示すことが知られている²⁶。つまり、TH への S40E の変異導入により DA の結合を抑制し制御ドメインの構造変化を起こさない TH 変異体タンパク質を作製できる。仮に作製したバイオセンサーが DA 結合により蛍光強度変化を生じるならば、DA 結合を抑制する S40E 変異によって蛍光強度変化が減少するはずである。作製したバイオセンサーが DA の結合によって蛍光強度変化を起こしているかどうかを確認するために S40E 変異を各 TH 変異体の発現プラスミドベクターに加えた。

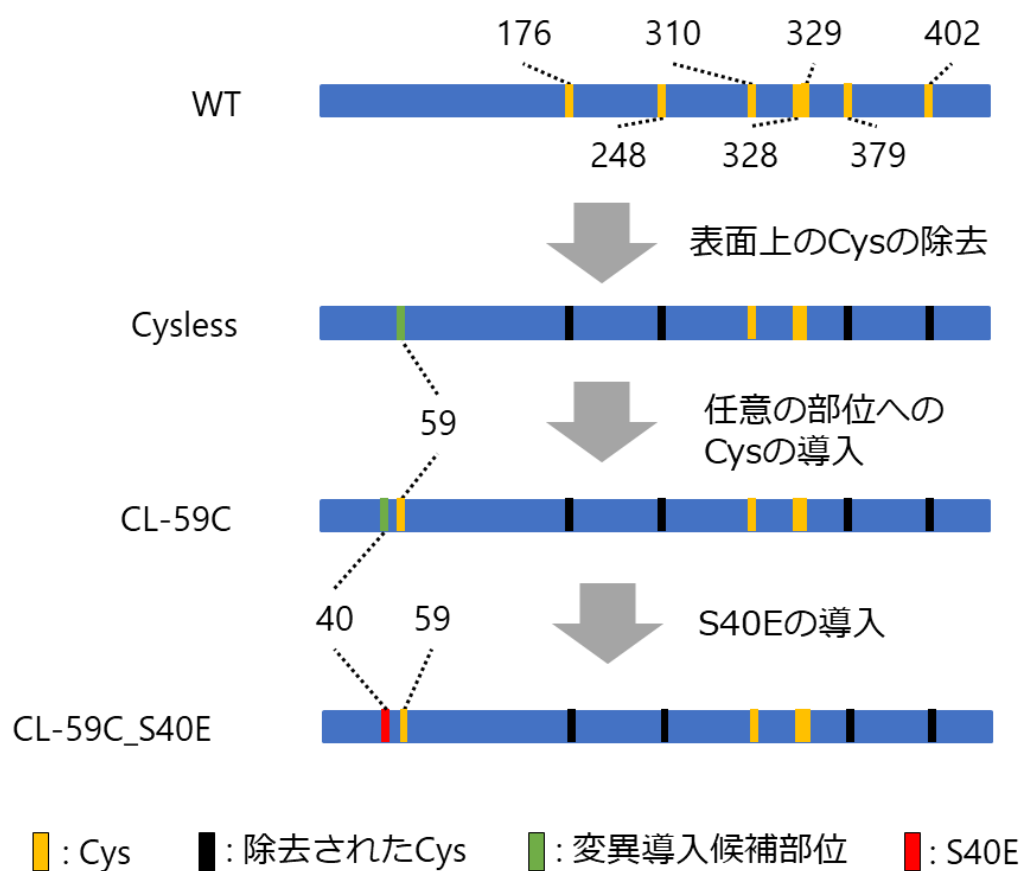


Fig. 5. 変異導入のイメージ

野生型（WT）の表面上に存在するシステイン残基 4 つを排除した変異体タンパク質（Cysless）の発現プラスミドベクターを作製した。さらに、Cysless に対して任意の部位にシステイン残基を導入し、任意の部位に蛍光物質が修飾される TH 変異体タンパク質の発現プラスミドベクターを作製した。最後に、各変異体に対して S40E 変異を加えた S40E 変異体の発現プラスミドベクターを作製した。

2.3. 方法

2.3.1. TH への変異導入

本研究では、pET3a に組み込まれた TH 遺伝子 (human TH アイソフォーム 1) を以下のプライマーで PCR を行い、Nde I と Hind III で PCR 産物を処理したのちに発現プラスミドベクター (pET23a) に組み込んだ (Table 1)。これを野生型 TH (WT) の発現プラスミドベクターとして使用した。

Table 1. WT-TH の発現プラスミドベクター作製用プライマー

Primer	Sequence (5' to 3')
T7 primer	TAATACGACTCACTATAGGG
hTH1_Hind III	CCCCAAGCTTCTAGCCAATGGCACTCAGCGCATGG

TH 表面上に存在するシステイン残基を除去するために、以下のプライマーを用いてシステイン残基をアラニン残基に置換した (Table 2)。この変異体タンパク質を Cysless と命名した。変異導入には TOYOBO の KOD-Plus-Mutagenesis Kit (a)、または TaKaRa の PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit (b)を用いた。

Table 2. Cysless への変異導入用のプライマー

Primer	Sequence (5' to 3')
hTH1_C176A_F ^a	CTGGTCACCAAGTTCGACCCTGAC
hTH1_C176A_R ^a	GTGATGAGCCTTGTCCAGCTCTGACAC
hTH1_C248A_F ^b	CACGCCGCCGGGAGCACCTGGAGGCC
hTH1_C248A_R ^b	CTCCCCGGCGGCGTGCGTGGCGTAGAG
hTH1_C379A_F ^b	GGGCTGGCTAAGCAGAACGGGGAGGTG
hTH1_C379A_R ^b	CTGCTTAGCCAGCCCGAACTCCACCGTG
hTH1_C402A_F ^b	CTGCACGCCCTGTCTGAGGAGCCTGAG
hTH1_C402A_R ^b	ACAGGGCGTGCAGGAGCTCCCCGTAGGAG

Cysless の任意の部位へのシステイン残基の変異導入を以下のプライマーを用いて行った。TH の蛍光標識部位は Ala59、Cys176、Ala230、Ser295 の 4 つの部位を選んだ。Cys176 は WT が本来持っているシステイン残基である。そのため、Cysless を作製する過程で Cys176 のみをアラニン残基に置換しないことで Cys176 のみが TH 表面上に残った変異体の発現プラスミドベクターを作製した。他 3 つの変異体の発現プラスミドベクターは、以下のプライマーを用いて変異導入を行った (Table 3)。変異導入には TOYOBO の KOD-Plus-Mutagenesis Kit を用いた。各変異体タンパク質を CL-A59C、CL-176C、CL-A230C、CL-S295C と命名した。

Table 3. システイン残基導入用のプライマー	
Primer	Sequence (5' to 3')
hTH1_S59C_F	CTGGTCACCAAGTTCGACCCTGAC
hTH1_A59C_R	GTGATGAGCCTTGTCCAGCTCTGACAC
hTH1_A230C_F	CACGCCGCCGGGGAGCACCTGGAGGCC
hTH1_A230C_R	CTCCCCGGCGGCGTGCGTGCGGTAGAG
hTH1_S295C_F	GGGCTGGCTAAGCAGAACGGGGAGGTG
hTH1_S295C_R	CTGCTTAGCCAGCCCGAACTCCACCGTG

WT、CL-A59C、CL-176C、CL-A230C、CL-S295C に対して以下のプライマーを用いて S40E の変異を導入した (Table 4)。変異導入には TaKaRa の PrimeSTAR Mutagenesis Basal Kit を用いた。各 S40E 変異体タンパク質を XX_S40E と命名した。

Table 4. S40E 変異導入用のプライマー	
Primer	Sequence (5' to 3')
hTH1_S40E_F	AGGCAGGAGCTCATCGAGGACGCCCCGC
hTH1_S40E_R	GATGAGCTCCTGCCTGCGCCCAATGAACC

2.3.2. 発現

大腸菌 BL21 (DE3)のコンピテントセルに WT 及び各変異体の発現プラスミドベクターを加え、形質転換を行った。形質転換処理をした大腸菌をアンピシリン添加培地に撒いて 37°Cで一晩インキュベートした。翌日生えてきたコロニーから一つを選択し、硫酸アンモニウム鉄(II)を加えた 5 mL の LB 培地（プレ培養液）に加えて 37°Cで 5 時間ほど振とう培養した（Table 5）。

Table 5. LB 培地の組成

10 mg/mL	トリプトン
5 mg/mL	酵母エキストラクト
5 mg/mL	NaCl
50 µg/mL	アンピシリン,
0.1 mM	硫酸アンモニウム鉄 (II)

大腸菌の増殖を目視で確認した後プレ培養液を 300 mL の LB 培地に加え、数時間 37°Cで培養した。分光光度計（JASCO V-550、1 cm セル）を用いて OD₆₀₀ を測定し、OD₆₀₀ が 0.5~1.0 に達したとき終濃度 0.1 mM の IPTG を加えた。IPTG 添加後 18°Cで 20 時間振とう培養を行い、4°C、8,000 rpm、3 分で遠心し、菌体を回収した。菌体回収後、TH タンパク質の精製を行うまで-25°Cで保存した。

2.3.3. 粗精製

菌体に懸濁用バッファーを 10 mL/g で加え懸濁し、4°Cでソニケーションを行い、大腸菌を破碎した（Table 6、Table 7）。

Table 6. 懸濁用バッファーの組成

20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
8%	スクロース

Table 7.	ソニケーション条件
超音波破碎機	BRANSON SONI FIRE 250
Out put	40
Duty cycle	20
time	15 分

破碎液を 4°C、15,000 rpm、10 分 で遠心を行い、上清を回収した。回収したサンプルに硫酸アンモニウム (0.113 g/mL) を加え、20%硫酸溶液とした。4°C で 1 時間攪拌した後、4°C、15,000 rpm、10 分 で遠心を行い、上清を回収した。上清に硫酸アンモニウム (0.121 g/mL) を加え、40%硫酸溶液とした。4°C で 1 時間攪拌した後、4°C、15,000 rpm、10 分 で遠心を行い、沈殿を回収した。沈殿を懸濁用バッファーで溶解させ、0.45 μ m フィルター (millex-HV, メルク) に通した。

2.3.4. アフィニティー精製

懸濁用バッファーで十分に平衡化させた HiTrap Heparin HP カラム (GE ヘルスケア) に粗精製サンプルを流速 1 mL/min でアプライした。Heparin カラムに洗浄バッファーを 30 mL 流したのち、溶出バッファーを 10 mL 流した (Table 8, Table 9)。溶出バッファーにより Heparin カラムから溶出した溶出液を 1 mL/fraction でフラクションを回収した。

Table 8.	洗浄バッファーの組成
20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
8%	スクロース
200 mM	KCl

Table 9.	溶出バッファーの組成
20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
8%	スクロース
400 mM	KCl

回収したフラクション 1 μ L にブラッドフォードプロテインアッセイキット (Bio-Rad) 20 μ L を加え、濃い青色を呈色したフラクションを TH が溶出したサンプルフラクションとして回収した。回収したサンプルを懸濁用バッファーで 2 倍に希釈し、ブラッドフォード法を用いてタンパク定量を行った。

タンパク質定量は 96 穴プレートを用いて行った。サンプルに対して 5 倍希釈したブラッドフォード溶液 (Bio-Rad) を 10 : 200 で加え、595 nm の吸光度を Bio-Rad の iMark を用いて測定した。既知濃度のウシ- γ -グロブリン溶液の希釈系列で検量線を引き、検量線をもとにサンプルのタンパク質濃度を算出した。

2.3.5. OGM 反応

得られたサンプルのタンパク質濃度をもとに希釈用バッファーを用いて、サンプルの TH タンパク質濃度を 50 μ M 以下に調製した (Table 10)。TH サブユニットの分子質量は 55.6 kDa として計算した。サンプルの TH タンパク質と等モルの OGM を加え、氷上 1 時間反応させた。終濃度 10 mM の DTT を加え、室温で 10 分間反応させて未反応の OGM を不活性化した。この OGM の付加反応は Cysless およびシステイン残基を導入した変異体タンパク質で行った。WT は OGM 付加反応を行ったものを行わなかったものを作製し、WT_S40E は OGM 付加反応を行わなかった。

Table 10. 希釈用バッファーの組成

20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
8%	スクロース
150 mM	KCl

2.3.6. ゲル濾過精製

四量体 TH タンパク質の精製および未反応の OGM を除去するためにゲル濾過精製を行った。アミコンウルトラ遠心式フィルターユニットウルトラセル-30 メンブレン装着を用いて、4°C、4000 g、10 分での遠心を複数回行い、サンプルを 500 μ L になるまで濃縮した。ゲル濾過用バッファーで十分に平衡化させた superose12 10/300 GL column (GE ヘルスケア) にサンプルを流速 0.2 mL/min でアプライした (Table 11)。フラクションの回収はサンプルのアプライから 50 ~ 100 分の間で 1 mL/fraction で回収した。

Table 11. ゲル濾過用バッファーの組成

20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
8%	スクロース
150 mM	KCl
1 mM	DTT

WT、Cysless、CL-176C の精製には Superose 6 10/300 GL (GE ヘルスケア) を使用した。フラクションの回収はサンプルのアプライから 35~75 分の間で 1 mL/fraction で回収した。

2.3.7. SDS-ポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

ゲル濾過精製により回収したフラクションを SDS-PAGE で分析し、TH タンパク質が存在するフラクションを特定した。まず、各フラクションサンプルに 4 × サンプルバッファー (SB) が 1 × SB になるように加え、95°C で 5 分間インキュベートしたものを 10% の濃縮ゲルにアプライした。10% の SDS-ポリアクリルアミドゲルおよび 1 × SB の組成は以下のとおりである (Table 12、Table 13、Table 14)。

Table 12. 分離ゲル (10%) の組成

9.7%	アクリルアミド
0.27%	Bis-アクリルアミド
0.38 M	Tris-HCl (pH 8.8)
0.08%	APS
0.1%	SDS
0.1%	TEMED

Table 13. 濃縮ゲルの組成

4.9%	アクリルアミド
0.13%	Bis-アクリルアミド
0.13 M	Tris-HCl (pH 6.8)
0.08%	APS
0.1%	SDS
0.1%	TEMED

Table 14. 1 × サンプルバッファの組成

60 mM	Tris-HCl (pH 6.8)
5 %	2-メルカプトエタノール (2-ME)
2 %	SDS
5 %	スクロース
50 mg/L	ブロモフェノールブルー

マーカーには Prestained XL-ladder broad (APRO SCIENCE) を使用し、300 V、30 mA、1 時間で電気泳動を行った。電気泳動後の分離ゲルを CBB 染色液に浸して染色したのち、水に浸して脱色を行った (Table 15)。

Table 15. CBB 染色液の組成

2.5 g/L	クマシーブリリアントブルー
50 %	エタノール
5 %	酢酸

電気泳動の結果より TH タンパク質があるフラクションサンプルを回収した。精製した TH タンパク質に終濃度 10% になるようにグリセロールを加え、いくつかのチューブに分画した。液体窒素で瞬間凍結し、実験を行うまで -80°C で保存した。

2.3.8. ラベル率測定

TH サブユニット一分子あたりの OGM の存在量を測定することで TH に修飾した蛍光物質の割合（ラベル率）を算出した。精製した TH タンパク質の濃度はブラッドフォード法によるタンパク定量で測定した。OGM の濃度は分光光度計をもちいて OGM の吸光波長（491 nm）の吸光度を測定し、OGM のモル吸光係数（81000 /cm/M）を用いて算出した。測定は 2 回行い、ラベル率は OGM 濃度を TH 濃度で割ることで算出した。

2.3.9. 活性測定

TH の活性は L-tyrosine と BH₄ を TH と反応させたのち、反応溶液中の L-DOPA の量を測定することによって求めた。まず、各変異体タンパク質を希釈用バッファーで適当に希釈したのち、ブラッドフォード法によるタンパク質定量を行った。得られた TH タンパク質濃度をもとに希釈用バッファーを用いて、TH タンパク質濃度が 0.4 μ M になるように調製した。TH タンパク質 10 μ L に対して、反応溶液プレミックスを 170 μ L を加えた。反応溶液プレミックスの組成は以下のとおりである（Table 16）。

Table 16. TH 活性測定反応溶液プレミックスの組成

0.1 M	リン酸カリウムバッファー (pH 7.4)
0.1 M	2-メルカプトエタノール (2-ME)
0.2 mg/mL	カタラーゼ

さらに TH 活性の基質である 1 mM の L-tyrosine を 10 μ L（終濃度：50 μ M）加え、よく混ぜたのちに TH 活性の補酵素である 20 mM の BH₄ を各サンプルに 10 μ L（終濃度：1 mM）ずつ加え、これを反応溶液とした。TH の活性測定では TH タンパク質を加えたサンプルのほかに、定量を行うために既知の量の L-DOPA を反応溶液に加えたサンプル（Standard）として TH、L-tyrosine の代わりに 200 pmol の L-DOPA を加えたサンプルを調製した。また、活性測定中の非酵素的反応により生じる L-DOPA の量を測定するためのサンプル (Blank) として TH の代わりに希釈用バッファーを加えたサンプルを用意した。

各サンプルへ BH₄ を加えたタイミングを酵素反応の開始とし、37°Cで 10 分間インキュベートを行った。反応終了後、氷上で Stop solution を 250 μ L を加え、10 分間氷上で静置した。Stop solution には PCA が含まれており、反応溶液を酸性にすることで TH を含むタンパク質の変性を引き起こさせ反応を停止させた。また、Stop solution には内部標準物質として α -m-DOPA を加え、内部標準と L-DOPA の比から TH の活性を定量できるようにした。Stop solution の組成は以下のとおりである (Table 17)。

Table 17. Stop solution の組成

0.8 M	PCA
40 mM	EDTA
5.3 μ M	α -m-DOPA

0.2 M の Tris-HCl (pH 8.5) / 1% EDTA を 0.5 mL 加えてサンプル溶液の pH を中性に戻し、1 M の炭酸カリウムを 150 μ L を加えて PCA の除去を行った。ボルテックスを行いよく混ぜたのち、15000 rpm、5 分で遠心を行い、上清を 10 mg のアルミナに加えた。よく混ぜたのちに 15000 rpm、5 分で遠心し、上清を捨てアルミナを回収した。0.02 M の Tris-HCl (pH 8.5) を 0.5 mL 加え、よく混ぜたのちに遠心し上清を捨てた。MilliQ 水を 0.5 mL 加え、よく混ぜたのちに遠心し上清を捨てた。最後に 0.5 M の HCl を 0.2 mL 加えアルミナに吸着したカテコールアミンを溶出させたのち遠心を行い、溶出液を回収した。溶出液をサンプルバイアルに分注したのち、オートサンプラー (大阪ソーダ) にセットし、高圧液体クロマトグラフィー (HPLC) による分析を行った。HPLC では C18 逆相カラムを用いて分離し、検出には電気化学検出器 (ECD) を用いた。HPLC による分析条件は以下のとおりである (Table 18、Table 19)。

Table 18. HPLC の測定条件

カラム	逆相カラム,NUCLEOSIL 100-7C18 (GL Sciences Inc.) ϕ 4.0 mm × 250 mm
ポンプ	PU-980 (日本分光)
流速	1.0 mL/min
検出器	電気化学検出器,ECD700 (エイコム)
検出電圧	550 mV

Table 19. 移動相の組成

0.1 M	リン酸ナトリウムバッファー (pH 3.4)
8 μ M	EDTA
1%	メタノール

各サンプルの L-DOPA および α -m-DOPA のエリア面積はクロマトグラムデータ解析ソフトである CDS-Lite を用いて算出した。解析結果は以下のような結果となって表れる (Fig. 6)。

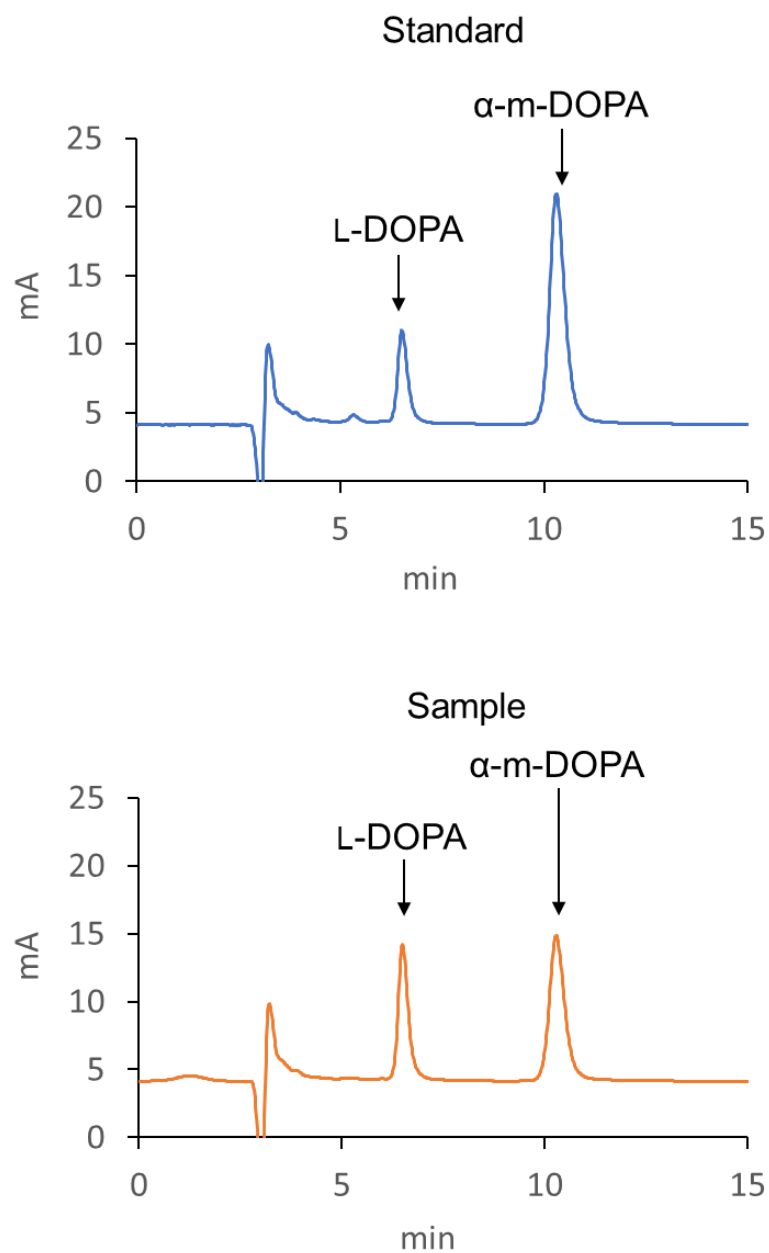


Fig. 6. 活性測定により得られるクロマトグラムの場合

Standard の結果と TH による活性を測定したサンプル (Sample) の結果をそれぞれ表した。縦軸は電気化学検出器 (ECD) による検出値を、横軸はクロマトグラムの時間 (分) で表した。L-DOPA は 6.5 分に α -m-DOPA は 10.3 分にそれぞれピークを示した。

サンプル中の L-DOPA (Sample (L)) の量は以下の式を用いて算出した。

$$\text{Sample (L)} = 200 \times \frac{\frac{\text{Sample (L) area}}{\text{Sample } (\alpha) \text{ area}}}{\frac{\text{Standard (L) area}}{\text{Standard } (\alpha) \text{ area}}}$$

L : L-DOPA, α : α -m-DOPA

この式により、サンプル中の L-DOPA の量を Standard の L-DOPA の量 (200 pmol) を基準として、サンプルおよび Standard の L-DOPA/ α -m-DOPA のエリア面積の比で求めた。さらに、Blank で検出された非酵素的反応により生じた L-DOPA の量を差し引くことで、各サンプルの TH の活性により合成された L-DOPA の量を算出した。さらに、得られた L-DOPA の量 (nmol)、反応溶液中のタンパク量 (mg)、反応時間 (min) から TH の比活性 (nmol/min/mg) を算出した。

2.3.10. 蛍光強度測定

蛍光標識された TH タンパク質を蛍光強度測定用希釈用バッファーで 0.02 μ M となるように希釈した。OGM 溶液は蛍光強度測定用希釈用バッファーで 6 nM となるように希釈した。希釈用バッファーは以下のものを使用した (Table 20)。

Table 20. 蛍光強度測定用希釈用バッファーの組成

20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
8%	スクロース
150 mM	KCl
1 mM	DTT
0.01%	Tween 20

サンプルは測定まで氷上で保存し、蛍光強度測定の直前に 37°C で 5 分間インキュベートを行った。蛍光分光光度計 RF-6000 (島津) を用いて、蛍光標識された TH の蛍光強度変化を測定した。測定条件は以下のとおりである (Table 21)。

Table 21. 蛍光強度測定条件

測定方法	タイムコース測定
励起光波長	493 nm
検出蛍光波長	525 nm
セル	1 cm×1 cm×4 cm
時間	5 分
データ点数	600 plots
データ間隔	0.5 秒/plot
温度	37°C

TH 溶液を 3.6 mL 分注し、攪拌子をセットした。測定開始 1 分後に DA 溶液を 20 μ L 添加し、1 mL のマイクロピペットを用いて 3 回ピペッティングを行った。その後は、測定終了まで攪拌子により攪拌を行った。

測定結果は二つのデータで表した。一つは各 TH 変異体タンパク質の蛍光強度変化率のタイムコースである。時間 t 秒の時の蛍光強度を F_t と表したとき、DA 添加前の蛍光強度の値 F_0 を $F_0 \sim F_{60}$ の平均値とした。この時、蛍光強度変化率 ($\Delta F_t/F_0$) を $(F_t - F_0)/F_0$ として算出した。x 軸に時間 t を y 軸に $\Delta F_t/F_0$ をとって蛍光強度測定のデータをプロットした。

もう一つは DA タイトレーションである。今回の実験では各 DA 濃度による最終的な蛍光強度変化率の差を比べた。各 DA 濃度による最終的な蛍光強度変化率 ($\Delta F/F_0$) を 540 秒から 600 秒までの $\Delta F_t/F_0$ の平均値とした。x 軸に DA 濃度を y 軸に $\Delta F/F_0$ をとって蛍光強度測定のデータをプロットした。また、データ解析ソフトである KaleidaGraph 4.1™を用いて DA タイトレーションのプロットにフィッティングを行い、各 TH 変異体タンパク質の DA の解離定数(K_d)と最大蛍光強度変化率 ($\Delta F_{\max}/F_0$)を求めた。フィッティングには以下の式を使用した。

$$\Delta F/F_0 = (F_{\max}/F_0) \frac{(\alpha + x + K_d) - \sqrt{\alpha^2 + x^2 + K_d^2 + 2xK_d + 2K_d\alpha - 2\alpha x}}{2\alpha} \quad (1)$$

α : TH 濃度、 x : DA 濃度、 K_d : 解離定数

式 (1) の導出は以下のように行った。TH の初期濃度を α 、DA の初期濃度を x とする。また、TH と DA の結合が平衡に達した際の DA 結合型の TH の濃度を β とする。このとき、 $[\text{TH}] = \alpha - \beta$ 、 $[\text{DA}] = x - \beta$ となる。これを式(2)に代入し、 β についての 2 次方程式を、2 次方程式の解の公式から解いて、式(3)を得た。

$$K_d = \frac{[\text{TH}][\text{DA}]}{[\text{TH-DA}]} \quad (2)$$

$$\beta = \frac{(\alpha + x + K_d) \pm \sqrt{\alpha^2 + x^2 + K_d^2 + 2xK_d + 2K_d\alpha - 2\alpha x}}{2} \quad (3)$$

ここで $\alpha > \beta$ かつ $x > \beta$ であるため、 β の解には式 (4) の条件が存在する。

$$\beta < \frac{\alpha + x}{2} \quad (4)$$

よって β は以下の式 (5) で表せる。

$$\beta = \frac{(\alpha + x + K_d) - \sqrt{\alpha^2 + x^2 + K_d^2 + 2xK_d + 2K_d\alpha - 2\alpha x}}{2} \quad (5)$$

次に、DA 結合型の TH および DA 非結合型の TH によってもたらされる蛍光強度をそれぞれ M および m とすると、蛍光強度 (F) は以下の式 (6) で表される。

$$F = M\beta + m(\alpha - \beta) \quad (6)$$

DA との反応前の初期の蛍光強度を F_0 ($F_0 = m\alpha$) と置いたとき、蛍光強度変化率 ($\Delta F/F_0$) は以下の式 (7) で表せる。

$$\Delta F/F_0 = \frac{F - F_0}{F_0} = \frac{\beta}{\alpha} \frac{(M - m)}{m} \quad (7)$$

すべての TH が DA に結合したとき ($\alpha = \beta$) の蛍光強度を $F_{\max}$ と置いたとき、最大蛍光強度変化率 ($\Delta F_{\max}/F_0$) は以下の式 (8) で表せる。

$$\Delta F_{\max}/F_0 = \frac{(M - m)}{m} \quad (8)$$

式 (5) と式 (8) を式 (7) に代入することで、式 (1) を得た。

2.4. 結果

2.4.1. TH 変異体タンパク質の蛍光ラベル率

TH への蛍光物質の修飾が行われているか確認するために、精製された TH のタンパク質濃度と OGM の濃度からラベル率を算出した (Table 22)。測定は 2 回行い、結果は平均値のみ表記した。WT のラベル率が 31%なのに対して、Cysless のラベル率は 1.7%となった。このことから、TH タンパク質表面上のシステイン残基の除去により TH への OGM 付加反応を大きく減少できたことが分かった。Cysless にはシステイン残基が表面上に露出していないと考えた 310、328、329 番目のシステイン残基がある。この内部のシステイン残基への標識、もしくは OGM で標識された大腸菌由来の夾雑タンパク質や未反応の OGM が十分に精製できなかったため、Cysless でもわずかな OGM の吸収があったと考えられる。Cysless へ Cys 残基を導入した各変異体タンパク質のラベル率は低いもので CL-A59C の 17%、高いもので CL-176C_S40E の 33%となった。どの変異体タンパク質も Cysless と比べると十分に OGM が付加されていると考えられ、システイン残基導入部位への特異的な蛍光標識が行われていることを確認した。また、各変異体タンパク質と各変異体に S40E 変異を加えた変異体タンパク質との間でのラベル率の差は CL-176C で 9%となり、すべての変異体タンパク質の中で最も高くなった。

Table 22. 変異体タンパク質の OGM のラベル率

TH	ラベル率 (%)
WT	31
Cysless	1.7
CL-A59C	17
CL-A59C_S40E	18
CL-176C	24
CL-176C_S40E	33
CL-A230C	19
CL-A230C_S40E	20
CL-S295C	22
CL-S295C_S40E	19

ラベル率は OGM の吸光度測定によって求められた濃度を TH の濃度で割ることによって算出した。測定は 2 回行い、平均値で結果を表した。

2.4.2. TH 変異体タンパク質の活性測定

本研究では DA バイオセンサーの開発を目的に TH への変異導入を行った。DA バイオセンサーとして使用するためには TH の DA 結合能が維持している必要があり、TH への変異導入が TH の DA 結合に影響を及ぼしていないかを確認する必要がある。TH は DA 結合により活性阻害がおきるため、TH 変異体タンパク質を DA と反応させたのちに活性測定を行うことで、変異導入による DA 結合への影響を確かめることにした。DA との反応は各変異体タンパク質に対して 2 μ M DA とプレインキュベーションすることによって行った。活性測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。

WT の比活性は DA 無添加で 156 $\pm$ 28.7 nmol/min/mg、DA 添加で 15 $\pm$ 3.4 nmol/min/mg となり、DA 添加により TH の活性は減少した (Fig. 7)。対して S40E 変異体タンパク質の比活性は DA 無添加で 109 $\pm$ 23.4 nmol/min/mg、DA 添加で 88 $\pm$ 4.4 nmol/min/mg となり、DA 添加による TH の活性減少が抑制された (Fig. 7)。これらの結果から、DA 添加による TH の活性阻害は S40E の変異導入により抑制できていると判断した。

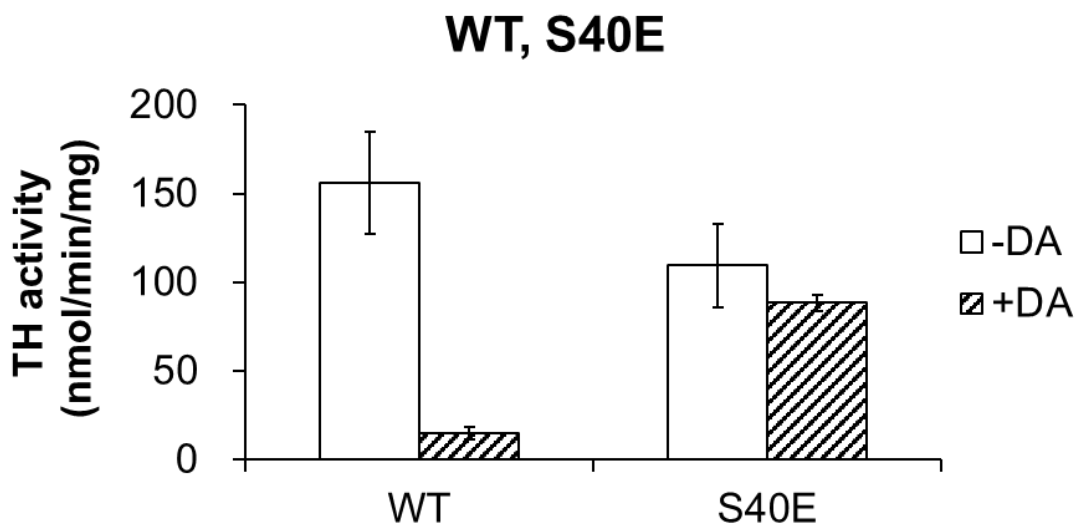


Fig. 7. WT、S40E の活性測定

TH を 2 μ M の DA を添加、無添加したのちに活性測定を行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。

Cysless の比活性は DA 無添加で 141 ± 5.1 nmol/min/mg となり、DA 添加で 20 ± 1.4 nmol/min/mg となった (Fig. 8)。この結果から、Cysless は DA 結合による活性阻害があることが確認された。

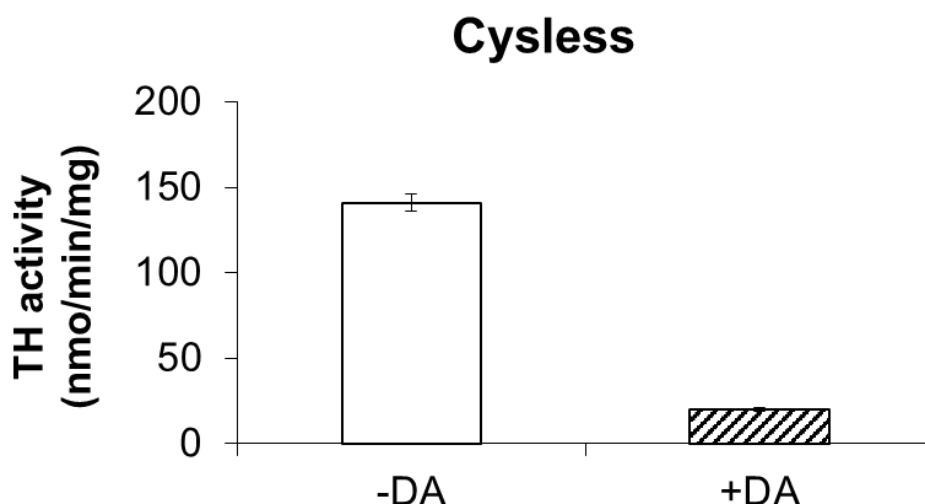


Fig. 8. Cysless の活性測定

TH を $2\mu\text{M}$ の DA を添加、無添加したのちに活性測定を行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。

CL-A59C の比活性は DA 無添加で 45 ± 2.7 nmol/min/mg となり、DA 添加で 10 ± 1.1 nmol/min/mg となった (Fig. 9)。CL-A59C_S40E の比活性は DA 無添加で 39 ± 2 nmol/min/mg となり、DA 添加で 33 ± 0.7 nmol/min/mg となった (Fig. 9)。

CL-A59C の比活性は WT の比活性の四分の一程度となり TH の活性減少が生じた。一方、DA の添加による TH の活性減少は S40E 変異の導入により抑制された。これらの結果から、CLA59C の変異導入や蛍光物質の修飾は TH の活性を減少させるが、DA 結合による活性阻害には大きく影響を与えていないと判断した。

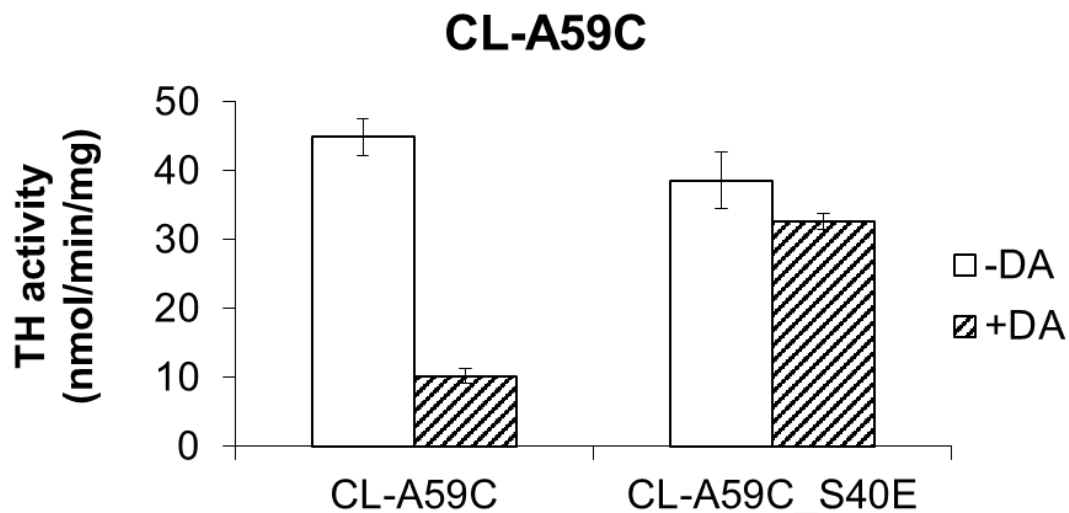


Fig. 9. CL-A59C の活性測定

TH を 2 μ M の DA を添加、無添加したのちに活性測定を行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。

CL-176C の比活性は DA 無添加で 37 ± 5.1 nmol/min/mg となり、DA 添加で 6.5 ± 1.9 nmol/min/mg となった (Fig. 10)。CL-176C_S40E の比活性は DA 無添加で 8.9 ± 0.46 nmol/min/mg となり、DA 添加で 7.2 ± 0.53 nmol/min/mg となった (Fig. 10)。

CL-176C の比活性は WT の比活性の四分の一程度となったが、DA 結合による活性阻害による比活性の減少が起きた。S40E 変異により比活性は CL-176C の比活性のさらに四分の一程度となり、DA 添加による TH の活性減少は抑制された。これらの結果から、CL-176C の変異導入は TH の比活性を減少させるが、DA 結合による活性阻害への影響は大きくないと判断した。また、S40E 変異体において CL-176C の変異導入や蛍光物質の修飾が TH の比活性を大きく減少させることが分かった。

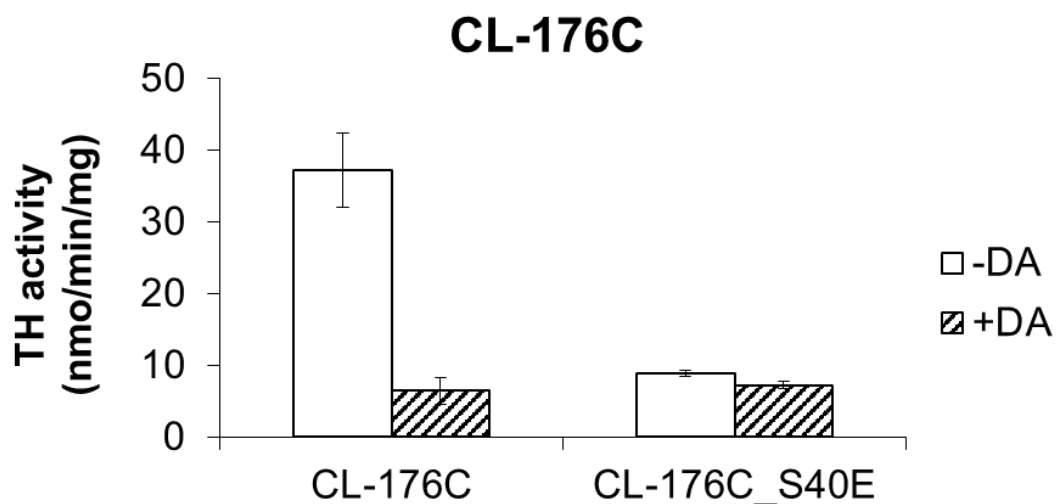


Fig. 10. CL-176C の活性測定

TH を 2 μ M の DA を添加、無添加したのちに活性測定を行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。

CL-A230C の比活性は DA 無添加で 123 ± 1.7 nmol/min/mg となり、DA 添加で 20 ± 2.9 nmol/min/mg となった (Fig. 11)。CL-A230C_S40E の比活性は DA 無添加で 260 ± 28 nmol/min/mg となり、DA 添加で 214 ± 22 nmol/min/mg となった (Fig. 11)。

CL-A230C の比活性は WT と比べて大きく減少せず、DA 結合による活性の減少が引き起こされた。S40E 変異により比活性は CL-A230C の二倍程度高くなり、DA 添加による活性の減少は抑制された。これらの結果から、CL-A230C の変異導入は TH の比活性と DA 結合による TH の活性阻害への影響は大きくないと判断した。また、S40E 変異体において CL-176C の変異導入や蛍光物質の修飾が TH の比活性を増加させることが分かった。

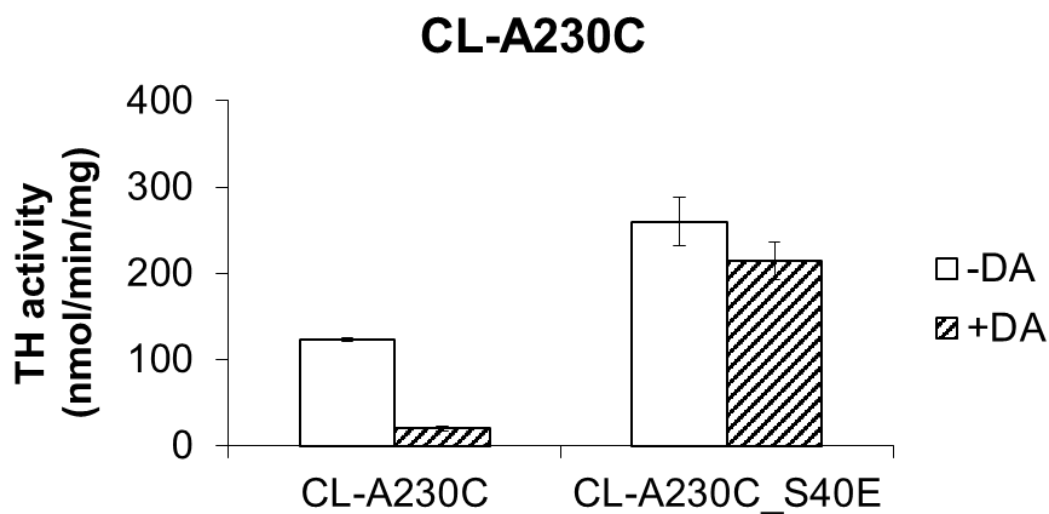


Fig. 11. CL-A230C の活性測定

TH を $2\mu\text{M}$ の DA を添加、無添加したのちに活性測定を行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。

CL-S295C の比活性は DA 無添加で $35 \pm 3.6 \text{ nmol/min/mg}$ となり、DA 添加で $7.0 \pm 1.3 \text{ nmol/min/mg}$ となった (Fig. 12)。CL-S295C_S40E の比活性は DA 無添加で $40 \pm 1.4 \text{ nmol/min/mg}$ となり、DA 添加で $31 \pm 1.6 \text{ nmol/min/mg}$ となった (Fig. 12)。

CL-S295C の比活性は WT の比活性の四分の一程度となり TH の活性減少が生じた。一方、DA の添加による TH の活性減少は S40E 変異の導入により抑制された。これらの結果から、CL-S295C の変異導入や蛍光物質の修飾は TH の活性を減少させるが、DA 結合による活性阻害には大きく影響を与えていないと判断した。

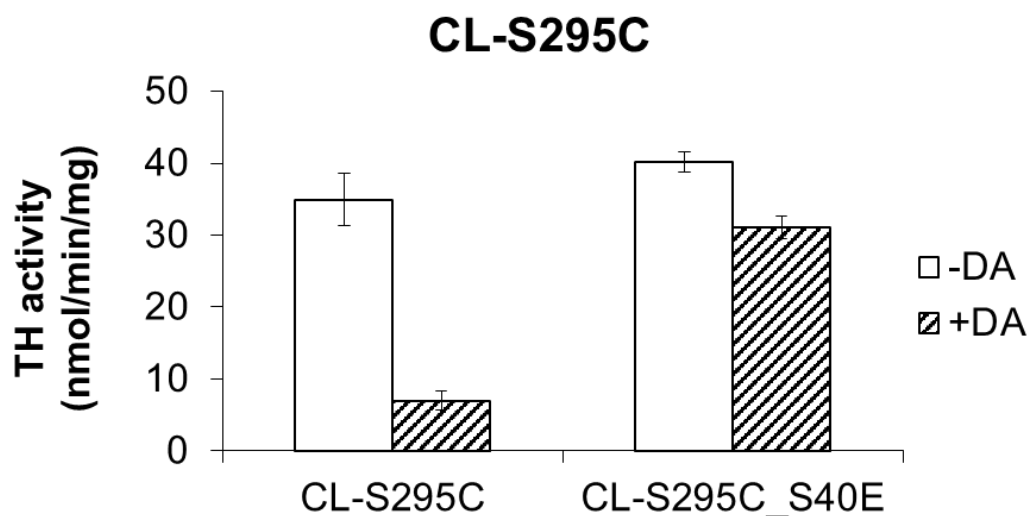


Fig. 12. CL-S295C の活性測定

TH を 2 μ M の DA を添加、無添加したのちに活性測定を行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記した。

2.4.3. 蛍光強度測定

活性測定の結果から、本研究で作製された DA バイオセンサーの候補である TH 変異体タンパク質は DA との反応により活性阻害が生じることが分かった。そのため、これらの TH 変異体タンパク質は DA 結合能が保持されている可能性が高いと考えた。そこで、これらの変異体タンパク質について DA 量に応答した蛍光強度変化が生じるかを確認するために蛍光強度測定を行った。

DA 添加による蛍光強度測定をするにあたって、蛍光物質である OGM 自身が DA 添加の影響を受ける可能性が存在する。また、TH から表面上に露出しているシステイン残基をすべて除いた変異体タンパク質 Cysless において DA 添加による蛍光強度変化が起きるかどうかについても調べるために、OGM または Cysless に DA を添加して蛍光強度の変化を測定した (Fig. 13)。OGM は DA の添加により蛍光強度変化率 ($\Delta F/F_0$) が $0.0 \pm 0.1\%$ となった。そのため、OGM 自身は DA により蛍光強度変化を起こさないことを示した。Cysless は DA の添加での蛍光強度変化率 ($\Delta F/F_0$) が $-1.5 \pm 0.3\%$ となった。蛍光強度変化が生じた理由として、Cysless または夾雑タンパク質にわずかに修飾していた OGM が DA 添加による影響により蛍光強度変化を起こした可能性が考えられる。

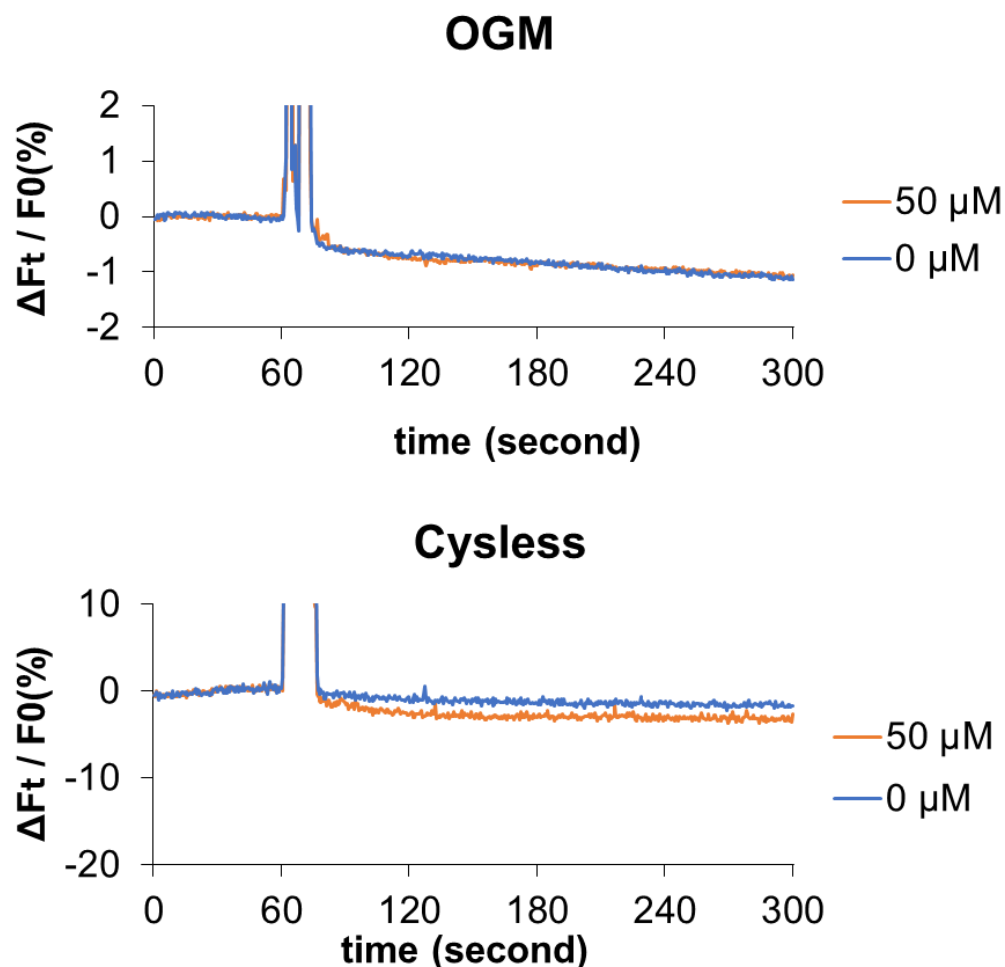


Fig. 13. OGM と Cysless の蛍光強度測定

蛍光強度測定は励起光 493 nm、検出蛍光波長 525 nm で行った。測定開始から 60 秒後に各 DA 濃度で添加、ピペッティングを行い、その後 4 分間測定を行った。各サンプルの濃度は OGM が 6 nM、Cysless が 0.02 μ M で行った。結果は測定開始後 60 秒までの蛍光強度の平均に対する各時間での蛍光強度の相対値で示した。測定は 3 回行い、その平均値を示した。

続いて今回作製した TH 変異体タンパク質について各 DA 濃度添加後の蛍光強度の変化を測定した。DA 添加後の蛍光強度変化率のタイムコースの結果から各 DA 濃度での最終的な蛍光強度変化と DA 濃度をプロットした (Fig. 14~17)。また、2.3.10 で示した式 (1) を用いてプロットしたデータのフィッティングを行い、各変異体タンパク質の DA の解離定数と最大蛍光強度変化率を求めた (Table. 23)。

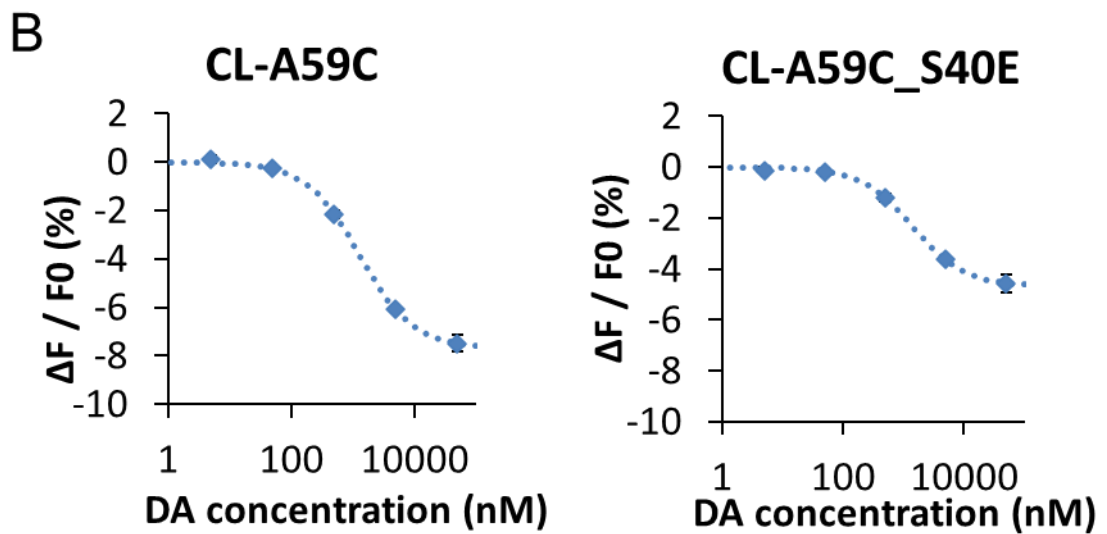
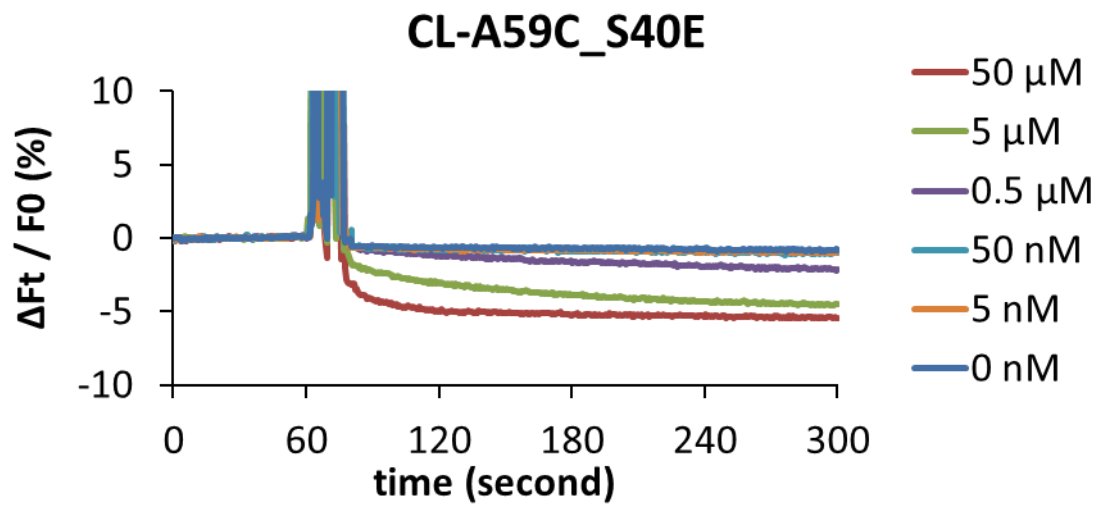
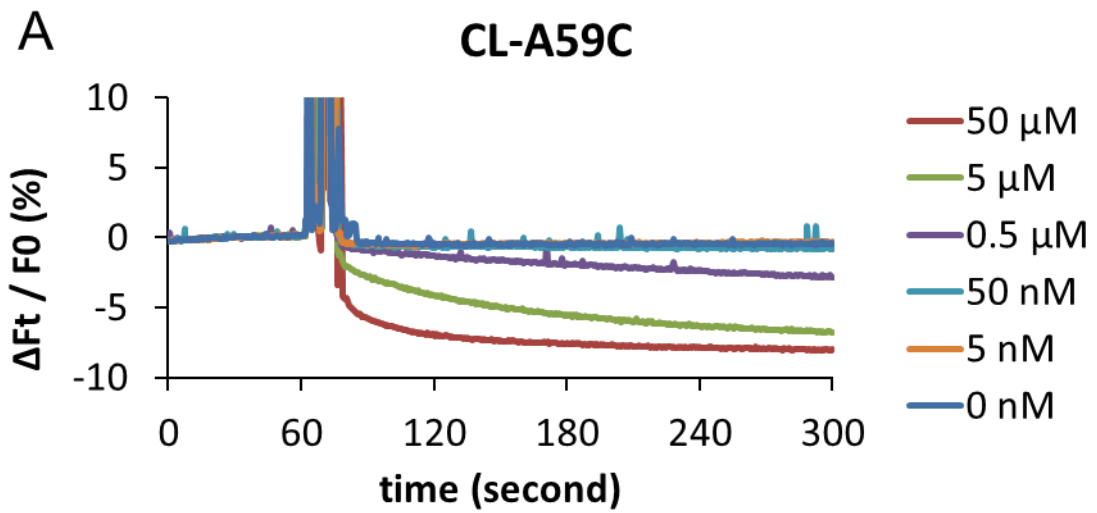


Fig. 14. TH 変異体タンパク質 CL-A59C の蛍光強度測定

- (A) 蛍光強度変化率のタイムコースの結果。蛍光強度測定は励起光 493 nm、検出蛍光波長 525 nm で行った。測定開始から 60 秒後に各 DA 濃度で添加、ピペッティングを行い、その後 4 分間測定を行った。各 TH 変異体タンパク質の濃度は 0.02 μ M で行った。結果は測定開始後 60 秒までの蛍光強度の平均に対する各時間での蛍光強度の相対値で示した。測定は 3 回行い、その平均値を示した。
- (B) 各 DA 濃度における最終的な蛍光強度変化率のプロット。プロットしたデータは 2.3.10 の蛍光強度測定で示した式 (1) を用いてフィッティングを行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。

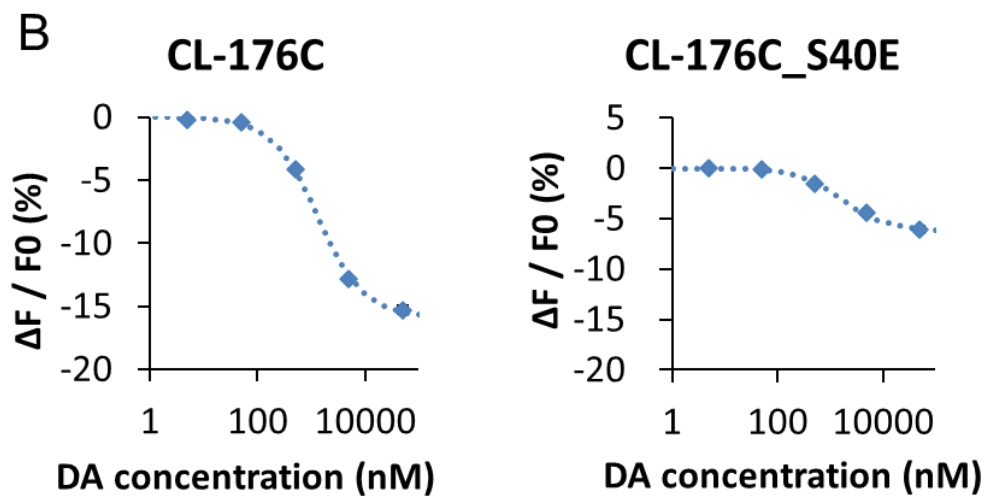
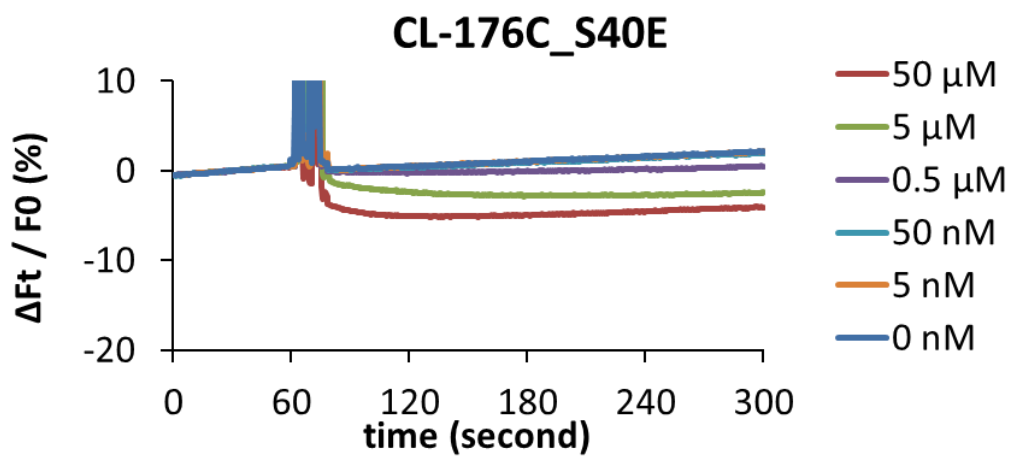
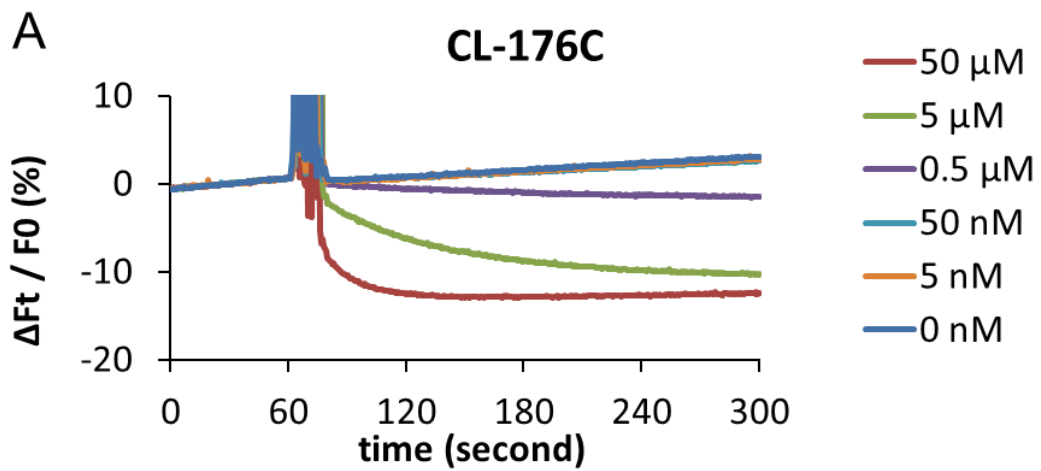


Fig. 15. TH 変異体タンパク質 CL-176C の蛍光強度測定

- (A) 蛍光強度変化率のタイムコースの結果。蛍光強度測定は励起光 493 nm、検出蛍光波長 525 nm で行った。測定開始から 60 秒後に各 DA 濃度で添加、ピペッティングを行い、その後 4 分間測定を行った。各 TH 変異体タンパク質の濃度は $0.02\ \mu\text{M}$ で行った。結果は測定開始後 60 秒までの蛍光強度の平均に対する各時間での蛍光強度の相対値で示した。測定は 3 回行い、その平均値を示した。
- (B) 各 DA 濃度における最終的な蛍光強度変化率のプロット。プロットしたデータは 2.3.10 の蛍光強度測定で示した式 (1) を用いてフィッティングを行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。

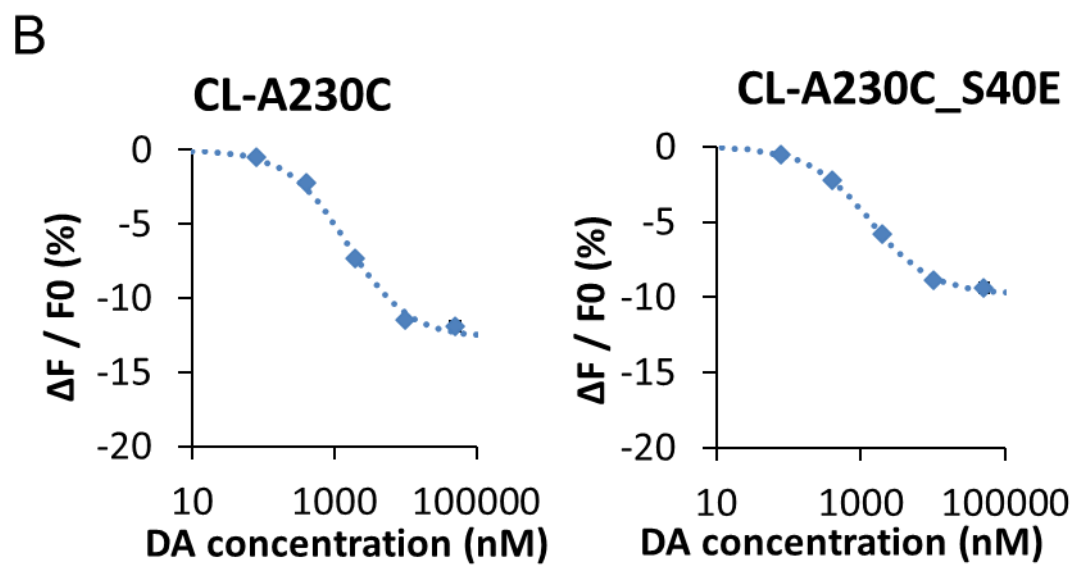
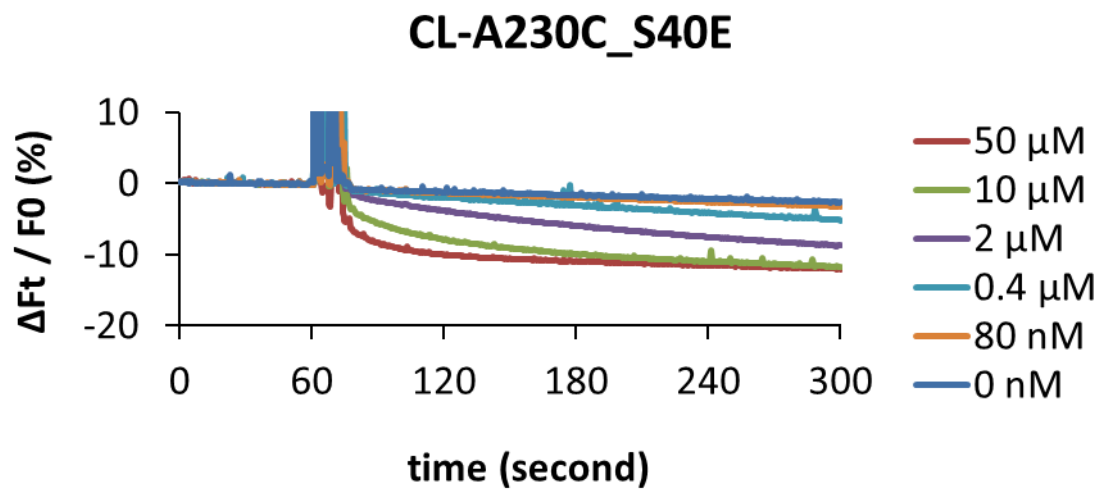
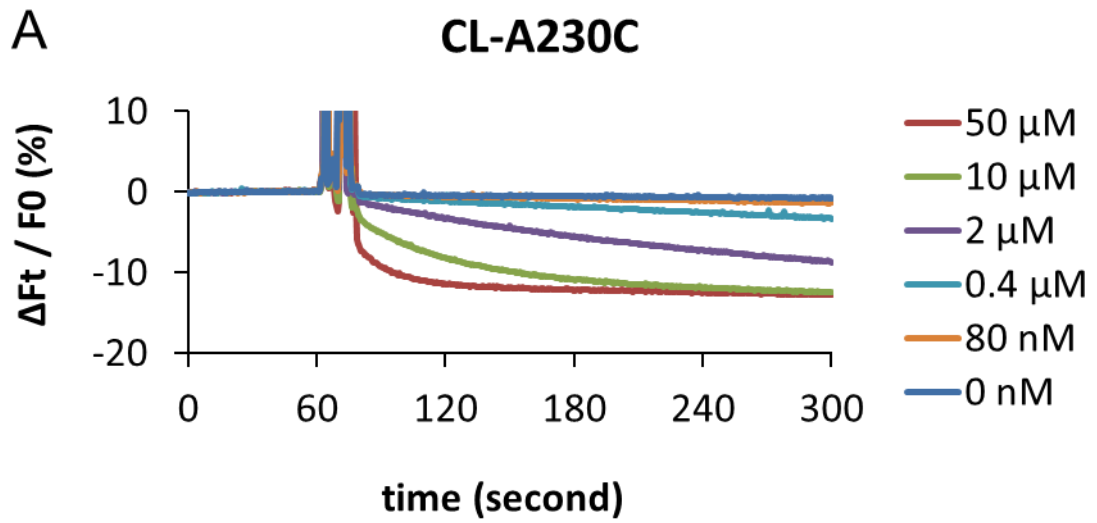
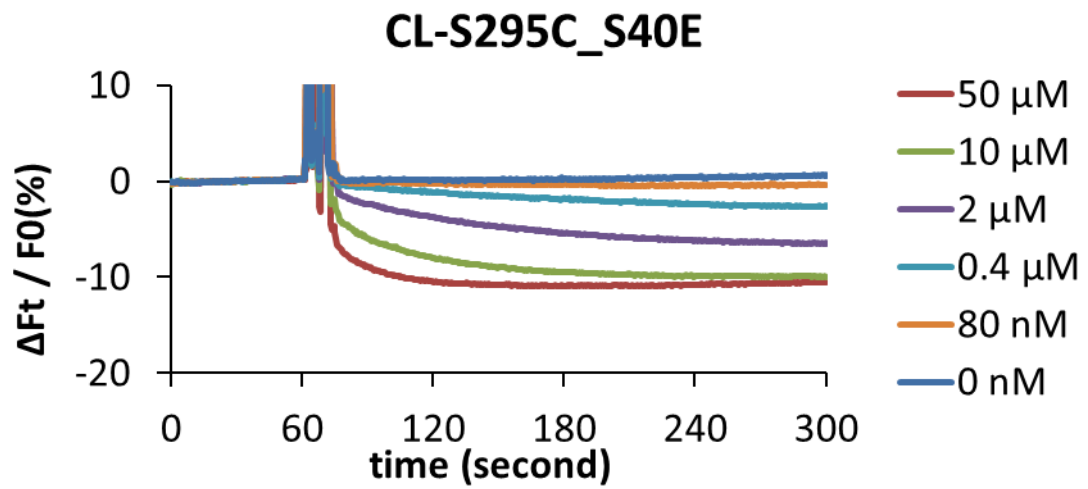
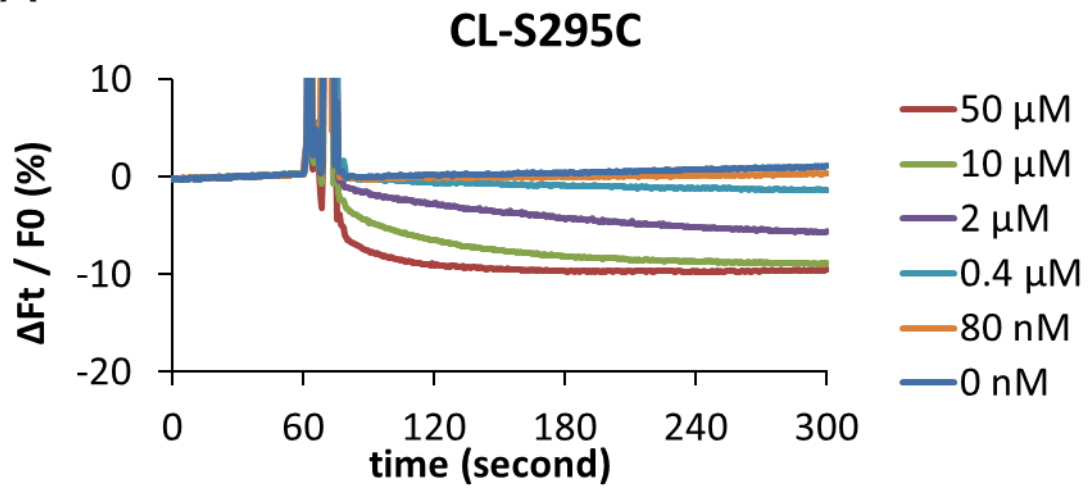


Fig. 16. TH 変異体タンパク質 CL-A230C の蛍光強度測定

- (A) 蛍光強度変化率のタイムコースの結果。蛍光強度測定は励起光 493 nm、検出蛍光波長 525 nm で行った。測定開始から 60 秒後に各 DA 濃度で添加、ピペッティングを行い、その後 4 分間測定を行った。各 TH 変異体タンパク質の濃度は 0.02 μ M で行った。結果は測定開始後 60 秒までの蛍光強度の平均に対する各時間での蛍光強度の相対値で示した。測定は 3 回行い、その平均値を示した。
- (B) 各 DA 濃度における最終的な蛍光強度変化率のプロット。プロットしたデータは 2.3.10 の蛍光強度測定で示した式 (1) を用いてフィッティングを行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。

A



B

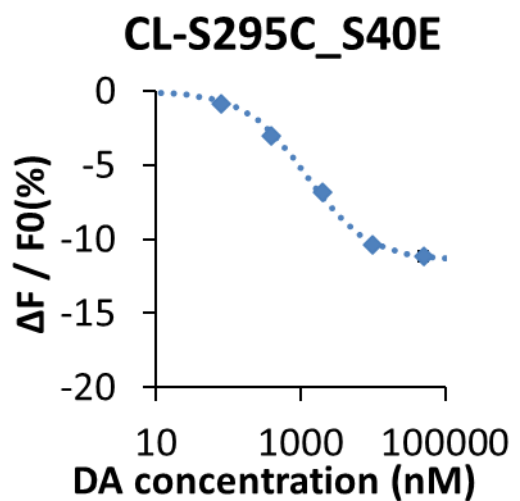
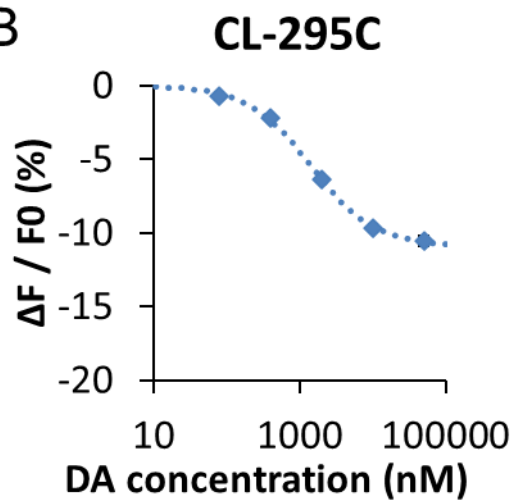


Fig. 17. TH 変異体タンパク質 CL-S295C の蛍光強度測定

- (A) 蛍光強度変化率のタイムコースの結果。蛍光強度測定は励起光 493 nm、検出蛍光波長 525 nm で行った。測定開始から 60 秒後に各 DA 濃度で添加、ピペッティングを行い、その後 4 分間測定を行った。各 TH 変異体タンパク質の濃度は 0.02 μ M で行った。結果は測定開始後 60 秒までの蛍光強度の平均に対する各時間での蛍光強度の相対値で示した。測定は 3 回行い、その平均値を示した。
- (B) 各 DA 濃度における最終的な蛍光強度変化率のプロット。プロットしたデータは 2.3.10 の蛍光強度測定で示した式 (1) を用いてフィッティングを行った。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。

Table 23. 蛍光強度測定による各変異体タンパク質の DA 解離定数と最大蛍光強度変化率

TH	DA 解離定数 (μ M)	最大蛍光強度変化率 (%)
CL-A59C	1.3 $\pm$ 0.12	-7.7 $\pm$ 0.15
CL-A59C_S40E	1.4 $\pm$ 0.17	-4.7 $\pm$ 0.12
CL-176C	1.3 $\pm$ 0.19	-16 $\pm$ 0.45
CL-176C_S40E	1.6 $\pm$ 0.33	-6.2 $\pm$ 0.26
CL-A230C	1.5 $\pm$ 0.38	-13 $\pm$ 0.69
CL-A230C_S40E	1.3 $\pm$ 0.17	-9.8 $\pm$ 0.28
CL-S295C	1.4 $\pm$ 0.15	-11 $\pm$ 0.26
CL-S295C_S40E	1.2 $\pm$ 0.17	-11 $\pm$ 0.35

各変異体タンパク質の蛍光強度測定の結果 (Fig. 14~17) の各 DA 濃度での最終的な蛍光強度変化プロットしたデータを 2.3.10 で示した式 (1) でフィッティングを行い、各変異体タンパク質の DA の解離定数と最大蛍光強度変化率を求めた。測定は 3 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準誤差で表記した。

蛍光強度測定の結果、本研究で作製したすべての TH 変異体タンパク質で DA の添加による蛍光強度変化を引き起こすことが分かった。また、CL-S295C を除くすべての TH 変異体タンパク質で S40E 変異により蛍光強度変化が抑制された。

2.5. 考察

本研究では DA センサーを作製するために TH のシステイン残基への任意の部位へ蛍光物質である OGM を導入することを考えた。そこで、WT から 4 つのシステイン残基 (Cys176、248、379、402) をアラニン残基に置換した変異体タンパク質である Cysless を作製した。Cysless はシステイン残基を任意の部位に導入するための鋳型である。Cysless の比活性、DA 結合による活性阻害および蛍光強度測定の結果は他の変異体タンパク質と比較するためのコントロールとして扱った。活性測定の結果から、Cysless の DA 添加による活性阻害が確認された。そのため、Cysless は DA 結合能を保持していると考えられる。また、蛍光強度測定の結果から、Cysless は DA 添加により蛍光強度の減少を引き起こすことが分かった。この結果の理由として、Cysless または夾雑タンパク質にわずかに修飾していた OGM が DA 添加による構造変化などの影響により蛍光強度変化を起こした可能性が考えられる。しかし、Cysless のラベル率は Cysless にシステイン残基を導入した他の変異体タンパク質よりも 10 倍以上低いため、Cysless で起きた蛍光強度変化率の減少は各変異体タンパク質の蛍光強度変化率に対して十分に小さいものであると考えられる。そのため、各変異体タンパク質の DA 添加により生じた蛍光強度変化は各部位へ OGM が修飾されたために生じた結果であると考えられる。

CL-A59C は Cysless に制御ドメインの一つである Ala59 をシステイン残基に置換することで得られた変異体タンパク質である。Ala59 は Ser40 と ACT ドメインの間に位置する。そのため、DA 結合に伴う構造変化が制御ドメインで起こるのならば、構造変化の影響を受けて CL-A59C は蛍光強度変化を起こすと考えた。

制御ドメインは DA 結合による活性制御に重要であると考えられているが、制御ドメイン欠失変異体タンパク質において TH の活性が認められていることから、TH の触媒反応自体に必須の領域ではないと考えられる¹¹。しかし、本研究において活性測定の結果から CL-A59C の変異導入や蛍光物質の修飾は TH の活性を減少させることが分かった。DA 非結合状態の制御ドメインを含んだ TH の構造は解かれていない。一方で、DA 結合した TH の構造においては Ala59 を含む制御ドメインの構造が解かれており、この構造によると Ala59 は ACT ド

メイン側に近接していることが分かる (Fig. 18)。ACT ドメインは制御ドメインのなかで触媒ドメインに最も近傍に位置する。また、ACT ドメインは二量体化を介して TH の四量体形成に影響を与えており、TH のサブユニット間に構造変化の影響を伝搬させる可能性がある。そのため、ACT ドメインへの影響は TH の活性に影響を与える可能性があり、Ala59 への変異導入や蛍光物質の修飾は ACT ドメインへの影響を介して TH の活性に影響を与えた可能性が考えられる。

蛍光強度測定の結果では、CL-A59C で DA 添加による蛍光強度の減少が見られた。また、S40E の変異導入により蛍光強度変化が抑制された。これらの結果は Ala59 が DA 結合による構造変化および S40E による制御ドメインの構造変化の影響を受ける部位であることを示唆している。

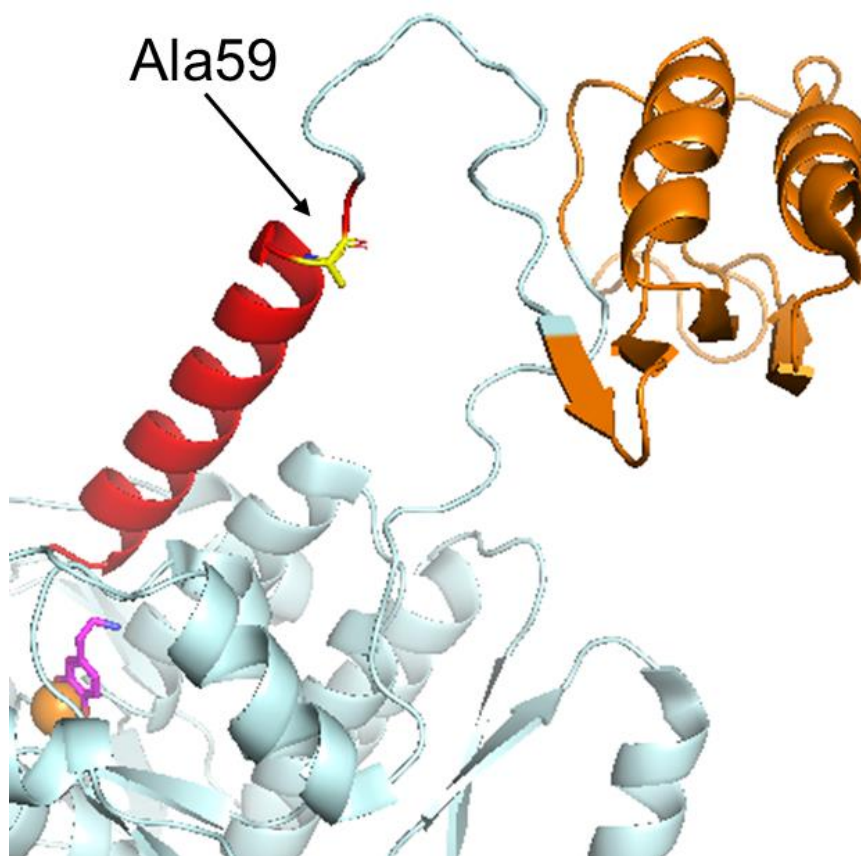


Fig. 18. Ala59 と制御ドメインの構造

DA 結合した TH の構造 (PDB ID : 6ZVP) を PyMOL で各部位に色を付けて表記した。制御ヘリックス領域 (40-60 a.a.) を赤色に、ACT ドメイン (74-150) をオレンジ色に、触媒ドメインは薄水色に表した。鉄 (活性部位) はオレンジ色の球体、DA はピンク色のスティックで表した。Ala59 は黄色のスティックで表した。

CL-176C は WT の表面上に露出している 4 つのシステイン残基うち Cys176 を除いた 3 つのシステイン残基を Ala に置換した変異体タンパク質であり、WT に存在する Cys176 が残っている。Cys176 は TH の触媒ドメインの 176 番目から 196 番目に存在するフレキシブルループと呼ばれる部位の N 末端側に位置している²⁷。フレキシブルループは基質の結合に影響を与える部位であると考えられており、DA 結合によって構造変化が起きることが構造解析から分かっている¹⁸ (Fig. 19)。そのため、CL-176C は DA 結合によりフレキシブルループの構造変化を介して蛍光強度変化を起こすと考えた。

CL-176C および CL-176C_S40E は今回用意した変異体タンパク質の中で、最も OGM のラベル率が高かった。WT のラベル率は 31%なのに対して CL-176C のラベル率は 24%であったため、WT で修飾したシステイン残基のうち 77%が Cys176 に修飾していると考えられる。このことから Cys176 は WT の他のシステイン残基よりも反応性やアクセシビリティが高いシステイン残基であると考えられる。また、S40E 変異によってラベル率が増加したことから、制御ドメインの構造変化によって Cys176 の反応性やアクセシビリティが変化すると考えられる。

活性測定の結果では、CL-176C は変異導入及び蛍光物質の修飾により活性が減少することが分かった。フレキシブルループの構造変化は TH の活性に影響を与えることが知られている。そのため、Cys176 への蛍光物質の修飾はフレキシブルループへの構造変化を介して TH の活性を減少させた可能性が考えられる。

Cys176 は WT に存在するシステイン残基である。Cys176 への修飾により TH の活性が減少したことから、TH にはシステイン残基への修飾を介した活性制御機構が存在している可能性が考えられる。また、本研究において S40E 変異により CL-176C の活性はさらに減少することが分かった。S40E 変異は Ser40 のリン酸化を模倣しており、DA 結合による活性阻害を抑制する。また、生体内において Ser40 のリン酸化は TH を活性型にすると考えられている。そのため、Cys176 への修飾による TH の活性阻害が S40E 変異によってさらに大きくなったことから、Cys176 への修飾は活性型の TH の活性を特に強く阻害する可能性が考えられる。

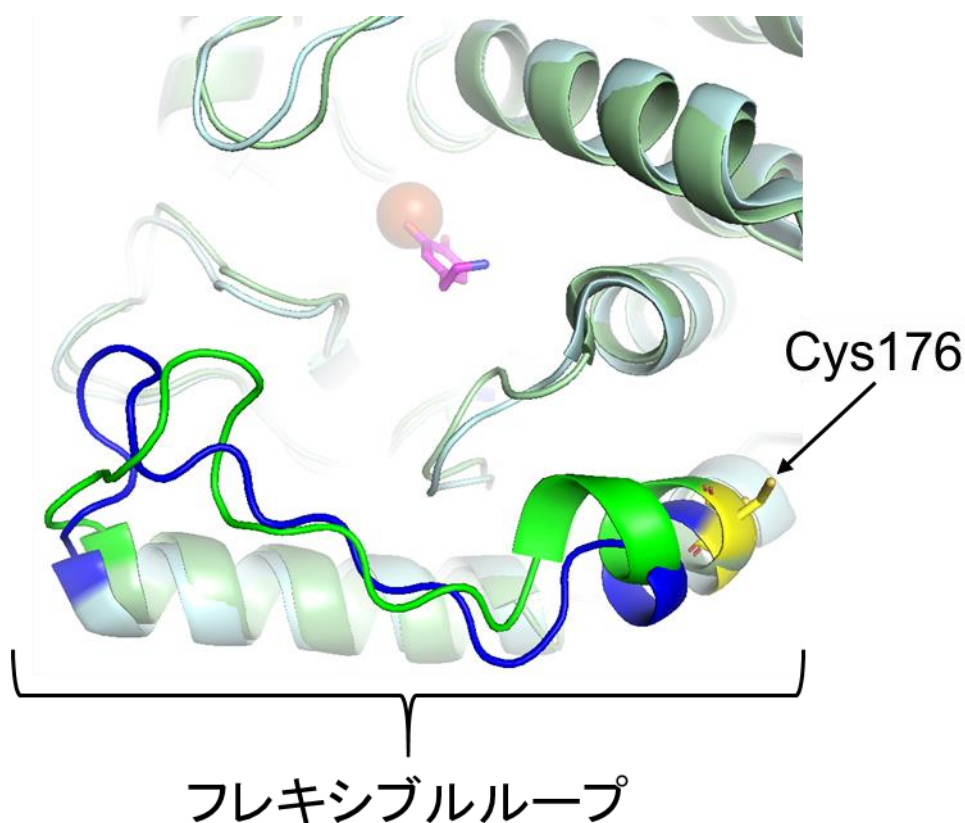


Fig. 19. Cys176 とフレキシブルループの構造

DA 非結合状態の TH の構造 (PDB ID : 7A2G) と DA 結合した TH の構造 (PDB ID : 6ZVP) を PyMOL で各部位に色を付けて表記した。鉄 (活性部位) はオレンジ色の球体、DA はピンク色のスティックで表した。フレキシブルループは緑 (DA 非結合状態) 及び青色 (DA 結合状態) で示した。Cys176 は黄色のスティックで表した。

蛍光強度測定では、CL-176C は DA 添加により蛍光強度が減少し、今回測定された TH 変異体タンパク質の中で最も蛍光強度変化率が高くなった。また、S40E の変異導入による蛍光強度変化の抑制が最も大きかった。これらの結果は Cys176 またはフレキシブルループが DA 結合による構造変化および S40E による制御ドメインの構造変化の影響を大きく受ける部位であることを示唆している。

CL-A230C は Cysless に触媒ドメインに存在する Ala230 を Cys に置換することで得られた変異体タンパク質である。Ala230 は触媒部位から比較的離れた位置に存在しており、Ala230 は DA 結合による構造変化の影響が少ない部位であると予想した (Fig. 20)。

CL-A230C_S40E は変異導入や蛍光物質の修飾によって活性が増加した。Ala230 は活性部位から離れており、TH の他のサブユニットが隣接していない位置に存在している (Fig. 20)。そのため、CL-A230C_S40E の活性が上昇した構造的な理由は本研究では明らかにできなかった。しかし、TH の構造のうち制御ドメインの天然変性領域 (1-40 a.a.) は構造が解かれていないため、Ala230 周辺に制御ドメインの一部が存在している場合には、Ala230 の変異導入や蛍光物質の修飾は制御ドメインへの影響を介して TH の活性に影響を与える可能性が考えられる。

蛍光強度測定の結果では CL-A230C は DA 添加により蛍光強度の減少が見られた。また、S40E の変異導入により蛍光強度変化が抑制された。これらの結果は Ala230 が DA 結合による TH の構造変化および S40E による制御ドメインの構造変化を受ける部位であることを示唆している。CL-A230C に修飾した蛍光物質が DA 結合による構造変化の影響を受けた要因として、TH の Ala230 近傍に制御ドメインの一部が存在しており制御ドメインの構造変化の影響を受けた可能性や、Ala230 が DA 結合による活性部位近傍の構造変化の影響を間接的に受けた可能性が考えられる。

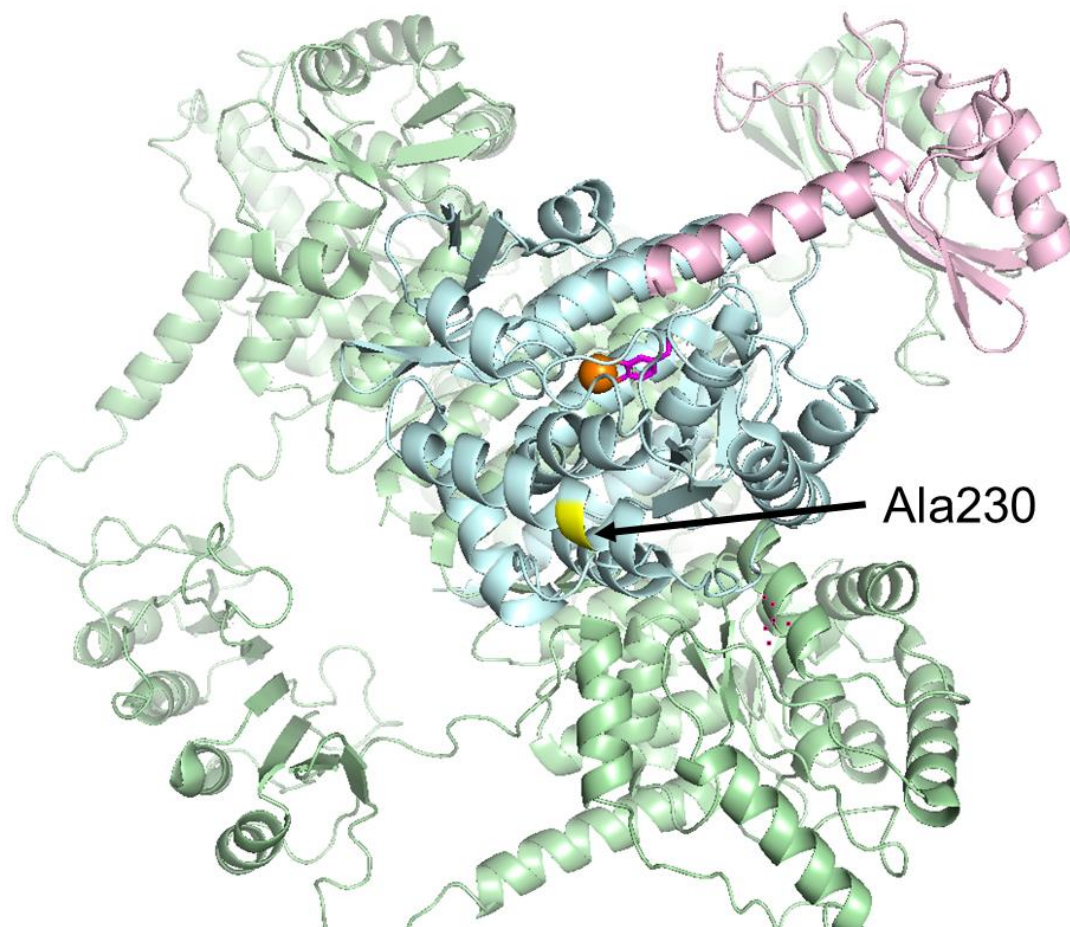


Fig. 20. Ala230 と TH 四量体構造

DA 結合した TH の構造 (PDB ID : 6ZVP) を PyMOL で TH の構造に色を付けて表記した。一つの TH サブユニットの制御ドメインをピンク色に、触媒ドメインを水色に、他の TH サブユニットを緑色で表記した。鉄 (活性部位) はオレンジ色の球体で表し、DA はピンク色のスティックで表記した。Ala230 は黄色で表記した。

Ser295 は DA 添加により重水素置換速度に差が見られた領域 (295-299 a.a.) に位置している¹⁰ (Fig. 21)。重水素置換はタンパク質の表面上の重水中に露出している領域ほど速く起こるため、DA 添加により重水素置換速度に変化のある部位はタンパク質の構造変化が起こった領域と考えられる。そのため、CL-S295C は DA 添加に伴う構造変化の影響を受ける部位であると予想した。

活性測定の結果から CL-S295C の変異導入や蛍光物質の修飾は TH の活性を減少させることが分かった。Ser295 は活性部位近傍に存在しているため、TH の活性に影響を与えたと考えられる。

蛍光強度測定の結果では、CL-S295C は DA 添加による蛍光強度の減少が見られた。一方で、S40E の変異導入による蛍光強度変化に差は生じなかった。これらの結果は CL-S295C が DA 結合によって受ける影響は制御ドメインの構造変化の影響ではなく、DA と TH の相互作用そのものに由来する活性部位近傍の構造変化の影響であると考えられる。

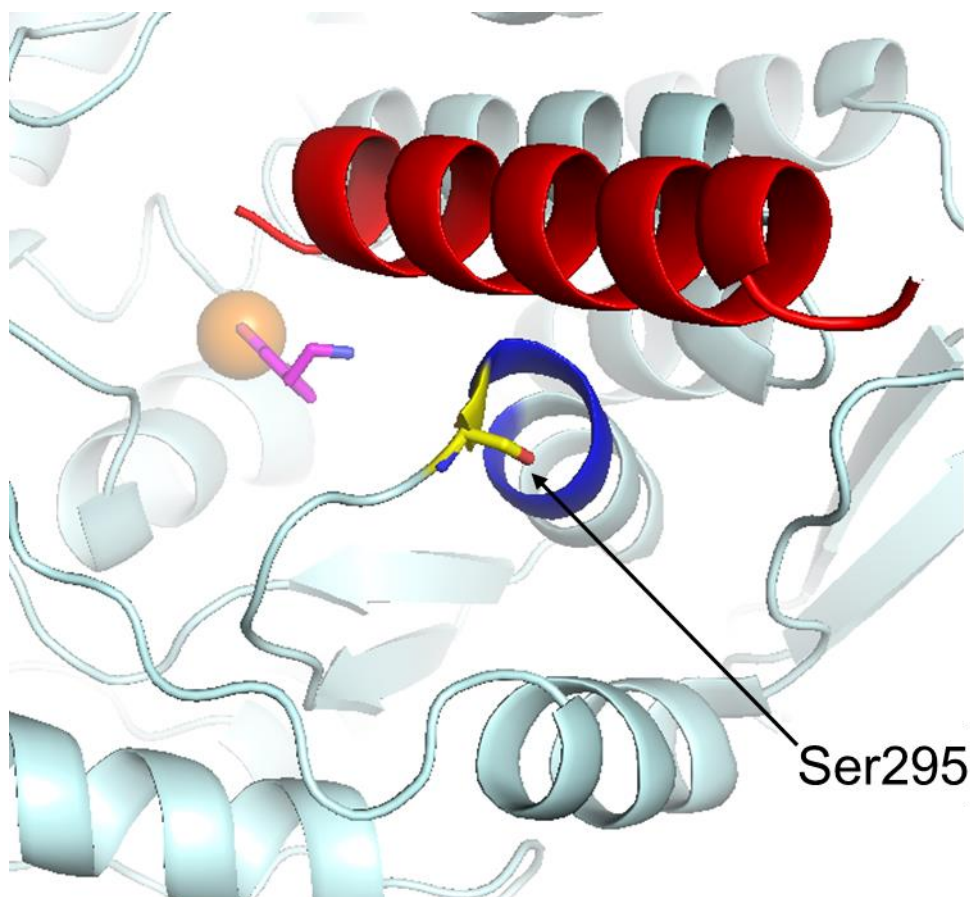


Fig. 21. Ser295 と重水素置換速度変化領域

DA が結合した TH の構造 (PDB ID : 6ZVP) を PyMOL で各部位に色を付けて表記した。鉄 (活性部位) はオレンジ色の球体、DA はピンク色のスティックで示した。制御ドメインは赤色に、重水素置換速度変化領域は青色でそれぞれ示した。Ser295 は黄色のスティックで示した。

本研究では DA バイオセンサーの開発を目的に TH 変異体タンパク質を作製してきた。その結果 CL-176C の変異体タンパク質において最大蛍光強度変化率 -16% の変異体タンパク質を作製した。また、この変異体タンパク質の蛍光強度変化から得られる DA の解離定数は 1.3 μM となった。細胞外の DA 量は数 μM 前後であるため、DA バイオセンサーとして適切な値であると考えられる²²。一方で蛍光強度変化率は一般的なバイオセンサーと比べて低いと考えられる。また、本研究では 5 分間で生じた蛍光強度変化を各 DA 濃度での最終蛍光強度変化と考えた。結果として、すべての変異体タンパク質で DA 添加量に応じた蛍光強度変化が観測されたが、生体内で数秒単位に変化する DA 量変化を検出するためには時間分解能が低いと考えられる。そのため、今回作製された DA バイオセンサーの性能はまだ実用的なものではないと考えられる。変異導入や蛍光物質の検討などによる改良を加えることで DA バイオセンサーとして扱える可能性がある。

一方で、新規の DA バイオセンサーとして dLight や GRAB_{DA} が報告されている^{28,29}。これらの DA バイオセンサーは DA 受容体または DA 受容体の DA 認識部位を利用して作製されており、DA やノルアドレナリンに対して特異的に認識できることが示されている。また、これらの DA バイオセンサーの蛍光強度変化率は高いもので 300% にまで達し、DA の解離定数は数百 nM から数十 μM まで幅広く開発されている。そのためこれらの DA バイオセンサーは今回作製した DA バイオセンサーよりも有能かつ実用的であると考えられる。

第3章 システイン残基を介するチロシン水酸化酵素の活性調節機構の解析

3.1. 背景

3.1.1. DA 酸化物

DA 量は生合成やシナプス小胞への取り込み、代謝などによって細胞質内の量が調節されている (Fig. 1)。しかし、DA は細胞質内において非常に不安定であり、一部の DA は酸化ストレスや酸化酵素などにより酸化されることが知られている³⁰ (Fig. 22)。DA のカテコール基が酸化することでキノン体であるドパミンキノン (DAQ) が生成される。DAQ のアミノ基が分子内で求核攻撃を行い、環化することによりロイコアミノクロム (LAC) が形成される³¹。LAC がさらに酸化されることによってアミノクロム (AC)、5,6-ジヒドロキシインドール (DHI)、DHI キノン (DHIQ) を形成していく。キノン体は生体内で抗酸化ストレスの一つであるグルタチオンやタンパク質のシステイン残基をはじめとしたチオール基と反応し、システイニルドパミンを形成する³²。DA 酸化物はカテコール基の酸化を繰り返しながら重合化や凝集体化していき、最終的にニューロメラニンの構成要素となる³³。ニューロメラニンの蓄積は黒質緻密部をはじめとした DA ニューロンで観察されており、そのため DA 酸化物も同様に DA ニューロンに存在すると考えられる³⁴。

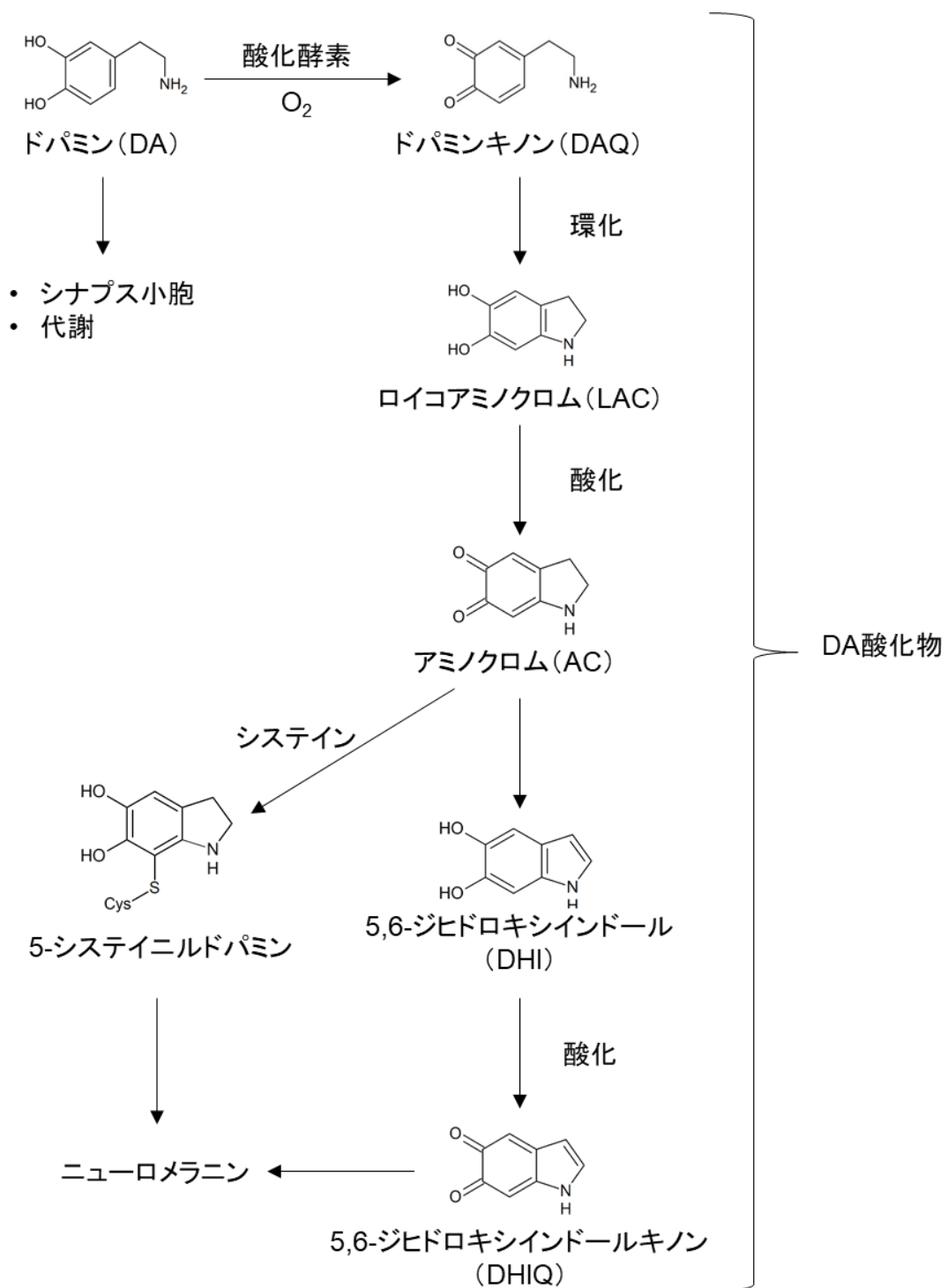


Fig. 22. DA の酸化と DA 酸化物

DA は酸化酵素や酸化ストレスなどにより酸化されドパミンキノン (DAQ)、ロイコアミノクロム (LAC) を介してアミノクロム (AC) を形成する。AC は内在の抗酸化物質やさらなる酸化を介して最終的にはニューロメラニンの構成要素となる。

3.1.2. DA 酸化物と神経毒性

DA 酸化物はカテコールの水酸基がカルボニルに変換されたキノン体の構造を持っている。キノン体には細胞内毒性があることが知られており、酸化還元サイクルによる活性酸素種 (ROS) の産生、グルタチオン (GSH) やタンパク質のシステイン残基のチオール基への修飾を介して酸化ストレスの増大やタンパク質の機能不全などを引き起こす³⁵⁻⁴⁰ (Fig. 23)。このような DA 酸化物の毒性はパーキンソン病の原因の一つであると考えられている^{30,31,41}。

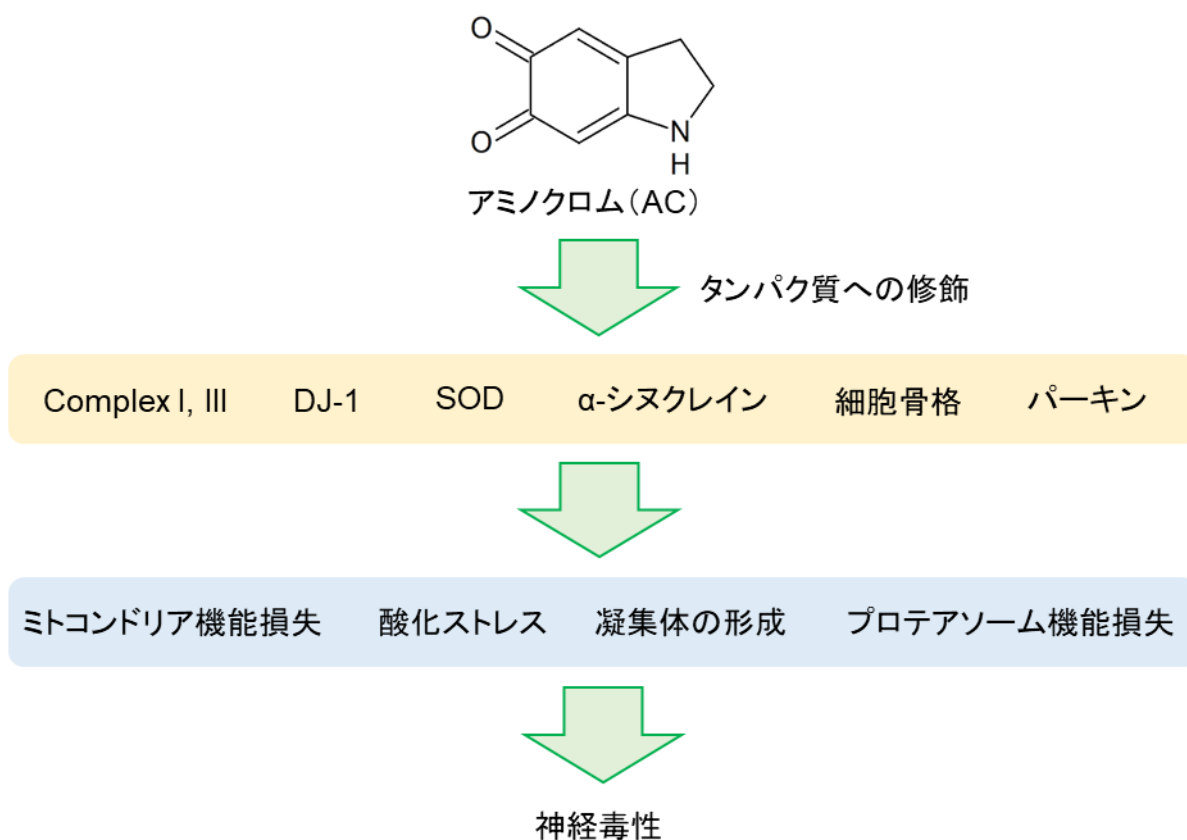


Fig. 23. DA 酸化物のタンパク質のシステイン残基への修飾を介したタンパク質機能損失及び神経毒性

3.1.3. TH のシステイン残基への修飾

TH は DA 結合やリン酸化の制御だけでなく、システイン残基への修飾を介した活性制御を受けることも知られている。例えば、ラット副腎褐色細胞腫 (PC12) に対して酸化剤であるジアミドを反応させることによって、細胞内 TH の活性が減少することが報告されている⁴²。彼らは同位体標識したグルタチオンを細胞培養液中に添加したのちに、細胞をジアミドと反応させることにより細胞内 TH がグルタチオン化されることを示した。他にも、マウスの脳領域の一つである線条体のライセートに対してニトロソグルタチオンを反応させることによって、TH がニトロシル化され、活性が増加することが報告されている⁴³。彼らはシステイン残基が置換された TH 変異体を用いることで、TH の Cys248 がニトロシル化されていることを示した。しかし、このような例を含め TH の活性制御機構のその全貌は解明されてはいない。第 2 章の CL-176C の活性測定では、TH の Cys176 への OGM の修飾が TH の活性を減少させることを示した (Fig. 9)。また、DA 酸化物はタンパク質のシステイン残基を修飾する物質であり、TH が多く発現している DA ニューロン内に存在している物質でもある。そこで私は、DA 酸化物などによるタンパク質のシステイン残基への修飾が TH においても起こりうるのではないかと考えた。実際、DA 酸化物が TH のシステイン残基への修飾を介して活性を減少させることが過去に報告されている^{44,45}。彼らは TH と DA をはじめとしたカテコール類を酸化させる酵素であるチロシナーゼとともに反応させることで TH の活性が減少することを示した。また、同位体標識した DA を用いて作製した DA 酸化物と TH を反応させることにより、DA 酸化物が TH を修飾していることを示した。さらに、DTNB を用いたチオール基の定量により、TH に含まれる 7 つのシステイン残基に由来するチオール基が DA 酸化物との反応によって減少することを示した。これらの結果から、DA 酸化物がシステイン残基への修飾を介して TH の活性を減少させることを示した。しかし、DA 酸化物による TH の活性制御機構に関してその詳細な分子機構、例えば「TH の 7 つあるシステイン残基のどの位置に修飾するのか」、「なぜ修飾によって TH 活性が減少するのか」、「既知の制御機構である DA 結合と制御ドメインのリン酸化がどのようにシステイン残基への修飾に影響を与えるか」といった疑問は解決されていない。

3.2. 目的

本研究では TH のシステイン残基への修飾による活性減少の分子メカニズムを調べるためにシステイン残基の化学修飾剤である N-エチルマレイミド (NEM) や DA ニューロンに存在するシステイン残基へ修飾する DA 酸化物などを用いてその分子メカニズムについて調べることを目的とした⁴⁶。

3.3. 方法

3.3.1. TH の調製

TH に存在する 7 つのシステイン残基 (Cys176、248、310、328、329、379、402) をそれぞれアラニン残基に置換した変異体の発現プラスミドベクターの作製を行った。このうち、Cys176、248、379、402 については第 2 章で用いたプライマー (Table 2) を使用して作製した。一方、残りのシステイン残基 (Cys310、328、329) については以下のプライマーを用いて作製した (Table 24)。Cys328、329 に関しては連続しているアミノ酸残基であるため、両方ともアラニン残基に置換して作製した。変異導入には TOYOBO の KOD-Plus-Mutagenesis Kit (a) を用いた。

Table 24. システイン残基置換用プライマー

Primer	Sequence (5' to 3')
hTH1_C310A_F ^a	CCACCCAGTATATCCGCCACGCGTC
hTH1_C310A_R ^a	CCTGGAACACGCGGAAGGCCAGGCTG
hTH1_C328/329A_F ^a	GCCCACGAGCTGCTGGGGCACGTG
hTH1_C328/329A_R ^a	GGCGTCCGGCTCAGGGGAGTGCATG

制御ドメインを欠失した変異体タンパク質 (DEL33、DEL76、DEL156) を作製するために以下のプライマーを用いて PCR を行い、Nde I と Hind III で PCR 産物を処理したのち発現ベクター (pET23a) に組み込んだ (Table 25)。

Table 25. 制御ドメイン欠失用プライマー

Primer	Sequence (5' to 3')
hTH1_DEL33_F	GGAATTCCATATGTTTCATTGGGCGCAGGCAGAGCC
hTH1_DEL76_F	GGAATTCCATATGAAGGAGGGGAAGGCCGTGCTAAAC
hTH1_DEL156_F	GGAATTCCATATGCGCAGCCCCGCGGGGCCCAAGGTC
hTH1_Hind III	CCCCAAGCTTCTAGCCAATGGCACTCAGCGCATGG

また、これらの変異体タンパク質及び S40E 変異体タンパク質に C176A 変異を加えた変異体の発現プラスミドベクターも作製した。作製方法は第 2 章の C176A 変異体の発現プラスミドベクターの作製方法に従った。

各 TH 変異体タンパク質の発現と精製は第 2 章での TH の発現と精製の方法に従った。変更点として、第 2 章では精製過程で OGM の修飾反応を行ったが、本章のタンパク質の精製では行わなかった。また、第 2 章では OGM の修飾反応に影響を与えるため精製に用いたバッファーに還元剤を加えていなかったのに対して、本章では 1 mM の DTT を精製に用いた各バッファーに加えた。DTT はシステイン残基と修飾剤との反応に影響を与えるため、各実験を行う直前に Nap5 (GE Healthcare) もしくは SephadexG-25 Fine (GE Healthcare) を充填したマイクロバイオスピンクロマトグラフィーカラム (Bio-Rad) を用いて DTT を取り除いた。DTT の除去の際に用いた樹脂の平衡化及び TH タンパク質の希釈には以下の希釈用バッファーを用いた (Table 26)。

Table 26. 希釈用バッファー

20 mM	Tris-HCl (pH 7.4)
150 mM	KCl
0.01%	Tween 20

3.3.2. 活性測定

TH の活性測定は第 2 章の活性測定の方法に従った。活性測定に用いた反応溶液は pH 6.0 または pH 7.4 で行った。pH 6.0 の環境下では TH への DA の結合が抑制されることが報告されている⁴⁷。そのため、DA 結合による活性阻害の影響を抑制する必要がある場合には、pH6.0 の反応溶液を用いた活性測定を行った。各 TH 変異体タンパク質を発現させた大腸菌ライセートはタンパク質量をしたのちに 100 μ M の NEM と 25°C で 30 分間反応させ、10 倍希釈したのちに活性測定を行った。精製した TH は希釈用バッファーを用いて希釈を行い、5 μ M の TH を 100 μ M の NEM と 25°C で 30 分間、または 100 μ M の DA 酸化物と 25°C で 120 分間反応させた。反応後、TH を 0.5 μ M まで希釈したのちに活性測定を行った。DA 酸化物との反応後の測定では pH6.0 の反応溶液を用いて活性測定を行った。

DA 結合による NEM のシステイン残基への修飾の影響を調べる実験では 10 μM の TH を 100 μM の DA と 25°C で 5 分間反応させたのちに 10 μM の NEM と 4°C で 15、30、60、120 分間反応させた。反応後、TH を 0.5 μM まで希釈したのちに活性測定を行った。活性測定では pH6.0 の反応溶液を用いた。

NEM の修飾による TH の各基質の速度論的パラメータの変化を見るための活性測定では速度論解析をするため以下の条件で活性測定を行った。TH の基質である L-tyrosine は 250 μM の BH4 に対して L-tyrosine の濃度を 50、25、12.5、6.25、3.13 μM にしてそれぞれ活性測定を行った。TH の補酵素である BH4 は 50 μM の L-tyrosine に対して BH4 の濃度を 250、125、62.5、31.3、15.6 μM にしてそれぞれ活性測定を行った。速度論的パラメータとして各基質の K_m および $V_{\max}$ を Lineweaver-Burk プロットを用いて算出した。

3.3.3. MALDI-TOF MS

本章では、TH のシステイン残基への修飾による質量変化を調べるために質量分析を行った。TH は 10 μM に調製したのちに NEM と 25°C で 30 分間、または DA 酸化物と 25°C で 120 分間反応させ、おおよそ 20 μM になるまで vivaspin (分画分子量：30 k、GE Healthcare) を用いて濃縮した。その後東京工業大学オープンファシリティセンター分析部門に C18 チップを用いた脱塩と MALDI-TOF MS (Bruker) による質量分析を依頼した。

3.3.4. 擬一次速度定数の算出

DA 結合による NEM のシステイン残基への修飾の影響を調べる実験では、NEM による TH の活性減少のタイムコースの結果において以下の式を用いてフィッティングを行い、擬一次速度定数を算出した。フィッティングはデータ解析ソフトである KaleidaGraph 4.1™ を用いて行った。

$$v = Ae^{-kt} + B$$

v : 各インキュベーション時間 (t) における NEM と未反応の TH に対する NEM と反応させた TH の活性の相対値

k : 擬一次速度定数 A : 最大阻害率 B : オフセット

3.3.5. DA 酸化物の調製・分析

DA 酸化物は 200 μ M の DA をチロシナーゼ (0.5 U/ μ L) と 30°C で 15 分間反応させることで調製した。チロシナーゼは褐色細胞などで発現する酵素でカテコール基をキノン体に変換する反応を触媒する。チロシナーゼの分子量は 128 k であるため、vivaspin (分画分子量：30 k) を用いて分画することで DA 酸化物反応溶液からチロシナーゼを除去した。DA 酸化物の生成を確認するために吸光度測定と質量分析を行った。

吸光度測定は 200 nm から 700 nm の間で行い、キノン体のピークである 480 nm のピークの有無を確認した。質量分析は LCMS-8050 (島津) の一次代謝物 (Ver. 2.0) メソッドパッケージを用いて行った (Table 27、Table 28、Table 29)。DA 酸化物は 10 mM の HCl を用いて 10 倍に希釈したのち 10 μ L をアプライした。

Table 27. 一次代謝物メソッドパッケージ (LC 条件)

分析カラム：	Discovery HS F5-3 (2.1 mmI.D. $\times$ 150 mmL, 3 μ m)、 Sigma-Aldrich P/N 567503-U
移動相 A：	0.1%ギ酸 (LCMS 用) -水 (LCMS 用)
移動相 B：	0.1%ギ酸 (LCMS 用) -アセトニトリル (LCMS 用)
流速：	0.25 mL/min
カラム温度：	40°C

Table 28. グラジエントプログラム

ステップ	時間 (min)	移動相 A (%)	移動相 B (%)
0	0	100	0
1	2.0	100	0
2	5.0	75	25
3	11.0	65	35
4	15.0	5	95
5	20.0	5	95
6	20.1	100	0
7	25.0	100	0

Table 29. 一次代謝物メソッドパッケージ (MS 条件)

ネブライザーガス流量：	3.0 L/min
ドライイングガス流量：	10.0 L/min
ヒーティングガス流量：	10.0 L/min
インターフェイス温度：	300°C
DL 温度：	250°C
ヒートブロック温度：	400°C
イオン化モード：	ESI

3.4. 結果

3.4.1. システイン残基への修飾剤の検討

システイン残基への修飾が TH の活性に影響を与えるかを調べるために、システイン残基への修飾に使われている試薬との反応によって TH の活性に変化が起きるかを調べた。本研究では、S-グルタチオン化を引き起こす酸化型グルタチオン (GSSG)、S-ニトロシル化を引き起こすニトロソグルタチオン (GSNO)、過酸化を引き起こす過酸化水素 (H_2O_2) とアルキル化に使われる NEM を用いて検討を行った。各試薬を TH と反応させたのちに活性測定を行った。その結果、GSNO、 H_2O_2 、NEM は TH の活性を減少させる傾向を示し、特に NEM は TH の活性を 20% まで減少させることが分かった (Fig. 24)。また、TH の活性測定に用いられる反応溶液内に含まれる還元剤が TH のシステイン残基への修飾と活性の減少に影響を与えるか調べるために、還元剤である 2-メルカプトエタノール (2-ME) を加えて、あるいは加えない条件で活性測定を行った。その結果、還元剤があることによって GSNO、 H_2O_2 は TH の活性の減少が抑制される傾向を示したのに対して、NEM によって引き起こされた TH の活性減少は抑制されなかった。このことから、TH の NEM との反応により生じる活性の減少は活性測定の反応溶液内に含まれる還元剤の影響を受けないことが分かった。そのため、以降の実験では還元剤を含む反応溶液を用いて活性測定を行った。

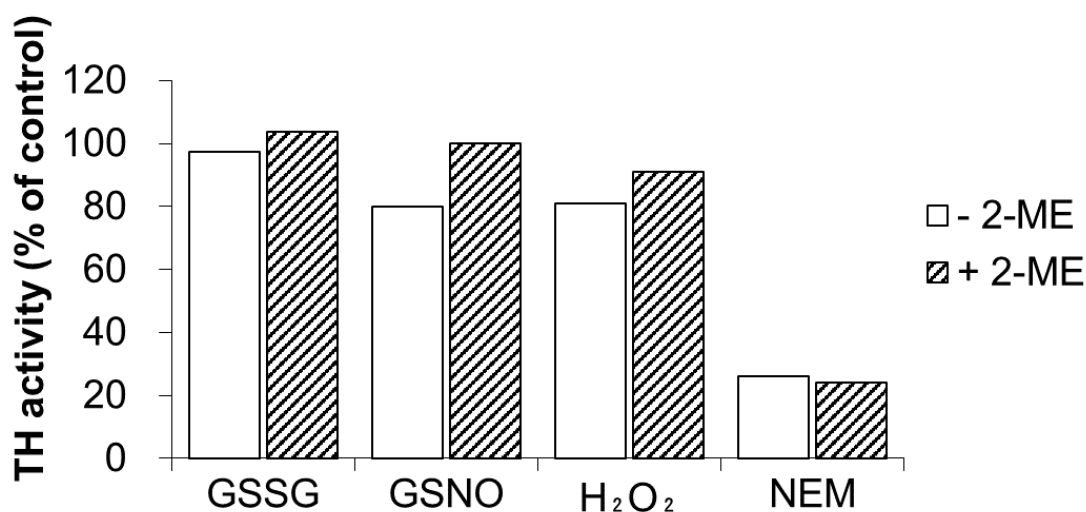


Fig. 24. システイン残基への修飾剤の検討

TH (5 μ M) を各試薬 (GSSG、GSNO、H₂O₂、NEM) と 25°C で 30 分反応させたのち 2-ME を含む反応溶液 (斜線) または含まない反応溶液 (白) を用いて活性測定を行った。結果はコントロールとして希釈用バッファーを加えた TH の活性の値 (2-ME なし: 273 nmol/min/mg、2-ME あり: 113 nmol/min/mg) に対する相対値で表した。測定は 2 回行い、その平均値で結果を示した。

3.4.2. 修飾されるシステイン残基の特定

TH は 7 つのシステイン残基を持っている。NEM によって引き起こされる活性減少がどのシステイン残基への影響によるものか確かめるために、6 つのシステイン残基がアラニン残基に置換された変異体タンパク質 (C176A、C248A、C310A、C328/329A、C379A、C402A) を作製した。各変異体タンパク質を BL21 (DE3) で発現させたのちに、大腸菌ライセートに対して NEM を反応させて活性測定を行った (Fig. 25)。その結果、C176A-TH 変異体タンパク質のみ NEM による活性減少を引き起こさないことが分かった。この結果から NEM による TH の活性減少は Cys176 を介したものであることが分かった。

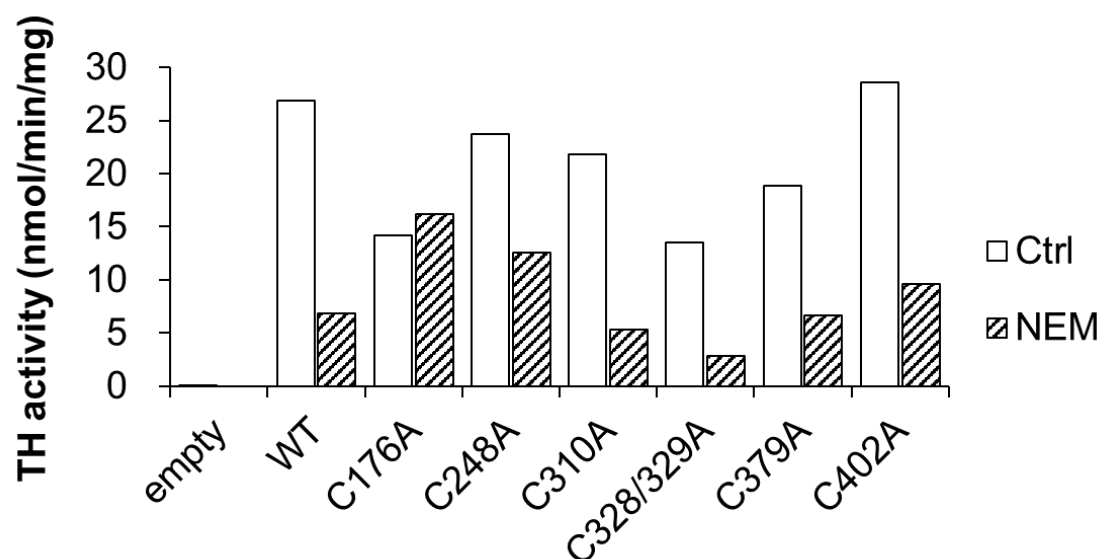


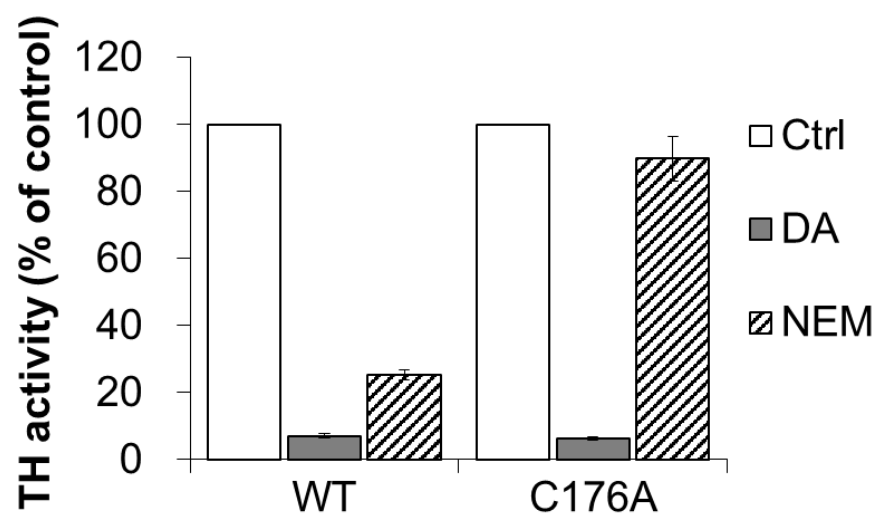
Fig. 25. TH 変異体タンパク質と NEM の影響の変化

システイン残基を置換した TH 変異体タンパク質を発現した BL21 (DE3) ライセートを 25°C で 30 分間 100 μ M の NEM と反応させた。活性測定の実験溶液は pH 7.4 で行った。測定は 2 回行い、その比活性の平均値で結果を示した。

3.4.3. システイン残基への修飾の確認

WT 及び C176A 変異体タンパク質の精製タンパク質を調製し、再度 NEM による活性阻害の検証を行った (Fig. 26A)。精製タンパク質においても C176A 変異体タンパク質において WT と同様に DA 結合による活性阻害が引き起こされた一方で、NEM との反応による TH の活性の減少が抑制された。さらに NEM の Cys176 への修飾を確認するため質量分析を行った (Fig. 26B)。WT において NEM との反応により 125 Da の質量の増加が起きた一方で、C176A 変異体タンパク質においては同様な質量の変化は見られなかった。125 Da は 1 分子の NEM に相当する質量であるため、TH に対して 1 分子の NEM が Cys176 に修飾することで TH の活性を減少させていると考えられる。

A



B

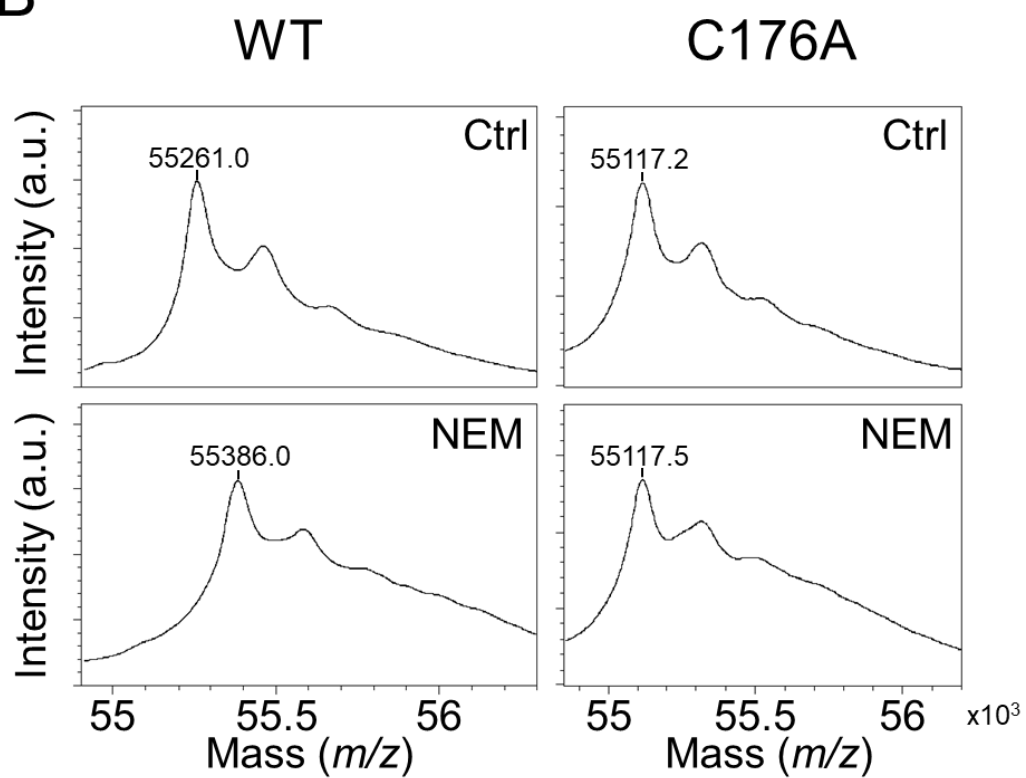


Fig. 26. NEM による 176Cys の修飾を介した TH の活性阻害

- (A) WT 及び C176A 変異体タンパク質の NEM 反応後の活性測定の結果。TH (5 μ M) を 100 μ M の NEM または 10 μ M の DA と 25°C で 30 分間反応させたのち活性測定を行った。活性測定の反応溶液は pH 7.4 で行った。測定は 3 回行い、Ctrl (WT : 141 ± 18.1 nmol/min/mg、 C176A : 124 ± 15.1 nmol/min/mg) との相対値を平均値 $\pm$ 標準偏差で結果を表した。
- (B) WT 及び C176A 変異体タンパク質の NEM 反応後の質量分析の結果。TH (5 μ M) を 100 μ M の NEM と 25°C で 30 分間反応させたのちにタンパク質を濃縮し、MALDI-TOF MS で質量分析を行った。

3.4.4. NEM の修飾による速度論的パラメータの変化

NEM の修飾により TH 活性の速度論的パラメータがどのように変化しているかを調べるため TH の基質である L-tyrosine と補酵素である BH4 に対して TH と NEM との反応後に速度論解析を行った (Fig. 27、Table 30)。NEM の Cys176 への修飾により L-tyrosine の K_m は増大する一方で、BH4 の K_m は減少した。 V_{max} は BH4 が 250 μ M 及び L-tyrosine が 50 μ M の条件でともに大きく減少した。これらの結果から NEM の Cys176 への修飾により TH の基質へのアフィニティーを変化させ V_{max} を大きく減少させることが分かった。また、生体内の各基質の濃度は L-tyrosine が数十 μ M、BH4 が数 μ M である^{48,49}。そのため、この K_m の変化及び V_{max} の減少は生体内でシステイン残基への修飾が起きるときに TH 活性に影響を与える可能性があることを示している。

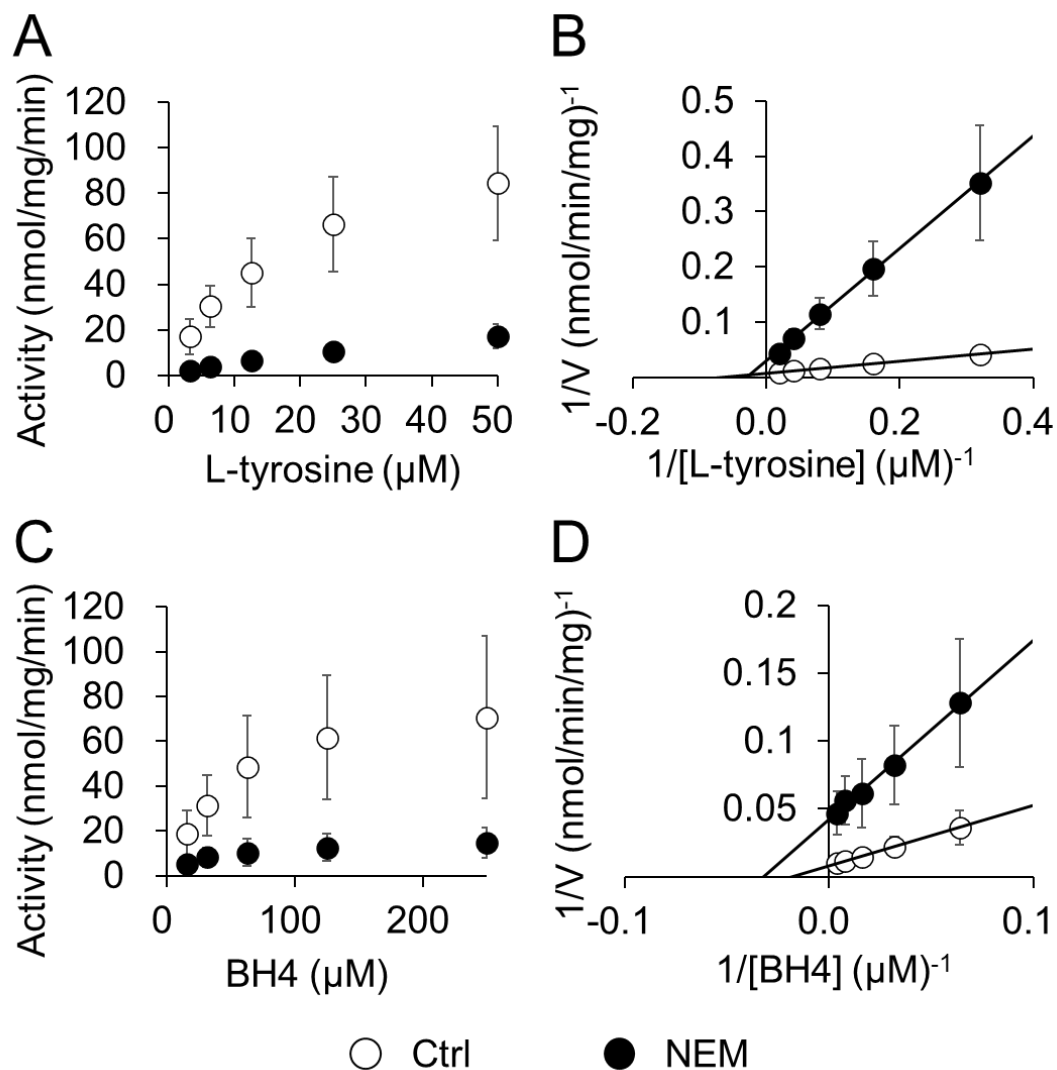


Fig. 27. NEM 修飾後の TH の速度論解析の結果

TH ($5 \mu\text{M}$) を $100 \mu\text{M}$ の NEM と 25°C で 30 分間反応させたのち、 $250 \mu\text{M}$ の BH4 と各濃度の L-tyrosine を用いた活性測定 (A、B) および $50 \mu\text{M}$ の L-tyrosine と各濃度の BH4 を用いた活性測定 (C、D) を行った。活性測定の反応溶液は pH 7.4 で行った。測定は 4 回行い、結果は平均値 $\pm$ 標準偏差で表記し、S-V プロット (A、C) および Lineweaver-Burk プロット (B、D) を用いて表した。

Table 30. NEM 修飾後の TH の速度論的パラメータの変化

	L-tyrosine		BH4	
	K_m (μ M)	V_{max} (nmol/min/mg)	K_m (μ M)	V_{max} (nmol/min/mg)
Ctrl	15 $\pm$ 3	141 $\pm$ 24	57 $\pm$ 5	138 $\pm$ 37
NEM	35 $\pm$ 10	35 $\pm$ 8	32 $\pm$ 9	26 $\pm$ 8

Fig. 27 のデータを用いて Lineweaver-Burk プロットを作成し、各速度論的パラメータを算出した。測定は 4 回行い、平均値 $\pm$ 標準偏差で示した。

3.4.5. DA 結合がシステイン残基への修飾に与える影響

既知の TH の活性制御機構である DA 結合による TH の活性阻害において、DA は TH の活性部位に存在する鉄に結合し、TH は不活性化状態になる。この時、DA 結合は制御ドメインが活性部位を覆うような構造変化を引き起こすと考えられている。そのため、DA 結合が NEM の Cys176 への修飾にどのような影響があるかを調べるために、TH を DA と反応させた DA 結合型の TH に対して NEM を反応させ、NEM との反応時間ごとの TH の活性を測定した (Table 31)。

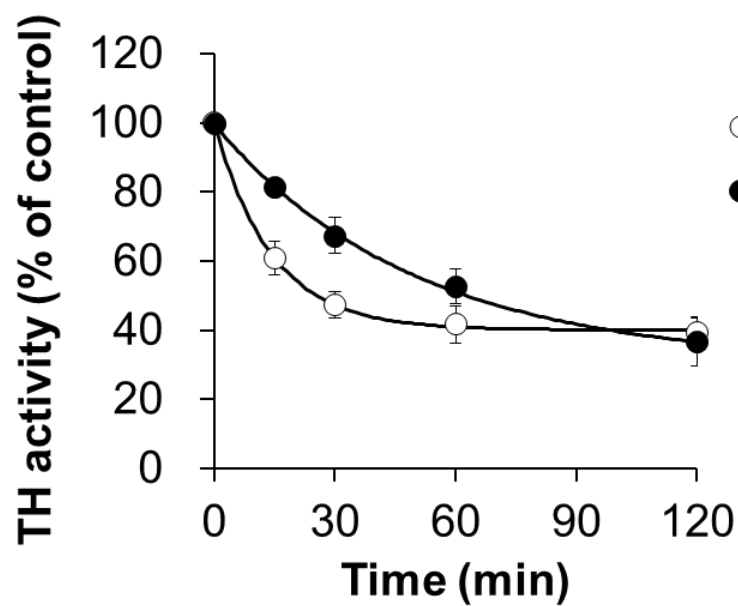
Table 31. DA 結合による NEM の TH の活性阻害への影響

Time (min)	TH activity (nmol/min/mg)			
	- DA		+ DA	
	- NEM	+ NEM	- NEM	+ NEM
0		108 $\pm$ 26		39 $\pm$ 12
15	107 $\pm$ 24	66 $\pm$ 19	36 $\pm$ 10	29 $\pm$ 8.0
30	108 $\pm$ 26	52 $\pm$ 16	36 $\pm$ 10	25 $\pm$ 8.4
60	105 $\pm$ 25	45 $\pm$ 15	33 $\pm$ 9.9	18 $\pm$ 6.3
120	99 $\pm$ 25	40 $\pm$ 14	31 $\pm$ 8.4	12 $\pm$ 4.9

TH (10 μ M) を 100 μ M の DA と 25°C で 5 分間反応させたのち、10 μ M の NEM と 4°C で各時間反応させ活性測定を行った。コントロールとして DA を加えなかったサンプル、NEM を加えなかったサンプルを同時に測定した。DA の結合による TH の活性阻害の影響を抑制するために活性測定の反応溶液は pH 6.0 で行った⁴⁷。測定は 3 回行い、平均値 $\pm$ 標準偏差で結果を表した。

さらに、各反応時間の NEM を反応させなかったサンプルに対する NEM を反応させたサンプルの相対値をそれぞれプロットし、3.3.4 の式でフィッティングを行い、擬一次速度定数を算出した (Fig. 28A)。NEM の TH に対する活性の減少の速度定数は DA 非結合時には 0.070 min^{-1} に対して DA 結合時には 0.020 min^{-1} となり、DA 結合によって NEM による TH の活性減少が 3 倍ほど遅くなることが分かった。また、DA 結合が TH への NEM の修飾に影響を与えているか確認するために、NEM と 15 分間反応させたサンプルを用いて質量分析を行った (Fig. 28B)。DA 非結合状態の TH では NEM 修飾型の TH のピークが多く見られるのに対して、DA 結合型の TH では NEM 未修飾型の TH のピークが多く残っていた。これらの結果から、DA 結合や DA 結合によって引き起こされる構造変化は TH の Cys176 への反応性やアクセシビリティを減少させると考えられる。

A



B

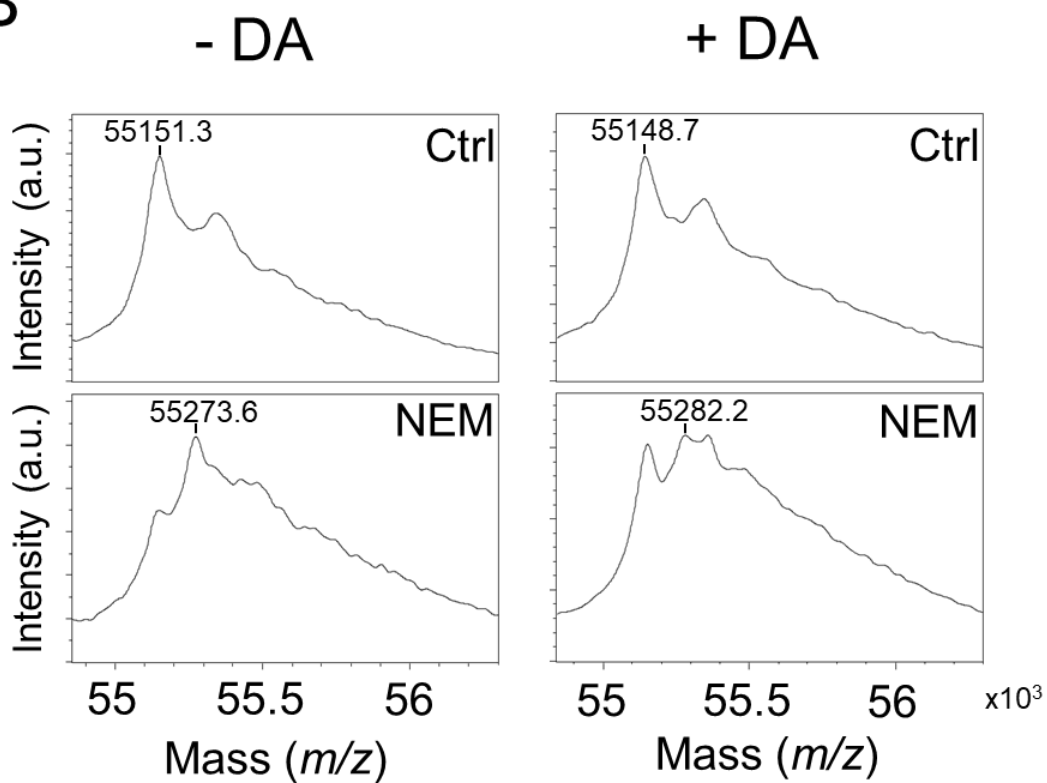


Fig. 28. DA 結合による NEM の TH の活性阻害、修飾への影響

- (A) Table 31 の結果を用いて、各反応時間の NEM を反応させなかったサンプルに対する NEM を反応させたサンプルの相対値をそれぞれプロットし、3.3.4 の式でフィッティングを行った。結果は平均値±標準偏差で表した。
- (B) Table 31 および Fig.28A の NEM との反応時間が 15 分間のサンプルの質量分析の結果。サンプルのタンパク質を濃縮したのちに MALDI-TOF MS で質量分析を行った。TH の NEM 未修飾型のピーク及び NEM 修飾型のピークの移動を矢印で表した。

3.4.6. S40E 変異がシステイン残基への修飾に与える影響

TH の活性制御機構としてよく知られている Ser40 のリン酸化は制御ドメインの構造変化を介して DA 結合を抑制し、TH を活性化状態にする。この Ser40 のリン酸化が NEM の Cys176 への修飾による TH の活性の減少にどのような影響があるかを確認するために、Ser40 のリン酸化を模倣した S40E 変異を WT 及び C176A 変異体タンパク質に加え、S40E、S40E/C176A 変異体タンパク質を製作した²⁶。各 TH を NEM と反応させたのちに活性測定を行った (Fig. 29A)。WT と C176A では DA 結合による活性阻害が生じていた (Fig. 26A) が S40E 変異体タンパク質では DA 結合による活性阻害が抑制された。一方で、S40E 変異体タンパク質であっても NEM による TH の活性減少は WT と同様に生じ、これは S40E/C176A 変異体タンパク質では抑制された。次に、NEM の TH への修飾も同様に起きるかを確認するために質量分析を行った (Fig. 29B)。S40E 変異体タンパク質では WT (Fig. 26B) と同様に NEM との反応による質量の増加を確認した。一方で、S40E/C176A 変異体タンパク質では NEM による質量の増加は抑制された。これらの結果から NEM による TH の Cys176 への修飾および TH の活性減少は Ser40 のリン酸化とは無関係に起こると考えられる。生体内において、DA が結合した不活性化状態の TH は、Ser40 のリン酸化によって DA が解離して活性化状態になる。リン酸化した Ser40 を模倣した S40E 変異体タンパク質に対しても TH の Cys176 への修飾がその活性を減少させることから、Cys176 への修飾は生体内において TH を強く阻害する制御機構であることを示唆している。

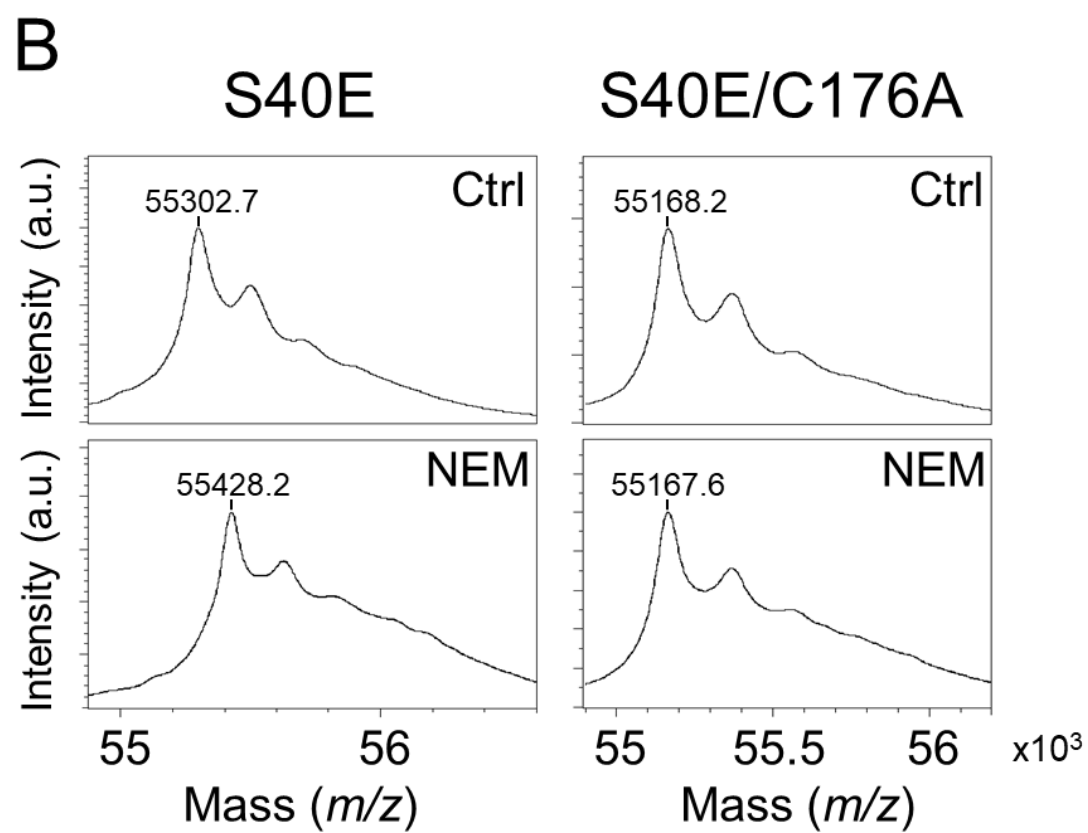
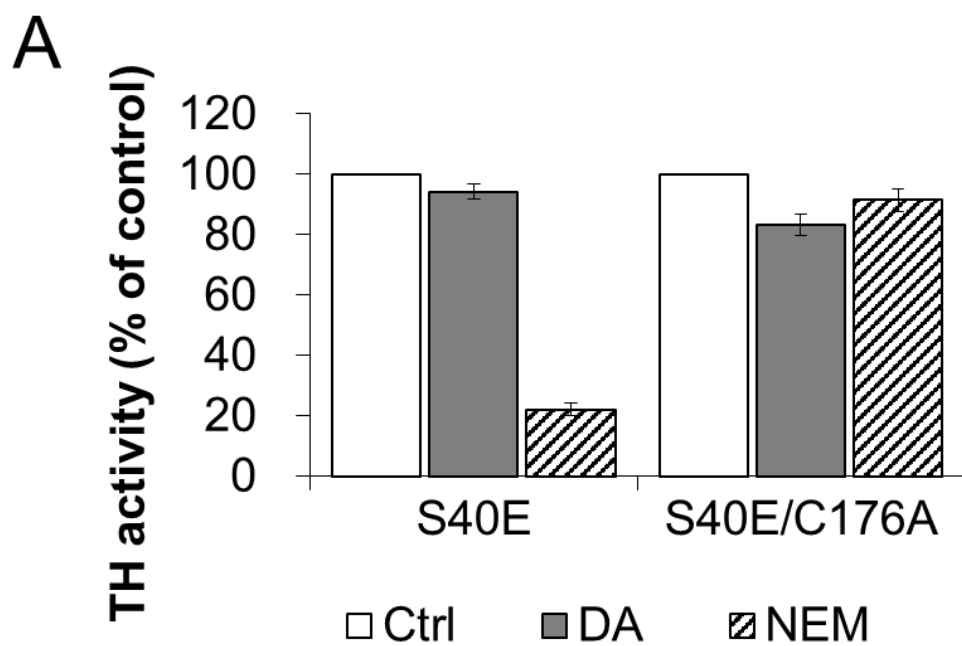


Fig. 29. リン酸化による NEM の TH の活性阻害への影響

- (A) S40E 及び S40E/C176A 変異体タンパク質の NEM 反応後の活性測定の結果。
TH (5 μ M) を 100 μ M の NEM または 10 μ M の DA と 25°C で 30 分間反応させたのち活性測定を行った。活性測定の反応溶液は pH 7.4 で行った。測定は 3 回行い、Ctrl (S40E : 126 ± 18.3 nmol/min/mg、S40E/C176A : 115 ± 21.3 nmol/min/mg) との相対値を平均値 $\pm$ 標準偏差で結果を表した。
- (B) S40E 及び S40E/C176A 変異体タンパク質の NEM 反応後の質量分析の結果。
TH (5 μ M) を 100 μ M の NEM と 25°C で 30 分間反応させたのちにタンパク質を濃縮し、MALDI-TOF MS で質量分析を行った。

3.4.7. 制御ドメイン欠失変異とシステイン残基への修飾

TH の制御ドメインは DA 結合や Ser40 のリン酸化による構造変化をはじめとした TH の活性制御機構に関わっている (Fig. 2)。制御ドメインは天然変性領域 (1-40 a.a.)、制御ヘリックス領域 (40-60 a.a.)、ACT ドメイン (74-156 a.a.) に分けることができる (Fig. 3)。TH の天然変性領域は特定の構造を取っていないと考えられており、この領域についての構造はまだ解かれていない。制御ヘリックス領域は Ser40 を含んだ領域である。また、重水素置換速度の解析から、DA 結合により触媒ドメインに相互作用する領域 (35-71 a.a.) であることが示されている¹⁰。そのため、この領域は TH の DA 結合や Ser40 のリン酸化による構造変化を介した活性制御機構に大きく影響を与えと考えられる。ACT ドメインは TH サブユニット間で二量体を形成し、TH の四量体構造に寄与する領域である。PAH においては二量体形成の他に、基質の認識を介して PAH の活性制御を行うことが知られているが、TH において活性制御に与える役割は分かっていない²⁰。

本研究では Cys176 への修飾による TH の活性阻害が制御ドメインの影響を介しているかを調べるために、天然変性領域の 33 番目のアミノ酸までを欠損した変異体タンパク質 (DEL33)、制御ヘリックスを含む領域までを欠失させた変異体タンパク質 (DEL76)、最後に ACT ドメインを含む制御ドメインすべてを除いた変異体タンパク質 (DEL156) をそれぞれ作製した。また、それぞれの制御ドメイン欠失変異体タンパク質に対して、さらに C176A 変異を加えた計 6 つの変異体タンパク質を作製した。これらの変異体タンパク質を WT や S40E、S40E/C176A 変異体タンパク質と共に BL21 (DE3) を用いて発現させ、大腸菌ラ

イセートを作製した。これら的大腸菌ライセートに対して NEM を加えたのち活性測定を行った (Fig. 30)。WT および S40E 変異体タンパク質は NEM との反応により活性を減少させ、これは S40E/C176A 変異体タンパク質では抑制された。大腸菌ライセート中の TH の活性を測定した結果として、Fig. 30 の WT の活性は Fig. 25 の WT 活性よりも増加した。この結果は、発現誘導時の条件により TH タンパク質の発現量に差が生じたため、大腸菌ライセート中の TH タンパク質の量が異なっているために生じたと考えられる。DEL33、DEL76、DEL156 の制御ドメイン欠失変異体タンパク質においては、いずれも NEM との反応によって TH の活性は減少した。また、この NEM による活性減少は C176A の変異によって抑制された。これらの結果は Cys176 への修飾による TH の活性の減少が、DA 結合や Ser40 のリン酸化のような制御ドメインを介した制御機構ではないことを示した。

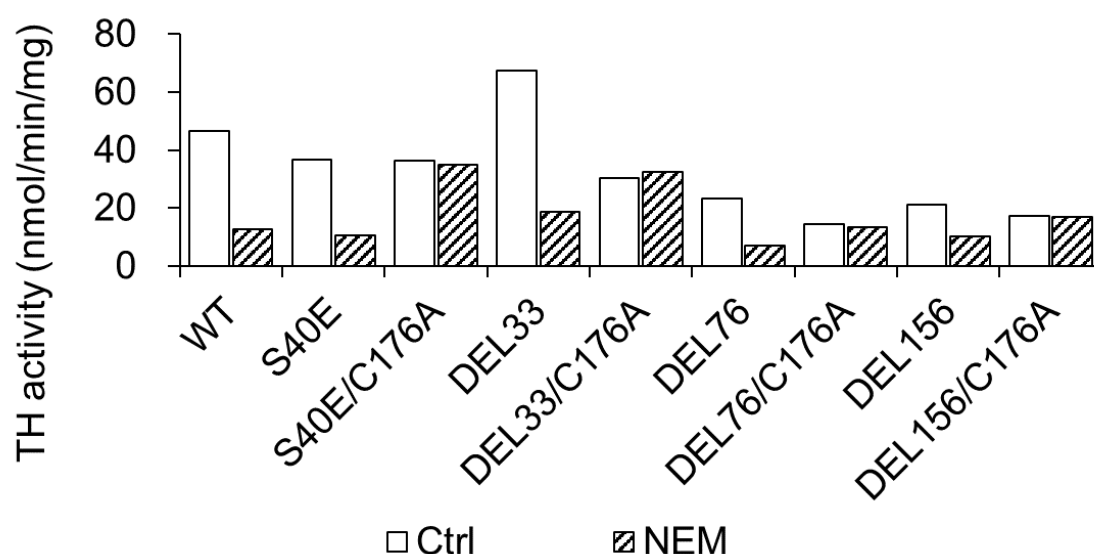


Fig. 30. 制御ドメインの欠失による NEM の TH の活性阻害への影響

制御ドメイン欠失した TH 変異体タンパク質を発現した BL21 (DE3) ライセートを 25°C で 30 分間 100 μ M の NEM と反応させた。活性測定の反応溶液は pH 7.4 で行った。測定は 2 回行い、その比活性の平均値で結果を示した。

3.4.8. DA 酸化物の調製と分析

NEM は Cys176 への修飾を介して TH の活性を減少させた。本研究では NEM をシステイン残基への修飾のモデル化合物として用いたが、NEM は生体内に存在する化合物ではない。そこで、生体内に存在するシステイン残基を修飾する物質においても TH のシステイン残基への修飾を介した活性阻害が起きるかを確認するために、TH が発現している DA ニューロンにおいて存在し、タンパク質のシステイン残基へ修飾することが報告されている DA 酸化物に着目した。本研究では DA 酸化物は DA をチロシナーゼと反応させることで調製した。DA 酸化物の生成と分子種を確認するために吸光度測定および質量分析を行った (Fig. 31)。吸光度測定の結果、調製された DA 酸化物は 480 nm に吸収ピークを持つことが分かった。キノン化合物は 480 nm に吸収波長をもつことが知られている³⁹。このことからチロシナーゼと DA の反応によりキノン体の DA 酸化物が生成されていることを確認した。また、LC/MS による質量分析を行った結果、DA 酸化物から DA とは異なる保持時間のピークが検出された。このピーク中のマススペクトルの結果において 150 m/z の質量をもつ物質を含んでいることが分かった。DA 酸化物のうち、この分子量に相当するものは AC もしくは DHI である⁵⁰。キノン体であることを踏まえると、今回調製された DA 酸化物サンプルの中には AC が存在していると考えられる。

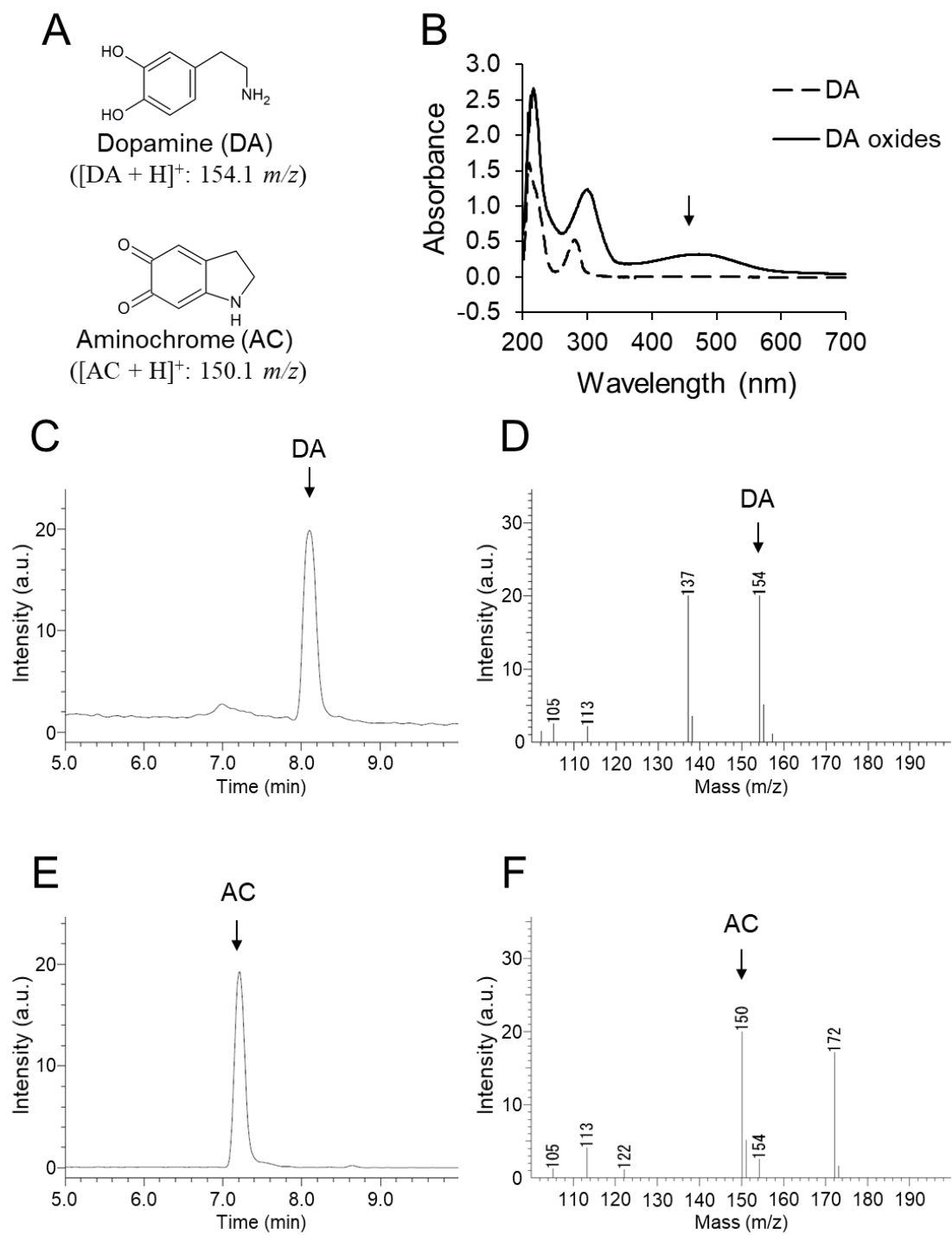


Fig. 31. DA 酸化物の分析

- (A) DA 及び AC の構造と理論上の m/z 。
- (B) DA (破線) 及び DA 酸化物 (実線) の 200 nm から 700 nm までの吸収スペクトル。480 nm のピークを矢印で示した。
- (C) DA の LC/MS による質量分析のクロマトグラム。8.1 min のピークを矢印で示した。検出範囲は 145 m/z から 155 m/z までの質量電荷比で表示した。
- (D) Fig. 31C の 8.1 min でのマススペクトル。DA に相当する 154 m/z のピークを矢印で示した。
- (E) AC の LC/MS による質量分析のクロマトグラム。7.2 min のピークを矢印で示した。検出範囲は 145 m/z から 155 m/z までの質量電荷比で表示した。
- (F) Fig. 31E の 7.2 min でのマススペクトル。AC に相当する 150 m/z のピークを矢印で示した。

3.4.9. DA 酸化物が TH に与える影響

WT 及び S40E、C176A、S40E/C176A 変異体タンパク質に DA 酸化物を反応させたのちに活性測定と質量分析を行った (Fig. 32、Fig. 33)。WT において DA 酸化物との反応により活性の減少が引き起こされた一方で、C176A 変異体タンパク質においては DA 酸化物による活性の減少が抑制された。また、質量分析の結果では WT において DA 酸化物との反応による明確な質量ピークの移動は見られなかったものの、未修飾型の TH の割合の減少と質量の増加が確認された。一方で、C176A においてはそのようなピークの変化は確認できなかったため、DA 酸化物は NEM と同様に Cys176 への修飾を介して TH の活性を減少させていると考えられる。しかし、S40E および S40E/C176A 変異体タンパク質において DA 酸化物は C176A 変異に関係なく TH の活性減少を引き起こした。一方で、質量分析の結果では、C176A 変異により DA 酸化物のシステイン残基への修飾が抑制された。これらの結果から、DA 酸化物にはシステイン残基への修飾によらず、S40E 変異を加えられた活性型 TH の活性を減少させる別の機構があると思われる。しかし、この機構について本研究では明らかにすることはできなかった。本研究で用いた DA 酸化物のサンプル中には AC の他にも DA とチロシナーゼとの反応や TH との反応中に生じる副反応物や DHI をはじめとした他の DA 酸化物などが生成する可能性がある。そのため、これらの物質が TH、特に S40E 変異体タンパク質の活性に影響を与えた可能性が考えられる。

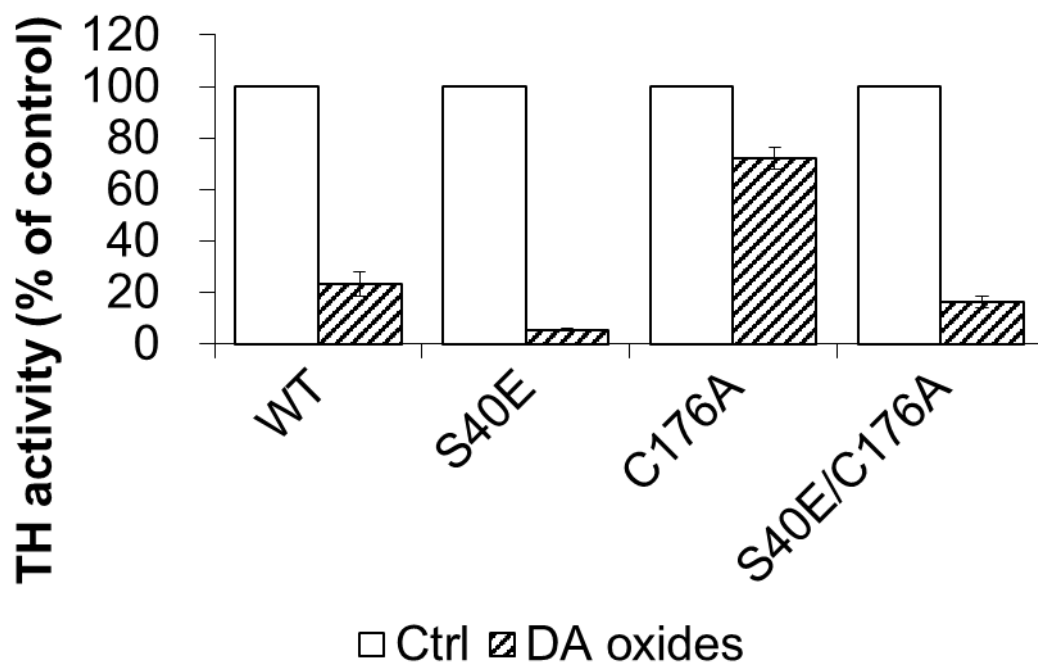


Fig. 32. DA 酸化物による TH の活性阻害

WT 及び S40E、C176A、S40E/C176A 変異体タンパク質の NEM 反応後の活性測定の結果。TH (5 μ M) を 100 μ M の NEM または 10 μ M の DA と 25°C で 120 分間反応させたのち活性測定を行った。DA 酸化物中に含まれる未反応の DA による TH の活性阻害の影響を抑制するために、活性測定の反応溶液は pH 6.0 で行った⁴⁷。測定は 3 回行い、Ctrl (WT : 127 ± 68.4 nmol/min/mg、S40E : 91 ± 40.4 nmol/min/mg、S40E : 145 ± 72.3 nmol/min/mg、S40E/C176A : 113 ± 65.6 nmol/min/mg) との相対値を平均値 $\pm$ 標準偏差で結果を表した。

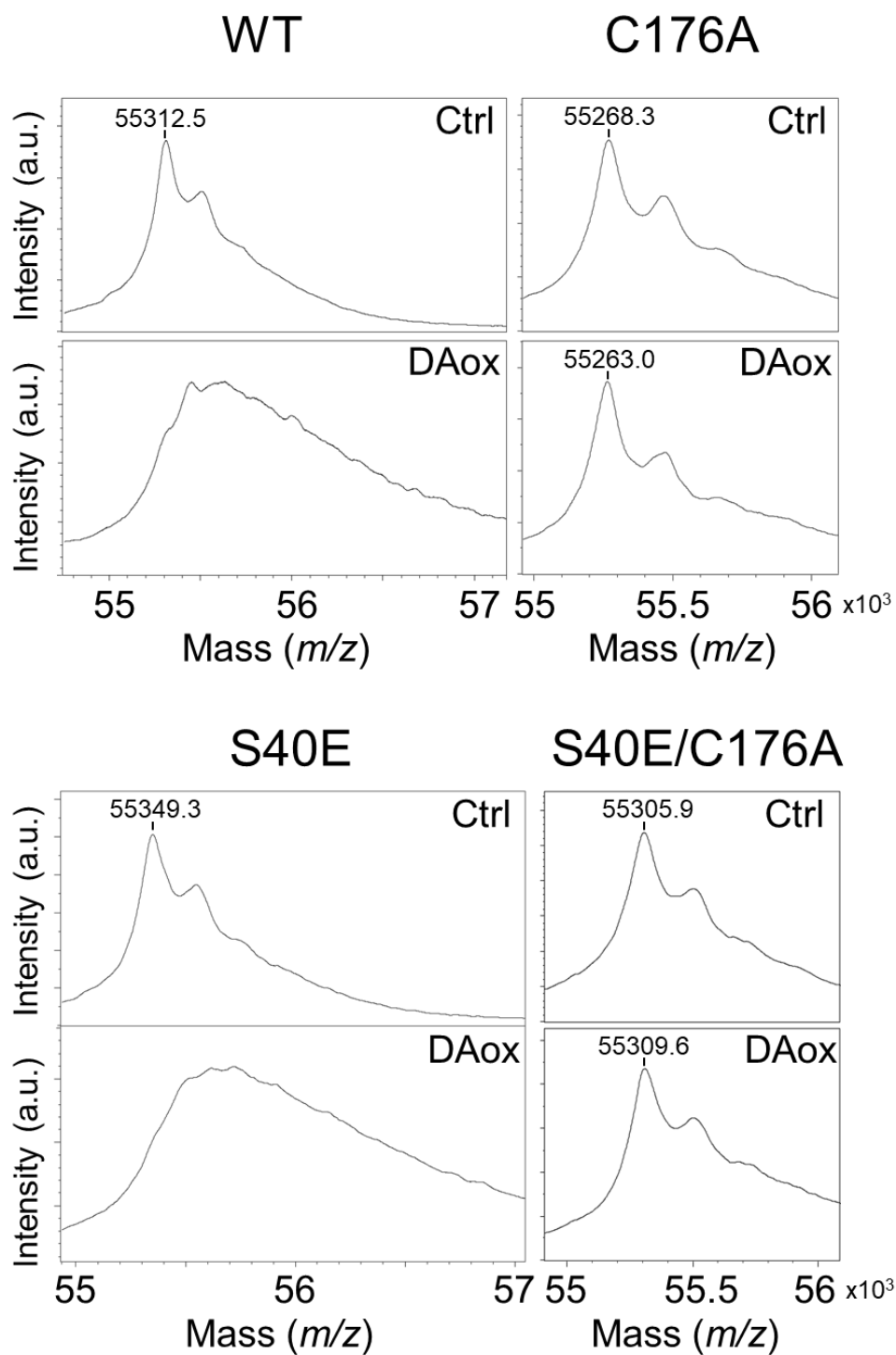


Fig. 33. DA 酸化物による TH のシステイン残基への修飾

WT 及び S40E、C176A、S40E/C176A 変異体タンパク質の DA 酸化物 (DAox) との反応後の質量分析の結果。TH (5 μ M) を 100 μ M の DA 酸化物と 25°C で 120 分間反応させたのちにタンパク質を濃縮し、MALDI-TOF MS で質量分析を行った。

3.5. 考察

TH は DA 生合成経路の律速段階で働く酵素であり、TH の活性は DA 生合成に大きくかわる。したがって、その活性は DA 結合や Ser40 のリン酸化をはじめとした様々な機構によって制御されている。本研究では、TH のシステイン残基への修飾による活性減少に注目し、その制御機構についての分子機構の詳細について調べた。本研究では TH のシステイン残基への修飾のモデル化合物として中性条件下において、システイン残基特異的な高い反応性を有した修飾剤である NEM を用いた。その結果、TH は NEM との反応によって活性の減少を引き起こすことが分かった (Fig. 24)。一方で GSSG や GSNO をはじめとした酸化修飾を引き起こす化合物との反応に関してはわずかな影響しか起こらなかった (Fig. 24)。培養細胞や脳組織を用いた研究で TH がグルタチオン化やニトロシル化を受けることはすでに報告されているが、本研究においては再現しなかった^{42,43}。これらの先行研究と比較した際、本研究の実験条件とは TH の調製方法や活性測定の方法などが異なっている。本研究では先行研究の結果と一致しなかった原因を明らかにすることはできなかったが、このような実験条件の違いが結果に影響を与えた可能性がある。

本研究では NEM 及び DA 酸化物が TH の Cys176 への修飾を介して活性の減少を引き起こしていることを活性測定や質量分析を行うことで示した (Fig. 25、Fig. 26)。TH には 7 つのシステイン残基があるにもかかわらず、Cys176 のみ NEM や DA 酸化物が修飾することが分かった。この結果は、第 2 章の考察でも述べたように Cys176 の反応性や外部とのアクセシビリティが TH の他のシステイン残基よりも高いことを示唆している。また、Cys176 は TH の構造上で分子内及びサブユニットの他のシステイン残基との間にジスルフィドを形成するような位置には存在していない。そのため、生体内においても TH の Cys176 は他のシステイン残基とジスルフィドを形成せず、反応性の高いチオール基として存在していると考えられ、DA 酸化物のようなシステイン残基を修飾する化合物と反応する可能性がある。また、TH の Cys176 は広い生物種間で保存されているため、Cys176 や Cys176 への修飾は生体内での TH の構造や活性制御に重要である可能性が考えられる (Fig. 34)。

HUMAN	LLSGV----RQVSED-----VRSPAGPKVPWFPRKVSELDK C HHLVTKFDPDLDDLHHPG	193
RAT	LLSSV----RRVSDD-----VRSAREDKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDDLHHPG	194
MOUSE	LLSSV----RRVSDD-----VRSAREDKVPWFPRKVSELDKCHHLVTKFDPDLDDLHHPG	194
DROME	LIRSL----RQSGSFSSMNLMDNNLNKAPWFPKHASELDNCNHLMTKYEPDLDMNHHPG	272
CAEEL	SAELLTQNHVALTKFSIFAKKLSDEKNQSQIWFPRIHSELQCSKCITKYEPTTDPRHHPG	210
	: . . . ****:****:* : **:*** * ***	

Fig. 34. 生物種間の TH タンパク質配列のアライメント

タンパク質アミノ酸配列データベースである The Universal Protein Resource (UniProt)を用いて、各生物種の TH のアミノ酸配列の取得とアライメントを行った。アライメントは Homo sapiens (HUMAN)、Rattus norvegicus (RAT)、Mus musculus (MOUSE)、Drosophila melanogaster (DROME)、Caenorhabditis elegans (CAEEL)の5種類の生物種について比較した。アスタリスク (*) を用いてグループ間で完全に保存されている位置を、コロン (:) を用いてグループ間で高い類似性を持つ位置を、ピリオド (.) を用いてグループ間で低い類似性を持つ位置をそれぞれ示した。ヒト TH の Cys176 を赤色で表記した。

本研究において、DA 結合は TH の Cys176 への NEM の修飾および活性の減少を抑制することが示された (Fig. 28)。この結果は、DA 結合により Cys176 の反応性やアクセシビリティが減少したためと考えられる。しかし、Cys176 は DA 結合部位や DA 結合によって構造変化を起こす制御ドメインの近傍に存在していない (Fig. 35)。一方で、フレキシブルループと呼ばれる Cys176 からはじまるループ構造は DA の結合によって構造変化を起こすことが報告されている¹⁸。そのため、DA 結合によるフレキシブルループの構造変化が Cys176 の反応性やアクセシビリティを減少させた可能性が考えられる。

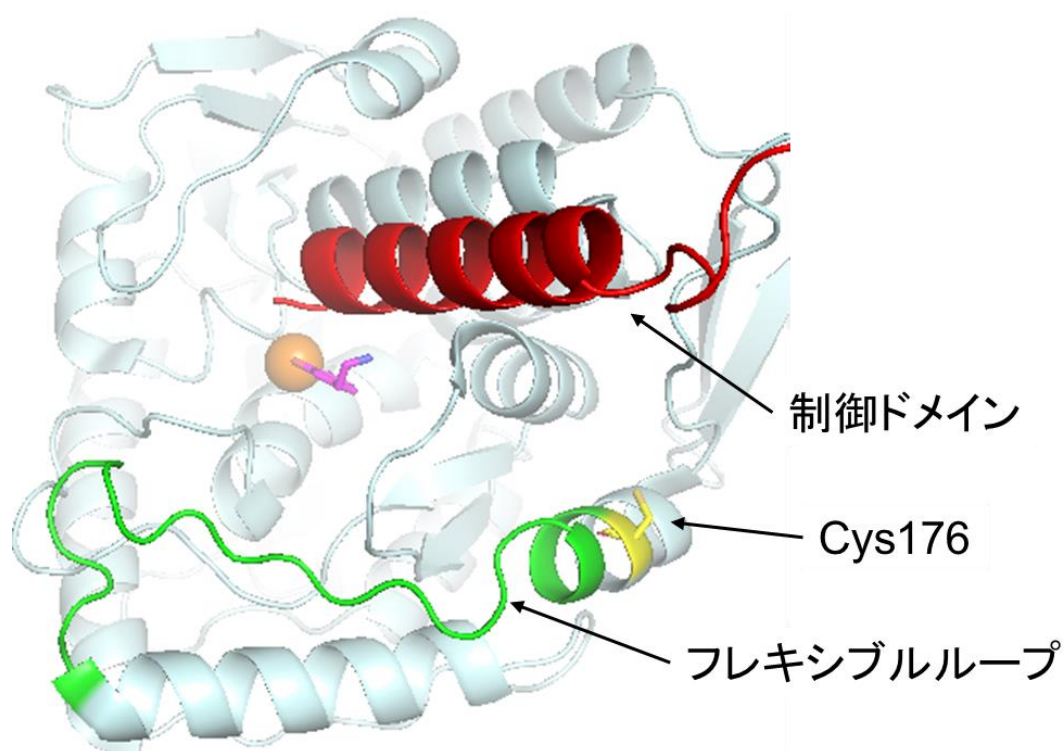


Fig. 35. Cys176 と制御ドメイン、フレキシブルループの構造

DA 結合した TH の構造 (PDB ID : 6ZVP) を PyMOL で各部位に色を付けて表記した。鉄 (活性部位) はオレンジ色の球体、DA はピンク色のスティックで表した。制御ドメインは赤色、フレキシブルループは緑色で示した。Cys176 は黄色のスティックで表した。

Cys176 への修飾は $V_{\max}$ の大きな減少、L-tyrosine の K_m の増加と BH4 の K_m の減少を引き起こした (Table 30)。既知の阻害機構である DA 結合の場合には制御ドメインの構造変化を伴い、結果として BH4 の K_m を増加させるが $V_{\max}$ については大きく変化しない⁵¹。また、制御ドメインの欠失は DA 結合による TH の活性阻害を抑制することが知られている¹¹。一方、本研究において制御ドメインを欠失させた TH 変異体タンパク質に対して NEM による活性の減少と C176A 変異による活性減少の抑制が起きたことから、Cys176 への修飾による活性阻害は制御ドメインの影響を受けない阻害機構であると考えられる。これらの速度論的パラメータへの影響や制御ドメインの寄与の違いから、Cys176 への修飾による TH の活性の阻害は既知の制御である DA 結合による阻害機構とは異なるメカニズムであると考えられる。

Cys176 は TH の活性部位近傍に位置していないにもかかわらず、Cys176 への修飾は TH の活性を減少させた。TH の触媒ドメインに存在するフレキシブルループは DA 結合によって構造変化を引き起こすことが報告されており、Cys176 はこのループの N 末端部位に位置している¹⁸。また、フレキシブルループの構造的な柔軟性は TH 活性に影響を与える領域であると考えられており、フレキシブルループへの変異導入は TH の K_m の変化および活性の減少を引き起こすことが報告されている²⁷。例えば、F183A 変異は L-tyrosine と BH4 の K_m を減少させ、 V_{max} を大きく減少させる。一方で、C176A の変異は L-tyrosine と BH4 の K_m を増加させるが、 V_{max} にはほとんど影響を与えない。このような速度論的パラメータの変化は本研究で得られた Cys176 への修飾による速度論的パラメータの変化と近い挙動を示している。そのため、Cys176 が活性部位近傍に位置していなくとも、Cys176 への修飾はフレキシブルループへの影響を介して TH の活性を制御する可能性が考えられる。また、本研究において WT の比活性が 141 nmol/min/mg なのに対して、C176A 変異体タンパク質は 124 nmol/min/mg となっており、C176A 変異そのものは先行研究と同様に TH の活性に大きく影響を与えなかった²⁷。一方で、TH 欠損症やドーパ反応性ジストニアの患者の遺伝子解析において TH の C176Y 変異が同定されており、C176Y 変異が TH の活性を減少させることが報告されている^{52,53}。これらの事実から、Cys176 のかさ高い残基への変異や NEM、DA 酸化物などの修飾による TH の活性の減少は Cys176 のチオール基の欠失によるものではなく、それらの変異や修飾による立体障害などがフレキシブルループの構造変化や柔軟性に影響を与えたためである可能性が考えられる。

TH は生体内において DA が結合した不活性型と Ser40 がリン酸化された活性型のいずれかの状態になっていると考えられている。本研究では、活性型 TH の模倣体である S40E 変異体タンパク質において NEM の Cys176 への修飾によって TH の活性が減少することを示した (Fig. 29)。また、DA 酸化物によって生じた TH の活性減少が C176A 変異によって抑制されたことから、DA 酸化物は NEM と同様に Cys176 への修飾を介した TH の活性減少を起こすと考えられる (Fig. 32、Fig. 33)。一方で、DA 酸化物は NEM と異なり S40E 変異体タンパク質に対しては C176A の変異の有無にかかわらず TH の活性を減少させた

(Fig. 32、Fig. 33)。そのため、DA 酸化物はシステイン残基への修飾とは別に未知の分子機構によって活性型の TH に対する特異的な活性減少を引き起こす可能性が考えられる。この未知の機構について本研究で明らかにすることはできなかったが、S40E 変異体タンパク質で見られた DA 酸化物による質量変化が S40E/C176A 変異体タンパク質では見られなかったことから、少なくとも TH に修飾するといった機構ではないと考えられる。

生体内においては、活性型の TH とその後の酵素反応により DA は生合成されている。DA は通常、シナプス小胞に取り込まれて神経伝達物質として作用するか、あるいは細胞質内で代謝される。しかし、一部の DA は細胞質内の中性条件下において非常に不安定であり、酸化ストレスや酸化酵素などにより酸化されることで AC をはじめとした DA 酸化物を形成する。通常、DA 酸化物はシステインやグルタチオンなどの内在性のチオール基との反応や DT-ジアホラーゼをはじめとした還元酵素により無毒化され、タンパク質への修飾を介した神経毒性は抑制されていると考えられる⁵⁴。

一方で、DA ニューロンの脱落に伴い運動障害が生じるパーキンソン病では最も主要な発症のリスク要因は高齢化であるとされており²、病理学的な特徴として酸化ストレスやシステイニルドパミンが健常者より増加していることが報告されている^{55,56}。また、TH を過剰発現させたマウスの脳内でグルタチオンの減少やシステイニルドパミンが増加することが報告されている⁵⁷。システイニルドパミンは DA 酸化物が細胞内在性のチオール基に修飾されることで生成する物質である。そのため、高齢化や TH の活性異常などによる酸化ストレスや細胞質内の DA 量の増加は、DA 酸化物などのチオール基を修飾する物質を増加させる可能性が考えられる。

AC をはじめとしたキノン体がタンパク質に修飾したものはキノプロテインと呼ばれている。ラットの複数の脳領域のうち、DA ニューロンが多く存在する黒質において週齢に伴ってキノプロテインが増加することが報告されている⁵⁸。また、ヒトの神経芽細胞株である SH-SY5Y 細胞は DA の添加によってキノプロテインの増加が起きることが報告されている⁵⁸。そのため、DA 酸化物の生成が増加するような環境では TH のシステイン残基への修飾が生じる可能性が考えられる。

本研究において、NEM や DA 酸化物の Cys176 への修飾は還元剤存在下での活性測定であっても TH の活性を減少させた。そのため、Cys176 への修飾による活性阻害は不可逆的な阻害機構であると考えられる。一方、生体内の TH の活性制御機構としてよく知られている DA 結合による活性阻害は Ser40 のリン酸化によって解除されるため、可逆的な阻害機構であると考えられる。そのため、生体内において DA 酸化物による TH の Cys176 への修飾が起きた場合には、DA 結合と異なり TH が再び活性を取り戻すことは難しく、TH は最終的に分解されるか細胞内に蓄積して凝集するかのどちらかの経路をたどると考えられる。そのため、TH のシステイン残基への修飾が TH の分解や凝集性にどのような影響を与えるかについて調べていく必要がある。

TH のシステイン残基の修飾が生体内で起きる場合、生理学的な意義として以下のことが考えられる。一つは DA 酸化物の細胞内毒性に対する安全弁としての役割である (Fig. 36)。TH の活性により生成された DA の一部は DA 酸化物へと酸化されていく。DA 酸化物は酸化ストレスの産生やグルタチオンおよびタンパク質のシステイン残基をはじめとしたチオール基への修飾を介した細胞内毒性を持つ。さらに SOD 2 や Gpx4 といった抗酸化酵素のシステイン残基への修飾を介した活性阻害により、酸化ストレスの悪循環が生まれる^{37,59}。DA 酸化物が活性型 TH の活性を減少させることは、生体内において過剰な DA 生合成を抑制し、DA 酸化物による悪循環を防ぐ安全弁としての役割があるのではないかと考えられる。

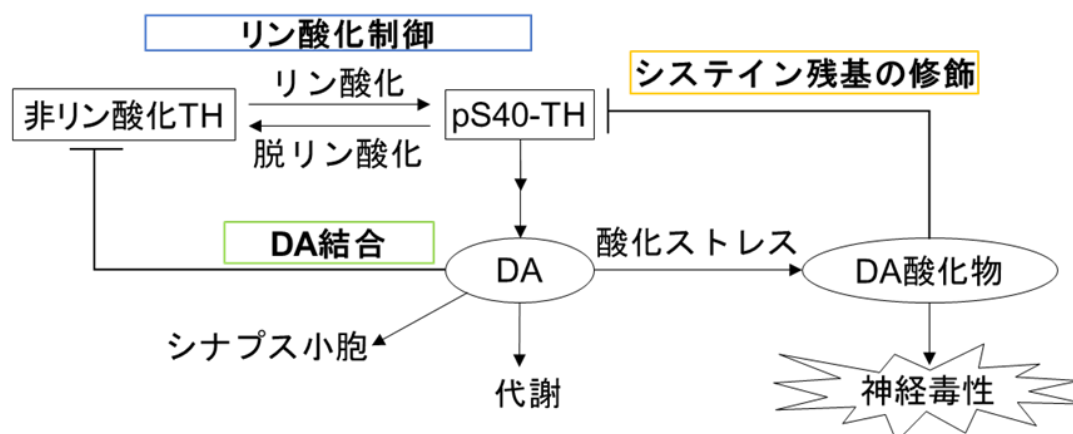


Fig. 36. DA 酸化物の TH への活性阻害による神経毒性の抑制

リン酸化型の TH によって生合成された DA の一部が酸化されることによって神経毒性が生まれる危険が存在する。DA 酸化物が活性型の TH の活性を減少させることで DA の生合成を抑制させる制御機構がある可能性が考えられる。

一方で、Cys176 への修飾による TH の活性阻害がパーキンソン病の進行に関わる可能性が考えられる。パーキンソン病における運動障害は DA ニューロンの変性による DA の減少が原因とされている²。パーキンソン病の病理学的な特徴としては酸化ストレスの増大の他にミトコンドリアやリソソームの機能喪失、凝集体の形成などが報告されている²。パーキンソン病の進行とともに細胞内の酸化ストレスが増大することによって TH のシステイン残基への酸化修飾が行われた場合、活性型の TH の活性減少が生じる。本来であれば、DA の減少は DA 結合した不活性型の TH の割合を減少させ、活性を取り戻した TH により生体内の DA 量は維持される。しかし、酸化されやすい環境下では DA 結合をしていない活性型の TH に対してもシステイン残基への修飾が起きることで、生体内の DA 量はますます減少することになる。このような DA 量の減少が結果としてパーキンソン病の運動機能障害の症状の原因となる可能性が考えられる。

第4章 総括

本稿では二つの TH に関する研究 (DA バイオセンサーの開発と TH のチオール基を介する活性制御機構) について記載した。第 2 章では細胞外の DA を検出できる DA バイオセンサーを開発するために、TH の DA 結合により生じる構造変化を利用した DA バイオセンサーの開発を試みた。TH に蛍光物質を修飾させた DA バイオセンサーの候補を複数作製し、DA 添加に伴う蛍光強度の変化が起きるか検討した。結果として、今回作製したすべての DA バイオセンサーの候補において蛍光強度の変化が観察された。また、蛍光物質の修飾位置によって蛍光強度変化率や S40E 変異の導入による影響が異なっていたことはそれぞれのアミノ酸残基の位置や領域の特徴が反映されたものと考えられる。これらの結果から、TH を用いた DA バイオセンサーは DA 応答性を持っていると考えられ、実用的な DA バイオセンサーの開発は不可能なものではないと思われる。しかし、今回作製された DA バイオセンサーは既存の DA バイオセンサーである dLight などと比べ、まだ有用であるとはいえない。

今後、TH を用いた DA バイオセンサーの開発を続けるためには、より効率的なスクリーニングができる実験系を考えていく必要がある。そこで、TH に対して蛍光物質を修飾させるのではなく、G-Camp のように cpGFP を導入した DA バイオセンサー (TH-cpGFP) の開発を目指すことを提案する。融合タンパク質によるバイオセンサーの開発であれば、ランダムな変異を導入したのちにスクリーニングを行うことで効率的な開発をすることができるという利点がある。

TH-cpGFP は自然に細胞外に配置されることはないため、細胞外の DA を検出するバイオセンサーとして活用するためには、EOS と同様に発現させた細胞から一度精製したのちに細胞膜表面上に配置させる必要がある。一方で、既存の DA バイオセンサーである dLight などと異なり、TH-cpGFP には細胞内 DA の検出を行うための DA バイオセンサーとして活用できる可能性がある。第 3 章で述べたように細胞質内に存在している DA は酸化されることによって毒性のある DA 酸化物を形成することが知られている。一方で細胞質内の DA を検出する方法は確立されておらず、実際に細胞質内にどの程度 DA が存在しているかは詳しくわかってはいない。そのため、TH-cpGFP は細胞内に発現させることによって細胞質内の DA の蓄積や代謝異常をモニタリングできるツールとしての活用が期待できる。

第3章ではシステイン残基への修飾による TH の活性制御に着目して研究を行った。その結果、TH は Cys176 への修飾を介して活性阻害を受けることが明らかとなった。また、生体内において活性型である Ser40 のリン酸化の模倣体である S40E 変異体タンパク質においても、システイン残基への修飾を介した活性阻害が起きることが分かった。このことは、システイン残基への修飾が生体内で起きる場合、考察で述べたように生理学的に非常に重要な意義を持っていると考えられる。しかしながら、このようなシステイン残基への修飾による TH の活性制御機構が実際に生体内に存在し、考察してきたような生理学的な意味を持っているか否かに関して本研究では示すことはできていない。細胞やモデル動物を用いた実験の例として、細胞内の DA 酸化物が増加した環境下において TH の C176A 変異の導入によって生体内の TH 活性や修飾がどのように変化するかを調べることで、TH のシステイン残基への修飾による活性制御が生体内で機能しているか、またその生理学的な役割について調べることができるかもしれない。今後このような培養細胞やモデル動物を用いた研究などにより、この研究がさらに発展することに期待している。

参考文献

1. Klein, M. O. *et al.* Dopamine: Functions, Signaling, and Association with Neurological Diseases. *Cell. Mol. Neurobiol.* **39**, 31–59 (2019).
2. Kalia, L. V. & Lang, A. E. Parkinson's disease. *The Lancet.* **386**, 896–912 (2015).
3. Guillot, T. S. & Miller, G. W. Protective actions of the vesicular monoamine transporter 2 (VMAT2) in monoaminergic neurons. *Mol. Neurobiol.* **39**, 149–170 (2009).
4. Salatino-Oliveira, A., Rohde, L. A. & Hutz, M. H. The dopamine transporter role in psychiatric phenotypes. *Am. J. Med. Genet. Part B Neuropsychiatr. Genet.* **177**, 211–231 (2018).
5. Burke, W. J. *et al.* Neurotoxicity of MAO Metabolites of Catecholamine Neurotransmitters: Role in Neurodegenerative Diseases. *NeuroToxicology.* **25**, 101–115 (2004).
6. Nagatsu, T., Levitt, M. & Udenfriend, S. Tyrosine hydroxylase the initial step in norepinephrine biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **239**, 2910–2917 (1964).
7. Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A. & Udenfriend, S. Elucidation of the ratelimiting step in norepinephrine biosynthesis in the perfused guinea-pig heart. *J. Pharmacol Exp. Ther.* **148**, 1–8 (1965).
8. Daubner, S. C., Le, T. & Wang, S. Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys.* **508**, 1–12 (2011).
9. Almas, B., Le Bourdelles, B., Flatmark, T., Mallet, J. & Haavik, J. Regulation of recombinant human tyrosine hydroxylase isozymes by catecholamine binding and phosphorylation: Structure/activity studies and mechanistic implications. *Eur. J. Biochem.* **209**, 249–255 (1992).
10. Wang, S., Sura, G. R., Dangott, L. J. & Fitzpatrick, P. F. Identification by hydrogen/deuterium exchange of structural changes in tyrosine hydroxylase associated with regulation. *Biochemistry.* **48**, 4972–4979 (2009).
11. Ota, A., Yoshida, S. & Nagatsu, T. Regulation of N-terminus-deleted human tyrosine hydroxylase type 1 by end products of catecholamine biosynthetic pathway. *J. Neural Transm.* **103**, 1415–1428 (1996).
12. Martínez, A., Haavik, J., Flatmark, T., Arrondo, J. L. R. & Muga, A. Conformational Properties and Stability of Tyrosine Hydroxylase Studied by Infrared Spectroscopy. *J. Biol. Chem.* **271**, 19737–19742 (1996).
13. Fujisawa, S. O. and H. A new mechanism for regulation of tyrosine 3-monoxygenase by end product and cyclic AMP-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* **260**, 2633–2635 (1985).
14. Kobayashi, K. *et al.* Structure of the Human Tyrosine Hydroxylase Gene: Alternative Splicing from a Single Gene Accounts for Generation Four mRNA Types. *J Biochem.*

- 103**, 907–912 (1988).
15. Arturo, E. C. *et al.* First structure of full-length mammalian phenylalanine hydroxylase reveals the architecture of an autoinhibited tetramer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 2394–2399 (2016).
 16. Zhang, S., Huang, T., Ilangovan, U., Hinck, A. P. & Fitzpatrick, P. F. The solution structure of the regulatory domain of tyrosine hydroxylase. *J. Mol. Biol.* **426**, 1483–1497 (2014).
 17. Bezem, M. T. *et al.* Stable preparations of tyrosine hydroxylase provide the solution structure of the full-length enzyme. *Sci. Rep.* **6**, 1–14 (2016).
 18. Bueno-Carrasco, M. T. *et al.* Structural mechanism for tyrosine hydroxylase inhibition by dopamine and reactivation by Ser40 phosphorylation. *Nat. Commun.* **13**, 74 (2022).
 19. Grant, G. A. The ACT Domain : A Small Molecule Binding Domain and Its Role as a Common Regulatory Element. *J. Biol. Chem.* **281**, 33825–33829 (2006).
 20. Meisburger, S. P. *et al.* Domain Movements upon Activation of Phenylalanine Hydroxylase Characterized by Crystallography and Chromatography-Coupled Small-Angle X-ray Scattering. *J. Am. Chem. Soc.* **138**, 6506–6516 (2016).
 21. Zoli, M. *et al.* The emergence of the volume transmission concept. *Brain Res. Rev.* **26**, 136–147 (1998).
 22. Shen, H. W. *et al.* Regional differences in extracellular dopamine and serotonin assessed by in vivo microdialysis in mice lacking dopamine and/or serotonin transporters. *Neuropsychopharmacology*. **29**, 1790–1799 (2004).
 23. Donita L Robinson, B Jill Venton, Michael L A V Heien, R. M. W. Detecting Subsecond Dopamine Release with Fast-Scan Cyclic Voltammetry in Vivo. *Clin. Chem.* **49**, 1763–1773 (2003).
 24. Namiki, S., Sakamoto, H., Iinuma, S., Iino, M. & Hirose, K. Optical glutamate sensor for spatiotemporal analysis of synaptic transmission. *Eur. J. Neurosci.* **25**, 2249–2259 (2007).
 25. Nakai, J., Ohkura, M. & Imoto, K. A high signal-to-noise Ca²⁺ probe composed of a single green fluorescent protein. *Nat. Biotechnol.* **19**, 137–141 (2001).
 26. McCulloch, R. I., Daubner, S. C. & Fitzpatrick, P. F. Effects of substitution at serine 40 of tyrosine hydroxylase on catecholamine binding. *Biochemistry*. **40**, 7273–7278 (2001).
 27. Colette Daubner, S. *et al.* A Flexible Loop in Tyrosine Hydroxylase Controls Coupling of Amino Acid Hydroxylation to Tetrahydropterin oxidation. *J. Mol. Biol.* **359**, 299–307 (2006).
 28. Patriarchi, T. *et al.* Ultrafast neuronal imaging of dopamine dynamics with designed genetically encoded sensors. *Science*. **360**, 1–8 (2018).
 29. Sun, F. *et al.* A Genetically Encoded Fluorescent Sensor Enables Rapid and Specific Detection of Dopamine in Flies, Fish, and Mice. *Cell*. **174**, 481–496 (2018).
 30. Miyazaki, I. & Asanuma, M. Approaches to prevent dopamine quinone-induced

- neurotoxicity. *Neurochem. Res.* **34**, 698–706 (2009).
31. Muñoz, P., Huenchuguala, S., Paris, I. & Segura-Aguilar, J. Dopamine oxidation and autophagy. *Parkinsons. Dis.* **2012**, 1–13 (2012).
 32. Sulzer, D. & Zecca, L. Intraneuronal dopamine-quinone synthesis: A review. *Neurotox. Res.* **1**, 181–195 (1999).
 33. Zucca, F. A. *et al.* The neuromelanin of human substantia nigra: Physiological and pathogenic aspects. *Pigment Cell Res.* **17**, 610–617 (2004).
 34. Zecca, L. *et al.* The role of iron and molecules in the neuronal vulnerability of locus coeruleus and substantia nigra during aging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 9843–9848 (2004).
 35. Van Laar, V. S., Mishizen, A. J., Cascio, M. & Hastings, T. G. Proteomic identification of dopamine-conjugated proteins from isolated rat brain mitochondria and SH-SY5Y cells. *Neurobiol. Dis.* **34**, 487–500 (2009).
 36. Girotto, S. *et al.* Dopamine-derived quinones affect the structure of the redox sensor DJ-1 through modifications at Cys-106 and Cys-53. *J. Biol. Chem.* **287**, 18738–18749 (2012).
 37. Belluzzi, E. *et al.* Human SOD2 modification by dopamine quinones affects enzymatic activity by promoting its aggregation: Possible implications for Parkinson's disease. *PLoS ONE*. **7**, 1–9 (2012).
 38. Mor, D. E. *et al.* Dopamine induces soluble α -synuclein oligomers and nigrostriatal degeneration. *Nat. Neurosci.* **20**, 1560–1568 (2017).
 39. Paris, I. *et al.* Aminochrome induces disruption of actin, alpha-, and beta-tubulin cytoskeleton networks in substantia-nigra-derived cell line. *Neurotox. Res.* **18**, 82–92 (2010).
 40. LaVoie, M. J., Ostaszewski, B. L., Weihofen, A., Schlossmacher, M. G. & Selkoe, D. J. Dopamine covalently modifies and functionally inactivates parkin. *Nat. Med.* **11**, 1214–1221 (2005).
 41. Zhang, S., Wang, R. & Wang, G. Impact of Dopamine Oxidation on Dopaminergic Neurodegeneration. *ACS Chem. Neurosci.* **10**, 945–953 (2019).
 42. Borges, C. R., Geddes, T., Watson, J. T. & Kuhn, D. M. Dopamine biosynthesis is regulated by S-glutathionylation. Potential mechanism of tyrosine hydroxylase inhibition during oxidative stress. *J. Biol. Chem.* **277**, 48295–48302 (2002).
 43. Wang, Y., Sung, C. C. & Chung, K. K. K. Novel enhancement mechanism of tyrosine hydroxylase enzymatic activity by nitric oxide through S-nitrosylation. *Sci. Rep.* (2017).
 44. Xu, Y., Stokes, A. H., Roskoski, R. & Vrana, K. E. Dopamine, in the presence of tyrosinase, covalently modifies and inactivates tyrosine hydroxylase. *J. Neurosci. Res.* **54**, 691–697 (1998).
 45. Kuhn, D. M., Arthur, R. E., Thomas, D. M. & Elferink, L. A. Tyrosine hydroxylase is inactivated by catechol-quinones and converted to a redox-cycling quinoprotein: Possible

- relevance to Parkinson's disease. *J. Neurochem.* **73**, 1309–1317 (1999).
46. Renault, K., Fredy, J. W., Renard, P. Y. & Sabot, C. Covalent Modification of Biomolecules through Maleimide-Based Labeling Strategies. *Bioconjug. Chem.* **29**, 2497–2513 (2018).
 47. Fitzpatrick, P. F. The pH dependence of binding of inhibitors to bovine adrenal tyrosine hydroxylase. *J. Biol. Chem.* **263**, 16058–16062 (1988).
 48. McTavish, S. F. B., Cowen, P. J. & Sharp, T. Effect of a tyrosine-free amino acid mixture on regional brain catecholamine synthesis and release. *Psychopharmacology (Berl)*. **141**, 182–188 (1999).
 49. Kurosaki, H. *et al.* Administration of tetrahydrobiopterin restored the decline of dopamine in the striatum induced by an acute action of MPTP. *Neurochem. Int.* **125**, 16–24 (2019).
 50. Lemos-Amado, F. *et al.* Electrospray tandem mass spectrometry of aminochromes. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **15**, 2466–2471 (2001).
 51. Ames, M. M., Lerner, P. & Lovenberg, W. Tyrosine hydroxylase. Activation by protein phosphorylation and end product inhibition. *J. Biol. Chem.* **253**, 27–31 (1978).
 52. Willemsen, A. M. *et al.* Tyrosine hydroxylase deficiency : a treatable disorder of brain catecholamine biosynthesis. *Brain A J. Neurol.* **133**, 1810–1822 (2010).
 53. Fossbakk, A., Kleppe, R., Knappskog, P. M., Martinez, A. & Haavik, J. Functional Studies of Tyrosine Hydroxylase Missense Dopa-Responsive Dystonia. *Hum. Mutat.* 880–890 (2014).
 54. Herrera-Soto, A. *et al.* On the Role of DT-Diaphorase Inhibition in Aminochrome-Induced Neurotoxicity In Vivo. *Neurotox. Res.* **32**, 134–140 (2017).
 55. Trist, B. G., Hare, D. J. & Double, K. L. Oxidative stress in the aging substantia nigra and the etiology of Parkinson's disease. *Aging Cell* **18**, 1–23 (2019).
 56. Spencer, J. P. E. *et al.* Conjugates of catecholamines with cysteine and GSH in Parkinson's disease: Possible mechanisms of formation involving reactive oxygen species. *J. Neurochem.* **71**, 2112–2122 (1998).
 57. Vecchio, L. M. *et al.* Enhanced tyrosine hydroxylase activity induces oxidative stress, causes accumulation of autotoxic catecholamine metabolites, and augments amphetamine effects in vivo. *J. Neurochem.* **158**, 960–979 (2021).
 58. Wang, N., Wang, Y., Yu, G., Yuan, C. & Ma, J. Quinoprotein adducts accumulate in the substantia nigra of aged rats and correlate with dopamine-induced toxicity in SH-SY5Y cells. *Neurochem. Res.* **36**, 2169–2175 (2011).
 59. Hauser, D. N., Dukes, A. A., Mortimer, A. D. & Hastings, T. G. Dopamine quinone modifies and decreases the abundance of the mitochondrial selenoprotein glutathione peroxidase 4. *Free Radic. Biol. Med.* **65**, 419–427 (2013).

研究業績

原著論文

Shunya Inukai, Satoshi Hara, Hiroshi Ichinose. Tyrosine hydroxylase activity is regulated through the modification of the 176th cysteine residue.

(*Biochem Biophys Res Commun.* 2022; 589: 209-214., doi: 10.1016/j.bbrc.2021.12.024.)

学会発表

○犬飼駿弥、原怜、一瀬宏 「蛍光標識を用いたドパミン結合に応答するチロシン水酸化酵素の構造変化の解析」 第 91 回日本生化学会大会、国立京都国際会館 2018 年 9 月 24 日（ポスター発表）

○犬飼駿弥、原怜、一瀬宏 「部位特異的蛍光標識を用いたドパミンに応答するチロシン水酸化酵素の構造変化の解析」 第 62 回日本神経化学大会 朱鷺メッセ 2019 年 7 月 26 日（ポスター発表）

○犬飼駿弥、原怜、一瀬宏 「Dopamine oxides inactivate tyrosine hydroxylase by modification of the cysteine residue.」 第 43 回 日本神経科学大会 オンライン開催 2020 年 7 月 29 日～8 月 1 日

○犬飼駿弥、原怜、一瀬宏 「システイン残基への DA 酸化物の修飾が TH の活性を減少させる」 第 63 回日本神経化学会大会 オンライン開催 2020 年 9 月 9 日～9 月 26 日

謝辞

本研究を行うにあたり、様々なご指導を承りました
本学 一瀬 宏 教授に心から感謝申し上げます。

折に触れて適切な助言を受け賜り、また、研究生活全般に気を配っていただいた
本学 原 怜 助教に心から感謝申し上げます。

本研究において多くの助言並びに審査をしてくださいました
本学 清尾 康志 教授、林 宣宏 教授、久堀 徹 教授、村上 聡 教授に
心より御礼申し上げます。

日頃より、研究だけでなく、日々の生活に関しても気にかけて、支えてくださった
本研究室の皆様感謝いたします。