

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
Category(English)	Doctoral Thesis
種別(和文)	論文要旨
Type(English)	Summary

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位（専攻分野）： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	（ 理学 ）
学生氏名： Student's Name	犬飼 駿弥		指導教員（主）： Academic Supervisor(main)	一瀬 宏	
			指導教員（副）： Academic Supervisor(sub)		

### 要旨（和文 2000 字程度）

Thesis Summary (approx.2000 Japanese Characters )

ドパミン (DA) は神経伝達物質の一つであり、DA 作動性ニューロン内で生合成され、シナプス小胞内に蓄えられる。神経伝達物質としてシナプス間隙へ放出された DA の一部はプレシナプスへと回収され、神経伝達物質として再利用または酵素によって代謝される。しかし、一部の DA は酸化ストレスや酸化酵素によって DA 酸化物に変換される。DA 酸化物はタンパク質のシステイン残基への修飾を介して細胞内機能を障害して、神経毒性を發揮する作用があることが知られている。

チロシン水酸化酵素 (TH) は神経伝達物質である DA の生合成経路の律速段階の反応を触媒する酵素である。TH の活性は現在二つの機構によって制御されていることが知られている。一つは DA 結合によるフィードバック阻害である。DA 結合は活性制御ドメインである N 末端領域の構造変化を引き起こす。この構造変化はもう一つの制御機構である Ser40 のリン酸化によって抑制される。Ser40 のリン酸化は DA 結合を解除することにより TH を相対的に活性化させる。TH の活性制御機構はこの二つの機構の他にも存在し、システイン残基の修飾による制御などが知られており、その全容は詳しく解明されていない。例えば、DA 酸化物によるシステイン残基の修飾を介した TH の活性阻害が起こることが報告されているが、「TH のどこのシステイン残基に修飾しているのか」、「システイン残基の修飾がなぜ TH の活性を減少させるのか」、「既知の制御機構とどのような関係があるのか」といったことについては分かっていない。

そこで、私はシステイン残基の修飾が TH に与える影響について着目し、その制御機構について調べるためにシステイン残基への化学的修飾剤である N-エチルmaleimide (NEM) や DA 酸化物を用いて TH の活性測定や質量分析を行った。TH には 7 つのシステイン残基が存在している。各システイン残基を欠失させた TH 変異体に NEM または DA 酸化物を反応させて活性測定を行ったところ、Cys176 を欠失した変異体において NEM 及び DA 酸化物による TH の活性減少が抑制された。質量分析を行ったところ、Cys176 の欠失は NEM や DA 酸化物と反応させたときに生じた TH の質量の増加を抑制した。これらの結果から、NEM 及び DA 酸化物は TH の Cys176 への修飾を介して TH の活性を減少させていることが明らかとなった。

NEM のシステイン残基の修飾による TH の速度論的パラメーターの変化について調べたところ、システイン残基の修飾によって基質である L-tyrosine の  $K_m$  が増加した一方で、補酵素である BH4 の  $K_m$  は減少した。また、基質および補酵素の両方で  $V_{max}$  が大きく減少することが分かった。さらに活性制御ドメインがシステイン残基の修飾による TH の活性阻害に影響を与えているか調べるために、N 末端欠失変異体を作製し NEM と反応させたのちに活性測定を行った。結果として、N 末端欠失変異体においても野生型 TH と同様に NEM による活性の減少及び Cys176 の欠失による活性減少の抑制が起きることが分かった。これらの結果から、システイン残基の修飾による TH の活性阻害において活性制御ドメインである N 末端領域は影響を与えていないことが分かった。

既知の TH の活性制御機構である DA 結合がシステイン残基の修飾及び活性阻害にどのような影響を与えるか調べるために、DA を事前に TH と反応させたのちに NEM と反応させ活性測定と質量分析を行った。結果として、DA 結合は NEM による TH の修飾およびそれによる活性阻害を抑制することが分かった。さらに、Ser40 のリン酸化がシステイン残基の修飾及び活性阻害にどのような影響を与えるか調べるために、Ser40 のリン酸化の模倣体である S40E 変異体を NEM と反応させ活性測定と質量分析を行った。結果として、S40E 変異体は野生型 TH と同様に NEM による修飾及び活性阻害が引き起こされることが分かった。これらの結果は、生体内で DA 酸化物などによって TH のシステイン残基が修飾された場合、活性型である TH の活性を減少させ、結果として生体内で DA の生成量を低下させる可能性があることを示した。

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note : Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).

(博士課程)  
Doctoral Program

## 論文要旨

THESIS SUMMARY

系・コース： Department of, Graduate major in	生命理工学 生命理工学	系 コース	申請学位 (専攻分野)： Academic Degree Requested	博士 Doctor of	(理学)
学生氏名： Student's Name	大飼 駿弥		指導教員 (主)： Academic Supervisor(main)	一瀬 宏	
			指導教員 (副)： Academic Supervisor(sub)		

### 要旨 (英文 300 語程度)

Thesis Summary (approx.300 English Words)

Dopamine (DA) is a neurotransmitter which is involved brain function such as motor control. DA is synthesized in dopaminergic neurons and stored in synaptic vesicles. A part of DA in cytoplasm converted into DA oxides because it is susceptible to oxidation. DA oxides have neurotoxicity causing loss of protein function through the modification to cysteine residues.

Tyrosine hydroxylase (TH) is the rate-limiting enzyme in the biosynthesis of DA and the regulation of its activity is important for DA homeostasis. TH activity is regulated by two major mechanisms which are a feedback inhibition by DA binding and the suppression of DA binding by Ser40 phosphorylation. In addition to these mechanisms, it has been known that the modification to cysteine residue of TH regulates TH activity, however the detail of the mechanism is unclear. Therefore, I focused on the effect of the modification to cysteine residue on TH.

I measured the activity of TH and mass spectrometry using N-ethylmaleimide (NEM), a chemical modifier to cysteine residues, and DA oxide to investigate the mechanism of regulation of TH activity. By using the TH mutants which were lacked cysteine residue, I found that the reaction of NEM and DA oxides to Cys176 reduced TH activity. In addition, Mass analysis showed the increase of TH mass by the reaction with NEM and DA oxides through the modification to Cys176. These results suggested that NEM and DA oxides reduce TH activity through the modification to Cys176.

Subsequently, I investigated the changes in the kinetic parameters of TH after the modification of NEM to cys176. As a result, it was found that the Cys176 modification increased the  $K_m$  for tyrosine, a substrate of TH, while the  $K_m$  for tetrahydrobiopterin, a coenzyme of TH, was decreased. It was also found that  $V_{max}$  for both the substrate and the coenzyme was significantly reduced.

Furthermore, I investigated the effect of N-terminal region considered as the regulation domain on the regulation of TH activity through the modification to Cys176. By using N-terminal deleted mutants, I found that the decrease of TH activity through the modification to Cys176 was occurred in N-terminal deleted mutants as well as wild type. This result suggested that regulation domain did not affect the regulation of TH activity through the modification to Cys176.

TH is thought to be in two states, DA-bound and phosphorylated, *in vivo*. I investigated how NEM modification was affected by the states of TH. As a result, DA-bound state which is considered as an inactive state of TH delayed the modification and inactivation of TH by NEM. In contrast, the S40E mutation, a mimic of the Ser40 phosphorylation, which is considered as an active state of TH, did not affect the modification and inactivation of TH by NEM. These results suggest that the modification to Cys176 can inhibit even phosphorylated active TH.

備考：論文要旨は、和文 2000 字と英文 300 語を 1 部ずつ提出するか、もしくは英文 800 語を 1 部提出してください。

Note: Thesis Summary should be submitted in either a copy of 2000 Japanese Characters and 300 Words (English) or 1copy of 800 Words (English).

注意：論文要旨は、東工大リサーチリポジトリ(T2R2)にてインターネット公表されますので、公表可能な範囲の内容で作成してください。

Attention: Thesis Summary will be published on Tokyo Tech Research Repository Website (T2R2).