

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)	
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)	審査の要旨
Type(English)	Exam Summary

論文審査の要旨及び審査員

報告番号	甲第	号	学位申請者氏名	犬飼 駿弥		
論文審査 審査員		氏名	職名		氏名	職名
	主査	一瀬 宏	教授		清尾 康志	教授
	審査員	久堀 徹	教授	審査員		
		村上 聡	教授			
林 宣宏		教授				

論文審査の要旨 (2000 字程度)

本論文は「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」と題し、4章より構成されている。

第1章「序論」では、神経伝達物質の一つであるドーパミンの役割とその代謝経路について説明し、チロシン水酸化酵素 (TH) はドーパミン生合成の律速段階を担う酵素であることを述べている。さらに、TH 活性は、生成物であるドーパミンが結合することによるフィードバック阻害や、40 番目のセリン残基のリン酸化による活性化などによる活性制御機構がこれまでに明らかとされていることを述べている。そして、第2章に記載した研究では、TH がドーパミンと結合する性質を利用して、細胞外のドーパミンを検出するバイオセンサーの開発を試みたこと、第3章では TH タンパク質の 176 番システイン残基の修飾による TH 活性の制御という新しい活性調節機構を見出したことを紹介している。

第2章「ドーパミンバイオセンサーの開発」では、神経細胞から放出されたドーパミンの動態をモニタリングするために、TH のドーパミン結合に伴う構造変化に着目してバイオセンサーの開発を試みたことを述べている。まず、蛍光物質であるオレゴングリーンを、マレイミド基を介してシステイン残基に標識するために、ヒト TH のタンパク質表面に存在すると考えられる4つのシステイン残基をアラニンに置換し、ドーパミン結合により TH のコンフォメーションが変化することが予想されるアミノ酸をシステインに変換した A59C, A230C, S295C 変異タンパク質と、内在の 176 番システイン残基だけを残した 176C 変異タンパク質の合計4種類の蛍光標識用変異タンパク質を作成し、大腸菌で発現させて精製したことを述べている。次に、これらの蛍光標識 TH 変異タンパク質をオレゴングリーンマレイミドと反応させた時のラベル率、ドーパミンを添加した時の活性変化と蛍光強度変化を調べた結果について述べている。その結果、176C 変異体で最も大きな蛍光強度変化が得られたことを述べている。

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」では、前章の解析の過程で TH 内在の 176 番システイン残基を修飾することにより、TH 活性が大きく変化する現象を観察したことから、システイン残基の修飾による TH 活性の調節機構について詳細に調べた結果を述べている。まず、システイン残基を修飾することが知られている酸化型グルタチオン、ニトロソグルタチオン、過酸化水素、N-エチルマレイミド (NEM) の各試薬を精製した野生型 TH タンパク質に作用させることによる TH 活性への影響を調べ、NEM により大きく活性が減少することを述べている。次に、TH の内在するシステイン残基をアラニンに置換した変異体タンパク質に対して NEM を作用させた時の TH 活性の変化、さらに、質量分析による NEM 修飾後の TH 変異体タンパク質の分子量変化から、176 番システイン残基に NEM が反応し TH 活性を大きく減少させたことを証明している。一方、ドーパミンは不安定で酸化されやすい性質を有しており、酸化されてアミノクロムなどのドーパミン酸化物が生体内で生成することが知られており、アミノクロムなどのドーパミン酸化物もシステイン残基に対する反応性があると報告されている。そのため、*in vitro* で作成したドーパミン酸化物を TH と反応させたところ、野生型 TH の活性が大きく減少し、176 番システイン残基をアラニンに置換した変異体 TH タンパク質では、ドーパミン酸化物による TH の活性低下が起こらなくなったことを報告している。そして、これらの結果は、ドーパミン酸化物が TH の 176 番システイン残基と反応することにより TH 活性を阻害する作用を有することを初めて示した研究であると述べている。

第4章「総括」では、本研究から得られた知見をまとめて、今後の展望について述べている。

以上を要するに、本論文は TH のチオール基を介する活性制御機構の分子機構を生化学的手法により明らかにしたものであり、理学的に貢献するところが大きい。よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として十分な価値があるものと認められる。

注意: 「論文審査の要旨及び審査員」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。