

AMCoR

Asahikawa Medical College Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

蛋白質・核酸・酵素 (1984) 29(12):1286-1294.

カテコールアミン生合成の調節 特にその分子的側面

奥野幸子, 藤沢仁

カテコールアミン合成の調節

—特にその分子的側面—

奥野幸子[※]・藤沢 仁[※]

ドーパミンやノルアドレナリン、アドレナリンなどのカテコールアミンは、神経伝達物質として、あるいは副腎髄質ホルモンとして重要な生理作用を営んでいる。これらのカテコールアミンは、いずれもチロシンから合成され、合成速度は律速酵素であるチロシン水酸化酵素によって調節されている。チロシン水酸化酵素には複雑な調節機構が働いていると考えられており、酵素の量を変動させる長時間の調節と、酵素活性を変動させる短時間の調節とに大別されている。酵素活性を変動させる因子としては、カテコールアミン、補酵素プテリン、酵素の燐酸化、多価陰イオン、燐脂質、塩、蛋白質分解、酵素精製などがある。中でも酵素の燐酸化による活性化機構については、この数年間に急速な研究の進展がみられた。これらの因子について、筆者らの考えを交えて最近の知見を解説した。

I. はじめに

ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンなどのカテコールアミンは神経刺激を伝える化学伝達物質として、あるいは副腎髄質ホルモンとして重要な生理作用を営んでいるが、これらのアミンは図1に示すような経路でチロシンから合成される。合成の第1段階のチロシンからドーパへの反応が、一連の生合成経路の律速段階¹⁾であり、この反応を触媒するチロシン水酸化酵素²⁾の活性が高められたり抑制されたりして、カテコールアミンの生成速度が調節されていると考えられており、これらの調節機構を明らかにするために酵素の発見当初より現在に至るまで数多くの研究がなされてきた。

調節機構を含めてチロシン水酸化酵素については、これまでに本誌でも詳細に総説されているが³⁻⁵⁾、ここ数年、酵素蛋白質の燐酸化による活性化反応など、チロシン水酸化酵素の活性調節機構を分子のレベルで解き明かそうとする研究の進展が著しいので、筆者らの実験結果も含めて、最近、相次いで報告されている研究成果を中心に、チロシン水酸化酵素の活性を調節する因子について紹介したい。

II. チロシン水酸化酵素について

チロシン水酸化酵素は還元型プテリンを補酵素として要求し、L-チロシンと分子状酸素を基質として、L-ドーパを生ずる反応を触媒する一原子酸素添加酵素であり、動物の脳、末梢交感神経系、副腎髄質などのカテコール

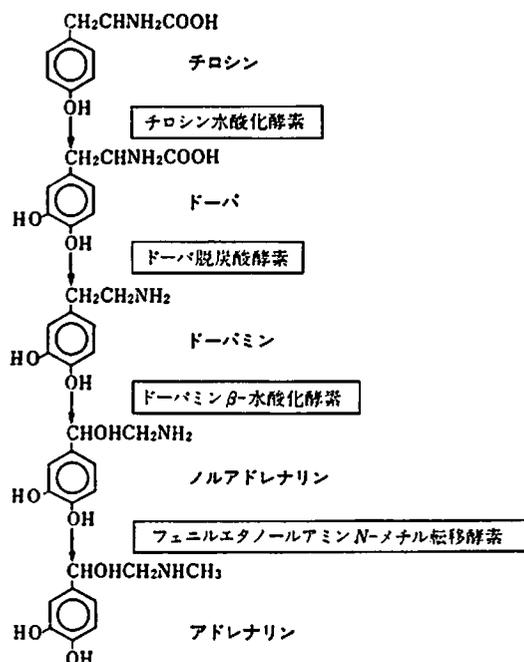


図1. カテコールアミン（ドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリン）の生合成経路

※ Sachiko Okuno, Hitoshi Fujisawa, 旭川医科大学第一生化学教室 (〒078-11 旭川市西神楽4線5号3-11) [Department of Biochemistry, Asahikawa Medical College, Asahikawa 078-11, Japan]

Regulation of catecholamine biosynthesis—Molecular aspects

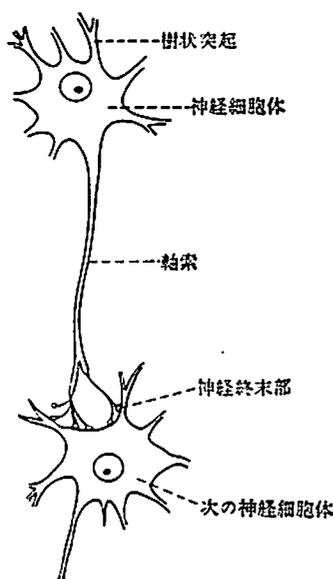


図 2. 神経細胞

アミンが作用をしている各組織に見いだされている。脳や副腎を材料として酵素の精製が試みられてきたが、非常に不安定で重合しやすい性質の酵素であるといわれ、精製は長い間成功しなかった。しかし、ようやく最近になって、ラットのフェオクロモサイトーマ (pheochromocytoma)⁶⁾、PC12 培養細胞⁷⁾、ラット副腎³⁾およびウシ副腎³⁾ からいずれも均一な酵素標品が得られて性質が調べられた。分子量約 60K のサブユニット 4 個から構成されている蛋白質である。また酵素に対する特異抗体も得られている。

1. チロシン水酸化酵素の細胞内分布

神経細胞 (ニューロン) は図 2 に示すように、神経細胞体、軸索、神経終末部より成っている。神経細胞体の樹状突起で受けた神経刺激が軸索を経て神経終末部に到達すると、神経終末部の顆粒中に貯蔵されていた神経伝達物質が刺激に応じて細胞間隙に分泌され、次の神経細胞に刺激が伝達される。カテコールアミンなどの神経伝達物質は、分泌に備えて神経終末部の分泌顆粒内に貯えられている。分泌されたカテコールアミンを補充するためのカテコールアミン合成に必要なチロシン水酸化酵素などの蛋白質は、神経終末部には蛋白質合成系が存在しないのですべて神経細胞体で合成された後、軸索流により神経終末部まで運ばれてこなければならない。同じ様式でカテコールアミンを分泌し、合成している副腎髄質のクロマフィン細胞では、酵素蛋白質の合成とカテコールアミンの分泌が同じ場所で行なわれており、神経細胞の場合とは異なっている。

チロシン水酸化酵素はカテコールアミンを神経伝達物質とするニューロンの、神経細胞体、軸索、神経終末部

のどの部分にも存在するが、細胞分画すると可溶性画分と顆粒画分のどちらにも見いだされ、動物の種類や組織の違いによって細胞内分布が異なるといわれている。ウシの副腎では可溶性画分¹⁰⁾のほかに顆粒画分にも存在し^{2,11,12)}、ウシ脳のドーパミン作働性ニューロンの神経終末部がある尾状核では粒子結合型が多く¹³⁾、分泌顆粒に存在する^{14,15)}ともいわれている。これらの粒子結合型酵素はトリプシン処理¹²⁾やアセトン粉末¹⁶⁾などによって可溶化されている。ラットでは副腎に存在する酵素はほとんど可溶型であるが^{10,17)}、脳では可溶型酵素のほかに神経終末部の膜に結合した酵素が報告され研究されてきた¹⁸⁾。筆者らが Whittaker の方法に従ってラット脳幹の細胞内分布を調べたかぎりでは、神経細胞体、神経終末部のいずれでもチロシン水酸化酵素は可溶型であった¹⁹⁾。

チロシン水酸化酵素が細胞内のどの画分に存在して、どのように作用しているのか、酵素の所在に関する問題は作用機構と直結しており、最も基本的で興味深い。

2. 神経細胞体に存在する酵素と神経終末部に存在する酵素の性質

上述のようにチロシン水酸化酵素は神経細胞体で合成された後、軸索流により神経終末部へ運搬される。その長い道のりの間に、合成された酵素蛋白質はプロセッシングを受けて、神経終末部で作用するのに好都合な酵素の状態に変化してゆくのであろうか、あるいはとくに可溶型の酵素であれば、蛋白質分解系などから保護されて、安全に神経終末部に運ばれるための機構が存在するのであろうか。現在のところ、これらの点に関してはまったく不明である。Pickel ら²⁰⁾が、神経軸索内のチロシン水酸化酵素が微小管に結合して存在することを、免疫組織化学的研究により報告していることは興味深い。

筆者らは合成された直後の神経細胞体に存在するチロシン水酸化酵素と、神経終末部まで運ばれてきた酵素に差異が認められるか否かを、次のような実験によって検討した¹⁹⁾。ラット脳のドーパミン・ニューロンの細胞体がある黒質の細胞質の酵素と、神経終末部の存在する線条体の神経終末画分の酵素と、副腎の酵素についてゲル濾過を行ない、その分子量を測定したが、これらの酵素に差は認められなかった。さらにチロシン水酸化酵素に対するモノクローン抗体のアフィニティーカラムを用いてそれぞれの酵素を精製して、サブユニットの分子量を SDS ゲル電気泳動により求めたが、いずれも分子量 59K のサブユニットであることが判明した。図 3 はこれらの 3 種類の酵素について粗抽出液内の酵素蛋白質量を、モノクローン抗体を用いて定量して求めた酵素の比活性の pH 依存性を示したものである。細胞体で合成された直後の酵素と、神経終末部まで運ばれてきた酵素は、

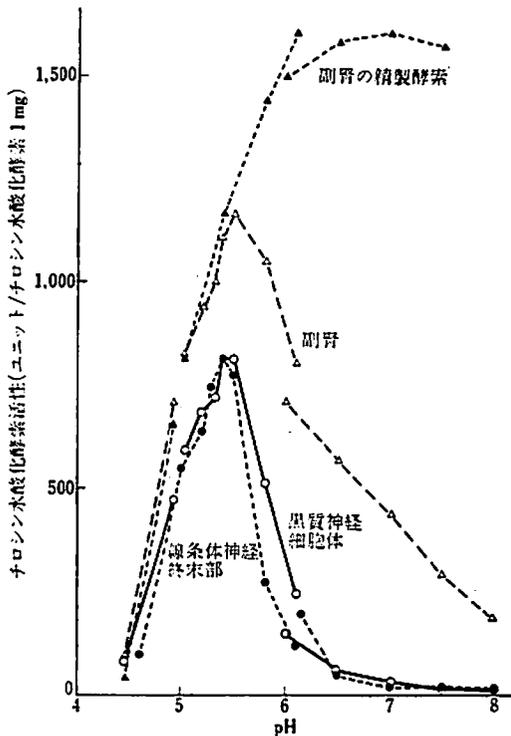


図 3. チロシン水酸化酵素活性の pH 依存性¹⁰⁾

補酵素ブテリンは 1mM 6-メチルブテリンを使用, 1ユニット: 1分間に 1nmol 生成する酵素活性を示す。

同じパターンを示した。至適 pH を 5.4 にもつシャープな曲線を描き、生体内の pH と考えられる pH7 付近では活性はほとんど認められなかった。これらの結果から、チロシン水酸化酵素は、不活性型として合成され、神経終末に運ばれても変化を受けず、つねに不活性な状態で存在し、カテコールアミン合成が必要なときに抑制が解除されて初めて作用する、という可能性が考えられた。

脳に比べて副腎の酵素の pH 曲線はゆるやかで、pH 7 付近でもかなりの活性が認められ、脳ほどには完全な抑制を受けていない。この相違は、カテコールアミンが神経伝達物質として作用している場合には、ホルモンとして作用しているときに比べて、刺激に応じた分泌と合成の on-off の調節がより厳密なものであることを反映しているのかもしれない。

3. チロシン水酸化酵素の受ける調節

チロシン水酸化酵素の受ける調節は、短時間の調節と長時間の調節に大別されている⁵⁾。短時間の調節とは、神経刺激に応じてただちに酵素の活性を変動させて、カテコールアミン生成量を増減させるものであり、長時間の調節とは、ストレスなどの持続的な刺激により、酵素蛋白質の合成能が高められて、酵素の増量によって応じるものである。酵素活性を変動させる因子としては、カ

テコールアミン、補酵素還元型ブテリン、酵素の燐酸化、酵素の蛋白質分解、多価陰イオン、磷脂質、塩、酵素精製などが見いだされている。

以下に、酵素活性を変動させる因子のそれぞれについての最近の知見を紹介したい。

A. カテコールアミン

チロシン水酸化反応の最終生成物であるドーパミンやノルアドレナリン、アドレナリンなどのカテコールアミンは、補酵素還元型ブテリンに拮抗して、強力な阻害作用を示す。この阻害作用は酵素発見当初に見いだされ²⁾、反応生成物のフィードバック阻害による酵素の重要な調節機構として注目されてきた。後述する、cAMP 依存性プロテインキナーゼによって、酵素が燐酸化されて活性化された場合には、補酵素還元型ブテリンに対する K_m の低下とともに、カテコールアミンに対する K_i が上昇するという報告がいくつかある^{1,21-24)}。磷脂質であるフォスファチジルセリンにより酵素が活性化された場合にも同様に K_i の上昇がみられている²¹⁾が、ヘパリンにより酵素が活性化されると、逆に補酵素ブテリンに対する K_m の低下と同時にカテコールアミンに対する K_i も低下して、環境の変化に対してより敏感な酵素の状態をとることが報告された¹⁸⁾。

カテコールアミンは神経終末部、および副腎髄質で合成されたのち、エキソサイトーシスによって細胞外に分泌されるまでの間、分泌顆粒内に貯蔵されている。生体内で実際に酵素活性の調節に働くためには、酵素と接触する必要があり、酵素の細胞内分布とも関連して、まだ不明な点が多い。

B. 補酵素還元型ブテリン

in vitro のチロシン水酸化反応には、6,7-ジメチルテトラヒドロブテリンや、6-メチルテトラヒドロブテリンなどの合成物が汎用されているが、生体内で補酵素として作用しているのは、(6R)-L-エリスローテトラヒドロビオブテリン²⁵⁾であると考えられている。還元型ビオブテリンの脳内の濃度は $10^{-6}M$ ²⁶⁾ で、チロシン水酸化酵素のビオブテリンに対する K_m $10^{-5}M$ ⁹⁾ に比べてはるかに低いためにビオブテリンの量の増減、またはチロシン水酸化酵素のビオブテリンに対する K_m の変化が、活性調節に密接に関与していると考えられてきた。還元型ビオブテリンは、電子供与体としてチロシン水酸化反応に関与しているので、酵化されて生じるキノノイドジヒドロブテリンの再生系が必要である。しかしジヒドロブテリジン還元酵素は大過剰に存在するので、ビオブテリン濃度を規定しているのは GTP からのビオブテリン新生系であると考えられている。合成酵素の GTP シクロヒドロラーゼとビオブテリンは、ともにアミン作動性神経の終末部に偏在しており、この偏りを考慮に入れ

ると、神経終末部内のビオプテリン濃度は約 100 μM とも計算されている³⁰⁾。他方、チロシン水酸化酵素が種々の条件下で、酵素蛋白質の高次構造に変化を起こして補酵素プテリンに対する親和性を増し、活性化される例が数多く報告されているが、以下の項で順次述べる。

C. チロシン水酸化酵素の燐酸化反応

a. cAMP 依存性プロテインキナーゼによる燐酸化と活性化

チロシン水酸化酵素が cAMP によって活性化されることが見いだされ³¹⁾、この活性化はチロシン水酸化酵素自身が cAMP 依存性プロテインキナーゼ³¹⁾の基質となって燐酸化を受けることによるものであることが明らかにされた^{6,7,24,32-34)}。酵素が燐酸化を受けて高次構造が変化し、補酵素プテリンに対する K_m が低下して活性化が起こるという結果や^{6,7,31-25,35)}、補酵素プテリンに対する K_m の低下とともに V_{max} の上昇を伴うという結果³⁶⁾、 K_m の低下は認められず V_{max} の上昇のみが起こるという結果^{35,32,37)} もあって、酵素のキネティクスに関する報告はさまざまである。pH によって酵素の性質が変化することも見いだされており^{26,38)}、Pollock ら³⁹⁾は pH6 では K_m の低下によって活性化され、pH7 では V_{max} の上昇によって活性化されて、至適 pH が6から6.7へ移ると報告している。酵素の至適 pH が、より中性側に移行するという結果は他にもいくつか報告されている^{38,39,40)}。チロシン水酸化酵素には補酵素プテリンに対して高い K_m 値を示す場合と、低い K_m 値を示す場合の2通りの酵素の状態が存在し、酵素が燐酸化を受けて活性化されると、高い K_m 型から低い K_m 型に変換するとも考えられている^{6,35)}。Sze ら⁴¹⁾は燐酸化を受けた酵素と受けていない酵素が、DEAE-セルロースによって分離できることを報告したが、Oka ら⁴²⁾も、ウシ副腎および尾状核の酵素が DEAE-セファセルによって2つのピークに分離され、キネティクスに差違のあることを報告している。

図4は筆者らの酵素の燐酸化による活性化の実験結果を示したものである¹⁹⁾。pH7では活性をもたないラット脳線条体の酵素は、cAMP 依存性プロテインキナーゼによって著しい活性上昇を示し、とくに pH7では、約100倍も活性化された。これまでに報告のなかった、このような高倍率の活性化の結果は、生体内でのチロシン水酸化酵素の活性調節に、cAMP 依存性プロテインキナーゼによる燐酸化反応が重要な役割を担っている可能性を強く示唆する。図4は1mMの6-メチルプテリンを補酵素として使用した測定条件下での活性化を示しており、 V_{max} の上昇に起因するものと考えられた。

チロシン水酸化酵素の燐酸化、活性化反応は可逆的であり、燐酸化された酵素は、プロテインフォスファター

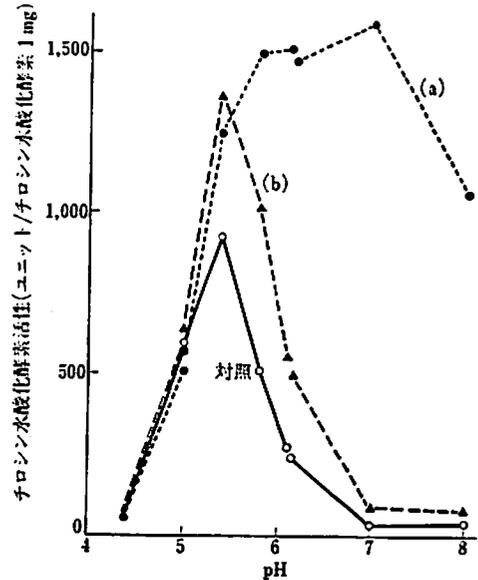


図4. 燐酸化により活性化されたラット脳線条体のチロシン水酸化酵素活性の pH 依存性¹⁹⁾

(a) ●—●: cAMP 依存性プロテインキナーゼによって活性化された酵素, (b) ▲—▲: カルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIによって活性化された酵素。

ゼによって燐酸化が除かれてもとの酵素の状態に戻ることが明らかにされており⁴³⁾、燐酸化—脱燐酸化による酵素の活性化—不活性化相互変換反応で、活性調節が行なわれていると想定されている。精製チロシン水酸化酵素も燐酸化されることが報告されているが、酵素に取り込まれた燐酸は、サブユニットあたり 0.7 mol⁴⁴⁾、酵素 1 mol あたり 0.7~0.9 mol⁴⁵⁾、酵素 1 mol あたり 1 mol⁴⁶⁾ と異なった結果が得られている。また、トリプシン処理したウシ副腎の酵素は燐酸化されないと報告された⁴⁰⁾。in vitro の研究に加えて、最近、クロマフィン細胞を用いた in situ の実験が行なわれて cAMP 依存性の燐酸化、活性化が確認されている⁴⁴⁾。

b. カルモデュリン依存性プロテインキナーゼによる燐酸化と活性化

チロシン水酸化酵素は、またカルモデュリン依存性プロテインキナーゼII⁴⁴⁾によっても燐酸化されて活性化される⁴⁵⁾。cAMP 依存性プロテインキナーゼによる酵素の活性化は、酵素が燐酸化を受けることによって活性が上昇する。これに対してカルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIによる場合には、酵素が燐酸化されても活性は変化せず、燐酸化された酵素にさらにもう1つの蛋白質、活性化蛋白質⁴⁶⁾が作用して初めて活性上昇が起こる2段階の反応であることが明らかにされた⁴⁷⁾。図4にラット脳線条体の酵素をカルモデュリン依存性プロテインキナーゼIIにより活性化した結果を示したが、 V_{max}

の増大による活性化であり、至適 pH はもとの酵素と等しく、cAMP 依存性プロテインキナーゼによって活性化された酵素の状態とは異なることが判明した。この燐酸化、活性化反応を cAMP 依存性プロテインキナーゼによる燐酸化、活性化反応と同時に進行すると、双方の和、もしくはそれ以上に活性化された⁴⁸⁾。2種類の燐酸化による相加的活性化は、PC12 細胞を用いた培養系でも確認された⁴⁹⁾。また、クロマフィン細胞では、アセチルコリンによって、燐酸化、活性化が促進され、これがカルシウム依存性であること⁵⁰⁾、酵素の燐酸化される部位が cAMP によって燐酸化される場合と異なることが報告されている⁵¹⁾。

カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II と、活性化蛋白質は、いずれも均一に精製され、性質が調べられている。カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II⁴⁴⁾ は分子量が 55K のサブユニットからなる分子量 540K の蛋白質であり、脳に特異的に分布しており⁵²⁾、末梢臓器にはほとんど活性が見いだされない。したがって、副腎のチロシン水酸化酵素にはこの活性化機構が関与していないものと考えられる。これに対して活性化蛋白質⁴⁶⁾ は中枢、末梢の各組織に広く分布する分子量 35K のサブユニット 2 個から成る蛋白質である。

カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II はチロシン水酸化酵素の燐酸化を行なうばかりでなく、セロトニンやメラトニン生成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素をも、チロシン水酸化酵素の場合とまったく同じ機構で燐酸化、活性化する⁴⁴⁾。また、脳のチューブリンや MAP2 (microtubule-associated protein 2) も燐酸化し、その重合-脱重合反応に深くかかわっていることも見いだされた^{53,54)}。微小管蛋白質は、軸索内輸送や神経伝達物質の分泌機構にも重要な役割を担っていると推定されているので、神経伝達物質の合成と分泌の両面に関与していると考えられるカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II による燐酸化反応の意義は非常に興味深く、今後の研究の進展が期待される。

以上述べてきたように、筆者らは、これら 2通りの燐酸化反応が神経終末部でのチロシン水酸化酵素の活性調節に果たしている役割は非常に大きいと考えて、図 5 のような仮説を提唱している^{55,56)}。①神経刺激に応じて神経終末部にカルシウム・イオンが流入し、カルシウム・イオンはカルモデュリンと結合して、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II を活性化する。②カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II は、一方では微小管蛋白質を燐酸化して神経伝達物質の分泌に関与する。他方、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II はチロシン水酸化酵素を燐酸化して活性化し、カテコールアミン合成速度を高める。③神経伝達物質とともに顆粒から分泌

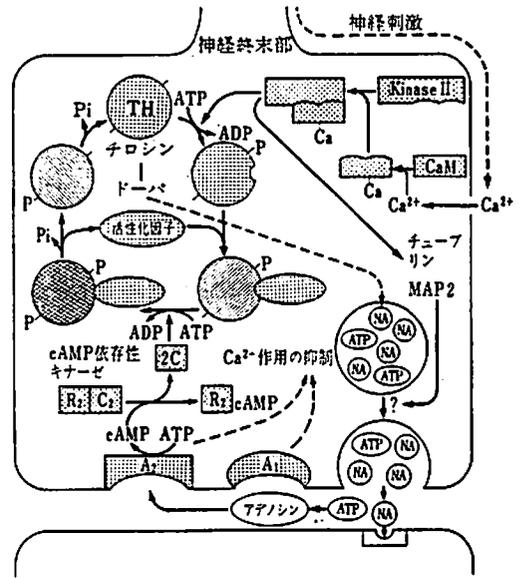


図 5. 神経終末部におけるチロシン水酸化酵素 (TH) の活性調節機構⁵⁵⁾

R₂ (regulatory subunit 2), C₂ (catalytic subunit 2), MAP 2(microtubule-associated protein 2). A₁: アデノシン受容体 1, A₂: アデノシン受容体 2, kinase II: カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II, CaM: カルモデュリン。

された多量の ATP はアデノシンに分解されて、シナプス前膜のアデノシン・レセプター (A₂ レセプター) に結合して、その結果神経終末部内の cAMP 濃度を高める^{57,58)}。④ cAMP 依存性プロテインキナーゼによりチロシン水酸化酵素はさらに活性化されて多量のカテコールアミンを合成する。⑤アデノシンはレセプターを介してカルシウム・イオンの作用を阻害する方向に働き、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II は不活性化され、これに伴ってチロシン水酸化酵素は脱燐酸化され、カテコールアミン合成速度が低下する。⑥分泌活性の低下に応じてアデノシン量が減少してくると cAMP 濃度が低くなり、cAMP 依存性プロテインキナーゼも不活性化されて、チロシン水酸化酵素はさらに不活性化もとの状態に戻り、カテコールアミン合成は停止する。

c. その他の燐酸化反応による酵素の活性化

Iuvone ら⁵⁹⁾は低濃度のカルシウム・イオンに依存した燐酸化による脳線条体のチロシン水酸化酵素の活性化が、フォスホリパーゼ C とのプレインキューションによって阻害されること、フォスホリパーゼ C の阻害効果がフォスファチジルセリンによって除かれること、さらに単独では活性化効果を示さないような低濃度のフォスファチジルセリンを添加することによって、カルシウム依存性のこの活性化反応が増強されることなどから、カルシウム、磷脂質依存性プロテインキナーゼ⁶⁰⁾によるチロシン水酸化酵素の活性化を報告した。

また、Andrews ら⁶¹⁾はラット脳線条体の酵素が、cAMP およびカルシウム・イオンに依存しない燐酸化反応により、約2倍 V_{max} が上昇することを見だし、cAMP 非依存性プロテインキナーゼによる活性化機構の存在を示した。筆者らの実験結果では、ラット脳線条体の酵素は凍結融解を繰り返した場合のみ活性化がみられ、新鮮な酵素標品を使用した場合には認められないので、この活性化機構の存在については、なお検討が必要と思われる。

D. 多価陰イオンとその関連物質

ヘパリンによってラット脳線条体の可溶性酵素が活性化されることが Kuczynski らによって見いだされた⁶²⁾。この活性化は V_{max} の上昇のみならず、補酵素ブテリンに対する親和性、カテコールアミンに対する親和性ととも増して、可溶性酵素を環境の変化に対してより鋭敏な、膜結合型の酵素と同じ性質に変えるので、生体内でのチロシン水酸化酵素と膜成分の関与が推定された。ヘパリンのほかにコンドロイチン硫酸、ポリグルタミン酸、デキストラン硫酸をはじめ、多価陰イオン構造をもついくつかの物質がチロシン水酸化酵素を活性化することが報告された^{62,63)}。これらの多価陰イオンは、塩と共存させると活性化効果を失う⁶²⁾。またトリプシンで処理したウシ副腎の酵素では多価陰イオンによる活性化は起こらない^{63,64)}。

陰イオン性の緩衝液、MES⁶⁵⁾や、界面活性剤の SDS⁶⁵⁾、メラニンによっても⁶⁶⁾チロシン水酸化酵素の活性化が認められた。これらはすべて多価陰イオン類似構造に由来する結果であることが報告された。同様な多価陰イオン構造をもつ ATP も補酵素ブテリンに対する K_m を低下して、チロシン水酸化酵素を活性化することが認められているが⁶⁷⁾、塩や多価陽イオンの共存下でも効果は消失しないので、ATP による酵素の活性化は、多価陰イオンによる活性化とは別の機構であり、燐酸化によるものでもないことが報告されている⁶⁸⁾。

多価陰イオンによって活性化されたチロシン水酸化酵素は、補酵素ブテリンに対する K_m の低下および V_{max} の上昇とともに酵素活性の至適 pH が中性側に移行することが示されている^{68,69)}。筆者らもラット脳線条体および副腎の酵素についてヘパリン、デキストラン硫酸、SDS などの多価陰イオンの効果を検討したが、脳の酵素および副腎の酵素はいずれも V_{max} の上昇による著しい活性化を示した。しかし酵素を均一に精製すると、この活性化効果は失われた⁹⁾。前述した、燐酸化による酵素の活性化が時間に依存した反応であるのに対して、多価陰イオンによる場合は、酵素液に添加するとただちに活性化される。活性化された酵素は活性の至適 pH が 5.4 から 6.5 付近に移行し、中性領域での活性化は数

十倍にも達したが、pH 5.4 付近では多価陰イオン添加により、活性は著しく阻害された。酸性 pH 領域でのこの阻害効果は、cAMP やカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ II によって活性化された酵素に多価陰イオンを添加した場合にも認められた¹⁹⁾。

E. 燐脂質

ウシ尾核核のアセトン粉末から部分精製された酵素がフォスファチジルセリンによって活性化されることが見いだされた。フォスファチジルセリンは重合またはミセル状になって多価陰イオンとしての性質を示し、活性化することが報告された¹⁹⁾。この活性化は補酵素ブテリンに対する K_m を低下させ、活性の至適 pH を中性側に移行させた。また cAMP 依存性プロテインキナーゼにより燐酸化した酵素にフォスファチジルセリンを加えても活性化率は燐酸化、あるいはフォスファチジルセリンのどちらか一方で活性化した場合に等しく、相加的でなかった³⁰⁾が、ラット脳線条体の部分精製酵素は、フォスファチジルセリンおよびリゾレシチンにより同様に活性化されて、cAMP 依存性プロテインキナーゼによる活性化と相加的であった²⁷⁾。Kuczynski⁷⁰⁾ はラット脳線条体の膜結合型酵素をフォスフォリパーゼで処理すると、酵素のキネティクスが変化して可溶性酵素の性質に近くなること、燐脂質の添加により回復効果が認められることなど、酵素と膜の結合について述べている。また、Lloyd ら⁷¹⁾はウサギ副腎の酵素はフォスファチジルイノシトールを反応液に加えることによって活性化されるが、酵素とフォスファチジルイノシトールをブレインキューベートしておく、補酵素ブテリンに対する K_m は低下して、酵素は不活性化されることを報告した。この不活性化反応は不可逆的であり、ブレインキューベーションの温度、時間、pH に依存している。この不活性化が粗酵素では認められず、精製酵素に見いだされるので、内在性の保護物質が存在し、精製によって酵素からはずれることが推定された。

F. 塩類

0.5M や 1M という高濃度の硫酸や食塩を添加して、イオン強度を上げると、チロシン水酸化酵素は可逆的に活性化を受ける^{62,72)}。この活性化は、酵素蛋白質表面の電荷と、添加したイオンが作用する結果、酵素蛋白質の高次構造変化をひき起こすことによると推定されている。高濃度の塩を添加すると、前述した多価陰イオンによる活性化効果が消失することから、低濃度で効果を示す多価陰イオンによる活性化と、高濃度の塩によって生じる活性化は、ともに酵素蛋白質の電荷との反応であって、酵素に同じ効果を及ぼしていると推定された。Kuczynski⁷³⁾ はイオンの種類によって酵素のキネティクスが変化することから、とくに Na^+ や K^+ などの

1価の陽イオンの効果をあげている。

G. 蛋白質分解

ワン副腎の粒子結合型酵素は、トリプシン処理によって可溶化され¹²⁾、分子量 34K¹³⁾の活性を保有した可溶性酵素が得られる。キモトリプシンによっても同様に可溶化されて高度精製が行なわれ、85~90%の酵素標品が得られた¹⁴⁾。精製酵素の分子量は34Kであり、ヘパリン、フォスファチジルセリン、cAMP依存性プロテインキナーゼなどによる活性化効果は失われた。Vignyら¹⁵⁾はトリプシン処理を行なうと酵素は活性を保ったまま分子構造が変化し、等電点がpH6から4.9に低下することを見だして、酵素分子内には活性部位とは別に、陰イオンの結合部位が存在し、トリプシン消化によってこの部位が切断されると推定した。

ラット脳線条体の可溶性酵素をトリプシン処理すると¹⁶⁾、分子量は約1/4の50Kになり、それに伴って酵素の活性化が認められた。基質チロシンに対する K_m も、補酵素プテリンに対する K_m も、ともに低下し、ヘパリンは基質チロシンに拮抗して活性を阻害した。これらの性質は副腎の酵素と異なるので、臓器に特異的なアイソザイムの存在する可能性が考えられた。

H. 酵素の精製

筆者らはラット副腎からチロシン水酸化酵素を精製して、分子量59Kのサブユニット4個から構成される電気泳動的に均一な酵素を得たが、特異抗体を用いて免疫滴定を行なった結果、精製酵素はもとの副腎抽出液内の酵素に比べて活性化されていることが明らかになった¹⁷⁾。図3に示したように、pH依存性は粗酵素とは非常に異なっており、中性に至るpHを示し、前述のcAMP依存性プロテインキナーゼで活性化された酵素(図4)と非常に似たパターンを示した。また、粗酵素では認められた多価陰イオンによる活性化も消失した。精製酵素の分子量は粗酵素と等しいので、蛋白質分解は起こっていないと推定され、精製中に酵素の立体構造が変化したのか、あるいは粗酵素液には活性抑制物質が存在しているのか、あるいは除去されたのか、その他の原因によるのかは定かでないが、精製操作によっても酵素は活性型に変換されることが明らかになった。

III. おわりに

以上、チロシン水酸化酵素活性を変動させる因子として、現在知られているものを列挙してその概略を述べた。

カテコールアミンの示す強力な生理作用、薬理作用に大きな関心が寄せられて、これまでにあらゆる分野にわたって広範な研究が展開されてきた。それに伴って律速酵素であるチロシン水酸化酵素に関する研究も、*in vivo*、*in vitro*を問わず枚挙にいとまがない。しかし酵素が

発見されてから20年を経た現在、ようやく酵素が精製され、その性質が明らかにされて、酵素の作用機序の全容を明らかにするための手がかりを得たばかりであるとも考えられる。

各項に分けて述べてきた活性を変動させる因子のそれぞれについても、研究者によって結果が異なるものや、存在意義の不明なものも多く、現在一致した知見の得られているものはまだごくわずかしかないように思われる。チロシン水酸化酵素による生体内の制御機構を明らかにするためには、まず酵素の存在様式や、活性調節に関与していると考えられる因子の1つ1つについて、*in vitro*で確実な研究成果を積み重ね、それらを*in situ*、*in vivo*の研究につないで生理的意義を追究してゆくことが大切と考えられる。

文 献

- 1) Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., Udenfriend, S.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 148, 1-8 (1965)
- 2) Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S.: *J. Biol. Chem.*, 239, 2910-2917 (1964)
- 3) 永津俊治: 本誌, 21, 161-173 (1976)
- 4) 永津俊治: 本誌, 22, 530-534 (1977)
- 5) 永津俊治: 本誌, 26, 1331-1341 (1981)
- 6) Vulliet, P. R., Langan, T. A., Weiner, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 92-96 (1980)
- 7) Markey, K. A., Kondo, S., Shenkman, L., Goldstein, M.: *Mol. Pharmacol.*, 17, 79-85 (1980)
- 8) Okuno, S., Fujisawa, H.: *Eur. J. Biochem.*, 122, 49-55 (1982)
- 9) Oka, K., Ashiba, G., Sugimoto, T., Matsuura, S., Nagatsu, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, 706, 188-196 (1982)
- 10) Musacchio, J. M.: *Biochem. Pharmacol.*, 17, 1470-1473 (1968)
- 11) Laduron, P., Belpaire, F.: *Biochem. Pharmacol.*, 17, 1127-1140 (1968)
- 12) Petrack, B., Sheppy, F., Fetzter, V.: *J. Biol. Chem.*, 243, 743-748 (1968)
- 13) Nagatsu, T., Sudo, Y., Nagatsu, I.: *J. Neurochem.*, 18, 2179-2189 (1971)
- 14) Fahn, S., Rodman, J. S., Côté, L. J.: *J. Neurochem.*, 16, 1293-1300 (1969)
- 15) Nagatsu, T., Nagatsu, I.: *Experientia*, 26, 722-723 (1970)
- 16) Lloyd, T., Kaufman, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 59, 1262-1269 (1974)
- 17) Stephens, J. K., Vulliet, P. R., Nakane, P. K., Weiner, N.: *Catecholamines: Basic and Clinical Frontiers* (ed. Usdin, E., Kopin, I. J. and Barchas, J.) Vol. 1 1357, Pergamon Press, New York (1979)
- 18) Kuczenski, R. T., Mandell, A. J.: *J. Biol. Chem.*, 247, 3114-3122 (1972)

- 19) Fujisawa, H., Yamauchi, T., Nakata, H., Okuno, S.: 5th International Catecholamine Symposium, Göteborg (1983)
- 20) Pickel, V. M., Joh, T. H., Reis, D. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 659-663 (1975)
- 21) Harris, J. E., Morgenroth, V. H. III, Roth, R. H., Baldessarini, R. J.: *Nature*, **252**, 156-158 (1974)
- 22) Lovenberg, W., Bruckwick, E. A., Hanbauer, I.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 2955-2958 (1975)
- 23) Goldstein, M., Bronaugh, R. L., Ebstein, B., Roberge, C.: *Brain Res.*, **109**, 563-564 (1976)
- 24) Ames, M. M., Lerner, P., Lovenberg, W.: *J. Biol. Chem.*, **253**, 27-31 (1978)
- 25) Simon, J. R., Hegstrand, L. R., Roth, R. H.: *Life Sci.*, **22**, 421-428 (1978)
- 26) Lazar, M. A., Lockfeld, A. J., Truscott, R. J., Barchas, J. D.: *J. Neurochem.*, **39**, 409-422 (1982)
- 27) Raese, J., Patrick, R. L., Barchas, J. D.: *Biochem. Pharmacol.*, **25**, 2245-2250 (1976)
- 28) Matsuura, S., Sugimoto, T., Hasegawa, H., Imaizumi, S., Ichiyama, A.: *J. Biochem.*, **87**, 951-957 (1980)
- 29) Gál, E. M., and Sherman, A. D.: Structure and function of monoamine enzymes (ed. Usdin, E., Weiner, N. and Youdim, M.B.H.) 23, Marcel Dekker Inc., New York (1977)
- 30) Levine, R. A., Miller, L. P., Lovenberg, W.: *Science*, **214**, 919-921 (1981)
- 31) Morgenroth, V. H. III, Hegstrand, L. R., Roth, R. H., Greengard, P.: *J. Biol. Chem.*, **250**, 1946-1948 (1975)
- 32) Joh, T. H., Park, D. H., Reis, D. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4744-4748 (1978)
- 33) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 503-507 (1979)
- 34) Edelman, A. M., Raese, J. D., Lazar, M. A., Barchas, J. D.: *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **216**, 647-653 (1981)
- 35) Masserano, J. M., Weiner, N.: *Mol. Pharmacol.*, **16**, 513-528 (1979)
- 36) Lloyd, T., Kaufman, S.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **66**, 907-913 (1975)
- 37) Chalfie, M., Settapani, L., Perlman, R. L.: *Mol. Pharmacol.*, **15**, 263-270 (1979)
- 38) Pollock, R. J., Kapatos, G., Kaufman, S.: *J. Neurochem.*, **37**, 855-860 (1981)
- 39) Simon, J. R., Roth, R. H.: *Mol. Pharmacol.*, **16**, 224-233 (1979)
- 40) Vigny, A., Henry, J. D.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **106**, 1-7 (1982)
- 41) Sze, P. Y., Alderson, P. F., Hedrick, B. J.: *Brain Res.*, **268**, 129-137 (1983)
- 42) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 6408-6413 (1979)
- 43) Meligeni, J. A., Haycock, J. W., Bennett, W. F., Waymire, J. C.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 12632-12640 (1982)
- 44) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Eur. J. Biochem.*, **132**, 15-21 (1983)
- 45) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Biochemistry International*, **1**, 98-104 (1980)
- 46) Yamauchi, T., Nakata, H., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 5404-5409 (1981)
- 47) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **100**, 807-813 (1981)
- 48) Fujisawa, H., Yamauchi, T., Nakata, H., Okuno, S.: 67th Annual Meeting of FASEB, Chicago (1983)
- 49) Yanagahara, N., Tank, A. W., Weiner, N.: *Fed. Proc.*, **42**, 378 (1983)
- 50) Haycock, J. W., Meligeni, J. A., Bennett, W. F., Waymire, J. C.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 12641-12648 (1982)
- 51) Haycock, J. W., Bennett, W. F., George, R. J., Weymire, J. C.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 13699-13703 (1982)
- 52) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *FEBS Lett.*, **129**, 117-119 (1981)
- 53) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 975-981 (1982)
- 54) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 287-291 (1983)
- 55) Fujisawa, H., Yamauchi, T., Nakata, H., Okuno, S.: Molecular Aspects of Cellular Regulation (ed. Cohen, P.) 3, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam, 167-183 (1984)
- 56) Fujisawa, H., Yamauchi, T., Nakata, H., Okuno, S.: 5th International Conference on Cyclic Nucleotides and Protein Phosphorylation, Milan (1983)
- 57) Erny, R. E., Berezo, M. W., Perlman, R. L.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1335-1339 (1981)
- 58) Guroff, G., Dickens, G., End, D., Londos, C.: *J. Neurochem.*, **37**, 1431-1439 (1981)
- 59) Iuvone, P. M., Butler, B. K. J.: *Fed. Proc.*, **42**, 379 (1983)
- 60) Nishizuka, Y., Takai, Y., Kishimoto, A., Hashimoto, E., Inoue, M., Yamamoto, M., Griss, W. E., Kuroda, Y.: *Adv. Cyclic Nucleotide Res.*, **9**, 209-220 (1978)
- 61) Andrews, D. W., Langan, T. A., Weiner, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2097-2100 (1983)
- 62) Katz, I. R., Yamauchi, T., Kaufman, S.: *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 84-95 (1976)
- 63) Vigny, A., Henry, J. P.: *J. Neurochem.*, **36**, 483-489 (1981)
- 64) Hoeldtke, R., Kaufman, S.: *J. Biol. Chem.*, **252**, 3160-3169 (1977)
- 65) Kuczenski, R.: *Life Sci.*, **14**, 2379-2384 (1974)

- 66) Nagatsu, T., Numata(Sudo), Y., Kato, T., Sugiyama, K., Akino, M.: *Biochim. Biophys. Acta*, 523, 47-52 (1978)
- 67) Morita, K., Oka, M., Izumi, F.: *FEBS Lett.*, 76, 148-150 (1977)
- 68) 森田恭二・立川英一・大内 武・岡 源郎: 本誌, 26, 1342-1347 (1981)
- 69) Kuczenski, R.: *J. Biol. Chem.*, 248, 5074-5080 (1973)
- 70) Kuczenski, R.: *J. Neurochem.*, 40, 821-829 (1983)
- 71) Lloyd, T.: *J. Biol. Chem.*, 254, 7247-7254 (1979)
- 72) Kuczenski, R. T., Mandell, A. J.: *J. Neurochem.*, 19, 131-137 (1972)
- 73) Kuczenski, R. T.: *J. Neurochem.*, 37, 681-686 (1981)
- 74) Musacchio, J. M., Wurzbarger, R. J., D'Angelo, G. L.: *Mol. Pharmacol.*, 7, 136-146 (1971)
- 75) Kuczenski, R.: *J. Biol. Chem.*, 248, 2261-2265 (1973)

