

AMCoR

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

蛋白質・核酸・酵素 (1986) 31(16):1841-1850.

蛋白質燐酸化反応:刺激反応共役 モノアミン生合成の調節

奥野幸子, 藤沢仁

モノアミン生合成の調節

奥野幸子・藤沢 仁

カテコールアミンやインドールアミンはホルモンや神経伝達物質として重要な役割を担っている。これらのアミンは外部からの刺激に反応して分泌され、合成されるが、その合成速度は律速酵素であるチロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素の活性変動によって調節されている。そこでこれらの律速酵素の活性調節機構の解明に努力が払われてきたが、最近チロシン水酸化酵素の活性調節機構についての研究が進み、蛋白質磷酸化酵素が主要な役割を果たしていることが明らかになってきたので、筆者らの結果も交えながら研究の現状を概説した。

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や、セロトニン、メラトニンなどのインドールアミンは、いずれもホルモンや神経刺激伝達物質として働いている。これらのアミンはそれぞれ特定の細胞で合成され、貯蔵されており、細胞が外部からの刺激を受けると、それに反応して分泌され、情報を次の細胞に伝達する。そして分泌によって消費されたアミンは再び合成されて補充され、次の刺激応答反応に備えられる。このような刺激から分泌に至る反応の連鎖を、分子レベルで明らかにしようとする研究が盛んに行なわれつつあるが、なかでもカテコールアミン合成の調節機構に関する研究は急速な進展をみている。

図1はカテコールアミンおよびインドールアミンの生合成経路を示したものである。いずれも芳香族アミノ酸を基質として、まず芳香環の水酸化が、次いで側鎖の脱炭酸が起り、アミンが生じる、という非常によく似た経路を示し、第2段階の反応を触媒する脱炭酸酵素は、双方に共通である。また第1段階の反応を触媒するそれぞれの水酸化酵素も、後述するように非常に類似点が多いのは興味深い。チロシンからドーパへの反応を触媒するチロシン水酸化酵素^{1,2)}がカテコールアミン生合成の律

速酵素であり、トリプトファンから5-ヒドロキシトリプトファンへの反応を触媒するトリプトファン水酸化酵素³⁾がセロトニン生合成の律速酵素であるので、これらの水酸化酵素の活性を高めたり抑えたりしながら、カテコールアミンやセロトニンの合成速度が調節されている。そのため、この両酵素の活性調節機構の重要性が多くの研究者の注目を集め、これまでに酵素活性に影響を与える種々の因子が報告され、複雑な調節機構が存在するらしいと推定されてきた。

1970年代後半から1980年代にかけて、精製困難とされていたチロシン水酸化酵素⁴⁻⁶⁾と、トリプトファン水酸化酵素^{7,10)}が均一に精製され、その性質が明らかにされた。還元型ピテリンを電子供与体とする一原子酸素添加酵素であり、よく似た反応を触媒する両酵素は、いずれも分子量59Kのサブユニット4個から構成されており、酵素の安定化条件などの結果も、両酵素の分子構造がきわめて似かよっていることを考えさせる^{6,9)}。酵素蛋白質の性質が明らかになる一方で、酵素活性の調節機構についての研究も進み、これらの水酸化酵素がカルモデュリン依存性プロテインキナーゼ(CaMキナーゼ)IIによって、同様な機構で活性化されることも明らかにさ

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

Regulation of Monoamine Biosynthesis

[Key word] 【チロシン水酸化酵素】【カテコールアミン】【cAMP】【蛋白質磷酸化酵素】

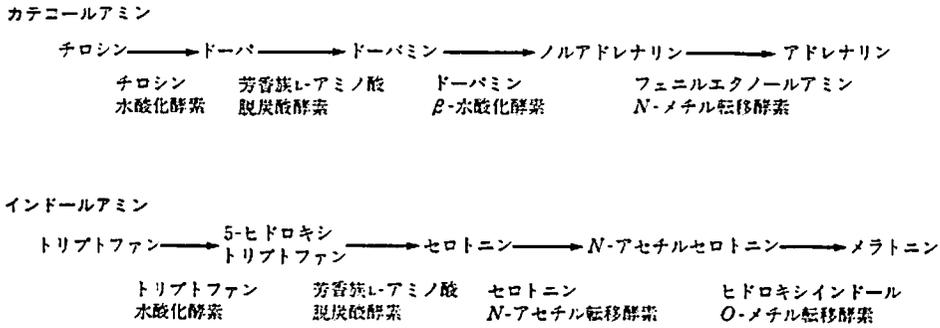


図 1. カテコールアミンおよびインドールアミンの生合成経路

れた^{11,12)}。

cAMP や Ca^{2+} が、セカンドメッセンジャーとして細胞内での情報伝達の役割を担っていること、それらが蛋白質磷酸化反応を介していることが明らかになり、種々多様な細胞機能の発現に参与している蛋白質磷酸化反応の重要性が認識されてきているが、モノアミン合成の調節に関しても蛋白質磷酸化反応が主要な役割を果たしていることが最近明らかになってきた。

筆者らの研究室でも、これまでモノアミンの合成と分泌の調節機構の研究を進めてきたが、興味ある実験結果をいくつか得ているので、それらも含めて、研究の進展が著しいチロシン水酸化酵素の磷酸化による調節機構を中心に、モノアミン合成の調節機構について考えてみたい。

I. チロシン水酸化酵素の活性調節

チロシン水酸化酵素がカテコールアミン合成系の律速酵素であることから、酵素の活性調節機構の研究は、チロシン水酸化酵素の発見と同時に開始された。20 余年を経た現在、酵素活性の抑制に働くもの、活性化に働くものなど、種々の調節因子が報告されたが、それぞれについてはすでに本誌¹³⁾で述べたので、それ以後、明らかになってきた知見を紹介しながら、調節機構の可能性を考えたい。

1. 不活性型酵素

細胞内の pH は 7 付近に保たれていると考えられているが、ラットの線条体の粗抽出液中のチロシン水酸化酵素は、pH 7 で活性を測定すると酵素活性が認められないので、酵素は中性の環境では不活性な状態にあると考えられた¹⁴⁾。この不活性型の酵素を精製すると、中性で高い活性を示すようになるので、生体内にはチロシン水

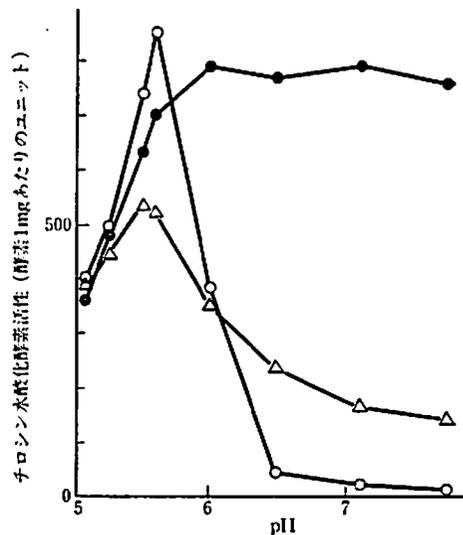


図 2. 内在性活性抑制物質によるチロシン水酸化酵素活性の pH 依存性の変化

ラット線条体の粗酵素を pH 5 にして酵素蛋白質を酸性沈殿させ、遠心して酸上清画分と分離した。粗酵素 (O)、酸性沈殿した酵素 (●) および酸性沈殿した酵素に酸上清画分を加えて 30°C、20 分間保温したもの (Δ) それぞれの酵素活性を測定した。1 ユニットは 1 分間あたり 1 nmol のドーパを生ずる酵素活性を示している。チロシン水酸化酵素量は、酵素に対するモノクローン抗体を用いて免疫滴定により定量した。

酸化酵素を不活性型に保っている活性抑制物質が存在し、この物質が精製操作で酵素からとり除かれたのではないかと考えられた¹⁵⁾。

図 2 は、内在性活性抑制物質についてラットの線条体を用いて調べた筆者らの実験結果を示したものである。粗抽出液中のチロシン水酸化酵素の活性は酸性で高く、中性付近では活性がほとんど認められなかったが、この酵素液を pH 5 にして蛋白質を沈殿させ、上清と分離す

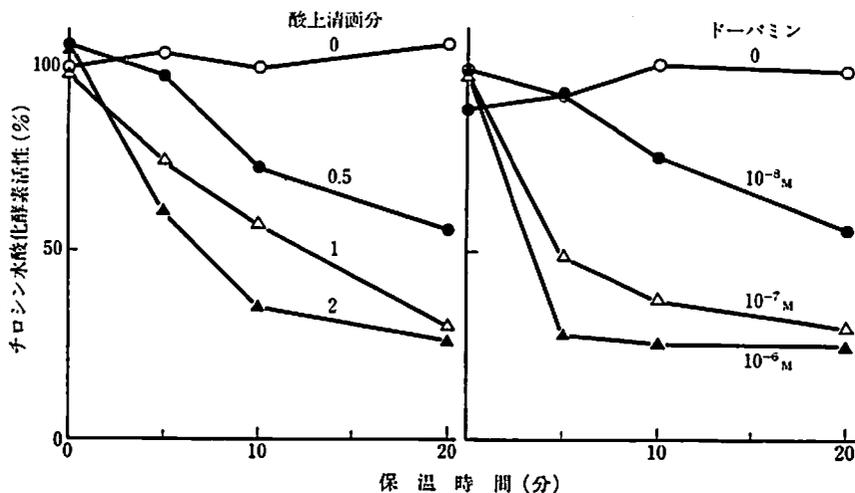


図3. 内在性活性抑制物質とドーパミンによるチロシン水酸化酵素の不活性化
酸性沈殿した酵素を、酸上清画分（左図）あるいはドーパミン（右図）と30°Cで保温したのち、pH 7で酵素活性を測定した。酸上清画分の添加量は、粗酵素中に含まれるチロシン水酸化酵素との相対量で示した。

ると、沈殿に回収されたチロシン水酸化酵素は中性付近で高い活性を示し、至適 pH となった。この酵素に、酸性処理で分離された上清画分を添加して保温すると、中性の酵素活性は再び低下して、酸性に至適 pH を示す酵素に戻った。これらの結果は、チロシン水酸化酵素が内在性の活性抑制因子によって、生体内では不活性型に保たれていること、内在性活性抑制因子は pH 処理の操作で酸上清画分に回収され、沈殿画分の酵素と分離されることを示している¹⁵⁾。その後の研究から、この内在性活性抑制因子がチロシン水酸化酵素の最終反応産物、カテコールアミンであることも明らかになった¹⁶⁾。

カテコールアミンによるチロシン水酸化酵素の活性阻害作用は、すでにチロシン水酸化酵素が発見された当時から見いだされており¹⁾、補酵素ブテリンと拮抗的な阻害様式を示すことも明らかにされ、この反応産物によるフィードバック阻害機構が、チロシン水酸化酵素の活性調節に重要な役割を果たしている可能性も考えられてきた。酵素を活性化する種々の因子が、酵素の補酵素ブテリンに対する親和性を増大させるとともに、カテコールアミンに対する親和性を減少させることによって作用することも報告されている¹⁸⁾。しかし、カテコールアミンは細胞内の分泌顆粒中に貯えられており、細胞質で働いている¹⁷⁾チロシン水酸化酵素とは局在部位が異なるので、はたしてカテコールアミンがチロシン水酸化酵素の活性を調節し得るほど高濃度に細胞質中に存在しているのだろうかという疑問が残されてきた。

図3は内在性活性抑制物質とドーパミンによる酵素の不活性化を調べた筆者らの実験結果を示したものである。酵素の不活性化に働くカテコールアミンは、充分量の補酵素ブテリン存在下においても、 $10^{-8} M$ という非常に低い濃度で効果を示し、また不活性化には酵素とカテコールアミンとの保温が必要であること、さらに、この不活性化は中性領域で酵素活性を測定したときのみ認められ、酸性領域で活性を測定した場合には認められないことなどから、このカテコールアミンによる酵素の不活性化の機構は、従来から知られている補酵素ブテリンと拮抗的な阻害機構とは異なったものであると考えられた¹⁶⁾。

細胞質にはチロシン水酸化酵素とともに、大過剰の芳香族 L-アミノ酸脱炭酸酵素が存在しているので¹⁷⁾、チロシン水酸化酵素が1回転反応すればそれだけで酵素を不活性化するのに十分なドーパミンが細胞質中に生成されると考えられる。酵素の不活性化にはドーパミン、ノルアドレナリン、アドレナリンおよびノルアドレナリンの代謝物である DOPEG のいずれでも同等な効果を示す¹⁹⁾ので、ドーパミン作働性、ノルアドレナリン作働性、アドレナリン作働性の細胞では、それぞれの最終反応産物や代謝産物が酵素の不活性化に関与している可能性がある。

2. 酵素の活性化

以上のようにチロシン水酸化酵素が平常は不活性型で

存在していることが明らかになったので、酵素はカテコールアミンの合成が必要なときのみ、不活性型から活性型へ転換して作働するという、活性型と不活性型の相互転換による調節機構が考えられた。不活性型酵素から活性型への転換がどのような機構によっているのかは、非常に興味深い問題である。

チロシン水酸化酵素の活性化因子として従来から報告されているものには、ポリアニオン、塩、磷脂質、蛋白質磷酸化酵素、蛋白質分解酵素などがある¹³⁾。このうち、蛋白質分解による活性化は不可逆であり、酵素の活性型と不活性型の相互転換には関与しないと考えられる。ポリアニオン、塩、磷脂質などの化合物と、蛋白質磷酸化反応のそれぞれについて活性化効果を検討した筆者らの実験結果では、塩や磷脂質による著明な活性化は認められなかった⁶⁾が、ポリアニオン、cAMP 依存性プロテインキナーゼ (Aキナーゼ)、カルモデュリン依存性プロテインキナーゼ (CaM キナーゼ) II による活性化が認められた。なかでも Aキナーゼによる活性化は、特に生理的 pH である中性付近で酵素活性を測定した場合に著しく、酵素の不活性型と活性型の重要な調節因子であろうと考えられた。

A. Aキナーゼによる調節

チロシン水酸化酵素が Aキナーゼによって磷酸化され、活性化されることは、*in vitro*^{4,5,18,19)} および *in situ*²⁰⁾ の多くの実験結果から、現在広く認められている。しかし、その活性化のメカニズムについては研究者によって異なった結果が報告されている。Aキナーゼによって磷酸化を受けると、チロシン水酸化酵素蛋白質の高次構造が変化し、補酵素ブテリンに対する親和性が增大して、酵素が活性化されるという報告が多いが^{4,5,9,20)}、活性化は補酵素に対する K_m の低下によるものではなく、 V_{max} の上昇によるものであるとの報告もある¹⁸⁾。酵素の磷酸化に関しても異なった結果が報告されている。4個のサブユニットから構成されているチロシン水酸化酵素には、サブユニット1モルあたり1モルの磷酸がセリン残基に取り込まれるという報告^{4,9)}と、4量体あたり1モルの磷酸が取り込まれる⁹⁾という報告がある。磷酸化部位に関しても、後述のように Aキナーゼに固有の磷酸化部位が存在するのか、あるいは、最近報告が相次いでいる他の蛋白質磷酸化酵素によっても磷酸化を受ける共通の部位であるのか議論がある。

図4は、Aキナーゼによって、不活性型のチロシン水酸化酵素を活性化した筆者らの結果である。生理的条件である pH7 付近では酵素活性をもたない不活性型酵素

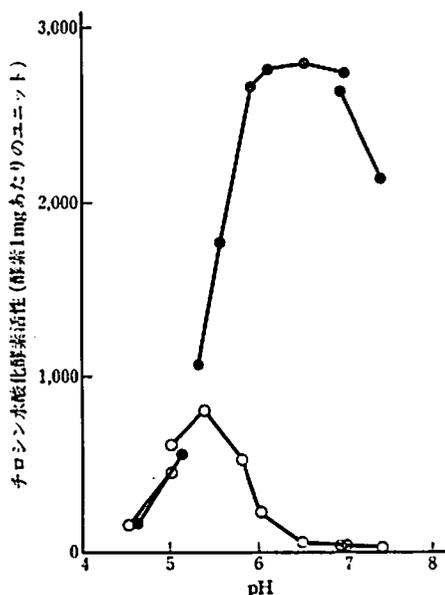


図4. Aキナーゼによる不活性型チロシン水酸化酵素の活性化

○: 粗酵素, ●: Aキナーゼで活性化された酵素。

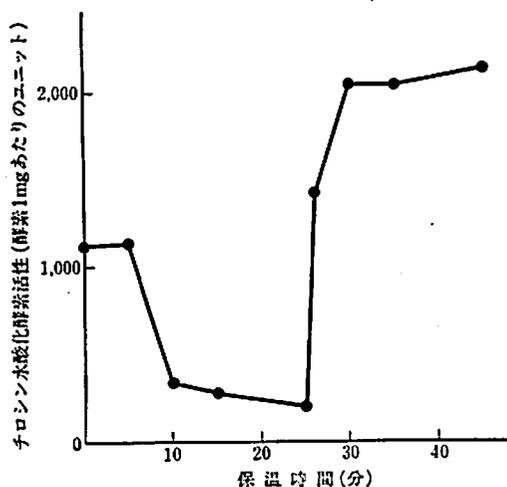


図5. チロシン水酸化酵素の不活性化、活性化の経時変化
酸性沈殿した酵素を 30°C で保温し、5 分後、ドーパミンを加え酵素を不活性型に転換し、25 分後、Aキナーゼの触媒サブユニットを加えて酵素を活性化した。酵素活性は pH7 で測定した。

に、Aキナーゼの触媒サブユニットを添加して磷酸化すると、中性付近の活性が著明に上昇し、至適 pH を示した。抗体を用いて酵素蛋白質量を定量した結果、活性化された酵素の比活性は、中性 pH で 2,800 nmol/min/mg にも達した¹⁸⁾。図5は、酸性処理して得た pH7 に活性をもつチロシン水酸化酵素に、ドーパミンを作用さ

せて不活性型にし、不活性型酵素にAキナーゼを作用させて活性化した場合の、pH7での酵素活性の経時変化を調べたものである。

従来、チロシン水酸化酵素のAキナーゼによる活性化は、せいぜい数倍にすぎないと報告されていたので、この程度の活性化で、神経刺激に应答して分泌されるカテコールアミンの合成というすばやい調節が説明できるのか、との疑問ももたれていた。しかし、図4、5の実験結果は、チロシン水酸化酵素の不活性型から活性型への劇的な変化が、Aキナーゼによって行なわれ得ることを示したものである。これらの実験には、1mMの6-メチルプテリンを使用しており、この点からも、劇的なこの活性化が、酵素の補酵素プテリンに対する親和性の増加によるよりは、 V_{max} の上昇によるものであると考えられる。

生体内で作用している天然補酵素はビオプテリンであり、チロシン水酸化酵素は高次構造変化により、この補酵素に対して、high K_m (100 μM) 型、low K_m (20 μM) 型の2つの活性状態を示すともいわれている²¹⁾。またビオプテリンの細胞内濃度は非常に低く(1~5 μM)、このビオプテリン濃度がチロシン水酸化酵素の重要な活性調節因子であるとの考えもあるが²¹⁾、他方、モノアミン作働性の細胞ではビオプテリン濃度が高く、ドーパミン作働性神経の終末部の濃度は100 μM ²²⁾、培養細胞NIE-115およびPC-12では、それぞれ40 μM 、25 μM ²³⁾との報告もある。

B. CaM キナーゼ II による調節

1980年に筆者らの研究室で、CaM キナーゼによってチロシン水酸化酵素が活性化されることが初めて明らかになった²⁴⁾。そして、この反応を触媒する新しい蛋白質燐酸化酵素を脳に見だし、CaM キナーゼIIと名づけた²⁵⁾。CaM キナーゼIIによるチロシン水酸化酵素の活性化の機構を調べたところ、チロシン水酸化酵素は、この蛋白質燐酸化酵素によって燐酸化を受けただけでは活性化されず、燐酸化された酵素に、もうひとつの蛋白質因子、活性化蛋白質¹³⁾が作用してはじめて活性化されるという、2段階の反応からなる活性化機構であり、酵素が燐酸化を受けると活性が上昇するというAキナーゼによる活性化とは異なった機構によるものであることが明らかになった。

CaM キナーゼIIによる燐酸化と、活性化蛋白質による活性化という、この2段階の反応で、セロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素も、同じように活性化を受ける¹⁴⁾。これらのよく似た2つの水酸

化酵素が同じ機構で活性化されることは興味深い。

脳に特異的に分布するCaM キナーゼIIは、チロシン水酸化酵素やトリプトファン水酸化酵素を基質とするばかりでなく、広い基質特異性を示し、脳の多くの種類の蛋白質を燐酸化するので、 Ca^{2+} による神経機能の調節に多彩な役割を担っている可能性があり、興味ももたれている。微小管を構成するチューブリンやMAP2も基質となり、燐酸化を受けると微小管の脱重合が起こることも明らかになった^{26,27)}。微小管やアクチンなどの細胞骨格蛋白質は、細胞内の物質輸送や分泌などの、細胞の動的機構に働いていると推定されており、神経刺激に应答して起こるカルシウム依存性のモノアミンの分泌に、CaM キナーゼIIが、これらの細胞骨格蛋白質の燐酸化反応を介して機能していることは充分考えられる。CaM キナーゼIIは、また、自らの酵素蛋白質をも基質として自己燐酸化を行ない、不活性化されることが見いだされ、酵素活性を自己調節する機能を備えていることも明らかになった²⁸⁾。さらに、脳に特異的なこのCaM キナーゼIIが、骨格筋のグリコーゲン合成酵素キナーゼとアイソザイムの関係であることが、両酵素の基質特異性が一致することや、CaM キナーゼIIに対するモノクローン抗体が両酵素と反応することなどから明らかになった²⁹⁾。CaM キナーゼIIは、筆者らの研究室とは独立に、それぞれ、チューブリンキナーゼ³⁰⁾、シナプシン1キナーゼII³¹⁾としても報告されている。

図6は、筆者らが不活性型チロシン水酸化酵素にカルモデュリンおよび活性化蛋白質を添加して、CaM キナーゼIIによる活性化を調べた結果である。CaM キナーゼIIで活性化されたチロシン水酸化酵素の活性のpH依存性は、Aキナーゼで燐酸化された場合とは異なっており、もとの不活性型酵素のパターンと同じように酸性領域に至適pHを示した。生理的pHと考えられる中性付近での活性化率は小さく、Aキナーゼによって活性化した場合にはとうてい及ばないので、不活性型チロシン水酸化酵素の活性型への転換には、*in vitro*で得られたこれらの結果から判断するかぎり、Aキナーゼが主要な役割を果たしているように思われる。しかし、培養細胞やスライスの実験系では、 Ca^{2+} に依存したチロシン水酸化酵素の活性化が多数報告されている。これらの*in vitro*、*in situ*での実験で得られた結果を合わせて考えると、CaM キナーゼIIは、チロシン水酸化酵素の燐酸化、活性化に直接的に作用するというより、むしろカテコールアミンの分泌機構の調節に主として関与して、分泌に連動するプレシナプス受容体を介した活性

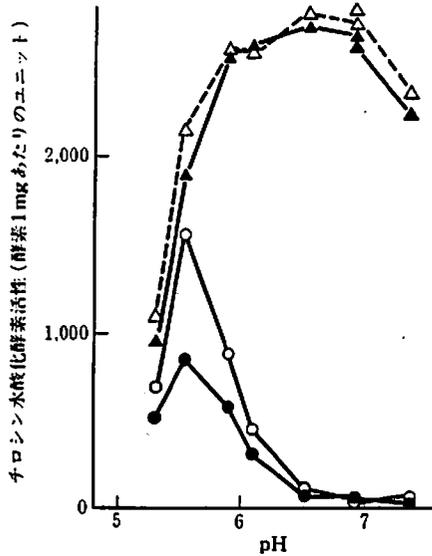


図6. AキナーゼおよびCaMキナーゼIIによるチロシン水酸化酵素の活性化
 ●:粗酵素, ○:CaMキナーゼIIによって活性化された酵素, ▲:Aキナーゼによって活性化された酵素, △:AキナーゼおよびCaMキナーゼIIによって活性化された酵素。

化機構で、二次的にモノアミン合成を調節している可能性も考えられる。

チロシン水酸化酵素がCaMキナーゼIIによって磷酸化を受ける部位についてもいくつかの報告がある。精製したチロシン水酸化酵素を、骨格筋のグリコーゲン合成酵素キナーゼで磷酸化すると^{32,33)}、酵素のサブユニット1モルあたり1モルの磷酸が取り込まれるが、その磷酸化部位は、Aキナーゼによっても磷酸化を受けるA部位と、CaMキナーゼに特異的な部位と考えられるC部位の双方に認められ、いずれの場合もセリン残基が磷酸化されることが報告された。この結果は、ウソ副腎髄質のクロマフィン細胞³⁴⁾を用いて行なわれた実験結果と一致しているが、他方、PC-12細胞を用いた実験では³⁵⁾、Aキナーゼによって磷酸化される部位と、カルシウム依存性プロテインキナーゼによって磷酸化される部位は異なっており、それぞれ1カ所ずつ存在するとの報告がある。

C. その他の蛋白質磷酸化酵素による調節

細胞膜成分のひとつであるホスファチジルイノシトールの代謝回転に伴って活性化されるCa²⁺、磷脂質依存性プロテインキナーゼ(Cキナーゼ)³⁶⁾が数々の細胞機能の調節に関与していることが明らかになってきており、注目されている。

チロシン水酸化酵素がCa²⁺とホスファチジルセリンに依存した活性化を受けることが報告され³⁷⁾、Aキナーゼ、CaMキナーゼIIに加えて、さらにCキナーゼがチロシン水酸化酵素の活性化機構に関与していることが考えられた。精製したチロシン水酸化酵素とCキナーゼを用いた実験から³⁸⁾、チロシン水酸化酵素がCキナーゼによって磷酸化され、活性化されることが報告された。このCキナーゼによる活性化は、補酵素ブテリンに対するK_m値の低下によるもので、V_{max}の増加は伴わない。

磷酸化部位についても解析され、セリン残基が磷酸化されることや、Aキナーゼで磷酸化した場合の部位と一致することが報告された^{33,39)}。一方、McTigueらは培養細胞PC-12³⁵⁾を用いた実験を行ない、ホルボールエステルを用いてCキナーゼを活性化すると、PC-12細胞中のチロシン水酸化酵素は磷酸化されて約2倍活性化されるが、酵素が磷酸化を受ける部位は、AキナーゼやCaMキナーゼによる場合とは異なった、Cキナーゼに固有の部位であること、Cキナーゼを活性化するホスファチジルイノシトールの代謝は、種々の細胞刺激にตอบสนองしやすいので、細胞を脱分極の条件や、cAMP濃度の高い条件に曝した場合にも、ホスファチジルイノシトール代謝を介してCキナーゼに固有の部位に磷酸が取り込まれることを述べている。

筆者らもCキナーゼによるチロシン水酸化酵素の活性化について*in vitro*で検討を進めているが、精製したチロシン水酸化酵素はCキナーゼで磷酸化を受けるものの、不活性型酵素から活性型への転換にCキナーゼが関与している可能性を示唆するほどの顕著な活性の変化は認められなかった。

Cキナーゼによる活性化のほかに、Andrewsら³⁹⁾は、ラット線条体のチロシン水酸化酵素がcAMPやCa²⁺に非依存性の蛋白質磷酸化反応で約2倍活性化され、この活性化がV_{max}の上昇によるものであることを報告した。

また、McTigueら³⁵⁾はPC-12培養細胞に上皮成長因子(EGF)を作用させるとチロシン水酸化酵素の磷酸化と活性化が起こることを報告し、神経成長因子(NGF)によるチロシン水酸化酵素の活性化が、Aキナーゼを介したものであるのに対して、EGFによる活性化はcAMPに非依存性であり、Aキナーゼ、CaMキナーゼ、Cキナーゼによって磷酸化される部位とは異なった第4番目のEGF感受性の磷酸化部位が存在することを示し、チロシン水酸化酵素の活性化に4種類の蛋白質磷酸化酵素が関与している可能性を述べた。しかし、このEGF

によるチロシン水酸化酵素の活性化に関与している蛋白質リン酸化酵素の性質については明らかにされていない。

これらの活性化機構の詳細に関しては、今後の報告に待たねばならない。

D. ポリアニオンによる活性化

種々の蛋白質リン酸化酵素による活性化のほかに、チロシン水酸化酵素は、ポリアニオンを添加した場合にも活性化される¹⁹⁾。

図7は、不活性型のチロシン水酸化酵素と、Aキナーゼで活性化された酵素のそれぞれに、ポリアニオンを作用させたときの酵素活性のpH依存性を示したものである。不活性型酵素にポリアニオンを作用させると、中性領域での酵素活性は上昇してpH6付近に至るpHを示し、酸性では逆に、もとの不活性型酵素より活性が低下した。中性で活性化が認められるものの、活性化された酵素のpH7での活性は、Aキナーゼで活性化された酵素に比べるとはるかに低く、生理的pHで起こるチロシン水酸化酵素の不活性型から活性型への転換には、ポリアニオンがそれほど寄与していないように見える。

Aキナーゼによって活性化された酵素にポリアニオンを作用させた場合は、中性領域での酵素活性にはポリアニオンによる新たな活性化は認められなかったが、酸性領域でのポリアニオンによる活性低下は不活性型酵素の場合と同じように認められた。チロシン水酸化酵素は、

活性型、不活性型にかかわらず、ポリアニオンが作用すると、酸性での活性が低下した違った状態の酵素に変化

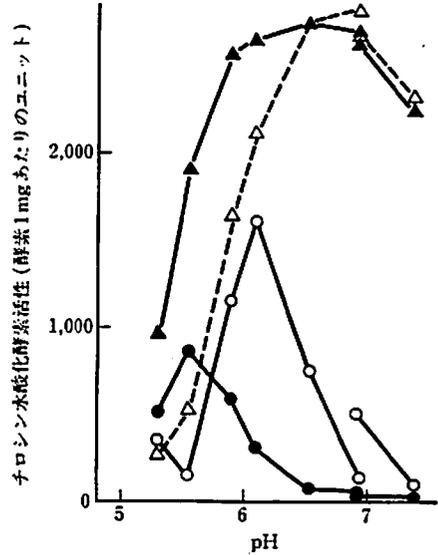


図7. Aキナーゼおよびポリアニオンによるチロシン水酸化酵素の活性変動
●: 粗酵素, ○: ポリアニオンで活性化された酵素, ▲: Aキナーゼで活性化された酵素, △: Aキナーゼおよびポリアニオンで活性化された酵素。

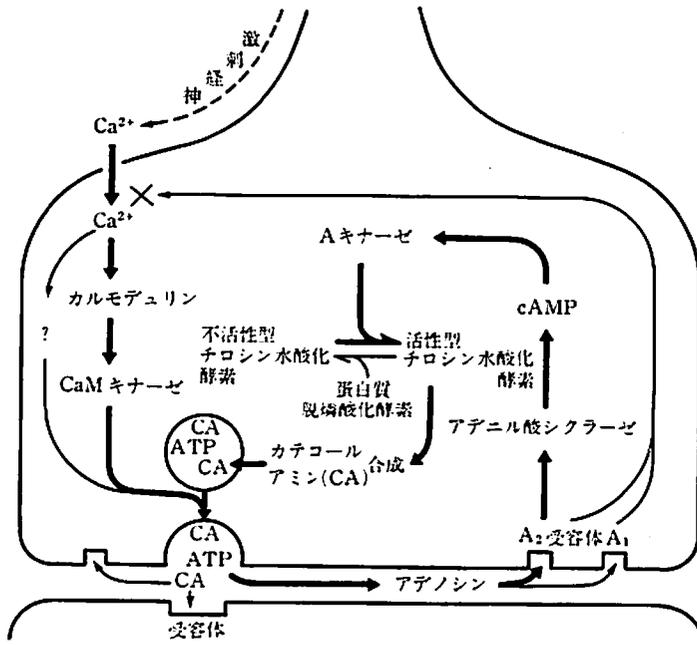


図8. カテコールアミンの分泌と合成の調節

すると思われる。

細胞内でのチロシン水酸化酵素の活性調節に、ポリアニオンがどのようにかかわっているのかは、現在のところ明らかではないが、Richtand ら⁸⁾は燐酸化されて不安定になった酵素をポリアニオンが安定に保ち、燐酸化を介した酵素の活性化に、補助的に作用しているとの考えを報告している。

3. 受容体を介するモノアミン分泌と合成の調節機構

以上のようなチロシン水酸化酵素の活性調節機構が細胞内ではどのように働いているのだろうか。これまでに得られた筆者らの実験結果を中心に、神経刺激にตอบสนองして起こるカテコールアミンの分泌と合成の調節機構について、筆者らは図8のような可能性を考えた⁴⁶⁾。

(1) 神経が刺激を受け、興奮が軸索を通過して神経終末に伝えられると、膜の脱分極が起こり、電位依存性のカルシウムチャネルが開いて Ca^{2+} が神経終末へ流入する。

(2) 神経終末に流入した Ca^{2+} は、カルモデュリンに結合して、CaM キナーゼIIを活性化する。

(3) CaM キナーゼIIは微小管などの細胞骨格蛋白質を燐酸化し、カテコールアミン分泌などの細胞内物質輸送に関与している可能性がある。分泌には、Cキナーゼやカルモデュリン依存性のミオシン軽鎖キナーゼなどのカルシウム依存性プロテインキナーゼの関与も考えられる。

(4) カテコールアミンは分泌顆粒から開口分泌によってシナプス間隙に放出され、次の神経細胞(シナプス後)の受容体に情報を伝える。一部はシナプス前のオートレセプターにも結合すると考えられる。¹⁾

(5) 開口分泌によってカテコールアミンとともに多量のATPがシナプス間隙に放出されることが知られている。放出されたATPはただちにアデノシンに代謝されてシナプス前膜のアデノシン受容体に結合すると考えられる。

(6) アデノシンがアデニル酸シクラーゼを活性化すること⁴²⁾や、細胞内のcAMP濃度を上昇させてチロシン水酸化酵素を活性化すること^{43,44)}が、培養細胞を用いた実験で報告されているので、アデノシンがアデノシン受容体を介してアデニル酸シクラーゼを活性化し、その結果、細胞内のcAMP濃度が上昇してAキナーゼが活性化されると考えられる。

(7) Aキナーゼが、不活性型チロシン水酸化酵素を活性型に転換する。

(8) 活性型チロシン水酸化酵素は分泌によって消費されたカテコールアミンを合成して補充する。

(9) 一方でアデノシンは、受容体を介してカルシウムポテンシャルを低下させる方向に働くことが知られているので⁴⁵⁾、 Ca^{2+} に依存した分泌は抑制され、それに伴ってシナプス前受容体を介したAキナーゼの活性化も停止し、活性型チロシン水酸化酵素は脱燐酸化されて⁴⁶⁾、もとの不活性型にもどり、カテコールアミン合成も停止することが考えられる。また、分泌されたカテコールアミンもシナプス前膜の受容体(オートレセプター)を介してチロシン水酸化酵素の不活性化の方向に働くといわれている。受容体を介してカルモデュリンのカルボキシメチル化が起こり、CaM キナーゼの不活性化を引き起こすこと⁴⁷⁾、受容体を介してAキナーゼの不活性化を引き起こすこと⁴⁸⁾などが報告されている。

おわりに カテコールアミンの生合成の調節機構を、律連酵素であるチロシン水酸化酵素の活性調節を中心に、筆者らの仮説も交えて研究の現状を紹介した。チロシン水酸化酵素は種々の条件で活性化されることが報告され、活性が変動しやすく、不安定で、取り扱いにくい酵素と考えられ、生体内では本当はどんな活性調節機構が働いているのかに興味をもたれながらも、その解明はなかなか容易でなかった。チロシン水酸化酵素の活性調節に、蛋白質燐酸化反応が関与していることが明らかになり、その後の数年間に飛躍的に研究が進み、調節機構の概略が浮きぼりにされてきた。現在、筆者らは、Aキナーゼが活性化機構の主役であり、平常は不活性型であるチロシン水酸化酵素を燐酸化して活性型に転換し、調節していると考えている。細胞内のcAMP濃度が減少すると、燐酸化反応が低下し、チロシン水酸化酵素は蛋白質脱燐酸化酵素によって脱燐酸化を受け、もとの不活性型に戻ると考えられるが、この燐酸化と脱燐酸化反応を主軸に、他の蛋白質燐酸化酵素やその他の調節因子が直接、間接に関与して、調節のネットワークが形成されているものと思われる。

チロシン水酸化酵素をめぐる調節機構については、本稿で述べたような、刺激にตอบสนองして起こる不活性型から活性型へのすばやい転換のほか、酵素誘導による調節機構が知られている。最近、チロシン水酸化酵素のcDNAが得られ^{49,50)}、その構造が明らかにされて⁵¹⁾ 遺伝子レベルでの研究も可能となった。cDNAを用いてmRNAを定量する酵素誘導機構の研究も始められてい

る^{50,52-54})。Schwartzらは酵素誘導にもAキナーゼが関与していると述べている⁵⁵)。

チロシン水酸化酵素に比べると、セロトニン合成の律速酵素であるトリプトファン水酸化酵素の活性調節機構についてはまだ不明な点が多い。前述したように、この2つの水酸化酵素には種々の点で共通するところが多い。活性調節についても類似した機構が存在することも考えられ、今後の研究の進展が期待される。

文 献

- 1) Nagatsu, T., Levitt, M., Udenfriend, S.: *J. Biol. Chem.*, **239**, 2910-2917 (1964)
- 2) Levitt, M., Spector, S., Sjoerdsma, A., Udenfriend, S.: *J. Pharmacol. Exp. Therp.*, **148**, 1-8 (1965)
- 3) Grahame-Smith, D. G.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **16**, 586-595 (1964)
- 4) Vulliet, P. R., Langan, T. A., Weiner, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **77**, 92-96 (1980)
- 5) Markey, K. A., Kondo, S., Shenkman, L., Goldstein, M.: *Mol. Pharmacol.*, **17**, 79-85 (1980)
- 6) Okuno, S., Fujisawa, H.: *Eur. J. Biochem.*, **122**, 49-55 (1982)
- 7) Oka, K., Asiba, G., Sugimoto, T., Matsuura, S., Nagatsu, T.: *Biochim. Biophys. Acta*, **706**, 188-196 (1982)
- 8) Richtand, N. M., Inagami, T., Misono, K., Kuczenski, R.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 8465-8473 (1985)
- 9) Nakata, H., Fujisawa, H.: *Eur. J. Biochem.*, **122**, 41-47 (1982)
- 10) Nakata, H., Fujisawa, H.: *Eur. J. Biochem.*, **124**, 595-601 (1982)
- 11) Yamauchi, T., Nakata, H., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 5404-5409 (1981)
- 12) Fujisawa, H., Yamauchi, T., Nakata, H., Okuno, S.: *Enzyme regulation by reversible phosphorylation—further advances* (ed. Cohen, P.), pp. 167-183, Elsevier Science Publishers B. V. (1984)
- 13) 奥野幸子・藤沢 仁: 本誌, **29**, 1286-1294 (1984)
- 14) Okuno, S., Fujisawa, H.: *J. Biochem.*, (Tokyo), **97**, 265-273 (1985)
- 15) Okuno, S., Fujisawa, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **124**, 223-228 (1984)
- 16) Okuno, S., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 2633-2635 (1985)
- 17) Okuno, S., Yamauchi, T., Nakata, H., Fujisawa, H.: *Biogenic Amines*, **1**, 291-295 (1984)
- 18) Joh, T. H., Park, D. H., Reis, D. J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **75**, 4744-4748 (1978)
- 19) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, **254**, 503-507 (1979)
- 20) Meligeni, J. A., Haycock, J. W., Bennett, W. F., Waymire, J. C.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 12632-12640 (1982)
- 21) 永津俊治: 本誌, **26**, 1331-1341 (1981)
- 22) Levine, R. A., Miller, L. P., Lovenberg, W.: *Science*, **214**, 919-921 (1981)
- 23) Bräutigam, M., Dreesen, R., Herken, H.: *J. Neurochem.*, **42**, 390-396 (1984)
- 24) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Biochemistry International*, **1**, 98-104 (1980)
- 25) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Eur. J. Biochem.*, **132**, 15-21 (1983)
- 26) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **109**, 975-981 (1982)
- 27) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **110**, 287-291 (1983)
- 28) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 213-219 (1985)
- 29) Woodgett, J. R., Cohen, P., Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *FEBS Lett.*, **170**, 49-54 (1984)
- 30) Goldenring, J. R., Gonzalez, B., DeLorenzo, R. J.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 421-428 (1982)
- 31) Kennedy, M. B., Greengard, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 1293-1297 (1981)
- 32) Vulliet, P. R., Woodgett, J. R., Cohen, P.: *J. Biol. Chem.*, **259**, 13680-13683 (1984)
- 33) Vulliet, P. R., Woodgett, J. R., Ferrari, S., Hardie, D. G.: *FEBS Lett.*, **182**, 335-339 (1985)
- 34) Haycock, J. W., Bennett, W. F., George, R. J., Waymire, J. C.: *J. Biol. Chem.*, **257**, 13699-13703 (1982)
- 35) McTigue, M., Cremins, J., Halegoua, S.: *J. Biol. Chem.*, **260**, 9047-9056 (1985)
- 36) Nishizuka, Y.: *Nature*, **308**, 693-698 (1984)
- 37) Iuvone, P. M., Butler, B. K. J.: *Fed. Proc.*, **42**, 379 (1983)
- 38) Albert, K. A., Helmer-Matyjek, E., Nairn, A. C., Müller, T. H., Haycock, J. W., Greene, L. A., Goldstein, M., Greengard, P.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 7713-7717 (1984)
- 39) Andrews, D. W., Langan, T. A., Weiner, N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 2097-2101 (1983)
- 40) Fujisawa, H., Yamauchi, T., Nakata, H., Okuno, S.: *Oxygenases and Oxygen Metabolism* (eds. Nozaki, M., Yamamoto, S., Ishimura, Y., Coon, M. J., Ernster, L., Estabrook, R. W.) pp. 281-290, Academic Press, New York
- 41) 奥野幸子・藤沢 仁: 生化学, **56**, 1380-1389 (1984)
- 42) Guroff, G., Dickens, G., End, D., Londos, C.: *J. Neurochem.*, **37**, 1431-1439 (1981)
- 43) Erny, R. E., Berezo, M. W., Perlman, R. L.: *J. Biol. Chem.*, **256**, 1335-1339 (1981)
- 44) Erny, R., Wagner, J. A.: *Proc. Natl. Acad.*

- Sci. USA*, 81, 4974-4978 (1984)
- 45) Lynch, G., Schubert, P.: *Ann. Rev. Neurosci.*, 3, 1-22 (1980)
- 46) Yamauchi, T., Fujisawa, H.: *J. Biol. Chem.*, 254, 6408-6413 (1979)
- 47) Roth, R. H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, 430, 27-53 (1984)
- 48) El Mestikawy, S., Glowinski, J., Hamon, M.: *J. Neurochem.*, 46, 12-22 (1986)
- 49) Lamouroux, A., Faucon Biguet, N., Samolyk, D., Privat, A., Salomon, J. C., Pujol, J. F., Mallet, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3881-3885 (1982)
- 50) Lewis, E. J., Tank, A. W., Weiner, N., Chikaraishi, D. M.: *J. Biol. Chem.*, 258, 14632-14637 (1983)
- 51) Grima, B., Lamouroux, A., Blanot, F., Faucon Biguet, N., Mallet, J.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82 617-621 (1985)
- 52) Black, I. B., Chikaraishi, D. M., Lewis, E. J.: *Brain Res.*, 339, 151-153 (1985)
- 53) Tank, A. W., Lewis, E. J., Chikaraishi, D. M., Weiner, N.: *J. Neurochem.*, 45, 1030-1033 (1985)
- 54) Stachowiak, M., Sebbane, R., Stricker, E. M., Zigmond, M. J., Kaplan, B. B.: *Brain Res.*, 359, 356-359 (1985)
- 55) Schwartz, J. P., Quach, T. T., Tang, F., Kageyama, H., Guidotti, A., Costa, E.: *Advances in Cyclic Nucleotide and Protein Phosphorylation Research* (eds. Greengard, P. *et al.*) Vol. 17, pp. 529-534 (1984)