

HPLC を用いたカテコールアミン関連酵素突然変異体の検討

浅田 伸彦

岡山理科大学理学部基礎理学科

はじめに

皮膚の機能には外界からの異物の侵入から生体を保護することがある。皮膚には色がついている。黒色も一例であり色素の沈着は高分子のメラニンに由来する。メラニン生成を触媒する酵素はチロシナーゼ(無脊椎動物ではフェノール酸化酵素と称される)¹⁾である。チロシナーゼ活性阻害剤は皮膚のメラニン化を阻害するので化粧品や美白剤などにも応用されている。昆虫ではフェノール酸化酵素は血球で生合成され、体内では前駆体である。フェノール酸化酵素の基質はカテコールアミン類でそれらは神経伝達物質でもあることから、カテコールアミンとパーキンソン病など神経難病との関連が指摘されている²⁾。かつて著者らはフェノール酸化酵素前駆体の未精製標品を試料にしてHPLC法を用いた酵素活性測定法を提案した³⁾。今回はショウジョウバエのフェノール酸化酵素活性欠損突然変異体について、表現型をHPLC法を用いて検討した。

材料と方法

キイロショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を出発材料とした。野生型標準系統の Oregon-R を対照(control)とし、旧ソ連の自然集団から発見されたフェノール酸化酵素活性欠損突然変異体、*Mox^{GM95}* (A_1 アイソフォーム活性欠損)と *Dox-3^{KD95}* (A_3 アイソフォーム活性欠損)の2系統を実験系統とした。酵素粗抽出分画の調製法⁴⁾、ネイティブ電気泳動法⁵⁾、HPLC法に依る酵素活性の測定法³⁾はそれぞれ既報に準じた。HPLCを実施した際の酵素の基質としては(10mM) L-チロシン或いは L-ドーパを用いた。レコーダーとしては理化電気社製(モデル R-01A)を用いた。

結果と考察

1. フェノール酸化酵素前駆体のネイティブ電気泳動
キイロショウジョウバエのフェノール酸化酵素

前駆体の活性化は、内因性トリプシントイプセリンプロテアーゼに依る限定分解と、アルコールなどに依る高次構造変化に由来する方法に分けられる。前駆体を7.5%ネイティブ電気泳動後、ゲル中の前駆体を最終濃度50%の2-プロパノールで活性化させ、基質のモノフェノール(この場合は10mMチラミン)或いはジフェノール(同20mMドーパミン)で発色させた例を Fig. 1 に示す。ここ

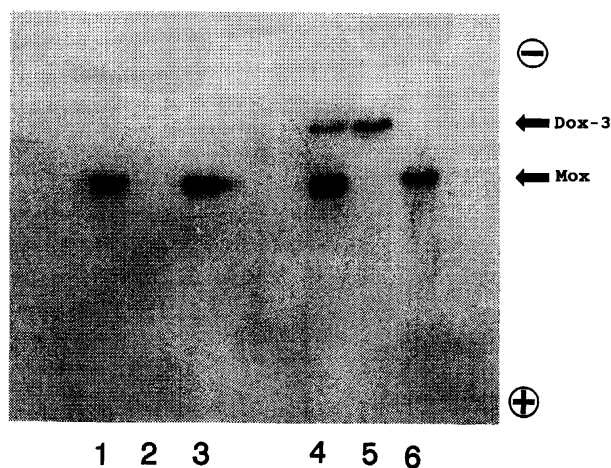


Figure 1. Electrophoretic patterns of *Mox*, *Dox-3*, *Mox^{GM95}*, and *Dox-3^{KD95}*. Proteins on the gel were activated with 50% 2-propanol, and then reacted with 10 mM tyramine (lanes 1, 2, and 3) or 20 mM dopamine (lanes 4, 5, and 6). Lanes 1 and 4: *Mox*, *Dox-3*; 2 and 5: *Mox^{GM95}*; 3 and 6: *Dox-3^{KD95}*.

では最終活性が高いチラミンとドーパミンを用いた。バンドは黒色で、酵素反応の最終産物であるメラニンが形成される。対照の野生型(*Mox*, *Dox-3*, レーン 1, 4)では基質がモノフェノールの場合には陽極側に1本、基質がジフェノールでは両極側に2本のバンドが形成される。この結果は無脊椎

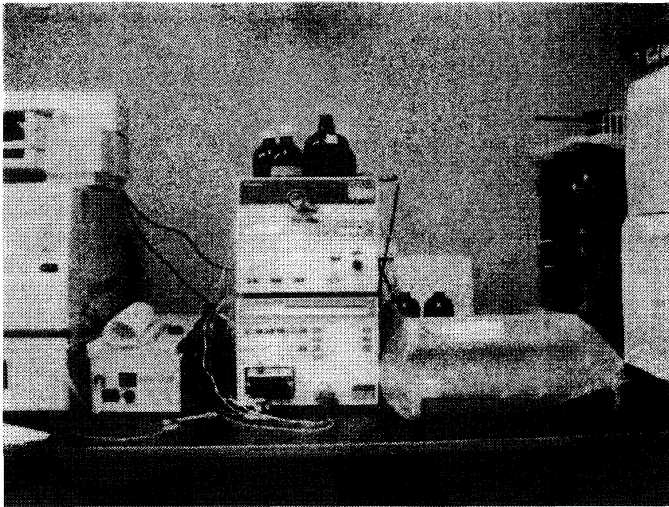


Figure 2. HPLC system used.

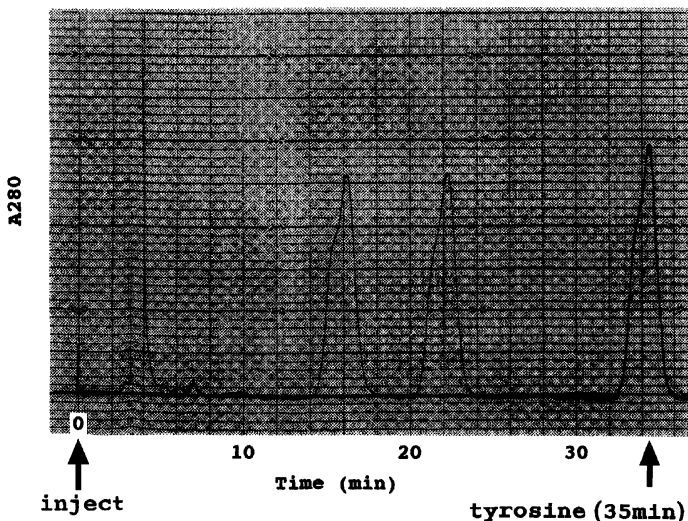
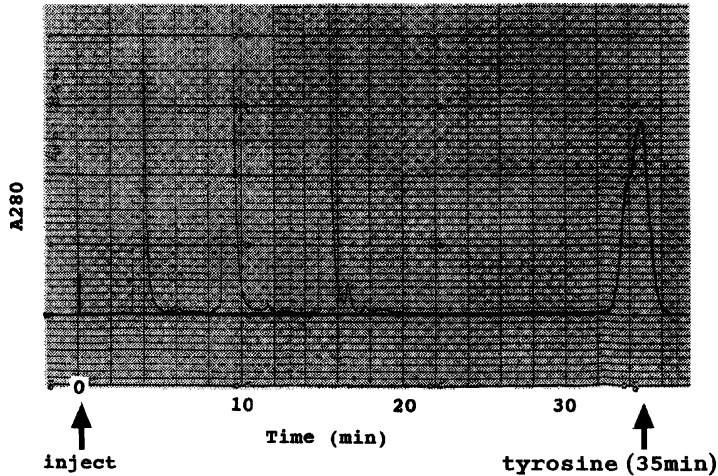


Figure 3-1. Separation of L-tyrosine and L-dopa.

動物、特にキイロショウジョウバエは、チロシナーゼ(モノフェノール酸化酵素)活性とドーパオキシダーゼ(ジフェノール酸化酵素)活性の両活性を有することを示しており、メラノサイト由来で前駆体構造は無く、チロシナーゼのみの哺乳類とは存在様式と活性の状況が異なっていることが解る。レーン 2 と 5 は *Mox^{GM95}* で、モノフェノール、ジフェノールの双方を基質にし得ない。レーン 3 と 6 は *Dox-3^{KD95}* で、ジフェノールを基質にし得ない。両系統は前駆体が活性化されないのか、活性化されたとしても活性を欠損するのかはまだ研究の余地があるが、いずれにしても、これらの結果は、無脊椎動物で初めて発見されたフェノール酸化酵素活性欠損突然変異であることを示し、ドーパミン分泌不全に起因するヒトのパーキンソン病など、カテコールアミン代謝と神経-筋肉系との関連について、突然変異体を用いた遺伝学解析が可能に成ると考えている。

2. HPLC 法

今回実験に使用した HPLC(日立 L-6200 型)の一式を Fig. 2 に示した。本システムを用いると市販標準標品の L-チロシンと L-ドーパの分離が可能で、それぞれの保持時間(リテンションタイム)は 24 分と 14 分であるので³⁾ それらの値を対照とした。野生型(*Mox*)を用いた対照実験では、L-チロシンで発色させると時間経過と共に保持時間はほぼ一定であるが、ピークの高さ(A280、280nm に於ける吸光度)は L-チロシンの場合は低下、逆に他方の基質であり、L-チロシンから生合成される L-ドーパは増加した。それに対して *Mox^{GM95}* を L-チロシンで発色させると(Fig. 3-1、上)、保持時間でも L-チロシンのピークは低下せず、HPLC にインジェクションしたまま検出された(Fig. 3-1、下)。また、L-ドーパで発色させると(保持時間の軸は異なっているが、Fig. 3-2、上)、野生型(*Mox*)の場合は基質である L-ドーパのピークは低下したが、*Mox^{GM95}* の場合はインジェクションされたまま検出さ

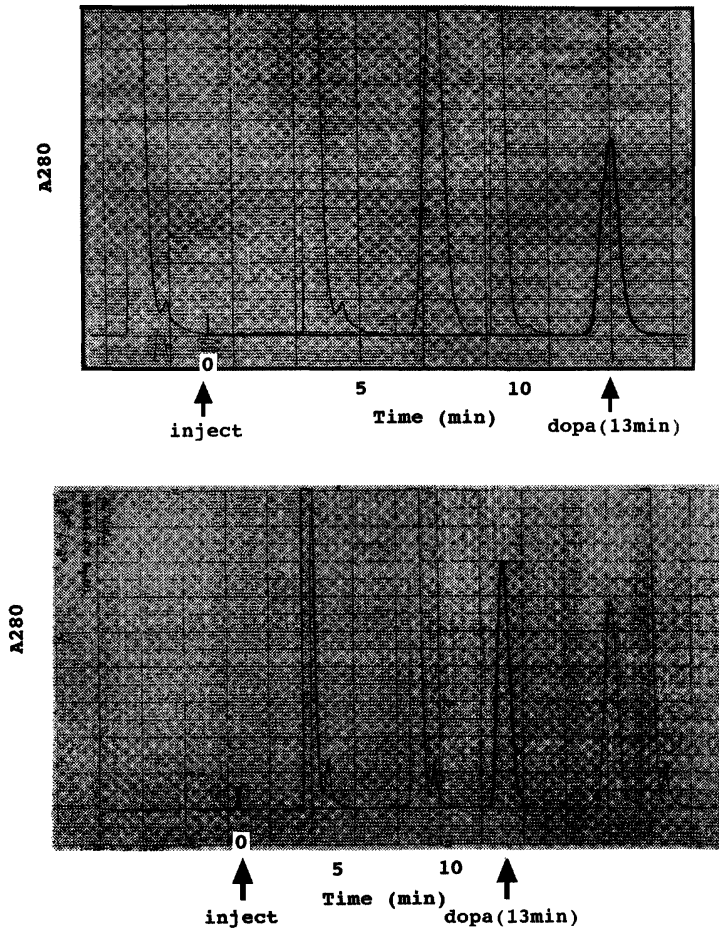


Figure 3-2. Separation of L-tyrosine and L-dopa.

れた (Fig. 3-2, 下)。これらの結果は、野生型 *Mox* の活性型はモノフェノール酸化酵素活性を示すのに対して、*Mox* の null 突然変異体の *Mox^{GN95}* はジフェノール酸化酵素活性はもとより、モノフェノール酸化酵素活性をも欠損することが HPLC のクロマトグラムのパターン解析によって始めて示された。

他方の野生型 (*Dox-3*) の場合も *Mox* と同様な実験を行うと、L-チロシンで発色させてもピークの高さは変化しない(データ表示無し)。 *Dox-3^{KD95}* を L-チロシンで発色させても野生型の場合と同様に、インジェクションされたまま検出された (データ表示無し)。基質である L-ドーパで発色させると、野生型では L-ドーパのピークは低下した(データ表示無し)が *Dox-3^{KD95}* の場合はインジェクションされたまま検出された(データ表示無し)。

電気泳動法と HPLC 法を用いた以上の結果から、野生型 *Mox* の活性型はモノフェノール酸化酵素活性を示すのに対して、*Mox^{GN95}* からはモノフェノール(チロシン、チラミン)が酸化されたことを示すことは無く、一方の野生型 *Dox-3* はジフェノール酸化酵素活性を示すのに対して *Dox-3^{KD95}* はジフェノール(ドーパ、ドーパミン)を酸化することは無かった。フェノール酸化酵素前駆体の活性化機構や、カテコール、カテコールアミンを酵素基質とする活性型の基質特異性などに関して、活性が null であることから通常のカラムクロマトグラフィ法などでは分画が困難である場合でも、既報に依り遂行が可能であることが再確認され、カテコールアミン代謝に関わる自然突然変異体分析からの知見は今後、ヒトの遺伝病治療対策などにも強く寄与するものと思われる。

謝辞

本研究を行うにあたっては岡山理科大学理学部基礎理学科の山崎重雄教授、松本一城、雨宮 健両氏にはお世話になった。記して感謝したい。

参考文献

- 1) Mitchell, H. K. and Weber, U. W. *Drosophila* phenol oxidase. *Science*, 148: 964-965(1965).
- 2) 笹井芳樹. 神経系発生の初期制御機構: カエル、マウス、サル研究から解りつつあること. *生化学*, 74(4): 297-303(2002).
- 3) 浅田伸彦・山崎重雄. HPLC を用いた昆虫のカテコールアミン関連酵素活性測定法. *岡山実験動物研究会報*, 第 17 号, 15-18(2000).
- 4) Fujimoto, K., Masuda, A., Asada, N., and Ohnishi, E. Purification and characterization of prophenoloxidases from pupae of *Drosophila melanogaster*. *J. Biochem.*, 113:285-291 (1993).
- 5) Asada, N., Fujimoto, K., Tanaka, M., and Ohnishi, E. Genetic polymorphism of prophenoloxidase A_1 in *Drosophila melanogaster*. *Jpn. J. Genet.* 68: 219-227(1993).