

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

浅田伸彦・山崎重雄
岡山理科大学理学部基礎理学科

はじめに

チロシン、ド-パなどのカテコールやド-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脳および末梢神経からの神経伝達物質として作用し、いずれも前駆アミノ酸のチロシンから生合成される (Fig. 1)。この一連の生合成反応の律速段階はチロシンからド-パを生じる過程で、その反応を触媒する酵素の一つはチロシン水酸化酵素で、他の一つはフェノール酸化酵素である。これらの酵素活性の調節により、カテコールアミンの生合成速度が調節されている。従ってこれらの酵素活性調節機構の研究は極めて重要であると言える。本稿ではフェノール酸化酵素を研究対象とした。従来は、未精製分画を直接カラムに注入するとタンパク質が充填剤などに吸着し、カラムが劣化することなどから、酵素活性の測定には精製標品を用いる方法が常であった¹⁾。しかしながら、この方法には標品量の減少や分画に時間を要するという欠点も挙げられる。そこで今回、著者らはHPLCを用いてカテコール、カテコールアミンの分画法やフェノール酸化酵素の活性測定を粗抽出分画を用いて比較的容易に測定することが可能な方法を考案したので報告する。

材料と方法

1. 材料

学習や記憶などの研究も進んでいるキリシウジョウバエ *Drosophila melanogaster* を研究対象にした。本種の野生型標準系統 Oregon-R の囲蛹殻形成後 24~48 時間の蛹 50 g をホモジナイズし、遠心分離 (30,000×g, 4℃, 20 min) によって得られた粗抽出分画、またはその分画を 44%~55% 飽和硫酸で沈殿させた前駆体 A 1 分画²⁾ を Phenyl Sepharose カラムで分画して^{3, 4)} 試料とした。昆虫のフェノール酸化酵素は体内では活性を持たない状態、すなわち前駆体で存在しているので⁵⁾、活性化は最終濃度 50% 2-プロパノールで行った⁶⁾。

2. 測定

HPLC 用試料の調整法：上述の 2-プロパノールで活性化した酵素含有溶液とあらかじめ 30℃ に温めた 3.5 μmol チロシン (20 mM) あるいはド-パと混合し、一定時間経過させた後、反応を停止させるため、pH 3.2 のリン酸ナトリウム緩衝液を用いてクエンチングした。この溶液を 0.22 μm 用メンブレンフィルターをその先端に取り付けた注射器に充填して、押し出して、酵素を除去し、HPLC 用試料とした。

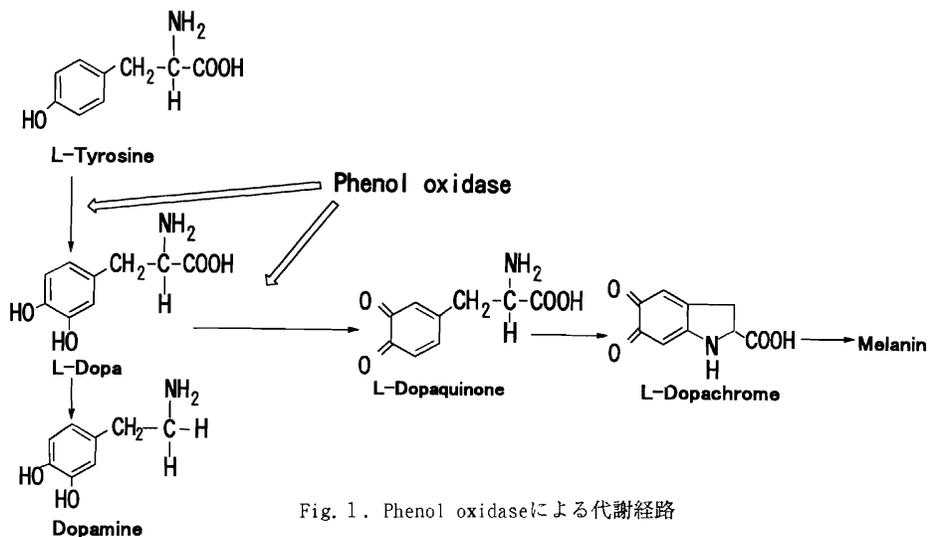


Fig. 1. Phenol oxidaseによる代謝経路

また、対照実験としてこの段階の試料を分光光度計で475 nmのときの時間依存性を調べた。用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) は日立L-6200型で、280 nmの吸収を測定した。HPLCの溶離条件；溶離液に5 mMオクチルスルホン酸ナトリウムと10%メタノールを含むpH 3.2 (50 mM)のリン酸ナトリウム緩衝液を用いて、流量 0.5 ml/min で送液した。ODSカラム (口径4.6 mm×150 mm) を使用した。測定波長は280 nmと475 nmを用い、280 nmでは基質のL-チロシンまたはL-ドパの減少量を、475 nmでは反応生成物であるドパクロムの生成量の測定を行った。

Native電気泳動は既報⁷⁾に従って行なった。酵素活性の測定はクレット光電比色計を用いて既報⁶⁾ あるいは日立分光光度計U2000型を用いて475 nmの吸収を測定した。

結果と考察

1. フェノール酸化酵素の活性型への転換

キイロショウジョウバエのフェノール酸化酵素前駆体は別の遺伝子にコードされたA₁とA₃の二つのアイソフォームによって形成されており、それぞれのサブユニットの分子量は約78 kと77 kである^{1, 7)}。体内での活性化系はすでに単離精製され、分子量28.5 kのトリプシントタイプのプロテアーゼである。その酵素の限定分解によって不活性型酵素が活性型に転換される⁸⁾。一方、限定分解以外にも界面活性剤、脂質、アルコールなどによっても活性型に転換される⁶⁾。これらは酵素前駆体の高次構造の変化に由来する⁹⁾。前駆体精製標品の活性化はFig. 2のように1秒未満と速い⁴⁾。免疫担当細胞を有しない昆虫にとって、その代替系として作用すると考えられているフェノール酸化酵素の活性型への転換に要する時間が短いことは理にかなっていると言えよう。

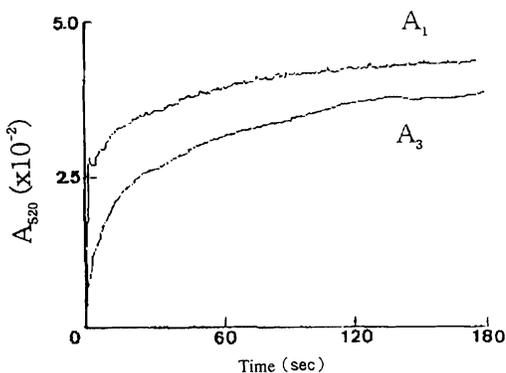


Fig. 2. Activation of prophenol oxidase

2. フェノール酸化酵素の活性調節領域

キイロショウジョウバエのフェノール酸化酵素は2個のサブユニットから構成されているホモダイマーのタンパク質である。複数の無脊椎動物のcDNAの

塩基配列とアミノ酸残基配列の比較¹⁰⁾ から酵素の触媒部位には2個の銅イオンが存在し、その周囲にアミノ酸のヒスチジンが配位し、且つその周囲は種間で非常に保存的である。前駆体の活性型への変換に際してはCD (円偏光二色性) スペクトル分析によっても主鎖部分の二次構造の変化に伴って、局所的な銅イオンの配位環境が変化していることが確認された。これらの結果から、銅イオン結合部位或いはその周囲がフェノール酸化酵素の触媒部位と推察されている⁹⁾。酵素の活性は活性化剤により様相は異なるが¹¹⁾、2-プロパノールを用いた場合には前駆体の活性型の双方で定量的に差はあるが、モノマー、ダイマーのいずれの場合にも酵素活性が得られた (Table 1)。また、緩衝液の塩濃度に依存して高塩濃度下ではダイマーとなり、低塩濃度下ではモノマーに解離するが、いずれの反応も可逆的であることも明らかになった^{11, 12)}。

Table 1.

Specific activity of phenol oxidase*

	Active A ₁	Active A ₃
Monomer	310	120
Dimer	320	150

*: Values are shown as average ± standard error (n=3).

3. 基質量と酵素反応生成物量の推移

今回の分析には逆相系充填剤C18系カラムを用いた。また、イオン対試薬としてはオクチルスルホン酸ナトリウムを用いた (Fig. 3)。ここでは、オクチル基のC₈がC₁₈表面のオクタデシル鎖と疎水結合して充填剤表面にスルホン基SO³⁻が濃縮されて存在し、見かけ上、陽イオン交換樹脂のようになってい。そして、充填剤表面のスルホン基と添加した試料のアミノ基が予めpH 3.2に調整されているために陽イオンになっており、静電引力により吸着する。その結果、L-チロシンとL-ドパの分離が可能となる。まず、市販の標準標品を用いてL-チロシンとL-ドパのリテンションタイムを測定した。その結果L-ドパは14分、L-チロシンは24分であり、今回のシステムで両者の分離が可能であることが明らかになった (Fig. 4)。そこで、基質としてL-チロシンを用いた場合には、フェノール酸化酵素との反応経過時間に対するL-チロシンの相対減少量は0、3、5分後にはそれぞれ89、95、92%となり5分後には約10%減少した (Fig. 5-A)。また、L-ドパを基質として用いた場合にはそれぞれ67、64、62%となり、5分後には約10%減少した。一方、反応中間体であるドパクロム (Fig. 1)の最大吸光度である475 nmで反応生成物の量を推定すると、40、67、74%と時間経過と共に増加した (Fig. 5 B)。Fig. 6は

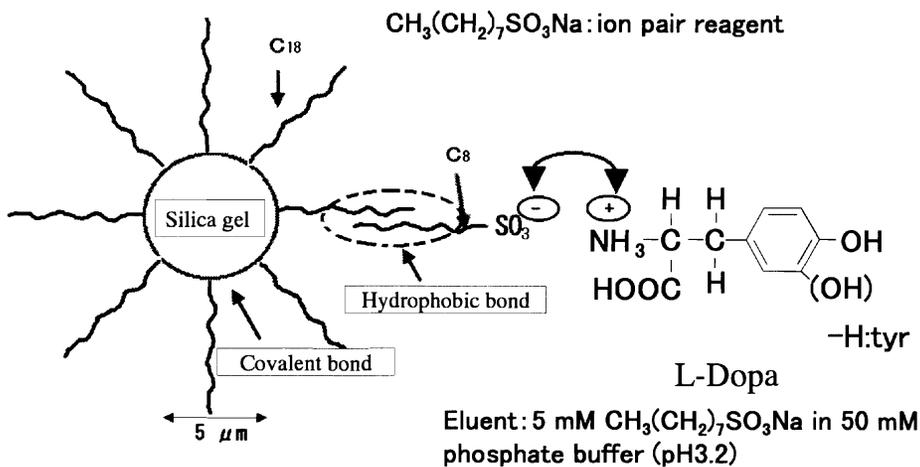


Fig. 3. Separation mechanism of L-Dopa and L-Tyrosine

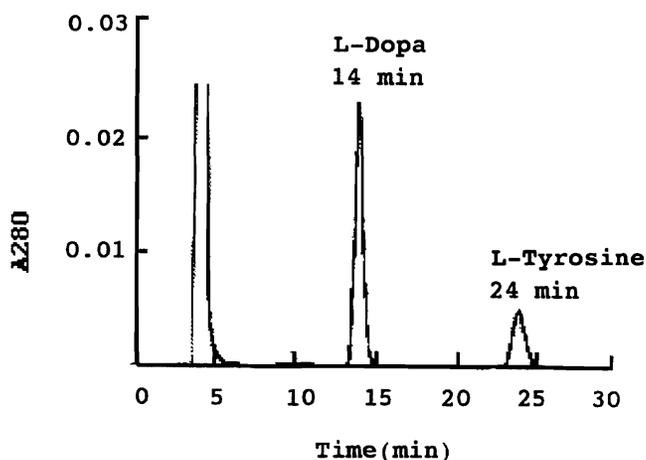


Fig. 4. Separation of L-Dopa and L-Tyrosine

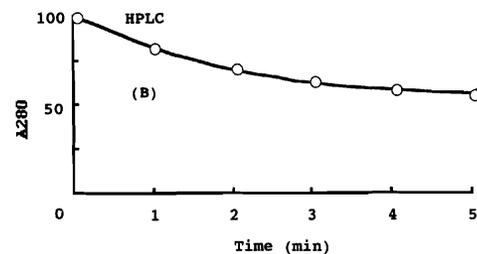
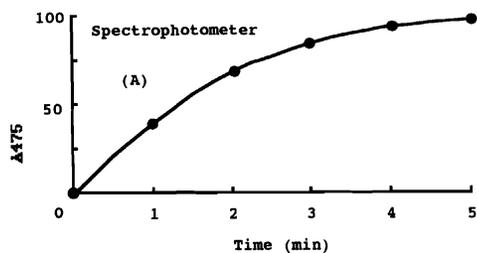


Fig. 6. Time course of enzymatic activity

- (A) Effect of reaction time in Spectrophotometer at 475 nm
- (B) Effect of reaction time in HPLC at 280 nm
- (C) Compare of time courses

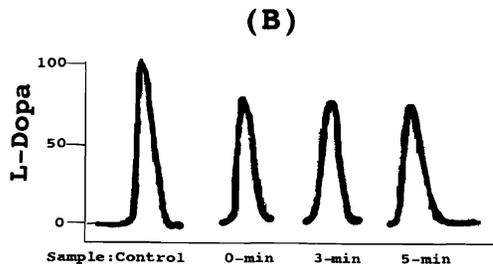
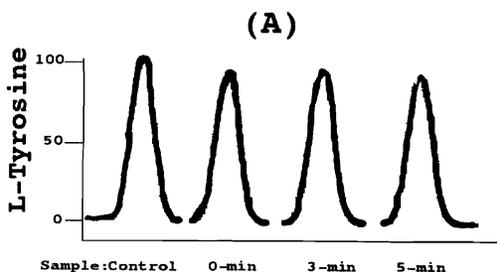
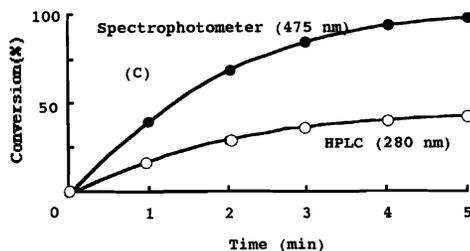


Fig. 5. Decrease of L-Tyrosine (A) and L-Dopa (B)

分光光度計で測定した場合 (Fig. 6-A) と HPLC で測定した場合 (Fig. 6-B) をまとめて変換したものである (Fig. 6-C)。

酵素活性値の定義には国際単位を採用した (1分間に $1 \mu\text{mol}$ の基質を生成物に変換する)。基質の減少値からは酵素反応前の吸光度を濃度100%とし相対比から計算した。初期反応段階 (0分から1分の間) では1.1 unit という結果が得られた。生成物の増大値からは5分付近で吸光度が増大しなくなったため5分時に基質が全て生成物に変換されたと仮定し5分後の吸光度を濃度100%として計算した結果1.2 unit であった。また十分に長い酵素反応時間後の生成値を2時反応速度式で近似し、値を求めると誤差は100分の1であった。

このように絶対値は異なるものの HPLC で酵素反応のタイムコースを測定することが十分可能であった。また、今回の最大の特徴は、フェノール酸化酵素活性測定に際してその精製標品を用いる必要が無いことにある。

謝辞

本研究には岡山理科大学理学部基礎理学科の北村智子・菊池紀子さんが寄与した。ここでお礼申し上げます。

参考文献

- 1) FUJIMOTO, K., MASUDA, K., ASADA, N. and OHNISHI, E. Purification and characterization of prophenoloxidases from pupae of *Drosophila melanogaster*. J. Biochem. 113:285-291 (1993).
- 2) MITCHELL, H. K. and WEBER, U. M. *Drosophila* phenol oxidase. Science 148: 964-965 (1965).
- 3) SEZAKI, H. Phenoloxidase in *Drosophila melanogaster*: an improved method for purification and effect of ionic concentration on the higher-order structure. Master's thesis, Okayama University of Science (1997).
- 4) ASADA, N. Reversible activation of prophenoloxidase with 2-propanol in *Drosophila melanogaster*. J. Exp. Zool. 282:28-31 (1998).
- 5) BRUNET, P. C. J. Insect. Biochem. 10:467-500 (1980).
- 6) ASADA, N., FUKUMITSU, T. FUJIMOTO, K. and MASUDA, K. Activation of prophenoloxidase with 2-propanol and other organic compounds in *Drosophila melanogaster*. Insect. Biochem. Molec. Biol. 23:515-520 (1993).
- 7) ASADA, N., FUJIMOTO, K., TANAKA, M. and OHNISHI, E. Genetic polymorphism of prophenoloxidase A₁ in *Drosophila melanogaster*. J. J. Genet. 68:219-227 (1993).
- 8) CHOSA, N., FUKUMITSU, T., FUJIMOTO, K., and OHNISHI, E. Activation of prophenoloxidase A₁ by an activating enzyme in *Drosophila melanogaster*. Insect Biochem. Molec. Biol. 27:61-68 (1997).
- 9) 浅田伸彦・キイロシヨウジョウバエ・プロフェノール酸化酵素の活性化機構, 大阪大学蛋白質研究所共同研究成果報告書 (1998).
- 10) FUJIMOTO, K., OKINO, N., KAWABATA, S., IWANAGA, S. and OHNISHI, E. Nucleotide sequence of the cDNA encoding the proenzyme of phenol oxidase A₁ of *Drosophila melanogaster*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 92:7769-7773 (1995).
- 11) ASADA, N. and SEZAKI, H. Properties of phenoloxidases generated from prophenoloxidase with 2-propanol and the natural activator in *Drosophila melanogaster*. Biochem. Genet. 37:149-158 (1999).
- 12) SEZAKI, H., KAWAMOTO, N. and ASADA, N. Effect of ionic concentration on the higher-order structure of prophenoloxidase in *Drosophila melanogaster*. Biochem. Genet. Accepted.