

解 説

Agrochemistry and Biology Series

昆虫におけるカテコールアミンの酸化

麻 生 陽 一

九州大学大学院農学研究科遺伝子資源工学専攻

(平成6年2月20日受理)

Oxidation of Catecholamines in Insects

Yoichi Aso

*Laboratory of Protein Chemistry and Engineering, Graduate School of Genetic Resources
Technology, Kyushu University, Higashi-ku, Fukuoka 812, Japan*

はじめに

昆虫は植物とともに人間の身近に存在する生物であり、人間の営みに密接にかかわっている。よくクローズアップされるのは、農業生産に被害をおよぼす稲作害虫、園芸害虫や森林害虫、病原菌を媒介する衛生害虫、人間の生命をおびやかす毒虫、あるいはシロアリによる住居の侵食などネガティブな存在としての昆虫であろう。しかし、人間は昔から昆虫を家畜のように操り、他の害虫を駆逐する天敵として利用したり、誘因物質であるフェロモンを利用したり、絹糸や蜂蜜の生産などにも利用してきた。また、積極的に何らかの目的に利用しなくても、夏のセミや春のチョウなど季節に応じて昆虫が現れたり消えたりすることは、人間の暮らしに精神的なゆとりを与えている。

ところで、最近では環境問題を自然対人間としてではなく、生物と無生物を含めた地球全体をグローバルな視点からとらえる「地球環境」という考え方が広まっている。それにしたがって、極端な言い方をすれば、害虫の排除よりも害虫との共存という考え方が必要になるかもしれない。そこで、問題を昆虫に限定すれば、害虫の防除や益虫の保護という実用に即応した課題から一歩退いて、昆虫そのものの生態、遺伝、生理、あるいは生化学についてより基本的な理解が求められていると考える。

昆虫を対象とした研究は歴史が古く、昆虫生理学や昆虫生化学の対象とするテーマも非常に広い範囲にわたっている¹⁾。また、昆虫は成長の各段階において、程度の差こそ違えその形態を変えるものが多く、生体組織の再

構成のモデル系としても興味深い研究材料である。特に、変態にともなう脱皮や新たに形成された皮膚（クチクル）の硬化は生化学、生理学、有機化学、物理化学などさまざまな立場から研究されている。また、昆虫は哺乳動物とは異質な生体防衛機能をもっているが、その点についても精力的な研究がなされている²⁾。これらの生命現象にはカテコールアミンの酸化が大きな役割を果たしている。

カテコールアミンの基本的な構造はベンゼン環に二つの水酸基がオルトの位置で結合したピロカテコール（1,2-ベンゼンジオール）である。カテコールアミンは、このピロカテコール核にエチルアミンの誘導体が結合した化合物の総称である（図1）。カテコールアミンはアルミナへの吸着などを利用して単離される生体アミンであり、ホルモンや神経伝達物質としてよく知られている。本稿では昆虫におけるカテコールアミンの酸化について生化学的側面からいくつかの話題を紹介する。

メ ラ ニ ン

カテコールアミンは *o*-ジフェノール化合物と総称される化合物に分類される。*o*-ジフェノールは容易に酸化され、酸化されるとキノン化合物となる。ドーパはカテコールアミンの1種であり、アミノ酸のチロシンに水酸基が一つ余分に結合している（図1）。ドーパの水溶液を放置しておくと、溶液の色が次第に黒ずんできてくる。これをさらに長期間保存しておくと、溶液と接するガラス容器の表面が黒色にコーティングされるとともに、黒い沈殿が現れる。このコーティングや沈殿は化学的に激し

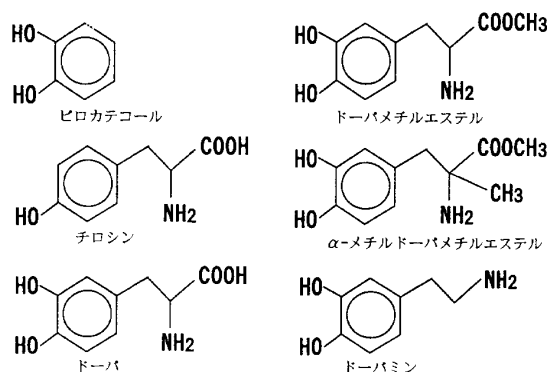


図1 カテコールアミンの構造

い処理を施さなければ分解できない。これはドーパが自然酸化されて黒色のメラニンが生じたためである。メラニンは高分子であるが、タンパク質、核酸あるいは多糖類などとは違って、メラニンにはペプチド結合やグリコシド結合といった特有の化学結合の繰り返しがない。また、その構成成分も一定ではなく、合成経路もその構造と同様、単純なものとは考えられていない。これらの点は高等植物の木部を強固にしている生体高分子リグニンの構造や合成機構と事情がよく似ていて興味深い³⁾。メラニンは多くの動物の色素細胞に存在し、皮膚の色に大きく関係している。メラニンがドーパだけから合成された場合と、ドーパとシステインの共存下で合成された場合とではその色が異なり、メラニン合成は皮膚科学の大きな研究分野である⁴⁾。

メラニンはドーパやドーパミンのようなジフェノール化合物の酸化で生じるさまざまな化合物の共重合によって作られる(図2)。ドーパを出発材料にすると、メラニン合成の最初のステップはドーパが酸化されてドーパキノンとなる過程である。試験管の中で無色透明なドーパ溶液をアルカリ溶液や酸化銀と混合すると、赤い色になりドーパが酸化されたことが視覚的によくわかる。このとき生じる化合物をドーパクロム(ドーパキノニイミ

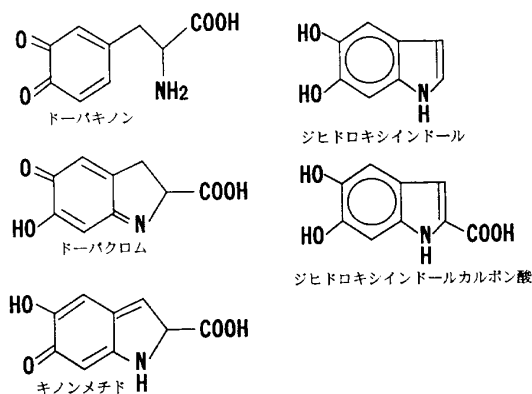


図2 ドーパの酸化で生じる化合物

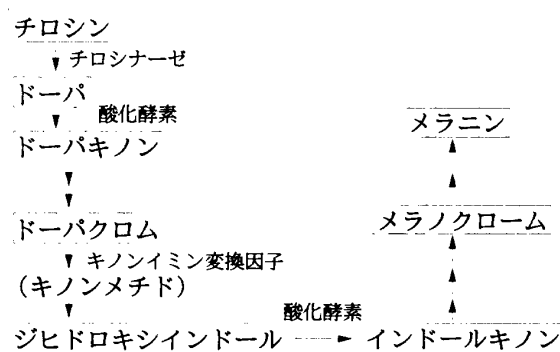


図3 メラニンの合成機構

ン) というが、これはドーパキノンではない。メラニン合成の最初のステップは酸素の消費を検圧計などで測定しなければ追跡できない。ドーパキノンはいくつかのステップを経てドーパクロムとなる。ドーパクロムは脱炭酸反応によりカルボキシル基を失い、環化してインドール環を形成し、無色のジヒドロキシインドールとなる。しかし、ドーパクロムの赤色はすぐに消えるわけではなく、かなりゆっくりとしたスピードで色が消えていく。ジヒドロキシインドールはドーパよりもはるかに不安定な化合物であり、酸化されてインドールキノンとなる。この後の反応は明らかではないが、溶液の色は無色から黒紫色へと変化する。分光光度計で見ると、赤い色は475 nmに極大吸収を示すはっきりとしたスペクトルを示すことがわかる。また、この波長の吸光度の増加が頭打ちになって、続いてゆっくりと減少することも観測できる。溶液の色が黒紫色に変化する頃にはスペクトルのベースラインが顕著に上がり、不溶性の物質が形成されていることを予想させる。このような逐次的なメラニン合成の経路は、研究者の名前をとって、Raper-Masonの経路といわれる(図3)。しかし、メラニンを化学的に分解し、得られた化合物の構造を調べる研究が精力的に行なわれた結果、酸化過程で生じる化合物はすべて反応性が高く、これらが不規則的に重合されてメラニンが合成されると考えられるようになった。それでも、どの段階から重合反応がスタートするかなど、メラニン合成の機構には依然として不明な点が多い。それは、上に述べた中間体のほとんどがきわめて不安定であり単離されていないことによる。たとえば、ジヒドロキシインドールはドーパクロムを含む混合物から昇華によって得られるが、その色はすぐに濃紺に変化する。

カテコールアミンの酸化酵素

先に述べたように、昆虫ではカテコールアミンの酸化が生体防御やクチクル硬化に重要な働きをしている⁵⁾。

この点についての一つの生化学的アプローチの方法は、カテコールアミン酸化に関与する酵素について調べることである。ジフェノール化合物の酸化は、チロシナーゼ、*o*-ジフェノールオキシダーゼ、ラッカーゼなどの銅原子を有する金属酵素によって触媒される。チロシナーゼはチロシンを水酸化してドーパに変える反応も触媒する。また、ラッカーゼは *p*-ジフェノールの酸化も触媒する。フェノールオキシダーゼという名称を用いるときには、ふつう *o*-ジフェノールオキシダーゼのことを指す。昆虫の生理現象と関連して酸化酵素を研究の対象とするとき、それがこれらの酵素のうちどれに分類されるのか議論が分かれることが多い。そこで、本稿では、特別な場合を除いてこれらの酵素をひっくるめて「酸化酵素」と総称する。

酸化酵素については、昔から多くの研究がなされているにもかかわらず、その構造や性質がはっきりしないものが多い。それは、これらの酵素が共有結合的に凝集しさまざまな形態をとっていたり、ガラス容器や精製用の樹脂に非特異的に吸着したり、研究の障害となる性質を示すためである。しかし、フェノールオキシダーゼの前駆体である不活性なプロフェノールオキシダーゼはこのような性質を示さない。この点で芦田らによるカイコ幼虫のプロフェノールオキシダーゼについての研究成果はこの分野の研究を進めるうえで画期的なものである。プロフェノールオキシダーゼはプロテアーゼである活性化酵素によってポリペプチドの一部を切除され、活性化される。活性化酵素はクチクルや体液中に存在する。また、体液中にはプロフェノールオキシダーゼ活性化のカスケード系が存在することや、それが体外から侵入した異物によってどのように応答するかについて精力的な研究がなされている²⁾。

メラニン合成に関与する他の酵素

メラニン合成はドーパの酸化、あるいはチロシンの水酸化によるドーパの生成によって開始され、チロシナーゼが両反応を触媒する。そこで、チロシナーゼによってドーパがドーパキノンに変化すると、それ以降の反応は自発的に進行するというのが定説であった。確かに、ドーパ溶液を酸化剤や酵素で酸化すると最後にはメラニン顆粒ができる。

1980年代のはじめに皮膚科学の研究者によって、マウスからドーパクロムの退色を促進するタンパク質が発見され、ドーパクロム変換因子と命名された⁶⁾。すなわち、チロシナーゼ以外の酵素もメラニン合成に関与していることが明らかになった。その頃、筆者らは害虫であ

るタバコスズメガのチロシナーゼについて研究を行っていた。その際、チロシナーゼの回収率をなるべく上げるために精製の初期段階の硫酸分画の範囲を広くした。その結果、チロシナーゼの速度論的パラメータを決定する実験でドーパクロム生成の経時変化に直線性が見られなくなった。ちなみに、酵素の速度論的パラメータを求めるということは、普通は定常状態近似に基づいてミハエリス定数や最大速度を求めることと理解されており、その近似が成立する実験条件下では理論上、基質の消失と生成物の出現は直線的な経時変化をする。筆者らはドーパの代わりにドーパクロムを基質とすることにより、ドーパクロム変換因子と見かけ上類似の反応を触媒するドーパキノニミン変換因子を発見し、これがチロシナーゼの共存下でメラニン生成を促進することを明らかにした⁷⁾。

たとえば、ドーパ溶液に酸化銀を添加すると、赤色のドーパクロムの生成が観察される。しかし、この赤色はかなりの時間維持され、黒紫色のメラニンが急激に生成することはない。このことは、この段階が試験管内においてはメラニン合成の律速段階の一つであることを示唆している。ドーパのチロシナーゼによる酸化を 475 nm の吸光度の増加で観測しながら、途中で銅のキレート剤であるジエチルジチオカルバミン酸、すなわちチロシナーゼの阻害剤を添加すると、475 nm の吸光度がゆっくり減少しているのが観察される。これは、ドーパが酸化されると同時にドーパクロムのジヒドロキシインドールへの変換もゆっくりと進行していることを示している。チロシナーゼによる酸化反応の途中にジエチルジチオカルバミン酸とドーパキノニミン変換因子を同時に添加すると、475 nm の吸光度の減少が加速される。また、ドーパクロム溶液にドーパキノニミン変換因子を添加し、475 nm の吸光度の減少が底をついた時点で、チロシナーゼを添加すると、600 nm 付近の吸光度が増加し、メラノクローム（構造未定のメラニンの前駆体）の生成が促進される。

ドーパキノニミン変換因子はドーパクロムがジヒドロキシインドールへと変化する過程を促進しているが、マウスのドーパクロム変換因子ではドーパクロムがジヒドロキシインドールカルボン酸への変換を触媒している。皮膚科学の研究者は後者の変換が哺乳動物のメラニン合成において本質的なものと考えている。ドーパのメチルエステルの酸化物にもドーパキノニミン変換因子は作用することから、おそらく、この因子はドーパクロムの脱炭酸を触媒していない⁸⁾。最近、 α -メチルドーパメチルエステルの酸化についての研究から、本因子は

互変異性化, すなわち分子内酸化還元を触媒し, 生成物はキノンメチドであると推定されている⁹⁾. キノンメチドはリグニンの合成においても中間体と考えられている化合物である.

これらの結果から, メラニン合成には少なくとも, (1) チロシン→ドーパ (チロシナーゼ), (2) ドーパ→ドーパキノン (酸化酵素), (3) ドーパクロム→ジヒドロキシインドール (ドーパキノンイミン変換因子), (4) ジヒドロキシインドール→インドールキノン (酸化酵素), という四つの律速段階があり, 各段階を () 内に示した酵素が触媒するものと考えられる. 昆虫において, ドーパキノンイミン変換因子は迅速なメラニン合成を実現しているものと予想される. その目的は, 体内に侵入した異物のメラニンコーティングによる不活性化の速度を上げている, クチクルの傷口のメラニンによる修復の速度を上げている, あるいは, メラニン合成の過程で生じる反応性の高い危険な中間体の残存時間を短縮しているなどが考えられる.

クチクル硬化

昆虫の幼虫が一定の大きさに成長すると, 古い表皮を脱ぎ捨て, 新たにクチクルを形成する. 新しい表皮は最初は軟らかであるが, 次第に強固になり着色する. 酸化酵素はこのクチクルの硬化・着色にも大きくかかわっている. クチクル硬化はメラニン合成とは異なり, ドーパではなく, ドーパミンの誘導体である *N*-アセチルドーパミンや *N*- β -アラニルドーパミンが酸化されて生じた化合物 (硬化剤という) がタンパク質と結合した架橋構造によって実現される (図 4)⁹⁾. この架橋体は非常に安定である.

ドーパミンの誘導体はチロシンの水酸化によるドーパの合成, ドーパの脱炭酸によるドーパミンの合成, ドーパミンの *N*-アシル化による誘導体の合成という代謝系を経て作られる. チロシンの水酸化は前に述べたようにチロシナーゼでも可能であるが, この酵素は生成物であるドーパを酸化してメラニンを作るのでクチクル硬化には都合が悪い. それで, 水酸化にはチロシン水酸化酵素

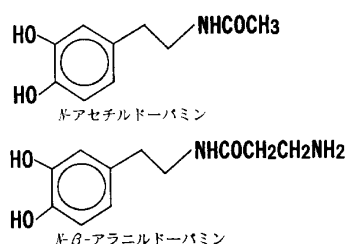


図 4 クチクル硬化剤としてのドーパミン誘導体

が働いていると考えられている. 次のステップはドーパ脱炭酸酵素によって触媒される. 最後のステップを触媒する酵素は, *N*-アセチルドーパミン転移酵素や *N*- β -アラニルドーパミン転移酵素である¹⁰⁾. これらのうち, 最も多くの研究がなされているのはドーパ脱炭酸酵素である.

クチクル硬化ではカテコールアミンの酸化のどの段階において, 酸化物のどの部位が架橋されるのかという疑問に答えねばならない. クチクル硬化によって生じるタンパク質の架橋がきわめて安定であることが硬化の機構を分析するうえで障害となっている. 現在のところ, キノンタンニングと β -硬化機構が一応の定説である. キノンタンニングではベンゼン環の炭素がタンパク質と結合する. β -硬化の β とは, カテコールアミン酸化物の β 炭素 (アミノ基が結合している炭素を α 炭素とする) の位置で架橋が生じるという考えから命名されたが, その後, β だけでなく α 炭素の位置でもタンパク質との架橋が生じると考えられている (図 5)¹⁰⁾. また, ドーパミンの誘導体のキノンメチドが直接の硬化剤であるという考え方から, β -硬化の代わりにキノンメチド硬化という名称を提唱している研究者もいる. キノンメチド硬化では, ドーパミンの *N*-アシル誘導体が酸化酵素によってキノンへ, キノンはキノンイソメラーゼによってキノンメチドへ, キノンメチドはキノンメチドイソメラーゼによって α - β 炭素間に脱水素反応を生じ, α , β -デヒドロ化合物となる. この化合物はさらに酸化酵素によってキノンとなり, α - β 間の 2 重結合を利用して α と β の位置でタンパク質との架橋が生じる⁹⁾. いずれにせよ, これらの仮説は対立する概念ではなく, 両方の反応が硬化・着色を実現していると考えられる.

最後に, チョウの羽根にはパピリオクロムという色素が含まれている. この色素はキヌレニン, β -アラニンおよびドーパミンからなる複雑な構造をしている (図

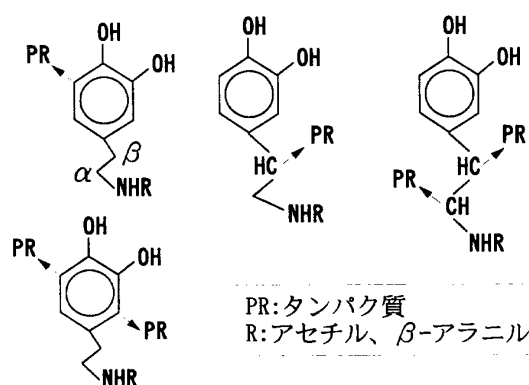


図 5 クチクルタンパク質の架橋の例

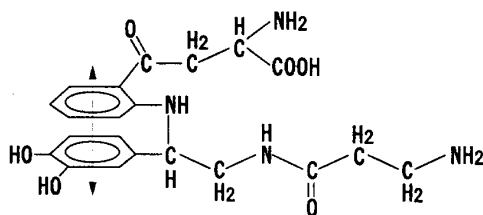


図 6 パピリオクローム II

6)¹¹⁾。この色素の合成がチロシナーゼによる *N*- β -アラニルドーパミンの酸化，キノニンソメララーゼによるキノンメチドの生成，キヌレニンとの反応によって達成されることはきわめて興味深い¹²⁾。

おわりに

本稿では取りあげなかったが，クチクルの色素斑点の形成や損傷したクチクルの修復もメラニン化によって行なわれる。すなわち，昆虫はカテコールアミンの酸化をいろいろな面で有効に利用し，この反応は昆虫の生理現象に大きく寄与している。そして，いずれの場合にも酸化酵素が重要な役割を果たしている。しかし，酸化酵素自体には酸化を制御する機能はない。また，チロシナーゼはタンパク質のチロシン残基をジフェノールに変化させることが知られ，ジフェノールが酸化されるとタンパク質間に不都合な架橋を生じる。そこで，活性な酸化酵素が体内，特に体液中に放置されると昆虫自身に重大な傷害を与える。おそらく，昆虫体内にはこの危険を回避するシステムがある。酸化酵素の基質特異性はそれほど高くはない。それで，酵素を含めた他の生体物質の役割がカテコールアミンの酸化をうまくコントロールしているものと推定される。

β -硬化の提唱者である S. O. Andersen はシンポジウム¹³⁾の席上，「自分がクチクル硬化の仕事をはじめたときは，それにだれも興味を示さなかった」と述懐した。昆虫におけるカテコールアミン酸化に関連した研究は，まさに，古くて新しい課題である。現在，この分野について次々と新しい情報が報告されつつあるが，これ

らの知見は昆虫の成長を人為的にコントロールするための基礎となることが期待される。かつての日本の主要産業は養蚕業であった。そのために，わが国には昆虫科学についての情報や蚕の系統保存を初めとする実験材料の蓄積は膨大なものがある。日本の伝統的な醸酵産業が世界のバイオテクノロジーへ大きく寄与しているように，養蚕業で培った研究成果が国際的な貢献を果たすものと考えられる。

引用文献

- 1) G. A. Kerkut & L. I. Gilbert: "Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry and Pharmacology," Pergamon, Oxford, 1985
- 2) 名取俊二・野本亀久雄・村松 繁・古田恵美子: 無脊椎動物の生体防御, 学会出版センター, 1991
- 3) 松崎 啓・大野泰雄・鈴木周一: 天然高分子, 高分子実験学 8, 共立出版, 1984
- 4) 及川 淳・井出宏之: 色素細胞, 講談社サイエンスフィク, 講談社, 1982
- 5) M. Sugumaran & M. Kanost: "Parasites and Pathogens," ed. by N. E. Beckage, S. N. Thompson & B. A. Federick, Academic Press, New York, pp. 317-342, 1993
- 6) J. M. Pawelek, A. Korner, A. Bergstrom & J. Bologna: *Nature* **286**, 617 (1980)
- 7) Y. Aso, K. J. Kramer, T. L. Hopkins & S. Z. Whetzel: *Insect Biochem.* **14**, 463 (1984)
- 8) Y. Aso, Y. Imamura & N. Yamasaki: *Insect Biochem.* **19**, 401 (1989)
- 9) T. L. Hopkins, T. D. Morgan, Y. Aso & K. J. Kramer: *Science*, N. Y. **217**, 364 (1982)
- 10) T. L. Hopkins & K. J. Kramer: *Annu. Rev. Entomol.* **37**, 273 (1992)
- 11) H. Rembold & Y. Umebachi: "Progress in Tryptophan and Serotonin Research," ed. by H. G. Schlossberger, W. Kochen, B. Linzen & H. Steinhart, Gruyter, Berlin, pp. 743-746, 1984
- 12) M. Yago: *Insect Biochem.* **19**, 673 (1989)
- 13) Second International Symposium on Molecular Insect Science, Flagstaff, Arizona, U.S.A., July, 1993