昆虫外骨格内に存在するメラニン合成酵素

朝 野 維 起*

黒～茶系色素であるメラニンは、地球上の生物に極めてありふれた存在である。髪の毛や鱗・皮膚など、我々脊椎動物の体色形成に関わるほか、植物や原生動物でも黒色素の合成が観察される。また、本総説で説明する昆虫について見てみると、アリやクロアゲハ・カブトムシなどの色からも明らかなように、メラニンの合成は特に珍しいものではない。しかし、種々の生物がつくるメラニンは、一見すると同じ物体であるかの様に見えつつも、個々の生物に特有の合成経路・合成酵素が存在する。つまり、進化の過程に於いてそれぞれの生き物が独自にメラニン合成能を発達・進化させてきたと考えられる。この総説では昆虫のメラニン合成系について論ずるが、特に我々が直接目にする「昆虫の体そのもの」である外骨格内の酵素群について説明する。ドーパやドーパミンなどのフェノール性基質の酸化反応を触媒する含銅酵素を中心に、それらの基質合成系などにも触れる。また、ヒトなどとの違いについて説明するとともに、その進化的な意義について議論したい。

1. はじめに

本題に入る前に、「昆虫類」について少し考えてみる。昆虫は地球上に存在する動物種の75%を占めるともいわれ⁴⁶⁾、実際、日常の町並みのなかで我々が昆虫を目にする機会は多い。また、昆虫に関係する人間のアクティビティ（収集、飼育、研究、利用、駆除）も盛んである。そのことを端的に示す、研究に関連する事柄の一例として、ゲノム解析の対象となっている昆虫について考えてみる。まず、最初に挙げるべきはキイロショウジョウバエ (*Drosophila melanogaster*) であるが、この昆虫は多細胞生物のなかでも最も初期にゲノム配列が読まれた動物の一つである。Chilanaらによると¹⁷⁾、彼らの総説が出版された2012年当時で39に及ぶ昆虫種のゲノム解読が終了している。また、DNAシーケンシングやバイオインフォマティクス技術の革新も相まって、現在は5000種に及ぶ昆虫ゲノムを解読するプロジェクト (i5K) が進行中である。本総説の主題であるメラニン合成系遺伝子の機能解析に関しては、ヒト (*Homo sapiens*)・マウス (*Mus musculus*) のような哺乳類と並んで、昆虫でも盛んに研究が行われてきた。メラニン合成経路を構成する様々な遺伝子が既に同定されている事に加えて、エクジステロイド (ecdysteroid) などのホルモンによる個々の遺伝子の発現制御・分子機能の調節などについて多くの研究報告がある。また、節足動物や軟体動物・環形動物ではメラニン合成系が免疫反応に関与しているとされているが³³⁾、これについても昆虫の研究報告数

が他を圧倒しているといつてよい状況である。因に私自身は、昆虫に存在するメラニン合成酵素群の中でも「フェノール性基質の酸化」を触媒する酵素の解析を、主にカイコガ (*Bombyx mori*) を用いて行っている。昆虫には2種類の酵素がこのステップに関わることが知られているが、それらは同じ反応を触媒するにもかかわらず全く異なるファミリーに属するタンパク質である。最初に、この2つについて説明しつつ、他の因子に関する最近の話題等説明したい。

2. 昆虫外骨格におけるメラニン合成

外骨格は一層の表皮細胞によって分泌されてできる非細胞性マトリクスである。他の動物と同様に体表の色彩は多様であるが、これはカモフラージュ・警戒色・性的特徴を表す模様などの役割があり、メラニン色素はそれらの形成に大変重要な存在である (図1B)。ただし、昆虫外骨格で

図1 フェノール性基質の酸化と外骨格の黒色化 (A) 脊椎動物ではドーパが酸化されてメラニンが作られる。その反応を触媒するのはチロシナーゼである。一方、昆虫ではラッカーゼまたはフェノール酸化酵素がドーパ・ドーパミンを酸化してメラニンを作る。(B) 左は蝶の翅の模様にもみられる黒色素。通常の後胚発生における外骨格形成時、ラッカーゼによる反応を経たメラニン色素合成によって黒色化する。右は大腸菌懸濁液中で針を刺すことで傷つけた後のショウジョウバエ幼虫。傷を受けた所が黒色化するが、これはフェノール酸化酵素前駆体 = proPOの活性化を経る (左の写真は著者が所属する首都大の企画で塚田悦造氏の「こぶちざわ昆虫美術館」を訪れた際に撮ったもの)。

*Tsunaki ASANO, 首都大学東京大学院理工学研究科生命科学専攻 (〒192-0397 東京都八王子市南大沢1-1)

Received 19 June 2013, Accepted 20 August 2013

メラニン合成が観察されるのはこのような場所だけではない。昆虫を対象としない研究者にとってなじみが薄いと思われるが、実は昆虫や甲殻類では外骨格に傷がついたり病原が侵入したりした際、傷害部位や病原の周囲にメラニン合成が観察される。これら二つのメラニン合成は、ともにチロシンを出発材料とする合成経路を経る反応系で(図3)、チロシン水酸化反応によって生成されるドーパ、およびドーパが脱炭酸されて生じるドーパミンが酸化される反応を経てメラニン合成へと向かう^{7, 15)}。因に、脊椎動物の場合もドーパが酸化されることでメラニンが合成されるが、この反応を触媒するのはチロシナーゼ (tyrosinase) と呼ばれる銅酵素である(図1 A)。これについては、後ほど触れる。ドーパ・ドーパミンが酸化されてキノン類 (quinones) が生成される反応が昆虫に於けるメラニン合成の重要なステップであるが、この反応を触媒する酵素は「成長期の体色形成時」と「傷害時」で異なっている。まず、通常の成長過程で体色・模様が形成されるときにはたらくのは、ラッカーゼ (laccase) である(図1 B)。一方、傷害時にはたらく酵素はフェノール酸化酵素 (phenoloxidase) と呼ばれる分子である。これらはともに活性中心に銅を配位するという点で共通だが、銅結合部位の配列は異なっている。分子全体を通したアミノ酸配列の相同性もほとんどなく、ラッカーゼとフェノール酸化酵素は全く異なるファミリーに属するタンパク質分子である。以下、それぞれについて詳しく説明する。

3. 脱皮時に観察される外骨格の着色

節足動物である昆虫は外骨格を持つため、成長するためには脱皮を繰り返す必要がある。一回の脱皮ごとに古い外骨格は脱ぎ捨てられ、同時に外骨格に含まれる色素類も捨てられる。つまり昆虫は、脱皮ごとに体色形成に必要な色素を合成しなくてはならない。この脱皮に伴う色素合成過程について、図2に示したセミの羽化の様子を見ながら説明する。羽化直後のセミの体はほとんど体色がなく、また柔らかい。その後、体・翅・脚などが伸びることに伴って、しぼんでいる外骨格が伸ばされていき、ある程度のびきった段階で体の硬化と着色が並行して起きる。この、外骨格の硬化と着色に重要な働きをするのがラッカーゼである。ラッカーゼは3ドメインマルチ銅オキシダーゼ (3 domain multi copper oxidase) と呼ばれるタンパク質ファミリーに属する。昆虫の外骨格中にはラッカーゼの基質となるフェノール性化合物が主に4種類存在する。ドーパ・ドーパミ

図2 脱皮に伴うメラニン合成 アブラゼミ (*Graptosaltria nigrofusca*) が羽化した後、脚・翅などを伸ばしてから硬化と着色する様子 文献15) から改変

ンはメラニン合成に用いられるが、それ以外に N-アセチルドーパミン (N-acetyldopamine: NADA) と N-β-アラニルドーパミン (N-β-alanyldopamine: NBAD) が酸化されて生じる NADA キノンおよび NBAD キノンが外骨格の硬化に用いられる。一般的に、これらのオルトジフェノール類が酸化されて生じるキノン類は反応性が高いが、特に NADA キノンや NBAD キノンは、外骨格中に存在するキチン結合性タンパク質表面のアミノ酸残基等を介した「タンパク質-タンパク質間」「タンパク質-キチン間」の架橋を形成することで外骨格が硬化すると考えられている。NADA キノンおよび NBAD キノンは外骨格硬化プロセスで中心的役割を果たすとされるが、硬化反応の結果として黄～茶系の着色も生じるとされる^{3, 4)}。一方、ドーパやドーパミンが酸化されて生じるドーパキノンのドーパミンキノンは、非酵素的にドーパクローム (dopachrome) やドーパミンクローム (dopaminechrome) へと変換されるが、これらはドーパクローム変換酵素 (dopachrome conversion enzyme: DCE) によって、5,6-dihydroxyindole (DHI) や 5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid (DHICA) に変換される。これらがさらにラッカーゼによって酸化された後に最終的にメラニンが合成されると考えられる(図3)。

4. カイコガ蛹外骨格からのラッカーゼ精製

昆虫外骨格中のラッカーゼ研究は、1954年に故大西博士(名古屋大学名誉教授、東京都立大学在籍時)がクロショウジョウバエ (*Drosophila virilis*) の囲蛹殻中にジメチル-p-フェニレンジアミン (dimethyl-p-phenylenediamine) を酸化する酵素活性を検出したことが始まりと言われる¹⁶⁾。その後、山崎によって⁵¹⁾ その活性を有する酵素が Keilin と Mann³⁶⁾ もしくは Dawson と Tarpley¹⁹⁾ が定義するところのラッカーゼに分類されることが示された。すなわち、1) p-フェニレンジアミンやポリフェノール類を酸化するがチロシンや p-クレゾール (p-cresol) を酸化しない、2) 酵素活性が一酸化炭素に影響されない、3) シアン化カリウムやジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム (sodium diethyldithiocarbamate) による阻害、などの特徴が観察された¹⁰⁾。以降は、酵素学的な解析を中心に80年代まで複

図3 昆虫に於けるメラニン合成経路 文献7) 15) などから改変

数の昆虫種でラッカーゼ様酵素が解析されていた。しかし、アミノ酸配列や遺伝子が明らかにされることなく、90年代は昆虫外骨格に存在するラッカーゼに関する報告も殆ど途絶えた状態だった。そのため、昆虫外骨格に存在するラッカーゼ様酵素が本当にラッカーゼと呼べるものなのか、それとも別なファミリーに属するタンパク質なのかが不明なままであった。その後、2004年にアメリカの Kanost らの研究グループが、タバコスズメガ (*Manduca sexta*) およびハマダラカ (*Anopheles gambiae*) からラッカーゼ様タンパク質をコードする遺伝子のクローニングに成功したと報告した¹⁹⁾。この研究が、昆虫ラッカーゼ研究の第2の口火になって、以後昆虫ラッカーゼに関する論文の年間出版数は、年を追うごとに増えている状況である。この時のクローニングには、植物やカビなどのラッカーゼに高く保存されている銅結合領域などのアミノ酸配列をもとに設計したデジェネレイト・プライマー (degenerate primer) が用いられた。この段階で、昆虫には2種類のラッカーゼ様タンパク質遺伝子が存在することが明らかにされ、それらはラッカーゼ1 (laccase1) とラッカーゼ2 (laccase2) と名付けられた。これら2つの遺伝子がコードするタンパク質の違いは、触媒ドメインのアミノ末端側に存在する領域に見受けられる。ラッカーゼ1については、血液凝固因子として知られる von Willebrand factor に相同な配列の繰り返しが存在するものの、ラッカーゼ2については既知のタンパク質に相同な部分は見つからなかった。荒金らがコクヌストモドキ (*Tribolium castaneum*) で RNA 干渉実験を行うことにより、2つあるラッカーゼ遺伝子のうちラッカーゼ2遺伝子が外骨格の構築 (硬化と着色) に重要であることを示した⁵⁾。また、このときは後述する「傷害時のメラニン合成にはたらくフェノール酸化酵素」をコードする遺伝子の RNA 干渉実験も行われているが、外骨格形成に関する表現型は観察されなかった。RNA 干渉を活用したラッカーゼ2遺伝子のノックダウンによる外骨格形成不全は現在に至るまで様々な昆虫種で報告されている^{26,44)}。

昆虫にラッカーゼ遺伝子があることや、ラッカーゼ2遺伝子の役割が明らかとなってきたという状況ではあったが、80年代までに報告されていたラッカーゼ様酵素が、本当にラッカーゼ2にコードされるタンパク質なのかについてまだ確認出来ていなかった。著者らはまず、約40年前に山崎によって報告された「カイコガ蛹外骨格に存在するラッカーゼ様フェノール酸化活性を持つ酵素」⁵²⁾に記載されている酵素精製の再現を試みた⁵³⁾。カイコガの場合、繭が完成し

てから2~3日ほどたった後に繭を開けると、蛹への脱皮直前の幼虫が得られる。このあと、幼虫は蛹へと変態するが、脱皮直後の蛹外骨格にはほとんど着色が見られない。しかし、時間の経過とともに外骨格は茶色に着色しながら硬くなる。山崎の報告に従い、著者らは出発材料として脱皮直後の蛹から得られる、まだ硬化・着色反応が起きていない外骨格を用いた。ところで、ラッカーゼは外骨格マトリクスに強固に結合しており、通常の中性・弱酸性バッファーなどでは抽出出来ない。山崎の方法では、トリプシンによって外骨格を消化することでラッカーゼを遊離させることに成功している。いささか乱暴にも感じられる実験操作ではあるが、幸運にもラッカーゼはトリプシンのようなプロテアーゼに耐性があり、この方法を用いることができた。得られた抽出液を、硫酸分画・各種カラムクロマトグラフィーを行うことにより精製を進めた。山崎の報告では、SDS-PAGEの泳動像上で70kDa, 66kDa, 62kDaに相当する3本のバンドがある状態だったが、今回はより精製度を上げ、最終的に70 kDa 付近の単一バンドになるまで精製することが出来た (ただし、以前の研究でバンドが3本になったのは、用いたトリプシン中の不純物による非特異的な消化産物の可能性も考えられる)。精製後の試料を SDS-PAGE で展開した後にバンドを切り出してトリプシン処理し、得られたペプチド断片の帰属を質量分析計で調べた所、他の昆虫で報告されているラッカーゼ2のカイコオースログ *Bmlaccase2* (*Bmlac2*) から予想されるアミノ酸配列が得られ、ラッカーゼ2の精製が初めて確認出来た。また、精製標品のアミノ末端配列を調べると、Asn-Pro-Ala-Lue-Ser (NPALS) だったが、これは cDNA から予想される配列の Asn147-Ser151 に相当する。質量分析では、この NPALS よりもアミノ末端側の配列が検出出来なかったことを考え合わせると、精製された *Bmlac2* はアミノ末端から146番目のアルギニンまでが欠けていると考えられる (図5 A)。この場合、予想される分子量が約6万9千になることから、SDS-PAGE 上での移動度 (7万に相当) とほぼ一致する。

著者らの精製手法では *Bmlac2* は酵素活性を持つ分子として精製されたが、外骨格の中では *Bmlac2* が実は不活性な前駆体として存在する可能性がある。図4 Bは、蚕の蛹外骨格を、ラッカーゼの基質であるドーパミンとインキュベーションした結果である。脱皮前、脱皮直後は殆ど染色されないが、2時間経過した試料は染色が観察される。しかし、図4 Aのノーザンプロットの結果からもわかるよう

図4 ラッカーゼの活性化 A、幼虫から蛹への脱皮期に於ける *Bmlac2* の RNA をノーザンハイブリダイゼーション法で検出したもの B、外骨格のみを採取し、ラッカーゼの基質であるドーパミンで *in situ* 染色したもの。上が染色前に固定したもの、下は染色後に固定したもの。文献15)、53) から改変

図5 ラッカーゼのドメイン構造と系統樹 A, カイコから精製したラッカーゼ2 (Bmlac2) が一番上に示してある。以下 Bmlac2, ハマダラカラッカーゼ1 (Aglac1), ウルシラッカーゼ (*Rhus vernicifera* laccase), シイタケラッカーゼ (*Lentinula edodes* Lcc6), パチルスラッカーゼ (*Batillus subtilis* cotA) の予想配列から模式図を描いた。模式図の左下に、モチーフ構造などが示してある。B, 昆虫のラッカーゼは学名の略 (本文参照) を頭につけている。他の動物のラッカーゼは属名で示してある。

に、脱皮前の段階で既に *Bmlac2* の発現はほぼ終了しており、十分量のラッカーゼタンパク質が外骨格に蓄積していることも確認されている。よって、脱皮前および脱皮直後で染色が殆ど観察されないのは、ラッカーゼが活性のない状態で存在しているためである、と説明できる。実際、カイコの蛹外骨格から尿素を含むバッファを用いることで、活性がない状態のラッカーゼを抽出することが可能である。また、この抽出物をトリプシンで処理すると、抽出物に含まれるラッカーゼが何らかのプロセッシングを受けて活性化される。これは、トリプシンを用いて外骨格から抽出したラッカーゼが、既に酵素活性を有していたことと一致する。つまり、外骨格中で不活性な状態で存在していたものがトリプシン抽出の際に何らかのプロセッシングを受けたと考えられる。ただし、生体内で実際にプロテアーゼによるプロセッシングが起きているのかは不明である。また、トリプシンによって N 末の147残基が消失したものと考えられるが、その部分の有無が酵素活性の制御に関係ないことは組み替えタンパク質で既に確認している (未発表)。この、「外骨格のラッカーゼが不活性な状態でつくられた後に活性化される」仕組みは、脱皮を成功裏に行うために重要だと考えられる。すなわち、脱皮そのもの・脱皮後の体の伸長には、外骨格が柔らかくなくてはならない。しかし、一旦体が伸びてしまえば、あとは急速に体が硬くならないと外敵から逃げることもできず、病原の侵入を許すことにもつながる。ただし、ラッカーゼ活性を抑える何らかの因子が結合したりしている可能性も否定は出来ない。カイコガでの報告の後に Kanost のグループから発表されたタバコスズメガにおけるラッカーゼ精製の論文では、ラッカーゼ2 (Mslac2) が活性を持つ状態で合成されると主張されている²¹⁾。このように、「ラッカーゼ活性制御機構」についての統一的な見解はまだない状況であり、また他の生物に於いて昆虫で見られるような活性制御の仕組みがあるという報告もない。もっとも、現在著者らはキイロショウジョウバエを用いて同様の研究をしているが、少なくともラッカーゼの活性を制御する機構の存在を確認しており (投稿準備中)、それが昆虫に広く共通するメカニズムなのではないかと考えている。

ラッカーゼは、そもそも日本産の漆 (*Rhus vernicifera*) から発見された酵素⁵⁴⁾で、酸化反応を触媒する酵素として世界で初めて見つかったものとされている。西欧の科学を取り入れた頃の日本で行われた画期的な発見だが、そのことを知っている日本人生化学者は多くない⁵⁰⁾。漆器を制作する過程で木の表面に漆を塗る工程があるが、漆によってできるプラスチック様の物質は、単に漆が乾いてできるのではない。漆には、ウルシオールと呼ばれるフェノール性の基質が高濃度で存在するが、これがラッカーゼの酵素活性によってポリマー化することが、漆器作成に重要である。そのため、漆器製作過程の「塗り」の工程で、漆を塗った後は高湿度の部屋で重合反応を進めながらゆっくりと乾燥させる。また、植物の体の中でラッカーゼは、細胞壁合成の過程でリグニンモノマーの重合を触媒することが知られている。昆虫の外骨格硬化も、ラッカーゼによるフェノール性基質を介した外骨格成分 (キチン、キチン結合性外骨格タンパク質など) の架橋が重要であるが、これについては既に述べた。ラッカーゼが植物から見つかったから既に130年が経過しており、真菌類や菌類から見つかったラッカーゼも含めて、酵素学的な解析結果や遺伝子配列・構造生物学的情報などが膨大に蓄積している。一方、動物にラッカーゼ遺伝子があることが示されたのは昆虫が最初だが、ラッカーゼ研究の歴史の中では最近のことで、現在も昆虫以外ではラッカーゼ遺伝子の機能解析はされていない。唯一、マガキ (*Crassostrea gigas*) にラッカーゼ様の酵素活性があることが最近報告されたのみである³⁹⁾。

図5 A は、様々な生き物に存在するラッカーゼの構造を模式的に示したものである。植物や真菌のラッカーゼは触媒ドメインのみから構成されるのに対して、昆虫のラッカーゼにはアミノ末端ドメインが存在する。ただし、それぞれの N 末端ドメインの機能は明らかにされていない。先程も述べたが、昆虫には二つのラッカーゼ遺伝子が存在し、昆虫外骨格の硬化・着色にはたらくのはラッカーゼ2である。近年、甲殻類であるミジンコ (*Daphnia pulex*)¹⁸⁾ や銚角類であるナミハダニ (*Tetranychus urticae*)²⁷⁾ などのゲノムが公開されたことにより、節足動物がもつ遺伝子の

進化などを今まで以上に詳しく考察することが可能になってきた。図5 Bは動物に存在するラッカーゼの系統樹だが、ここでは大きく2つのクラスターが存在する。ラッカーゼ1が含まれるクラスターには、ゲノムが読まれている動物（昆虫、甲殻類、ウニ、ホヤ）のラッカーゼが含まれる。これに対して、ラッカーゼ2のクラスターに属する分子は昆虫にしか存在しない。ラッカーゼ2の場合、クラスター分岐以降の進化が遅く、系統的に離れている双翅目と鞘翅目で比べても保存性が85%ある（触媒ドメインのみで比較）。このことは、ラッカーゼ2の分子としての様々な特徴が初期の昆虫が生まれた時代から保存されていること、およびその特徴が少しでも損なわれると昆虫の発生・生存に重篤な影響を及ぼす可能性を示唆する。ラッカーゼ2の重要な機能の一つである酵素活性に関わる部位は保存されていると考えられるが、それ以外にも上述した活性調節に関わる部位（まだ同定はされていないが）などがラッカーゼの機能維持に重要なのかも知れない。

5. 傷害・感染時に観察されるメラニン合成

昆虫の体に傷がつくと、傷害部位の黒色化がしばしば観察される。また、外骨格に伸びたカビ菌糸の周囲や、体腔内に侵入した寄生虫の周りでも黒色化は観察される。これらの場面で生じるメラニン合成は、昆虫のほかに甲殻類でも観察されている。このような状況でつくられるメラニン合成時の化学反応は、基本的には体色形成時のものと同じだと考えられる。しかし、ドーパ・ドーパミンの酸化を触媒するのは、この場合ラッカーゼではなくフェノール酸化酵素（phenoloxidase）と呼ばれる分子である。まず、フェノール酸化酵素（以下PO）の重要な性質として不活性な前駆体（prophenoloxidase: proPO）として合成されることが挙げられる。カビやバクテリアの細胞壁成分を認識することによって始まるプロテアーゼカスケードにより、最終的にアミノ末端の50残基ほどが切断されることによってproPOはPOへと活性化される。カイコガの場合、切断される部位のアミノ酸配列モチーフは-NRFG-で、アルギニ

ンのアミノ末端側で切断される（図6）。ここでは詳述しないが、proPO 活性化機構の研究については、先述した故大西博士の弟子である芦田（北海道大学名誉教授）が長らく牽引してきた。現在は先述のKanostや韓国の李（釜山大学）らの貢献が大きい。ProPOが活性化されるとドーパやドーパミンが酸化され、以降はラッカーゼと同様の反応系で最終産物であるメラニンが合成されると考えられている（図3）。すなわち、POによって生じるドーパキノンやドーパミンキノンがDHIやDHICAに変換される反応を経てメラニンが生成すると考えられる。この、proPO 活性化に関わるプロテアーゼカスケードを構成する主要な酵素群は、触媒ドメインのアミノ末端側にシステインリッチなクリップドメインをもつセリンプロテアーゼ（クリップドメインセリンプロテアーゼ: clip domain serine protease: CSP）である^{10, 12)}。カプトガニの血液凝固カスケードを構成する酵素群も同様である³³⁾。このCSPを含む酵素群によるカスケード反応は、キイロショウジョウバエ初期胚発生における背腹軸の決定や抗菌ペプチド類の合成誘導に関わるToll経路でも同様であり³²⁾、節足動物においてかなり基本的な細胞外シグナル系の一つである。また、セリンプロテアーゼによるカスケード反応自体は、脊椎動物の血液凝固反応なども同様で、広く動物界に存在する系である。ただし、メラニン合成が昆虫の免疫システムに於いてどのような役割を果たしているのかについては様々な議論があり、たとえばメラニン合成系に異常があるショウジョウバエ変異体において、細菌感染時の生存率が野生型とあまり変化がないなどの報告もある³⁸⁾。とは言いつつも、傷の周りや体内に侵入した寄生虫の周囲を取り囲むように沈着するメラニン色素、バクテリアの壁成分などをトリガーとするカスケード反応、proPO 活性化系のToll経路とのクロストーク¹⁾など、proPO 活性化のカスケードが関与するメラニン合成は相当重要な意味を持っているのではないかと推察される。

ProPOの研究はラッカーゼと同様に歴史が古く、第2次大戦以前までさかのぼることができる。もっと前では、パスツールが病気のカイコガ幼虫に黒い染みがあることを観

図6 proPOおよびヘモシアニン、チロシナーゼの構造と系統関係 3型銅タンパク質に属するタンパク質の構造と大まかな系統関係を示している。proPOは銹角類のヘモシアニンに近く、それらはまた甲殻類-昆虫ヘモシアニンに近い。一方、脊椎動物や軟体動物で見ついているチロシナーゼは軟体動物型ヘモシアニンに近い構造をしている。

察して、これも proPO が活性化してできたものであると考えられる。ProPO が最初に精製されたのはカイコガの血液からで、いまから 40 年ほど前に芦田によってなされた⁹⁾。この精製は不活性な proPO を対象としたことが、成功の要因だったと言える。何故なら、proPO が一旦活性化して PO になると、周りのタンパク質と非特異的に結合することで SDS-PAGE 用サンプルバッファーなどの処理にも耐性のある巨大な複合体を形成する性質があるためである（この複合体は電気泳動で展開しようとしてもゲル中に入っていない）。活性型 PO の酵素学的性質が脊椎動物などのチロシナーゼに類似していることから、proPO・PO はチロシナーゼ型フェノール酸化酵素と呼ばれている。すなわち、1) モノフェノール・モノオキシゲナーゼ活性を持つ、2) パラジフェノール (*p*-diphenol) は酸化せずオルトジフェノール (*o*-diphenol) を酸化する、などの特徴が共通している。やがて、1995 年にタバコスズメガヤカイコガ、キイロショウジョウバエから proPO の cDNA が単離され、配列上 proPO は節足動物の酸素運搬タンパク質であるヘモシアニンに非常に近いタンパク質であることが明らかとなった^(24, 29, 35)。cDNA から予想される分子量は約 8 万で、ヘモシアニンの約 7 万 5 千より若干大きい。ProPO には銅原子を配位する部位が 2 カ所あって、アミノ末端側から A site および B site とよばれるが、これは活性型 PO が基質を酸化する際に電子受容体となる酵素との結合に重要である（図 6）。ところで、動物界にはヘモシアニンは 2 種類存在しており、ひとつは節足動物に存在するもの、もう一つは軟体動物に存在するものである。これらは共通の祖先タンパク質から進化した分子で、B site は共通の配列モチーフをしているが A site に関しては独立に獲得したと考えられる。図 6 で示すとおり、proPO は節足動物タイプのヘモシアニン、特に鋏角類のヘモシアニンに近い配列をしている。一方、軟体動物のヘモシアニンは脊椎動物などに存在するチロシナーゼと配列が似ていることが以前から指摘されている。A site の配列に関して言えば、軟体動物のヘモシアニンとチロシナーゼは同じモチーフを共有するが、proPO や節足動物のヘモシアニンの A site の配列とはあまり共通性がない。2003 年にマツイカ (*Illex argentinus*) の墨汁腺からチロシナーゼ活性を有する酵素が精製され cDNA の配列が初めて調べられたが、A site の配列からやはり脊椎動物などが有するチロシナーゼや軟体動物のヘモシアニンに近いことが示されている⁴¹⁾。因に、図 6 に載せているタンパク質群は、2 つの銅結合部位のそれぞれが 3 つのヒスチジン残基で銅を配位する構造を持つという共通点があり、これらは 3 型銅タンパク質 (Type-III copper protein) と総称される。

ProPO および節足動物に存在するヘモシアニンの配列上の大きな違いは、proPO が活性化される際に切断される 50 残基ほどのアミノ末端配列の有無である。また、甲殻類のヘモシアニンは分泌のためのシグナル配列があるが、その合成器官である肝すい臓 (hepatopancreas) から分泌されたあとの成熟タンパクには存在しない。これに対し、鋏角類のヘモシアニン遺伝子にはシグナル配列がそもそもコードされておらず、血液への放出は合成組織である血球細胞の破裂によって考えられている⁴⁷⁾。鋏角類ヘモシアニンと同様に proPO も N 末端の分泌シグナルがなく、主な合成場所である血球細胞の破裂によって血中に放出されると考え

られている^{24, 29, 34)}。事実、proPO や鋏角類ヘモシアニンの合成細胞には小胞体が殆ど観察されず、これらの分子が糖鎖を持たないことと矛盾しない。以上のとおり、proPO は鋏角類ヘモシアニンに近い分子だと言え、分子系統樹上でも甲殻類のヘモシアニンではなく proPO と同じグループに含まれる（図 6）。

6. 外骨格からの proPO 精製

話を外骨格に戻す。昆虫外骨格の傷害部位にメラニン合成が観察されることから、フェノール性基質を酸化する酵素およびその活性化系が外骨格中に存在する可能性について、50 年代から指摘されていた。事実、80 年代後半までに、チロシナーゼ様の活性を持つ外骨格由来の酵素が複数の昆虫種から分離されており、部分精製標品等を用いた酵素学的研究が報告されている。しかしながら、血液の proPO と外骨格中のチロシナーゼ様酵素の関係（同じ分子なのかどうかなど）については明確に示されないままであった^{10, 16)}。その後、1994 年に芦田と Brey によって、カイコガ幼虫外骨格に proPO およびその活性化系が存在することが直接的に示された¹¹⁾。その際、proPO 抽出は弱酸性のバッファー、EDTA およびセリンプロテアーゼの阻害剤を用いて行われ、さらに陰イオン交換体による分画も併用された。この状態では proPO を直接切断して活性化する酵素である proPO 活性化酵素 (proPO activating enzyme: PPAE) も不活性な状態で抽出される。そのため、活性型 PO による複合体形成が起きず、イムノブロットによる解析などが可能であった。さらにその後、その抽出法を利用する形で著者らは外骨格の proPO を精製した。PPAE によるプロセシングの速度や、PO になってからの比活性・基質特異性などを含めて、分子としての性質が血中 proPO と殆ど変わらないことが示された¹³⁾。また、質量分析計によるフラグメント解析では、proPO 分子表面に存在するメチオニン残基がメチオニンスルホキシドへと酸化されていることが明らかとなった¹⁴⁾。ただし、この修飾は proPO の機能にはあまり影響しないようである。メチオニン残基はおそらく外骨格中で酸化されると思われるが、その場合外骨格マトリクス内が酸化的環境にある理由などが興味深く感じられる。cDNA をもとに作成したプローブで発現場所を調べたが、外骨格を裏打ちする表皮細胞に proPO mRNA は検出されなかった。代わりに、血中の proPO が表皮細胞層を通過して外骨格へと輸送されることが証明されている¹³⁾。PPAE などの活性化カスケードを構成する因子については表皮細胞での発現が確認出来ているが、proPO だけが何故血液から運ばれるようになったのかはわからない。シグナル配列を持たない proPO の場合、たとえ表皮細胞で合成されていたとしても外骨格への分泌経路が想像しづらい。もし、血液からの移行の際にレセプターを介したトランスサイトosis (transcytosis) のような膜でできた小胞を利用する輸送が行われれば、細胞外から細胞外への輸送になるので細胞膜に対する位置関係的にも整合性はある。また、鋏角類ヘモシアニンが血液から外骨格へ輸送されることが示されている訳ではないが、シグナル配列がなく血球の破裂によって血リンパ中に放出されるという機構は昆虫の proPO と同じであることから、同様な輸送が行われている可能性も類推出来る。日本産カブトガニ (*Tachypleus*

tridentatus) のヘモシアニンに関しては、キチン (chitin) 結合性抗菌物質であるタキプレシン (Tachyplesin) が結合することにより、フェノール酸化酵素に変換するとの報告がある⁴⁰⁾。これは、カブトガニにおいてはヘモシアニンが proPO の役割を兼ねそなえる可能性を示唆する。著者の知る限り、外骨格からの proPO 精製と移行についてはここで述べたカイコガの研究報告のみであるが、これがどの程度一般的な現象なのかを確かめるべく、例えば不完全変態昆虫などを用いた研究をしたいと考えている。

ところで、昆虫の気管の内側は薄い外骨格に覆われているが、そこに proPO が高濃度で存在することが芦田らによって報告されている¹¹⁾。これは最初、ヘモシアニンに近い proPO が酸素交換に関わっているのではないかという期待へとつながった。というのも、90年代後半まで昆虫にはヘモシアニンが存在しないと考えられており、ヘモシアニンとして機能する proPO の存在は当時の常識を覆す魅力的な仮説であった。しかしその後、アメリカカイナゴ (*Schistocerca americana*) の胚から構築された cDNA ライブラリーのなかに、甲殻類が持つヘモシアニンにきわめて類似したタンパク質をコードするクローンが見つかった⁴⁸⁾。その後、アミメカワゲラの一種である *Perla marginata* から、酸素運搬体として機能するヘモシアニンが精製されている²⁸⁾。つまり、昆虫は proPO とは別にヘモシアニンも持っていることが示されたのである。ただし、その配列は甲殻類のヘモシアニンに近く、proPO 及び鉗角類ヘモシアニンとは異なるサブファミリーに属する。近年、分子系統解析によって昆虫と甲殻類の分類上の近縁関係が決定的になっているが、おそらく初期の昆虫では甲殻類同様ヘモシアニンが呼吸色素として機能していたと考えられる。その後気管系の発達に伴って、より進化の進んだ昆虫においてはヘモシアニンの利用がなくなり、特に完全変態昆虫ではゲノムからヘモシアニン遺伝子そのものが失われている種がほとんどである。これに対し、カゲロウ・バッタの様な不完全変態昆虫はヘモシアニン遺伝子を有している場合が少なからず見受けられる。また、80年代に初めて見つかった甲殻類で、分子系統学的な観点では極めて昆虫に近いとされているムカデエビ類 (*Remipedia*) のヘモシアニンも、やはりエビやカニなどが属する十脚目などのヘモシアニンとは分岐し、昆虫ヘモシアニンと独立したクラスターを形成している。これは、昆虫とムカデエビの間の高い類縁関係を支持する²²⁾。

7. フェノール性基質の酸化に関わる酵素以外の因子

・チロシン水酸化酵素とドーパ脱炭酸酵素

黒〜茶系の体色形成、または感染・傷害時のメラニン合成に、ラッカーゼ 2 および proPO がそれぞれ機能することについてここまで述べてきたが、フェノール性基質の酸化に関わる酵素以外の因子についても考えてみる。先ほど説明した通り、脊椎動物の体表組織ではドーパがメラニン合成に用いられるが、この場合のドーパ産生にはチロシナーゼが関わっている。チロシナーゼによってチロシンが水酸化されてドーパになり、このドーパが同じくチロシナーゼにより酸化されドーパキノンになる。ラッカーゼにはチロシン水酸化能はないが、proPO が活性化してできる PO はチロシナーゼ型フェノール酸化酵素と呼ばれるだけあって、

チロシン水酸化作用も有している。しかし、その反応は非常に弱い。実は、昆虫の場合、チロシンからドーパが産生される際、チロシン水酸化酵素 (Tyrosine hydroxylase: TH) が重要だと考えられている。チロシン水酸化酵素は神経伝達物質合成系の構成因子として、ドーパミンを作るドーパ脱炭酸酵素 (dopa decarboxylase: DDC) とともに非常に良く研究されている酵素である。これらの酵素は他の動物では神経での発現が主であるが、昆虫に於いては表皮細胞でも発現している。昆虫の TH や DDC については、ショウジョウバエの行動や体色に関わる遺伝子として同定され、遺伝子配列も 80 年代に既に報告されている^{23, 42)}。また、DDC についてはタバコスズメガの体色形成過程に於ける発現制御について比留間・Riddiford が詳細に解析している³¹⁾。近年では、ナミアゲハ (*Papilio Xuthus*)²⁵⁾ やアワヨトウガ (*Pseudaletia separata*)⁴³⁾ などで、幼虫外骨格の紋様形成に於ける TH・DDC の発現・機能についても調べられている。先ほども述べたが、NADA や NBAD は外骨格硬化に用いられるが、これらはドーパミンから生成される分子である。つまり、ドーパ・ドーパミンの表皮組織に於ける発現は、メラニン合成だけではなく外骨格硬化反応の基質供給にも欠かせない。他の節足動物でも TH や DDC がメラニン合成や外骨格硬化に、もしかすると関わる可能性が考えられるが、現時点では殆ど明らかにされていない。

・ドーパクローム変換酵素

最後は、DHI や DHICA が生成される反応を触媒するドーパクローム変換酵素 (dopachrome-conversion enzyme: DCE) について説明する。脊椎動物では、ドーパクロームを異性化して DHICA を生成するのはチロシナーゼに相同な TRP2 (tyrosinase-related protein 2) である。2001 年にハマダラカから精製された酵素のアミノ酸配列が調べられ、cDNA も単離された³⁴⁾。この酵素はドーパクロームを脱炭酸的に異性化して DHI を生成する他、ドーパミンクロームを異性化することで DHI を生成する。後述するショウジョウバエ yellow タンパク質の場合、ドーパクロームの異性化による DHICA 生成も観察されている。DCE は分泌シグナルを有する約 5 万程度のタンパク質で、これに相同なタンパク質をコードする遺伝子をゲノム中に持つ生物は、真菌類や細菌類の他はナメクジウオ (*Branchiostoma floridae*) だけである³⁷⁾。ゲノムデータベースで他の節足動物について再検索したが、昆虫の DCE に相同なタンパク質をコードする遺伝子はみつからなかった (2013 年 5 月時点におけるミジンコ・ナミハダニ各々のデータベース内に於ける検索結果による)。そのような状況もあり、「DCE の利用」は昆虫が進化の過程である種のバクテリアから、遺伝子の水平伝播によって獲得したという説が有力である³⁷⁾。この DCE についてひとつ興味深い特徴があげられる。それは、どの昆虫種においても DCE 遺伝子のコピー数が多いということである。たとえば、キロショウジョウバエやコクヌストモドキで 14、カイコガで 10 あり、それぞれの遺伝子・翻訳産物がどのように機能するのかについてもコクヌストモドキなどで調べられている⁸⁾。因に、体色が薄くなることで古くから知られているショウジョウバエ yellow-y 遺伝子がコードするタンパク質は DCE のファミリーに属するが、その組み替えタンパク質には DCE 活性

がなかった。一方, yellow-yに類似する2つのタンパク質 yellow-f1, yellow-f2にはDCE 活性が見られた³⁰⁾。yellow-y タンパク質が生体内でメラニン合成にはたらく際は、もしかすると酵素活性以外の何らかの分子機能が重要である可能性もある。また、ミツバチ (*Apis mellifera*) では、DCE に相同なタンパク質 (主要ローヤルゼリータンパク質 (Major royal jelly protein: MRJP)) が全タンパク質の90% を占めていることも知られている¹⁾。

8. おわりに

昆虫の表皮で観察される2種類のメラニン合成系について、主にフェノール性基質を酸化する酵素に焦点をあてながら、基質合成酵素なども含め述べてきた。細かい分子機能的な説明というよりは、個々の因子について簡単に触れるのみとなってしまうが、少なくとも昆虫のメラニン合成系に関わる因子の多くが我々脊椎動物の系とは異なることが理解出来ると思う。個人的な興味として、昆虫のメラニン合成系がどこまで昆虫独自のもののなのか? という疑問に答える情報が今後得られればと感じている。proPOについては実は甲殻類からも見つかっており⁴⁹⁾、活性化系の因子も共通であることから昆虫と甲殻類の分岐以前から存在しているのは確実である。一方、最後に触れたDCEについては、昆虫独自に獲得された因子である可能性が高いと言える。DCE以外の因子についても、例えばラッカーゼ2遺伝子の存在が確認できるのは今のところ昆虫だけである。加えて、ラッカーゼ2が外骨格のメラニン合成に使われていることや、表皮細胞に於けるTH・DDCの利用が示されているのも現段階では昆虫のみである。無論、これらが本当に昆虫独自に発達したものであるのかについては他の節足動物に関する研究結果を待たねばならないだろう。ところで、先程からメラニン合成系で作られるドーパミンが外骨格硬化の基質合成に使われることに言及してきたが、もしかするとラッカーゼ2を用いるシステムの開発は昆虫進化の一大事件だった可能性が考えられる。なぜなら、外骨格を硬くする際、甲殻類のように一定量のカルシウムを使わなくて済むからである。どのような経緯でTHやDDCが表皮で合成されるようになったのかは不明であるが、これがラッカーゼと結びつくことによって、カルシウムの呪縛から解放されたのではないだろうか。さらに、DCEを得たことで体色形成にもラッカーゼを利用するように進化してきたという仮説も考え得る。現在、ラッカーゼの活性化系を含めて不明な点が多く残されている現状ではあるが、今後の研究によって昆虫外骨格・表皮で起きていることに対する理解が深まることが期待される。

謝 辞

本総説の執筆機会を与えてくださいました黒川信先生、フェノール酸化酵素研究の指導・ラッカーゼ研究の助言等して下さいました芦田正明先生に、この場を借りて感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Albert, S. & Klaudiny, J.: *J. Insect Phys.*, 50, 51-9 (2004)

- 2) An, C., Ishibashi, I., Ragan, E. J., Jiang, H. & Kanost, M. R.: *J. Biol. Chem.* 284, 19716-19726 (2009)
- 3) Andersen, S. O.: In *Comprehensive Molec. Insect Sci.* 4, 145-170, (2005)
- 4) Andersen, S. O.: *Insect Biochem. Molec. Biol.* 49, 166-178 (2010)
- 5) Arakane, Y., Muthukrishnan, S., Beeman, R. W., Kanost, M. R. & Kramer, K. J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 11337-11342 (2005)
- 6) Arakane, Y., Li, B., Muthukrishnan, S., Beeman, R. W., Karl J. Kramer & Park, Y.: *Mech. Dev.*, 125, 984-995 (2008)
- 7) Arakane, Y., Lomakin, J., Beeman, R. W., Muthukrishnan, S., Gehrke, S. H., Kanost, M. R., & Kramer, K. J.: *J. Biol. Chem.*, 284, 16584-16594 (2009)
- 8) Arakane, Y., Dittmer, N. T., Tomoyasu, Y., Kramer, K. J., Muthukrishnan, S., Beeman, R. W. & Kanost, M. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 40, 259-266 (2010)
- 9) Ashida, M.: *Arch. Biochem. Biophys.*, 144, 749-762 (1971)
- 10) Ashida, M., Yamazaki, H.-I.: In *Molting and Metamorphosis*, (eds. by Ohnishi, E. & Ishizaki, E.), 239-265, Japan Scientific Societies Press/Springer-Verlag, Tokyo/Berlin (1990)
- 11) Ashida, M. & Brey, P. T.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 92, 10698-10702 (1995)
- 12) Ashida, M., Brey, P. T.: In *Molecular Mechanisms of Immune Responses in Insects*, (eds. Brey, P. T. & Hultmark, D.), 135-172, Chapman & Hall, London. (1997)
- 13) Asano, T. & Ashida, M.: *J. Biol. Chem.*, 276, 11100-11112 (2001)
- 14) Asano, T. & Ashida, M.: *J. Biol. Chem.*, 276, 11113-11125 (2001)
- 15) 朝野維起: 脱皮と変態の生物学, pp123-144, 東海大学出版 (2011)
- 16) Barrett, F.M.: In *Physiology of the Insect Epidermis*, (eds. Binnington, K. & Retnakaran, A.), 195-212, CSIRO Publ. (1990)
- 17) Chilana, P., Sharma, A. & Rai, A.: *Cur. Sci.*, 102, 572-580 (2012)
- 18) Colbourne, J.K., Pfrender, M.E., Gilbert, D., Thomas, W.K., Tucker, A., Oakley, T.H., Tokishita, S., (...), Boore, J.L.: *Science*, 331, 555-561 (2011)
- 19) Dawson, C. R., & Tarpley, W. B.: In *The Enzymes*, eds. Sumner, J. B., & Myrback, K. Academic Press, New York (1951).
- 20) Dittmer, N. T., Suderman, R. J., Jiang, H., Zhu, Y.-C., Gorman, M. J., Kramer, K. J. & Kanost, M. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 34, 29-41 (2004)
- 21) Dittmer, N. T., Gorman, M. J. & Kanost, M. R.: *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 596-606 (2009)
- 22) Ertas, B., von Reumont, B. M., Wägele, J.-H., Misof, B. & Burmester, T.: *Mol. Biol. Evol.*, 26, 2711-2718 (2009)
- 23) Eveleth, D. D., Gietzl, R. D., Spencer, C. A., Nargang, F. E., Hodgetts, R. B. & Marsh, J. L.: *The EMBO J.*, 5, 2663-2672 (1986)
- 24) Fujimoto, K., Okino, N., Kawabata, S.-I., Iwanaga, S. &

Onishi, E.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7769-7773 (1995)

25) Futahashi, R. & Fujiwara, H.: Dev. Genes Evol., 215, 519-529 (2005)

26) Futahashi, R., Tanaka, K., Matsuura, Y., Tanahashi, M., Kikuchi, Y. & Fukatsu, T.: Insect Biochem. Molec. Biol., 41, 191-196 (2011)

27) Grbic, M., Van-Leeuwen, T. Clark, R. M., Rombauts, S., Rouze, P., Grbic, V. et al.: Nature, 479, 487-492 (2011)

28) Hagner-Holler, S., Schoen, A., Erker, W., Marden, J. H., Rupperecht, R., Decker, H. & Burmester, T.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101, 871-874 (2004)

29) Hall, M., Scott, T., Sugumaran, M., Söderhall, K. & Law, J. H.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7764-7768 (1995)

30) Han, Q., Fang, J., Ding, H., Johnson, J. K., Christensen, B. M. & Li, J.: Biochem. J., 368, 333-340 (2002)

31) Hiruma, K. & Riddiford, L.: Insect Biochem. Mol. Biol., 39, 245-253 (2004)

32) Hoffmann, J. A., & Reichhart, J. M. Nat. Immunol., 3, 121-126 (2002)

33) Iwanaga, S. & Lee, B. L.: J Biochem. Mol. Biol., 38, 128-150 (2005)

34) Johnson, J. K., Li, J. & Christensen, B. M.: Insect Biochem. Mol. Biol., 31, 1125-1135 (2001)

35) Kawabata, T., Yasuhara, Y., Ochiai, M., Matsuura, S & Ashida, M.: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 92, 7774-7778 (1995)

36) Keilin, D. & Mann, T.: Nature, 143, 304-304 (1939).

37) Ferguson, L. C., Green, J., Surridge, A. & Jiggins, C. D.: Mol. Biol. Evol., 28, 257-272 (2011)

38) Leclerc, V., Pelte, N., ElChamy, L., Martinelli, C., Ligoxygakis, P. et al: EMBO Reports, 7, 231-235 (2006)

39) Luna-Acosta, A. Rosenfeld, E., Amari, M., Fruitier-Arnaudin, I., Bustamante P. & Thomas-Guyon, H.: Fish Shellfish Immunol, 28, 719-726 (2010)

40) Nagai, T & Kawabata, S.-I.: J. Biol. Chem., 276, 27166-27170 (2001)

41) Naraoka, T., Uchisawa, H., Mori, H., Matsue, H., Chiba, S. & Kimura, A.: Eur. J. Biochem., 270, 4026-4038 (2003)

42) Neckameyer, W. S. & Quinn, H. G.: Neuron, 2, 1167-1175 (1989)

43) Ninomiya, R. & Hayakawa, Y.: FEBS J., 274, 1768-1777 (2008).

44) Niu, B.-L., Shen, W.-F., Liu, Y., Weng, H.-B., He, L.-H., Mu, J.-J., Wu, Z.-L., Jiang, P., Tao, Y.-Z. & Meng, Z.-Q.: Insect Mol. Biol., 17, 303-312 (2008)

45) Ohnishi, E.: Annot. Zool. Jpn., 27, 33-39 (1954)

46) 大西英爾 & 園部治之: 脱皮と変態の生物学, pp1-3, 東海大学出版 (2011)

47) Voit, R. & Feldmaier-Fuchs, G.: J. Biol. Chem., 265,

19447-19452 (1990)

48) Sánchez, D., Ganfornina, M. D., Gutiérrez, G., & Bastiani, M. J.: Mol. Biol. Evol., 15, 415-426, (1998)

49) Söderhäll, K. & Cerenius, L.: Curr. Opin. Immunol., 10, 23-8, (1998)

50) 芝哲夫: 化学大家 -391 吉田彦六郎. 和光純薬時報, 70, 2-4 (2003)

51) Yamazaki, H.I.: J. Insect Physiol. 15, 2203-2211 (1969)

52) Yamazaki, H. I.: Insect Biochem., 2, 431-444 (1972)

53) Yatsu, J. & Asano, T.: Insect Biochem. Mol. Biol., 39, 254-262 (2009)

54) Yoshida, H.: Chemistry of Lacquer (Urushi), Part 1. J. Chem. Soc., 43, 472-486

Abstract

Enzymes for melanin synthesis in insect cuticle

Tsunaki ASANO

Tokyo Metropolitan University, Department of Biological Sciences, Tokyo, 192-0397, Japan

Melanin is a brown-black pigment that is distributed to variety of terrestrial organisms. In the case of insects, melanin is synthesized not only for the formation of body color pattern but also in the situation where immune reactions occur. In insect cuticle, two types of enzymes, laccase and prophenoloxidase, are involved in melanin synthesis. They both are copper-containing enzyme and have a role to oxidize phenolic compounds such as L-dopa and dopamine. Laccase and prophenoloxidase belong to distinct family of proteins, three-domain multi-copper oxidase and type-III copper protein, respectively. It has been reported that the RNAi experiments of multiple insect species have shown that laccase is involved in brown-black pigmentation and cuticle hardening during the ecdysis process. In contrast, the knockdown of prophenoloxidase gene does not affect the process of cuticle pigmentation. In contrast to laccase, prophenoloxidase is thought to be responsible for melanin formation at wounded part of the cuticle and at around the invading parasites. This indicates that the melanin formation by the protein is important for defense reactions in insects. Here, this review describes about the systems for melanin synthesis in insects by focusing mainly on the two phenol oxidizing enzymes. It also discusses about the possible history of the systems for melanin synthesis during the evolution of insects.

Keywords: insect cuticle, phenol oxidase, laccase