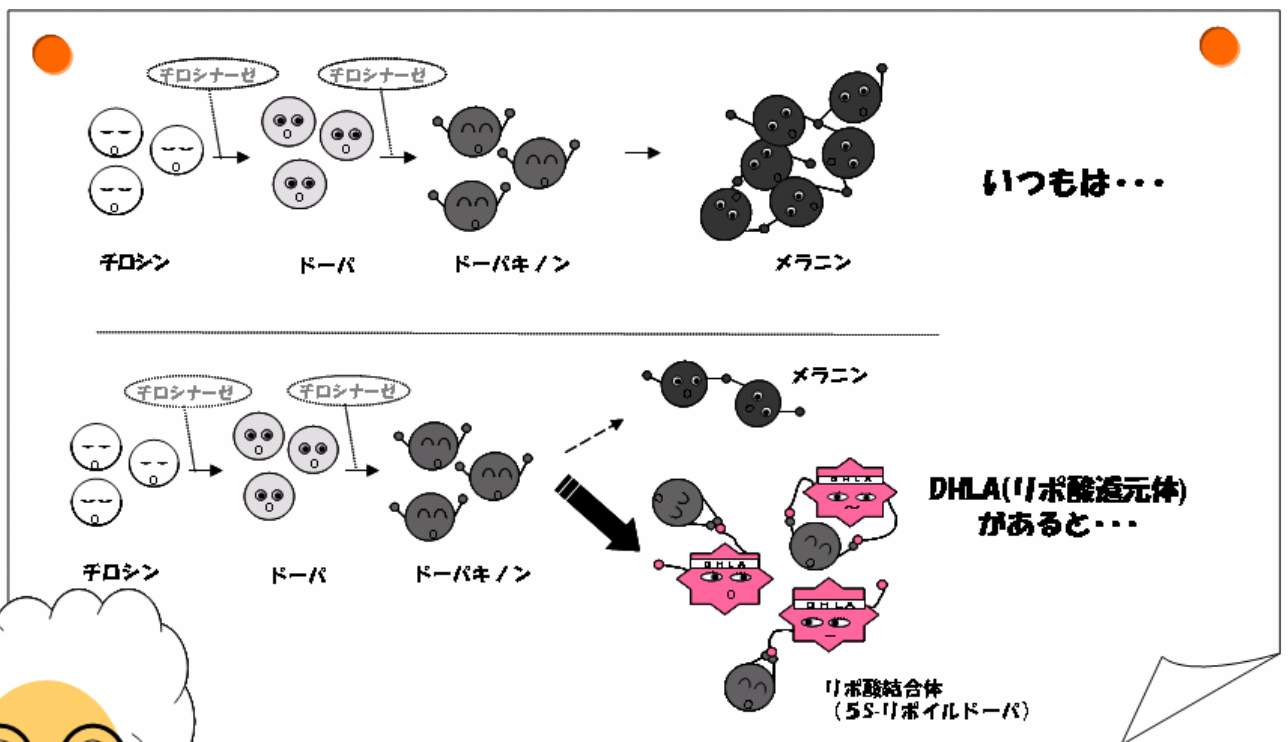


コスメ博士に聞くリポ酸の新発見！



通常、チロシンにチロシナーゼが働いてできたドーパキノンは、お互いに手をつないで重合してメラニンになるのじゃよ！
しか～しっ！
そこにDHLA(リポ酸還元体)があるとドーパキノンはDHLAと結合してしまうので、メラニンができにくくなるんじゃよ！新発見じゃな！！



Let's go~!!

詳しくは次のページへ！

掲載雑誌名

Biochemical and biophysical Research Communications (BBRC)

343号 15-20pp (2006)

*2006年2月28日よりオンラインで閲覧可能。

論文タイトル

Evidence for covalent lipoyl adduction with dopaquinone following tyrosinase-catalyzed oxidation

「リポ酸はメラニン前駆物質であるドーパキノンと化学的に結合することでチロシナーゼ反応を抑制する」

発表者

内藤健太郎*¹⁾、^{はたに}羽溪朋子¹⁾、岡田猛²⁾、手原隆夫¹⁾

1) 株式会社ディーエイチシー 第二研究所、〒261-0025 千葉県千葉市美浜区浜田 2-42

2) 株式会社タイキ、〒533-0031 大阪府大阪市東淀川区西淡路 6-3-41

*この著書の問い合わせ先

E-mail : knaito@dhc.co.jp (内藤 健太郎)

電話番号 : +81-43-275-4811

ファックス : +81-43-275-4831

論文和訳内容

要旨：

L-システインやグルタチオンといった含硫化合物は、チロシンやドーパ（以下、DOPA）がチロシナーゼ触媒を介して生成される DOPA キノンと化学的に反応し共有結合することがこれまでの知見として知られている。色素細胞における色素の制御や代謝において、これらの共有結合反応は重要な役割を果たす。本研究において、ジヒドロリポ酸（リポ酸の還元体；6,8-ジメルカプトオクタン酸 [以下、DHLA]）のチオール基と DOPA キノンが化学的に反応し、リポ酸付加体が形成されることを我々が初めて直接的に証明したことを報告する。チロシナーゼを介して生成した DOPA キノンと DHLA をインキュベートさせた反応溶液を HPLC-UV^{注)}(高速液体クロマトグラフィー)および LC-ESI⁻-MS^{注)}(質量分析装置)にて分析した結果、DHLA と DOPA が化学結合した化合物と推察される 3 種の化合物が生成していることが明らかとなった。これら主要生成物を HPLC で単離・精製し、FAB⁻-MS^{注)}(精密質量分析装置)、ESI⁻-MS/MS、および ¹H NMR^{注)}と 2D-COSY 測定^{注)}(共に核磁気共鳴装置による測定法)による解析を進めた結果、主要生成物の 1 つを 5-*S*-リポイル DOPA として同定した。結論として、DHLA は DOPA キノンとチオール基を介して反応することで結合することが明らかとなり、この反応は他の含硫化合物と同様に色素細胞にとって重要なチオール反応性の色素代謝に関与することが本研究により示唆された。

緒言：

メラニンは主に色素細胞中で合成され、皮膚、毛髪、脳、および眼の色素形成に寄与する[1,2]。哺乳類におけるメラニン合成過程は、色素生成反応に関与する複数の特異的酵素により制御される。チロシナーゼはメラニン形成における初期律速反応の触媒に重大な役割を果たす。メラニン形成には、チロシンの3,4-ジヒドロキシフェニルアラニン(DOPA)へのヒドロキシル化、DOPAのDOPAキノンへの酸化、および5,6-ジヒドロキシインドールのインドール-5,6-キノンへの酸化が含まれる[3,5]。チロシナーゼ関連タンパク質1(5,6-ジヒドロキシインドール-2-カルボン酸[以下、DHICA]単量体のメラニンへの酸化)やチロシナーゼ関連タンパク質2(DOPAクロムのDHICAへの転移を含む他のタンパク質が色素生成反応カスケードの下流点で作用するが[6,7]、これらの反応は実効性のある調節管理下で進行する[8]。

動物が保有するメラニンは主に2種類の基本形で構成されている。すなわち、DOPAクロム代謝物から構成されるユーメラニン、そしてシステニルDOPA代謝産物から構成されるフェオメラニンである[8]。この化学的および生物学的な事実は、いずれのメラニンもDOPAキノンを経る中間生成物とするヘテロ生体高分子であることを示している。システインおよび(もしくは)グルタチオン(以下、GSH)といったチオール基を有した含硫化合物は、環化、脱炭酸、および重合化を含む一連の自発的反応に比べ、より迅速な反応速度でDOPAキノンと結合することが知られており、この反応はRaper-Mason経路として知られている[9-12]。色素細胞内において含硫化合物の存在割合は、合成されるメラニンがユーメラニンかフェオメラニンか選択される経路分岐点において鍵の役割を担っている。すなわち含硫化合物が色素細胞内に存在する場合、含硫化合物が速やかにDOPAキノンと反応する。この共有結合性の反応は、フェオメラニン合成に必要とされるシステニルDOPAの産生に不可欠であり、2種類のメラニンの組成の制御に重要な役割を果たす。

リポ酸(以下、LA)は、還元体であるジヒドロリポ酸(DHLA)を含めミトコンドリアの β -ケト酸デヒドロゲナーゼの補因子としてよく知られており、代謝において基本的な役割を果たす[13,14]。実験研究および臨床試験から、LAも内在性のチオール抗酸化剤として作用し、細胞の酸化還元状態を変化させ、チオールや他の抗酸化剤と相互作用をするという高い潜在能力が明らかにされた[15,16]。興味深いことに、神経科学的な知見においてSpencer等は*in vitro*における試験報告において、非酵素的に酸化されたカテコールアミン、すなわちDOPAの o -キノンやドーパミン(以下、DA)がシステインやGSHと化学的に反応するのを還元体であるDHLAが阻害することを明らかにしており、一方で酸化体であるLAはこの反応を阻害しなかったことを報告している[17]。Spencer等の報告は、この阻害の結果はDHLAとカテコールアミンとが化学的に結合した付加

体が形成されたことによる結果であるという可能性を提起している。しかしながら、LA や DHLA のチオール基の DOPA キノンに対する化学反応性は、直接的証拠がないため、解明が進んでいない。本研究では、UV 検出機能を備えた HPLC 及び Q1-MS の LC/ESI-MS を用いて、DHHLA がチロシナーゼの存在下で DOPA と効率よく反応し、リポ酸付加体を形成することを明らかにし、一方で LA ではこの付加反応が起きなかったことを同時に明らかにした。本研究は、それら付加体の主要生成物の 1 つである 5-*S*-リポイル DOPA を新規のチオール生成物の 1 つとして詳細に解析したものである。

材料と方法 (Materials and method) ;

材料

L-DOPA、DHHLA、マッシュルーム由来チロシナーゼ(EC 1.14.18.1)は Sigma Chemical 社から購入した。LA はナカライテスク株式会社から購入した。その他の化学品は、全て市販されている製品を使用した。

分光法

^1H NMR スペクトルは JEOL JNM-AL 400 NMR spectrometer system (日本電子株式会社製)を用いて測定した。高速原子衝突質量分析(FAB-MS)は、JEOL JMS-SX102 mass spectrometer (日本電子株式会社製)を用いて測定した。UV-可視スペクトルは、Model MD-2010 plus multi UV detector (日本分子株式会社製)を用いて測定した。

DOPA クロムの生成、及び LA 及び DHHLA の作用

DOPA (2.5mM)及びチロシナーゼ(2.5U) 1 を 10mM リン酸緩衝液(pH 6.5)に溶解したものを反応液とした。反応液を 37 で保温し、DOPA クロムの形成を 1420 ARVO シリーズ マルチラベルカウンター (パーキンエルマー・ジャパン)を用いて測定した。LA 及び DHHLA の作用は、チロシナーゼ添加前に DHHLA または LA (500 μM) を反応液に添加することで試験した。DOPA クロム量は、475nm ($= 3700\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)の吸光度から推定した。反応液の二回目の分析試験には、以下に記載する HPLC 方法 II を用いて行った。

HPLC

HPLC は、Dual Model PU-2089 (10mL ポンプヘッド)付グラディエントシステム(日本分光株式会社製)、5.0mL サンプルループ付 Model 7725i (Rheodyne 社製)、およびマルチ波長 UV 検出器付 Model MD-2010(日本分光株式会社製)を用いて行った。移動相溶媒には、脱イオン水に濃縮ギ酸(0.1 %)を添加した溶媒 A と HPLC グレードアセトニトリルギ酸(0.1 %)を添加した溶媒 B の 2 種類を用いた。単離用 HPLC 方法 I では、逆相カラム(Develosil C₁₈, 5 μm , 20x250 mm、野村化学社製)を使用し、0-30 分 : 溶媒 A 100 % から溶媒 B 75 % (liner gradient)、30 - 40 分 : 溶媒 B 100 % (Liner gradient) のグラディエント条件、流速 1.0mL/min⁻¹ で HPLC を行った。

LC/ESI-MS

液体クロマトグラフィー/エレクトロスプレーイオン化質量分析 (LC/ESI-MS) は、ESI イオン源を装備した API2000 三連四重極質量分析(Applied Biosystems 社製)を陰イオンモードにして行った。ESI イオン源の加熱キャピラリは 45 で使用した。シースガス、噴霧ガス、および補助ガスとして窒素を用い、それぞれ 40、60、および 15 任意単位(AU)で使

用した。スプレー電圧は 4.5kV とした。

試料 (10 μ L) をオンライン LC/ESI-MS で分析し、全スキャン ESI スペクトルを得た。オンライン LC 分離は、バイナリーグラディエントポンプ、真空脱気装置、自動サンプラー、およびダイオードアレイ検出器 (DAD) を含む Model 1100 HPLC シリーズ (Agilent Technologies 社製) を用い、上記の分析用 HPLC 方法 II で示した条件で行った。LC/ESI-MS は、Q1 陰イオンスキャンモードで用いた。Develosil C₁₈、5 μ M、2.0 \times 250mm (野村化学株式会社製) カラムを使用し、流速は、150 μ L/min⁻¹ とした。質量分析装置内での汚染を防ぐため、切り替えバルブを使用し、その後、リポ酸-DOPA 付加体生成物のピーク溶出時間に相当する 18-25 分の溶出を分析装置内に誘導した。

付加体の娘イオンスペクトルを得ることを目的として、HPLC で精製された付加体を 50% アセトニトリル、0.1% ギ酸中に溶解し、10 μ L 試料を質量分析計に直接注入した。MS/MS 衝突エネルギーは 34V とした。

リポ酸-DOPA 付加体の調整と精製

DHLA (5mM) および DOPA (2.5mM) を 10mM リン酸緩衝液 (pH 6.5) 1L 中に溶解した。溶液の pH を 6.5 に再調整した後にチロシナーゼ (25U) を添加した。37 $^{\circ}$ C で 2 時間保温した。HPLC 分析でリポ酸-DOPA 付加体の形成を確認した後に、4M 過塩素酸溶液を用いて pH 1.0 に調節し、酵素反応を停止した。その後、反応液を氷水槽にいれ、溶液の pH が 6.5 に達するまで 5M 水酸化カリウム溶液を添加し、過塩素酸塩を沈殿させた。溶液を遠心分離した後、その上清を凍結乾燥した。乾燥粗生成物をエタノールに溶解し、HPLC 方法 I を用いて精製した。生成物に対するクロマトグラフィーのピーク下で分取した溶液を -80 $^{\circ}$ C で迅速に凍結した後、凍結乾燥し、固体乾燥生成物を得た。生成物の構造を示すスペクトルデータを以下に示す。生成物の ¹H NMR スペクトルで検出されたプロトン共鳴を DOPA と DHLA のスペクトル比較に基づいて帰属し、2次元相関分光法 (2D-COSY) により確認した。

5-S-リポイル DOPA

5-S-リポイル DOPA の ¹H NMR (400MHz、ギ酸-d₂ (1%) を含む DMSO-d₆) スペクトルは、以下の通りに帰属した。すなわち、カテコールアミン 部のシグナルは 6.67(d, 1H, *J*=1.7 Hz)、6.61(d, 1H, *J*=1.7 Hz)、4.01(dd, 1H, *J*=12.4, 6.1 Hz)、3.03(t, 1H, *J*=4.6 Hz)、2.95(m, 1H)、およびリポ酸 部については 3.05(s, 1H)、2.58(m, 2H)、2.24(m, 3H)、1.91(m, 1H)、1.63~1.82(m, 2H)、1.52(m, 5H) である。FAB-MS (担体グリセロール) では、C₁₇H₂₄NO₆S₂[M-H]⁻ についての *m/z* 計算値が 402.10、観測値は 402.11 であった。UV スペクトルから、 λ_{\max} が 292nm 及び肩が約 256nm の分離可能なピークが検出された。

結果及び考察：

含硫化合物であるシテインや GSH は DOPA キノンと求核反応し、その結果チオール結合化合物が形成されることが知られている。本研究では、DHLA のチオール基が DOPA キノンと反応し、リボ酸と DOPA とが共有結合した付加体を形成することを示した。

予備実験において、吸光度 475nm の分光学的モニターにより、DOPA クロム形成に及ぼす DHLA の作用を調べた。図 1 に示すように、DHLA は DOPA クロムの形成を有意に阻害したが、LA は阻害しなかった。興味深いことに、同様の濃度のシステインでも阻害作用が認められたが、DHLA の作用が永続的であったのに対し、長期保温した反応液でのシステインの阻害効果は、ほとんど認められなかった(データは示さない)。

チロシナーゼ存在下での DHLA と DOPA の反応を調べるために、UV 検出器付 HPLC で反応混合物をモニターした。図 2A に示した通り、DOPA と DHLA との酵素反応により、3つの未知のピークが現れた。このピークを HPLC フォトダイオードアレイ・システムで調べた結果、 λ_{\max} が 292nm 及び約 256nm 付近に吸光帯を持つ分離可能なピークであった。Q1-MS の LC/ESI⁻-MS 測定法(分子量 100 ~ 500)を用いて同様のクロマトグラフィー条件下で反応混合物を分析したところ、DOPA-DHLA 結合で予想されるピーク I、II、および III が検出された(図 2B~D)。さらに、これらのピークは DHLA またはチロシナーゼ触媒と DOPA のみの反応液からは検出されず、チロシナーゼを添加しなかった反応液からもほとんど検出されなかった(データは示さない)。チロシナーゼ存在下において、DHLA とともに DOPA を反応させた反応液から得られるピーク I/ピーク II/ピーク III のピーク比は、4:1:80 であり、この比は 260nm で測定した HPLC ピーク面積に基づいて行った。

ピーク III の生成量は、DHLA との反応時間とともに増加していった一方で、それとは対照的に DHLA を添加しない場合、または LA を添加した場合の反応は、検出不可能なレベルだった(図 3)。同スペクトルを示したその他の二つのピークは、ピーク III と同様に反応時間とともに増加し(データは示さない)、その経過は DOPA クロム形成の減少と非常に良い相関を示した。これらの結果から、我々は、これら 3つの生成物は DOPA キノンが結合した化合物であると推察すると同時に、DHLA が DOPA キノンに結合することで反応液中の DOPA キノンを消耗させることにより、DOPA クロムの形成が抑えられたと考えた。なぜなら、L-システインや GSH といった含硫化合物と DOPA の化学結合は、それらのチオール基の DOPA キノンに対する求核攻撃によって引き起こされるからである[9,10]。

これらの付加体のピークは、HPLC 分析条件の溶液に対し高い溶解性を示した。特にピーク III は HPLC で単離することが可能な程、充分量が形成された。ピーク III の

HPLC フラクションを回収し、再精製せずに構造解析へと進めた。DOPA と DHLA 反応液から単離した付加体は、FAB⁻-MS、ESI⁻-MS、ESI⁻-MS/MS、および ¹H NMR と 2D-COSY で解析することで構造を決定した。

ピーク III の FAB⁻-MS による分子量解析の結果、ピーク III の分子量は DOPA キノン結合生成物相当する分子量と完全に一致した(材料と方法の項参照)。MS/MS 解析において、 $m/z=150.1$ 、 167.1 、 183.0 、 210.9 および 227.9 の 5 つの生成イオンが検出された(図 4A)。最も優勢な生成イオンは $m/z=227.9$ であり、S 末端が修飾された LA のチオール-炭素間の結合が開裂して形成されたチオール-DOPA イオンと解釈される(図 4B)。ピーク III の ¹H NMR 解析では、チオール部分のシグナルについては DOPA や DHLA のスペクトルと比較して帰属し、さらに 2D-COSY で解析を進めた結果、芳香環領域プロトン間において、メタ位の共鳴に相当する 1.7Hz のカップリングが確認された。これらの化学分析に基づいて、我々は、ピーク III を 5-*S*-リポイル-DOPA と同定した。一方、LC-ESI⁻-MS/MS 測定において、ピーク I および II のフラグメンテーションは、5-*S*-リポイル-DOPA のパターンと一致しており、 m/z 402.2[M-H]⁻ 227.9、167.1 及び 150.1) このことからピーク I およびピーク II は DHLA チオール基の DOPA キノンの 2 位または 6 位への付加により生じた異性体であると推察された(データは示さない)。

これらカテコール-チオール結合は、カテコールアミン α -キノンと DHLA 間の非酵素的な反応から形成されると考えられる。つまり、この反応におけるチロシナーゼの役割は、DOPA を DOPA キノンに酸化することだけであることから(反応式 1)、これら共有結合反応は、実際には酵素的条件と非酵素的条件の両方で生じると推察される。神経色素形成において、非酵素的な自動酸化反応により細胞質 DA から DA キノン、さらにその後、DA キノンは環化し、酸化的に重合することで神経性メラニンが形成される[20,21]。多数の研究者が、L-システインおよび GSH の DA キノンの捕捉効果は、不溶性な黒色メラニンポリマー形成へつながら DA の酸化を転換または阻害することであり、その結果として可溶性なシステニルまたはグルタチオニル結合 DA が形成されることを言及している[22,23]。Spemcer 等は、一般的な神経系関連の酸化ストレスモデルを用いて、DHLA 及び LA の試験をしており、DHLA の場合、O₂⁻ラジカル生成モデルにおいて、5-*S*-システニル-及び 5-*S*-グルタチオニル-カテコールアミン付加体の形成を効果的に阻害するが、LA にはこの阻害作用がないことを明らかにしており、DHLA がカテコールアミン α -キノン種に関して、L-システインまたは GSH の各々一方と競合することにより、これらの阻害作用が達成されることを示唆している[17]。

本研究で我々は、チロシナーゼ存在下で DHLA が DOPA クロムの形成を有意に阻害することを示したと同時に、LA においては、これらを阻害しないことを示した。また、

Q1-MS の LC/ESI-MS 測定を用いて、チロシナーゼ存在下で DHLA が効率よく DOPA と反応し、リポ酸付加体を形成することを明らかにした。我々は、さらにその反応の主要付加体の 1 つとして 5-*S*-リポイル-DOPA を新規なチオール結合生成物として構造を明らかにした。我々は今回の研究により明らかとなったこの結合反応がユーマニン生成に至る DOPA クロムの形成に阻害作用を及ぼすことにより、メラニンの量及び質の制御にも寄与するのかもしれないと考えている。

現在、肌を効果的に美白化することについて世界のさまざまな地域において文化的に関心が寄せられている。このことは DHLA の持つ肌の黒化に対する抑制効果について、そして実用の高い製品開発の応用について、更なる研究と追求が求められる。

図1

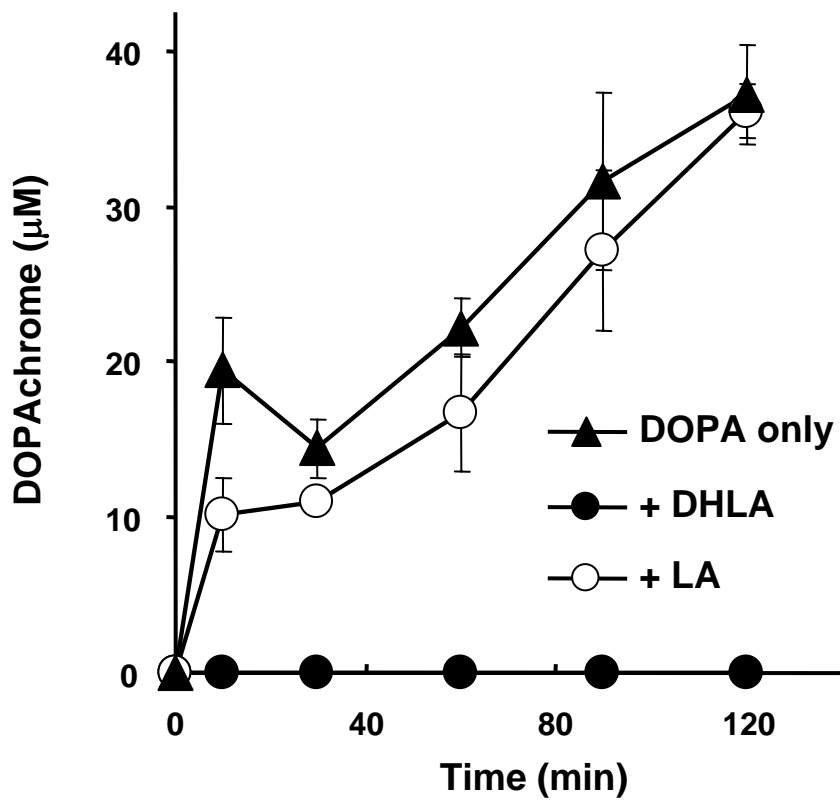


図1. チロシナーゼ存在下のDOPAクロムの形成、およびDHHLAやLAのそれらに対する抑制作用。反応混合物は、10mM リン酸緩衝液(pH 6.5)中にDOPA (2.5mM)およびチロシナーゼ(2.5 U)を含んでいる。混合物を37 °Cでインキュベーションし、1420 ARVOシリーズマルチラベルカウンターを用いてDOPAクロムの形成を測定した。LA及びDHHLAの作用は、チロシナーゼ添加前に反応混合物にDHHLAまたはLA(500mM)を添加して調べた。

図2

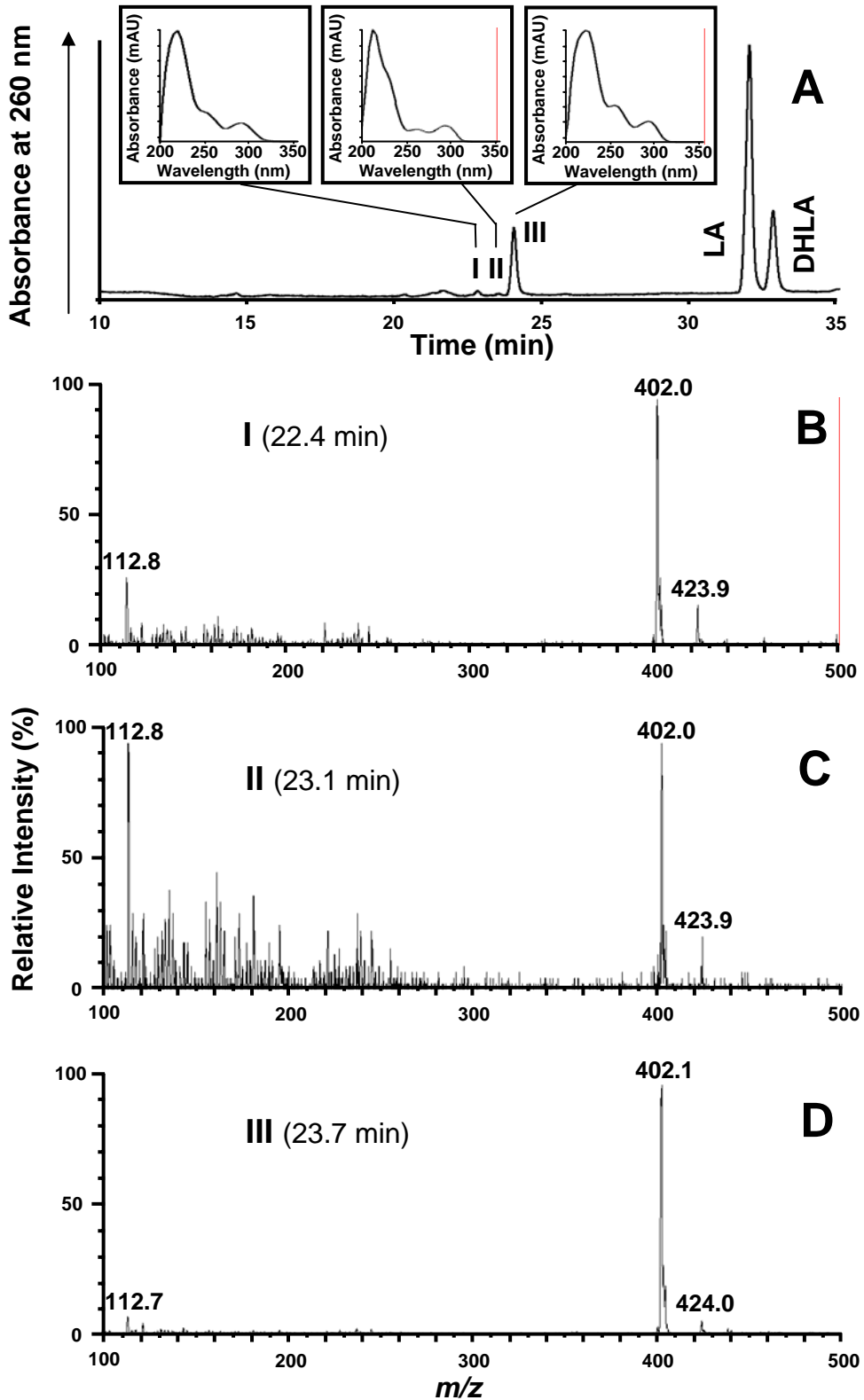


図2. チロシナーゼ触媒酸化後にDOPAとDHLAを加えてインキュベーションした反応混合物のHPLC測定結果(A)。ピークI、II、およびIIIのUVスペクトル(A中の差込図)。同様のクロマトグラフィー条件下での m/z 100 ~ 500までのQ1-MS測定におけるピークI (B)、II (C)、およびIII (D)のLC-ESI-MS/MS測定結果。

図3

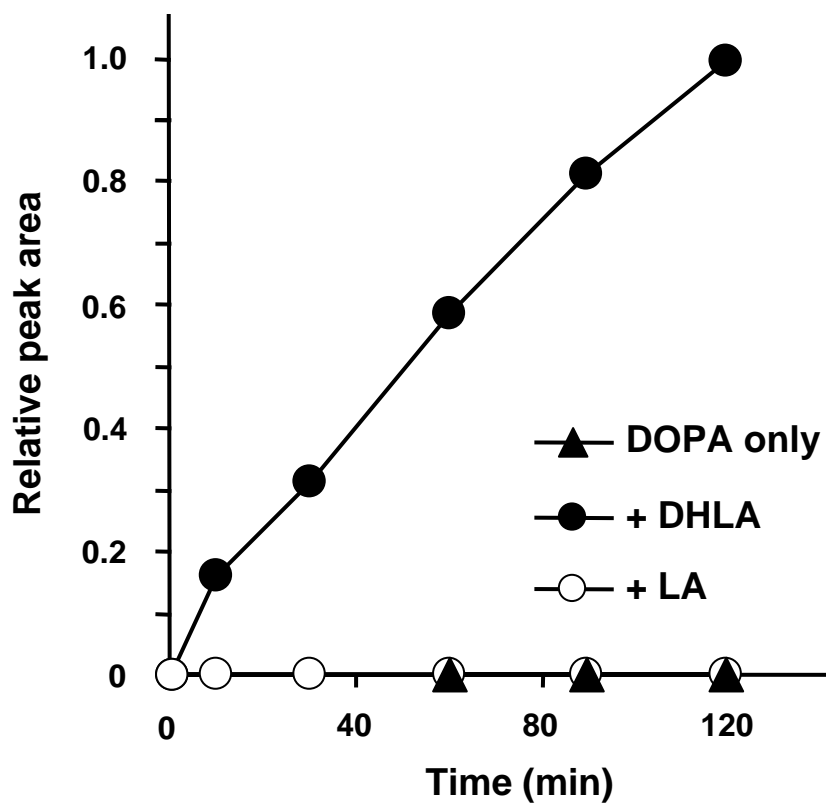


図3. チロシナーゼ存在下のDHLAまたはLAとの反応混合物中のピークIIIの相対量。HPLC方法IIを用いて測定したピークの面積を採用し、相対生成物収量を推定した。

図4

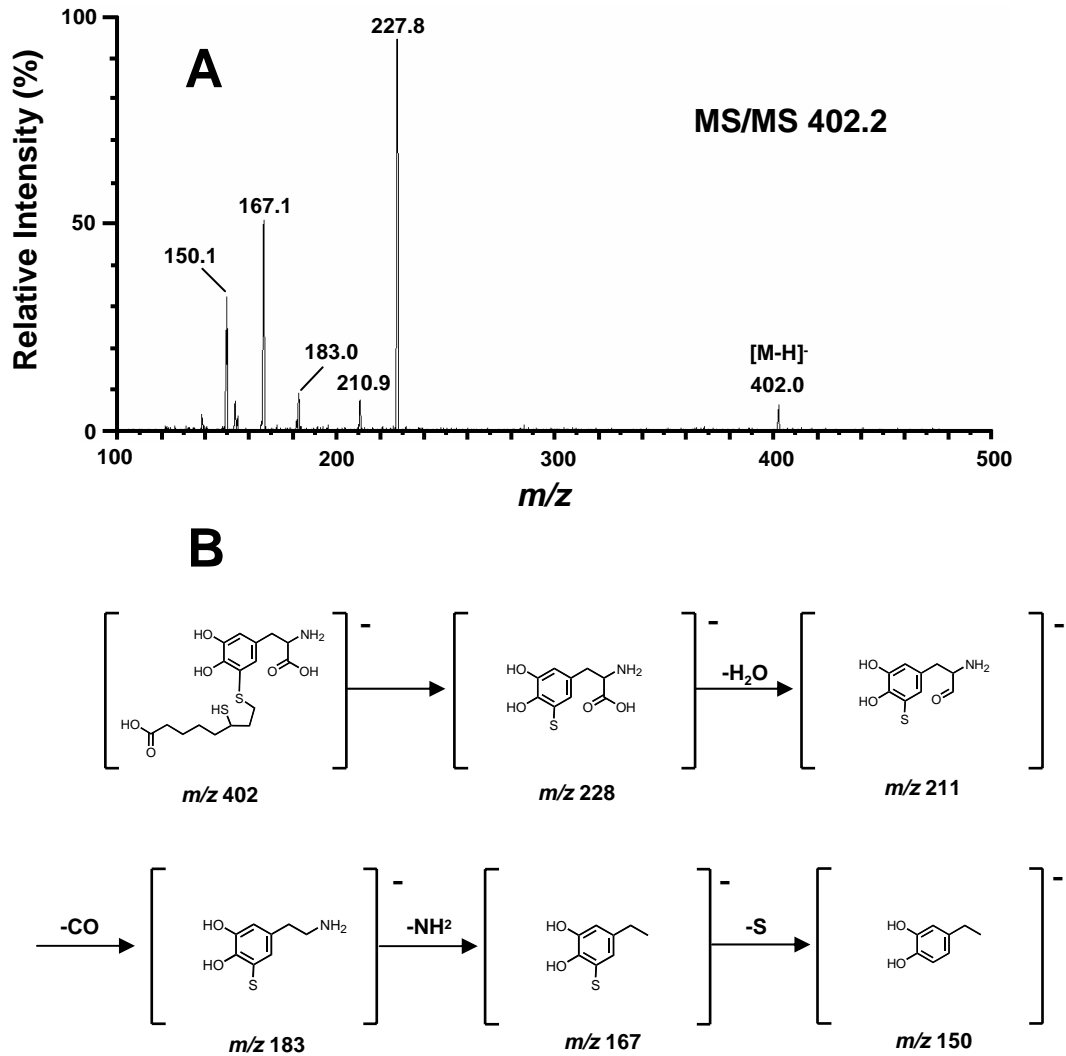
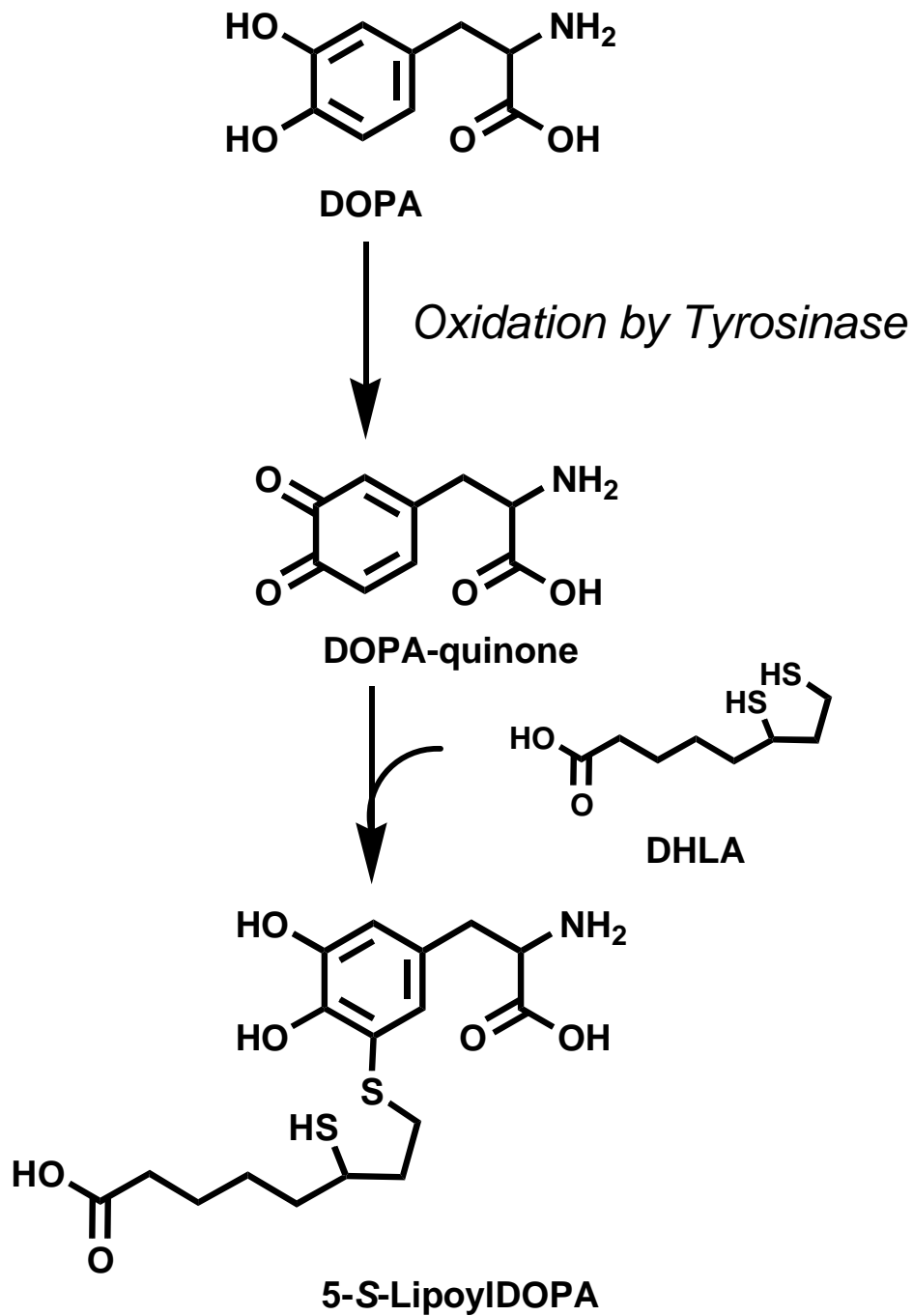


図4. ピークIIIの m/z 402 $[M-H]^-$ 分子イオンについての衝撃誘起MS/MSスペクトル(ESI) (A). 提案したピークIIIのフラグメンテーション経路 (B).

反応式1



反応式1. 5-S-リポイル-DOPAの形成