

解 説
読 物 企 画

ピロロキノリンキノン (PQQ) とキノプロテイン — PQQ のビタミン説について —

外 山 博 英*

山口大学農学部生物機能科学科

(平成 17 年 6 月 6 日受理)

Keywords: pyrroloquinoline quinone, PQQ, quinoprotein, vitamin.

は じ め に

2003 年はピロロキノリンキノン (PQQ, 図 1) が再び注目を浴びる年となった。理化学研究所の加藤, 笠原により英国 *Nature* 誌に, PQQ が哺乳類のビタミンである可能性があると報告されたためである¹⁾。

PQQ は 1979 年に化学構造が決定され, 1980 年代には PQQ を含有する酵素の探索が盛んに行われた。その中で, 哺乳類を含む様々な生物種由来のいくつかの酵素が共有結合型の PQQ を含むと報告された。その後それらは PQQ ではなく, 酵素タンパク質部分の芳香族アミノ酸残基が誘導体化された新規キノン補酵素 (ビルドインコファクター) であることが明らかにされた。そのため 1990 年代以降は, PQQ よりもビルトインコファクターに注目が集まっていた。そうした中で, 2003 年の理研グループの発表はマスコミに

大きく取り上げられ, 「半世紀ぶりの新ビタミン発見」「14 番目のビタミン発見」と報道された。しかし, 2005 年 2 月には, この *Nature* 論文に対する反対意見の論文が同雑誌の電子版に掲載され^{2,3)}, 事態は混沌としている。

この解説では, PQQ 研究の経過と PQQ の生理学的作用について述べ, さらに PQQ を補酵素として含有する酵素, キノプロテイン, の構造的特徴を解説する。そして, 理研グループのビタミン説論文について, 何が現在も論点となっているのかを明らかにしたい。なお, 敬称は略させていただく。

1. ピロロキノリンキノンの発見

上に簡単に述べた通りではあるが, PQQ の発見とその後のビルトインコファクターの発見の経緯と歴史については, 足立および谷澤の総説^{4,5)}に詳しく記されているのでご覧いただきたい。PQQ について簡単にまとめれば, ノルウェーの Hauge やイギリスの Anthony と Zatman らが PQQ の生化学的発見者 (1960 年代), オランダの Duine とアメリカの Forrest と Salisbury らが化学構造の発見者 (1979 年) ということになる。彼らは, メタノールを資化して生育する微生物 (メチロトロフ) のメタノール脱水素酵素 (MDH) から補酵素を抽出し構造決定した。それに対して, 山口大学の 鈴山・足立らは, 酢酸菌の細胞膜に存在して酸化発酵に重要な結合型脱水素酵素 (アルコール脱水素酵素やグルコース脱水素酵素など) にこの化合物が補酵素として含まれることを見出し (1980 年), その後の PQQ を含む多くのキノプロテインの発見へと先鞭をつけた。さらに彼らは, PQQ がいくつかの微生物で生育促進効果を示すことも発見した (1984 年)。ねずみでの PQQ 要求性を発見したのはアメリカの Rucker たちで, 1989 年に発表している。

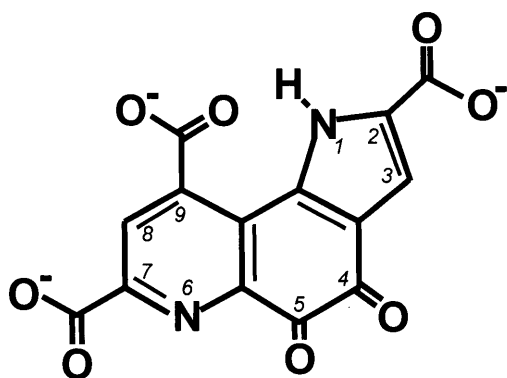


図 1. PQQ の構造.

* 〒 753-8515 山口市吉田 1677-1

E-mail: hiroto@yamaguchi-u.ac.jp

© Pesticide Science Society of Japan

2. PQQ の生理学的作用について

PQQ はキノプロテインの補欠分子族として、その酵素活性発現に重要であるが、それとは別に PQQ の栄養学的または薬理学的作用について調べられており、多くの論文がある。Rucker らによるすぐれた総説⁶⁾があるので詳しくはこちらをご覧ください。

マウスやラットでの実験では上述のように欠乏症が見られる。すなわち、化学的に限定された PQQ 欠乏食餌を与えられたマウスでは、成長や生殖能力や免疫機能などが低下し、機能の不完全なミトコンドリアの割合が上昇するが、PQQ を添加することでそれらの症状の改善が見られた。マウスで見られたこのような欠乏症は、現在までヒトでは知られていない。ヒトの培養繊維芽細胞に対する生育促進効果が観察され、神経ニューロンの伸長作用も報告されている。

多くの酸化還元活性を持つ物質と同様に、PQQ は抗酸化作用を示す⁶⁾。過酸化水素やヒドロキシラジカル、スーパーオキシドを消去する活性が報告されているが、逆にそれらフリーラジカルを生成する能力もある。毒性に関しては、ラットへの大量の投与で腎臓への毒性および酸化的損傷が起こること、*in vitro* では DNA 損傷を引き起こすことも報告されているが、いずれも μM 以上の高濃度であり、上記の生理学的な応答は nM レベルの濃度である。

微生物に対する生育促進作用には 2 通りの作用が報告されている⁴⁾。1 つはビタミン様の作用で、菌体収量が添加した PQQ 量に依存して増加する。ポリビニルアルコール分解菌でその例が知られていて、この菌はアポ型の脱水素酵素を生産していて、培地中に添加した PQQ の量に依存して活性型脱水素酵素が生産され、その活性型酵素量に応じて最終菌体収量が決定される。もう 1 つは酢酸菌で知られているホルモン様作用である。酢酸菌は合成培地で生育させると長い誘導期の後に生育を始める。そこに PQQ を添加しておく、最終的な菌体収量は変わらないが停滞期が短くなり生育が早まる。この作用は、PQQ がアミノ酸と結合して補酵素作用を消失した化合物 (PQQ-adduct) でも見られる。この作用の生化学的なメカニズムはまだ明らかになっていない。

3. キノプロテインの構造

広義な意味でのキノプロテインとは、PQQ の様なキノン部分 (図 1 の 4 位と 5 位の様な) を有する分子を補欠分子族として持つ酵素の総称である。PQQ 以外のそれらの補欠分子族は、酵素タンパク質部分の芳香族アミノ酸残基が誘導体化されたビルドインコファクターである⁵⁾。ここでは便宜的に PQQ を補欠分子族とするものだけをキノプロテインと呼ぶことにする。現在までに知られているキノプロテ

インはすべて脱水素酵素であり、グラム陰性菌のペリプラズムに存在している。最近になって、グラム陽性菌 *Streptomyces* でも PQQ を生合成している例⁷⁾が見出され、PQQ が抗生物質の生合成に関与していることが示されている。しかしこの菌株のキノプロテインはまだ見つかっていない。キノプロテインは基質の酸化を行うとともに、細胞表層で呼吸鎖と連結して働いてエネルギー生成 (膜を介したプロトン濃度勾配の形成とその駆動力を使った ATP 合成) に関わっている。ペリプラズムに可溶性で存在するものと、細胞質膜のペリプラズム側表層に結合しているもの、さらに PQQ 以外に補欠分子族としてヘム c を持つキノヘモプロテインと持たないキノプロテインに分類することも出来る⁸⁾。

これらのキノプロテインのアミノ酸配列が現在までに数多く報告されてきている。その配列中に特徴的な繰り返し配列 (AxDxxxGK(E)xxW, Trp-モチーフ) があることが明らかにされた。後述の X 線結晶構造解析とあわせて、この「繰り返し配列」がキノプロテインの構造上の特徴であると考えられてきた。

X 線結晶構造解析で立体構造が明らかにされているキノプロテインは、現在までに 7 つある。いずれも、4 つの β シートが少しねじれた逆平行シートを形成したプロペラの羽のような構造 (W-blade) が集まって樽状になっている (図 2)。この構造をスーパーバレル構造と呼んでいる。W-blade は 8 つ集合しているものが多いが、可溶性キノプロテイン・グルコース脱水素酵素 (sGDH) には 6 つしかなく、「繰り返し配列」も明確ではなく、他のキノプロテインとは少し異なる構造を持っている。ちなみに、sGDH は血糖値測定用の診断用酵素として現在広く利用されている。

私たちの研究室とワシントン大学のグループとの共同研究で立体構造を明らかにした、可溶性キノヘモプロテイン・アルコール脱水素酵素 (ADH IIB) を例として、この酵素の PQQ 結合ドメインのみの構造を図 2 に模式的に示した。PQQ はスーパーバレル構造の中央に乗っていて、その上には 4 つのループ構造が覆いかぶさっている (図中の太線)。ADH IIB の場合は、そのループの上にさらにシトクロム c ドメインが乗っている。PQQ の結合や酵素反応に重要なアミノ酸残基を図中に示した。「繰り返し配列」は W-blade の外側の β シート部分 (図 2 の点線で囲んだ部分) に相当し、PQQ 結合に直接関わるアミノ酸残基 (図中に太字で示した) は含んでいない。こうした立体構造上の特徴は、sGDH 以外の現在までに立体構造が明らかになっているキノプロテインに共通して見られる。また、構造が明らかでないキノプロテインでも、図中に示した PQQ 結合に関与しているアミノ酸残基は比較的良好に保存されている。

4. mU26 タンパク質はキノプロテインか?

冒頭に示した理研グループが発表した論文は、マウスの

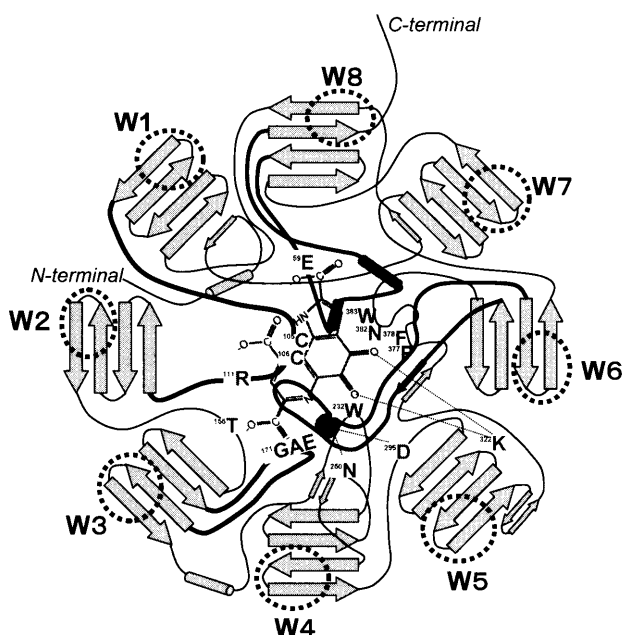


図2. キノプロテインの立体構造とPQQ結合に関わるアミノ酸残基. キノヘモプロテイン・アルコール脱水素酵素, ADH IIB, を例として模式的に示した. β シートを矢印, α ヘリックスを円筒, カルシウムイオンを灰色の丸で示した. PQQやカルシウムイオンとの結合に直接関与しているアミノ酸残基を番号とともに示した. ^{250}N , ^{295}D , ^{322}K は図中でカルシウムイオンやPQQから離れているが, 実際の立体構造中では接近しているので, その結合の様子を点線で示した. 「繰り返し配列」に相当する部分を点線の丸で示した(W1~W8).

ゲノム配列中に見つかる, 特徴的な「繰り返し配列」を持つ遺伝子産物(mU26)がPQQを補欠分子族とする酵素で, それはリジン分解代謝に関わる酵素である, というのが骨子である. そして, 今年発表された反論の論文は, 「繰り返し配列」が存在することからキノプロテインと予想しているが論拠に乏しい²⁾, リジン代謝の結果生じる2-Amino adipic acid (AAA)の変動は, PQQ添加または無添加で有意とは言えない³⁾, と述べている. またそれらに対する理研グループの反論も同時に掲載されている⁹⁾.

まずアミノ酸配列について詳しく見ていく. 図3Aには, mU26のアミノ酸配列の特徴を模式的に示した. mU26はC末端部分のPQQ結合ドメインと目されている部分(黒い部分)に特徴的な「繰り返し配列」が見られる. 実はこの「繰り返し配列」であるが, アミノ酸配列の相同性検索をすると, キノプロテイン以外に「WD40-repeat」というモチーフを持つタンパク質が多数現れてくる. 「WD40-repeat」を持つタンパク質には共通した機能は見られないが, 上述したスーパーバレル構造を持つことが予想されている¹⁰⁾. この「繰り返し配列」を持つタンパク質がキノプロテインであるとは限らないと言える.

このドメインの他にmU26には, adenylationドメインと4'-ホスホパンテテインが結合するthiolationドメインがアミノ酸配列の相同性から予測されている(灰色の部分). それらは, 酵母の2-Amino adipic acid (AAA) reductase (Lys2)のアミノ酸配列中にも見出されていて, 理研グループはLys2とmU26の相同性から, mU26タンパク質がリジン代謝に関連すると推定したわけである¹⁾. Lys2は, リジン生

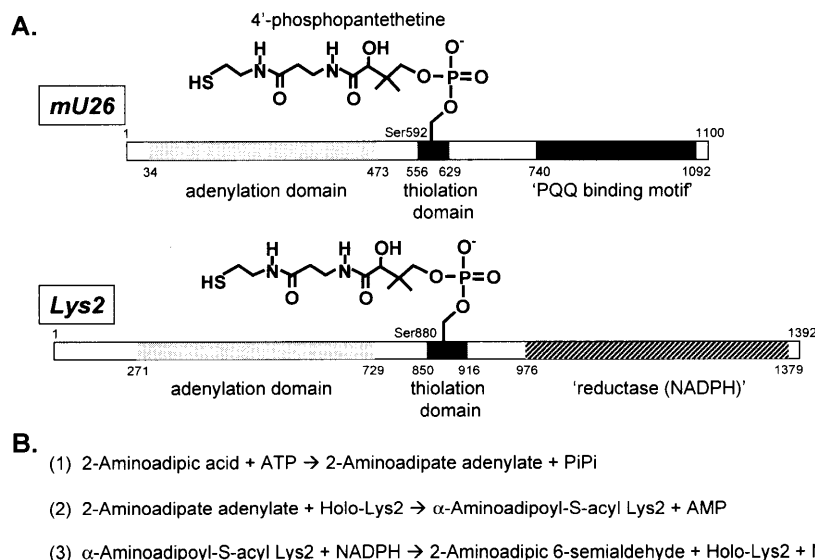


図3. A. mU26とLys2の構造の比較. 薄い灰色はadenylationドメイン, 濃い灰色は4'-phosphopantothetic acid結合ドメイン, 斜線はNADPH結合ドメイン, 黒色はmU26の推定されたPQQ結合ドメインを示す. 4'-phosphopantothetic acidはLys2のSer880に結合していることが示されていて, mU26ではSer592に結合すると推定される. B. Lys2の酵素反応. 1~3で示した3段階で, AASをAAAへと還元する.

合成過程で AAA から 2-Aminoadipic 6-semialdehyde (AAS) を生じる酵素反応を触媒することが示されていて, adenylation ドメインと thiolation ドメインが生化学的に決定されている¹¹⁾. Lys2 の反応機構は図 3B の様に考えられている. すなわち, (1) adenylation ドメインが AAA を ATP 依存的にアデニル化し, (2) Lys2 に共有結合している 4'-ホスホパンテテインへ転移しチオエステル結合させ, (3) でできた酵素基質複合体 (α -Aminoadipoyl-S-acyl Lys2) を NADPH で還元して AAS と NADP を生じる. Lys2 へ 4'-ホスホパンテテインを結合させるにはコエンザイム A と別の酵素である Lys5 が必要である. つまり, 上記のような複雑な系を利用して, AAA から AAS を生産するために ATP, コエンザイム A, NADPH を消費している. 生理学的には, リジン分解反応ではなく, リジン生合成系で働く酵素である. また, Lys2 が AAS を AAA へ酸化する反応を触媒できるのか明らかではないが, その場合図 3B の (3) の逆反応のみでよいと考えられ, adenylation ドメインは必要ないように思われる.

図 4 には, 現在までに最もよく構造解析が成されているキノプロテイン・メタノール脱水素酵素 (MDH) と上述の ADH IIB の PQQ ドメイン, および mU26 の PQQ 結合ドメインと予想される部分について, 「繰り返し配列」を考慮してアミノ酸配列をアラインメントした結果を載せている. 図 2 に示した β シート構造をアラインメントの下に示した. 「繰り返し配列」は四角で囲んだ W1~W8 に相当する. mU26 の繰り返し配列を含む領域は, キノプロテインの PQQ 結合ドメインに比して, 明らかに短い (560–590 残基に対して約 370 残基). キノプロテインはスーパーパレル構造の内部に PQQ を結合しているが, さらにいくつかのループ構造がそれに覆いかぶさるように伸びている (図 2). このループ構造のいくつかは酵素の基質特異性を決定するのに重要な働きをするアミノ酸残基を含んでいるとともに, PQQ を固定するフタになっている. mU26 はスーパーパレル構造をとることはできても, このようなループ構造を持つにはアミノ酸残基が足りない. さらに, PQQ の結合に直接関わるアミノ酸残基がキノプロテインでは同定されているが (図 2), それらの多くは mU26 では保存されていない (図 4, 太字で示した). こうした配列上の特徴を見ても, PQQ 結合することは難しそうに見受けられる. もちろん, 別のアミノ酸残基が結合に関わるか, または N-末端側の adenylation ドメイン及び thiolation 結合ドメインに PQQ 結合に関わる残基が存在することは否定できない. しかしながらいずれにしても, このタンパク質が PQQ を結合して活性を示すことは, 状況証拠的には低いといえる.

さらに, 文献 3 で指摘された AAA の血中濃度が PQQ 添加と無添加で有意に変動しているのかどうかはさておいて, もっと根本的な問題は, この mU26 タンパク質とリジン代

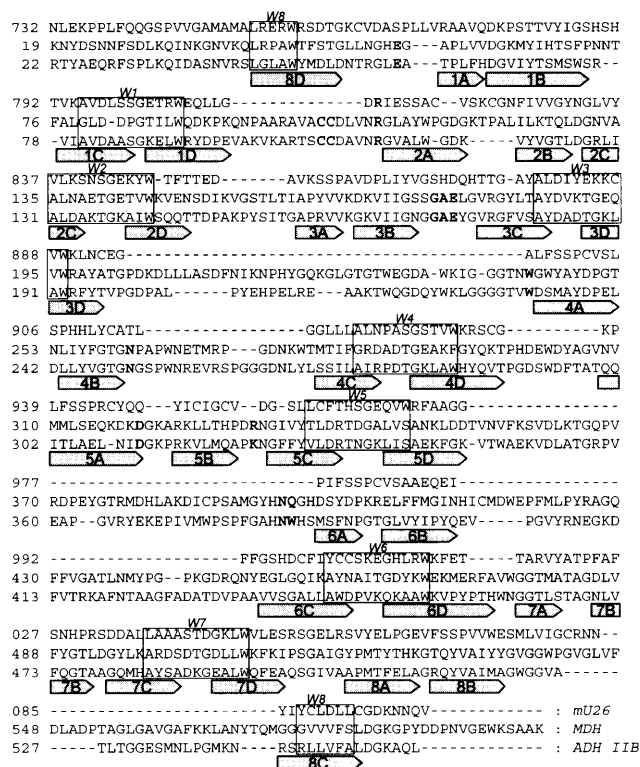


図 4. キノプロテインと mU26 の推定 PQQ ドメインとのアラインメント. MDH と ADH IIB の X 線結晶構造解析で得られた立体構造から明らかにされた, W-blade を形成する 4 つの β シート構造をアラインメントの下に示した. 図 2 で示した内側の β シートを A で, 外側へ順番に B, C, D で示している. mU26 の「繰り返し配列」をキノプロテインのものと合わせ (W1~W8), W-blade を形成する β シート構造を考慮してアラインメントした.

謝とが結びついているとする直接の証拠が理研グループの報告の中に示されていないことである. 食餌に PQQ 添加した時としない時に見られる AAA の血中濃度変化と mU26 を直接結びつけるデータもない. mU26 をノックアウトしたマウスを作製し, PQQ 添加あるいは無添加の食餌でのリジン代謝の違いを調べることで明らかにできそうである. 若しくは, mU26 タンパク質を遺伝子工学的に調製し, 精製タンパク質の酵素活性を示すことでも明らかにできるであろう. 後者の実験に関しては, 理研グループも既に試みているが, 組換え mU26 タンパク質を調製することが難しく, さらに酵素活性測定法にも問題があることから, 成功していないことを報告している (<http://www.brain.riken.jp/bsi-news/bsinews21/no21/research4.html>). 上記いずれかの実験結果があって初めて mU26 とリジン代謝の関係が明らかとなり, さらに mU26 タンパク質の酵素活性に PQQ が必要であること若しくは PQQ 結合能力があることが示されることで, mU26 タンパク質がキノプロテインであり PQQ がリジン代謝に関わるビタミンである, とする理研グループの主

張が正しいことが完全に証明されると考えられる。先に述べた理研グループの反論⁹⁾はここに挙げた問題点に十分応えているとは言えず、まだ今後の実験経過を見守っていく必要があるだろう。

5. マスコミ報道の問題点

本論とは直接関係ないが、ここで指摘しておきたいことがある。理研グループの発表に対してマスコミが使った「ビタミンの発見」という言葉である。理研グループはPQQがビタミンである「可能性」を指摘したにとどまるが、それが半世紀ぶりの「発見」として大々的に報道された。物質としてのPQQは、上にも書いた通り以前に発見され化学構造も決定されており、また「ビタミンであることを発見した」ということの論拠はまだ弱いものでしかないから、「発見」という言葉は適切でない。しかし、マスコミが悪いのだと一概に言えない。ある新聞記者から「学術雑誌に新規ビタミンと出ているのだから、マスコミがその通り報道するのは当然ではないか」と逆に尋ねられたことがあった。確かに2003年の*Nature*誌のタイトルは「A new redox-cofactor vitamin for mammals」となっていた。そう考えると*Nature*誌の発表の仕方の方が問題かもしれない。また、最初投稿した段階ではもう少し詳しいデータを載せていたようで、笠原博士は、「*Nature*誌から、タイトルを変更して生データを大きく削れば掲載すると言われたので、ああいう形式になった」と述べていた（私信）。それ以外に理研の知的財産部または広報部の意向というのも働いていたのかもしれない。いずれにしても、内容を正確に把握してマスコミが報道していれば、それほど過熱することもなかったのではないと思われる。

おわりに

PQQの作用については、培養細胞への成長促進効果や、ラットやマウスに対する栄養学的重要性を示すデータなどはたくさんあるが、生化学レベルでのメカニズムの検討まではされておらず、その生理学的作用についての分子レベルでの理解はまだ不完全である。最近、Ruckerのグループが、化学的に限定されたPQQ欠乏食餌を与えられたマウスとPQQ添加した食餌を与えたマウスでは、ミトコンドリアに存在する酵素やミトコンドリアに関連した細胞シグナル

伝達経路の遺伝子が影響を受けていることを、DNAマイクロアレイを使った実験で明らかにしている（私信）。また、PQQが抗酸化作用を示すことは報告されているから、同じく抗酸化剤であるビタミンCのように、酵素と直接結合することなく生理活性を示す可能性も考えられる。つまり、mU26タンパク質がキノプロテインでなくとも、PQQがビタミン作用を示す可能性はある。いずれにしても、PQQがラットやマウスにとっては必須あるいは重要であることは明らかであるから、そのメカニズムが明らかになることで、PQQがヒトにとってもビタミンであるか否かの結論が得られそうである。

謝 辞

この解説を執筆する機会を与えてくださった京都大学大学院農学研究科の三芳秀人先生に感謝いたします。

引用文献

- 1) T. Kasahara and T. Kato: *Nature* **422**, 832 (2003).
- 2) L. M. Felton and C. Anthony: *Nature* **433**, E10 (2005).
- 3) R. Rucker, D. Storms, A. Sheets, E. Tchapanian and A. Fascetti: *Nature* **433**, E10–E11 (2005).
- 4) 足立収生: ビタミン **75**, 355–359 (2001).
- 5) 谷澤克行: ビタミン **75**, 367–373 (2001).
- 6) R. Rucker, T. Stites, Y. Suzuki, F. Steinberg and D. Storms: ビタミン **75**, 381–387 (2001).
- 7) S. Mochizuki, K. Hiratsu, M. Suwa, T. Ishii, F. Sugino, K. Yamada and H. Kinashi: *Mol. Microbiol.* **43**, 1501–1510 (2003).
- 8) H. Toyama, F. S. Mathews, O. Adachi and K. Matsushita: *Arch. Biochem. Biophys.* **428**, 10–21 (2004).
- 9) T. Kasahara and T. Kato: *Nature* **433**, E11–E12 (2005).
- 10) M. Paoli: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **76**, 103–130 (2001).
- 11) D. E. Ehmann, A. M. Gehring and C. T. Walsh: *Biochemistry* **38**, 6171–6177 (1999).

略 歴

外山博英

生年月日: 昭和39年1月25日

最終学歴: 京都大学大学院農学研究科博士後期課程修了

研究テーマ: キノプロテインの構造と機能の解析と応用, アルコール酸化代謝調節の解析, 耐熱性微生物 (特に酢酸菌)