ピロロキノリンキノン(PQQ)の生化学

飴山 實*

脱水素酵素の補酵素としては、NAD(P) やフラビン化合物 (FAD, FMN) などが知られていたが、新たにピロロキノリンキノン (PQQ) が見つかり、1979 年には構造も決定された。細菌細胞膜のグルコース脱水素酵素、メタノール細菌のメタノール脱水素酵素、酢酸菌のアルコール、アルデヒド各脱水素酵素、哺乳動物のアミン酸化酵素など、いくつかの重要な酵素で PQQ が補酵素であることがわかってきた。PQQ は動植物の抽出エキスや微生物の培養液に検出され、さらに微生物の生育を促進する生理活性を示すことも認められるようになった。

ピロロキノリンキノン (PQQ) の研究史をふりかえってみると、細菌細胞膜に局在するグルコース脱水素酵素 (GDH) についての研究史、C₁ 化合物の微生物利用に伴って進展したメタノール脱水素酵素 (MDH) とメチルアミン脱水素酵素の研究史、それにアミン酸化酵素やその他の PQQ 酵素の研究史と微生物の生育因子としての研究史、の4つに分けることができる。前の2つは PQQ の構造決定で1つの区切りがついたが、後の2つは PQQ の情報が得られたことでそれぞれの研究前史を脱して急展開した分野である⁽¹⁾。

PQQ が生化学史の水面にその姿を現わしたのは構造決定より20年前の1959年のことで、ノルウェーの Hauge⁽²⁾ が報告した *Bacterium anitratum* (syn. *Acinetobacter calcoaceticus*) の GDH についての研究である。細菌の細胞膜にあって PMS-DCIP (phenazinemethosulfate-2,6-dichlorophenolindophenol) を電子受容体にするが NAD(P) やフラビン補酵素は関与しない GDH の最初の報告で、その後数年にわたって詳しく研究し、酵素を熱水抽出して得た cofactor 画分を精製して、酸化型が 248 nm の吸収極大と 270~280 nm の肩を示すことや、pH 2.5 のゲル濾過で不活性にした酵素に cofactor を加えて活性化させる再構成実験にも成功した。分光学的データから彼は、「この cofactor は置換型ナフトキノンだろう」と述べている。このように PQQ の研究史は Hauge の GDH から始まっている。1965 年には

Niederpruem が、*Rhodopseudomonas spheroides* のアルドース脱水素酵素の cofactor が好気培養菌の膜画分や培養液に見いだされること、嫌気明条件で培養した菌はアポ酵素をもつが cofactor がないことを報告した。*Pseudomonas fluorescens* の GDH のアポ酵素と cofactor は1979年に今永らが精製し、cofactor をジヒドロプテリンと推定した。彼らも cofactor が代謝産物として培地中に蓄積されることを記載している。

メチロトロフ *Pseudomonas* M 27 の MDH の cofactor は Anthony & Zatman⁽³⁾ が1967年に初めて報告し、吸収スペクトルや蛍光スペクトルからプテリンだろうと考えた。Forrest らは1971年前後に、*Pseudomonas* TP 1, *Hyphomicrobium* sp. WC, *Methylococcus capsulatus*, *Pseudomonas* M 27, W 1, *Ps. metanica* がいずれも同一の cofactor をもっていて、それがプテリンであると発表した。一方、メチルアミン脱水素酵素は1968年に Eady & Large⁽⁴⁾ が *Pseudomonas* AM 1 から精製し、1979年には松本、戸張らが結晶化し、補酵素をピリドキサル誘導体と考えた。

別々の道を歩いてきた GDH と MDH の研究史は、両方の酵素とも PQQ を補酵素としていたのだから、1979年のPQQの化学構造決定の瞬間にドッキングした。PQQの化学構造は2つのグループによって相次いで明らかにされ、その後のPQQ研究史の幕が切って落とされた。その年の春には、オランダの Duine らは、*Hyphomicrobium* X の MDH をメタノール抽出して得た補

Biochemistry of Pyrrolo-Quinoline Quinone

* Minoru AMEYAMA, 山口大学農学部農芸化学科

酵素を ESR で解析して 2 原子の N を含むキノンであることを示し、夏にはテキサス大学の Forrest, Salisbury らとケンブリッジ大学の Cruse ら⁽⁵⁾が共同研究で *Pseudomonas* TP 1 の菌体から得た補酵素を X 線回折に供し、PQQ の化学構造を初めて明らかにした。彼らは methoxatin と命名したが、秋になって Duine ら⁽⁶⁾が *A. calcoaceticus* の GDH の補酵素と *Hyphomicrobium* の MDH のそれが同じであることを確かめ、必須部分が *o*-キノンであることから“ピロロキノリンキノン”と呼ぶことを提唱し、PQQ を補酵素とする酵素を“quinoprotein”と呼んだ。糖質脱水素酵素をも対象とした Duine らの命名は、その普遍性のために一般にうけいれられている。

化学構造がわかったので、PQQ の合成も工夫された。いくつかの全合成法が発表されたが、Corey ら⁽⁷⁾の 2-methoxy-5-nitroaniline からの方法、あるいはその変法がすぐれている。いずれの方法でも反応工程が多く、収率にも問題がある。

PQQ の製造には発酵法⁽⁸⁾がいまのところ有利であろう。メチロトロフをメタノール培地で培養すると、150 時間で 100 $\mu\text{g/ml}$ の PQQ が蓄積する。培養濾液をイオン交換カラムクロマトグラフィーにかければ容易に精製することができる。

PQQ の構造と機能

PQQ (図 1) は、*o*-キノンの 2 つのカルボニル基が電子の授受を行なうことで、酸化還元酵素の補酵素として機能する。したがって、PQQ 酵素はカルボニル試薬で阻害をうけるし、この性質は PQQ 酵素か否かの判定に利用される。

大城らが合成した PQQ のアナログを用いて、化学反応での触媒活性や GDH の補酵素としての活性発現を調べると、必須部分の *o*-キノン以

図 1 PQQ の化学構造 (5-dioxo-1 H-pyrrolo [2, 3-f] quinoline-2, 7, 9-tricarboxylic acid)

外ではピロール環が重要で、ピリジン環はなくても触媒活性が認められるのに対し、アポ酵素としてはピリジン環にある 9 位のカルボキシル基とピロール環の 1 位のイミノ基が活性発現に必要である⁽⁹⁾。イミノ基にメチル基が導入されていてもいくらかは活性がある。PQQ はこれらのカルボキシル基とイミノ基で微生物細胞膜中のアポ酵素とイオン結合しているものと考えられる。

PQQ の分光学的性質

PQQ の吸収スペクトルは、中性で酸化型が 249 nm と 330 nm に極大吸収を示し、270 nm に肩をもつ (図 2)。400~600 nm 付近にも低くて広い吸収があるため、溶液は特徴的な赤紫色を呈する。NaBH₄ で還元すると 318 nm に還元型の吸収極大が現われる。PQQ の蛍光スペクトルもきわめて特徴的で、中性では 365 nm を励起波長にすると 485 nm 付近に蛍光極大が現われ、また励起スペクトルも 260, 320 および 380 nm に吸収極大がある (図 3)。吸収スペクトルと蛍光スペクトルはいずれも既知のビタミン補酵素の中では葉酸とよく似ているために、研究史の初期には GDH や MDH の補酵素はしばしばプテリン化合物と推定された。

このような分光学的性質のために、PQQ を補酵素とする酵素の紫外外部域は蛋白質の吸収におお

図 2 PQQ の吸収スペクトル (pH 7.0)
PQQ はトリカルボン酸だから pH に対してさまざまに挙動してスペクトルも少しシフトする。

図3 PQQの蛍光スペクトル (pH 7.0)
やはり、pHによりシフトする。

われてしまい、高濃度の酵素液でさえ 300~400 nm 域に何かが存在するという印象を与えるだけのスペクトルしか示さず、フラビンを含む酸化還元酵素やピリドキサルリン酸を含むトランスアミナーゼのように特徴的な可視部吸収スペクトルを示す、といったことがない。このことが PQQ の発見を遅らせた大きな理由だろう。

紫外部の 249 nm の吸収は HPLC による PQQ の定量に用いられており、現在では種々のすぐれたカラム充填剤が開発されているので、PQQ のみが高純度に含まれる試料には HPLC は簡便な方法である。しかし、紫外部域に強い吸収を有する物質が含まれる試料では、しばしば定量が困難になる。極微量の PQQ や試料中に多種多様の不純物を含むときの定量法としては、以下に述べる酵素法をおいて他にない。

PQQによるアポ-グルコース脱水素酵素のホロ化

好氣的に高濃度のグルコースをグルコン酸に酸化する *Pseudomonas* や *Acinetobacter* などは、細胞膜に疎水性の強い GDH をもっており、BTB などの pH 指示薬を加えたグルコース寒天培地に生育してコロニー周辺の色を変えるし、細胞膜画分はグルコースがあれば PMS-DCIP やフェリシナイドなどの電子受容体を還元する。そこで、アポ GDH は保有するが PQQ を生産できない菌株を用いると、外からの PQQ の添加でグルコースの酸化が起こるので、PQQ の定性的検出や定量ができる。生育菌体では、膜の GDH が機

図4 *Pseudomonas aeruginosa* の電子伝達鎖と細胞膜にある糖質脱水素酵素

グルコース培地で好氣的に培養した菌体の場合。図中の Q_P は PQQ 酵素を、 F_P はフラビン酵素を示す。

能しなくてもグルコースは細胞質に入って NAD (P) 関与の代謝系で利用されるから、PQQ 欠失 (PQQ⁻) 株でも生育できる。

図4はグルコース培地で好氣的に培養した *Pseudomonas aeruginosa* の細胞膜所在の脱水素酵素と電子伝達鎖を示す⁽¹⁰⁾。PQQ 酵素は GDH のみであり、酢酸菌のように多種類の PQQ 酵素がないので何かと都合がよい。

GDH ではアポ酵素と PQQ が共有結合していないためにホロ化は容易に起こるが、疎水性の強い蛋白質であり、脂質の多い膜でのホロ化だから、膜画分を用いるときには PQQ 含有試料を膜画分に加えてから 20 分間インキュベートする必要がある。0°C よりも 25°C にすると膜脂質の流動性がよくなり、ホロ化率が高まる。ホロ化後にグルコースを加えたときの PMS-DCIP を還元する活性の初速度から 0~25 ng/ml の PQQ を測定できる。

PQQ⁻ 株は *P. aeruginosa* や *Acinetobacter* を変異剤で処理すると容易に得られるが、酸化細菌でない一般の細菌も GDH をほとんどアポ型で保有していることがわかったので⁽¹¹⁾、次のように大腸菌細胞膜を用いるのが一層簡便である⁽¹²⁾。大腸菌は手近にある株でよい。筆者らの用いた *E. coli* K 12 IFO 3301 では、PQQ 無添加と添加で GDH の比活性は 0.03 と 0.34 U/mg protein であるが、膜画分を EDTA で洗うと PQQ 無添加時の活性は完全に失われる。それに 10 mM の $MgSO_4$ と PQQ を加え、25°C、10 分間のインキュベートで GDH をホロ化する。 Mg^{2+} は PQQ とアポ GDH のアンカーとして役立ってい

る。PQQ 無添加時に GDH 活性をまったく示さない大腸菌の株もあって、こんな株では EDTA 処理をしないでそのまま使用することができる。

PQQ 酵素の種類

PQQ 酵素はこれまで細菌とカビと哺乳動物で知られており、植物ではまだ報告がないが、PQQ そのものが生物界全般に存在しているので（われわれの飲食品のほとんどすべてに含まれている）、PQQ 酵素も生物一般に分布しているものと考えていいだろう。これまでに見つかった PQQ 酵素はすべて膜酵素であり、基質は PQQ を介して電子伝達系に連結し、チトクロムオキシダーゼを経て酸素で酸化される。だから、PQQ 酵素による基質の酸化は非可逆的である。表在性の膜酵素として、細菌の MDH とメチルアミン脱水素酵素、カビのニトロアルカン酸化酵素⁽¹³⁾、それにカビや哺乳動物（ウシ血漿、ブタ腎臓）のアミン酸化酵素⁽⁸⁾があり、これらは試料を超音波処理やフレンチプレスで破碎するだけで容易に酵素を得ることができる。しかし、細菌の GDH^(14~16)、酢酸菌のアルコール⁽¹⁷⁾、アルデヒド⁽¹⁸⁾、グリセリン⁽¹⁹⁾各脱水素酵素、*Flavobacterium* 属菌のポリエチレングリコール脱水素酵素⁽²⁰⁾ およびイヌ肝臓ミトコンドリアのコリン脱水素酵素⁽²¹⁾は、いずれも疎水性が強く、容易に可溶化されず、適当な界面活性剤を用いることではじめて粗酵素標品を得ることができる⁽²²⁾。

PQQ 酵素は、酵素と PQQ が共有結合しているか否かの違いで 2 群に区別できる。共有結合していない 1 群は、酵素から 90% メタノールで PQQ を容易に抽出できる。細菌のグルコース、メタノール、アルコール、アルデヒド、グリセリンの各脱水素酵素などであり、この 1 群は酵素の精製が進むにつれて、吸収スペクトルの 270 nm 付近の肩がはっきりしてくる。精製が窮まってくると、330 nm のピークも現われる。なお、グリセリン脱水素酵素の PQQ は酵素精製中に容易にはずれて、見掛け上の失活が起こるが、外から PQQ を添加すれば完全に活性が戻ることで特異的である。

酵素と PQQ が共有結合している他の 1 群は、細菌のメチルアミン脱水素酵素や、カビと哺乳動物のアミン酸化酵素、イヌのコリン脱水素酵素などで、これらは慣れないうちは精製酵素でも PQQ の存在を分光学的に認めるのがかなり困難である。しかし、酵素を 6N 塩酸で加水分解してクロモフォアを調製すれば、そのスペクトルで判定できる⁽⁶⁾。特に蛍光スペクトルは特徴的である。

ある酵素の補酵素が PQQ であることを確認するためには、化学的および分光学的なデータに頼るだけでなしに、最終的には酵素から得たメタノール抽出画分なりクロモフォアなりをアポ-GDH に加えてホロ化が起こるか否かをみる必要がある。

上記の 2 群の PQQ 酵素のそれぞれの代表例として、酢酸菌の膜酵素と哺乳動物のアミン酸化酵素について述べる。

酢酸菌の PQQ 酵素⁽²³⁾

細菌の PQQ 酵素としては、メタノールで培養したメチロトロフの MDH と一般細菌の GDH が代表であるが、酢酸菌ではこのほかにアルコール脱水素酵素 (ADH) とアルデヒド脱水素酵素 (ALDH) があり、*Gluconobacter* ではさらにグリセリン脱水素酵素 (GLDH) も PQQ 酵素である (図 5)。一般に、膜酵素は細胞質酵素に比べて非常に多量に含まれており、比活性も膜酵

図 5 *Gluconobacter suboxydans* の細胞膜にある糖質脱水素酵素

PQQ は PQQ 酵素、FAD はフラビン酵素。

DHA: ジヒドロキシアセトン, 2-KGA: 2-ケトグルコン酸, 2,5-DKGA: 2,5-ジケトグルコン酸

素のほうが桁ちがいに大きい。たとえば、*Acetobacter aceti* の膜の ADH (PQQ 酵素) に比べて細胞質の ADH (NAD 関与) は蛋白量として 100 分の 1 以下 (まったく欠く菌株さえある) であり、比活性は 300 分の 1 で (細胞質の酵素では可逆反応があるが、その酸化反応について) 無視できる程度にすぎない。このように、膜酵素のはたらきがたいへん大きいことが酸化発酵の生化学的な基盤であり、したがって PQQ 酵素の存在意義は酢酸菌において特に大きい。

酢酸菌の膜酵素はいずれも多量に含まれているので、個々に分別可溶化して精製する。可溶化を pH 2.5 で行なうと主に GDH だけが可溶化されてくるし、2% Brij 58-1% Tween 80 では ADH が可溶化され、その後 1.5% Triton-100, 50 mM ベンツアルデヒド、10% ショ糖の混液を用いて ALDH を可溶化する。GLDH は 0.5% ジメチルドデシルアミノオキソド (pH 8.0) を用いると可溶化できる。

GLDH は他の酵素に比べて PQQ が非常にはずれ易い特徴をもっている。EDTA 処理で GDH, ADH, ALDH は影響をうけないが、GLDH だけは PQQ がはずれてアポ GLDH として得られ、アポ GLDH に Mg^{2+} と PQQ を加えることでホロ化する。

このように、PQQ とアポ酵素が共有結合していない酵素には、EDTA 処理でも PQQ がはずれない酵素と、EDTA で PQQ がはずれるが Mg^{2+} があれば再びホロ化する酵素との 2 種類がある。後者の代表は大腸菌や *Klebsiella pneumoniae* の GDH で、通常アポ型である。イムノブロット法で調べたところ⁽²⁴⁾、大腸菌などのアポ GDH は酢酸菌や *Pseudomonas* の GDH よりむしろ分子量の大きい蛋白質であった。

哺乳動物の銅含有アミン酸化酵素

アミン酸化酵素の研究は NIH の Tabor 夫妻によって 1954 年から始まった。その後、いくつかの病気とアミンの関係が知られ、アミン類の生体内レベルの調節に重要な役割を担っているアミン酸化酵素に関心が高まってきた。この酵素は動

物、植物、微生物に広く存在し、結晶状に単離されて性質が詳しく調べられているものも少なくない⁽²⁵⁾。

アミン酸化酵素には補酵素としてフラビンを含むもの (細菌のプトレシン酸化酵素、チラミン酸化酵素、カビのポリアミン酸化酵素、および動物の脳や肝臓のミトコンドリア膜に結合しているもの) と、銅を含むものがある。含銅アミン酸化酵素はウシ血漿、ブタやヒトの血液あるいは腎臓などの哺乳動物起源のほか、植物や糸状菌にも見いだされるが、いずれもセミカルバジドや 2,4-ジニトロフェニールヒドラジンのようなカルボニル試薬で阻害されるなど、理化学的性質や銅含有量などでも共通した性質をもっている。このグループの酵素がカルボニル試薬で阻害されるのは、活性中心にカルボニル基が存在するためと考えられた。1960 年代には山田らのウシのポリアミン酸化酵素の結晶化をはじめアミン酸化酵素が次々に単離されたが、活性なカルボニル基としてピリドキサルリン酸を考える人が多かった。

一方、メチルアミン脱水素酵素がメチロトロフから 1968 年に Eady & Large⁽⁴⁾ によって精製された。精製酵素の吸収スペクトルはその当時までに報告されていた含銅アミン酸化酵素 (すべて特徴的なピンク色を呈する) と異なっていた。カルボニル試薬に対しては両者ともによく阻害されたが、アミン酸化酵素が金属キレート剤に敏感なのに対して、アミン脱水素酵素はほとんど阻害されないことがわかった。1971 年に Eady らが示した補酵素画分の吸収スペクトルと蛍光スペクトルは、PQQ のそれと非常に似ている。

MDH の補酵素が PQQ であることが同定されると、メチルアミン脱水素酵素のそれも PQQ であることがわかったが、MDH の場合と異なって PQQ が酵素蛋白に共有結合していることが de Beer らによって明らかにされた。筆者ら⁽⁸⁾は、*Pseudomonas* AM1 のアミン脱水素酵素を共有結合型補酵素の基準として用い、結晶あるいは高純度に調製したウシ血漿、ブタ腎臓、*Asp. niger* のアミン酸化酵素をプロテアーゼ消化、塩酸水分解、カラムクロマトグラフィーなどで処理して得

たクロモフォアの蛍光スペクトルを比較したところ、3つのアミン酸化酵素から得られた結果はアミン脱水素酵素のそれとよく一致し、PQQのスペクトルともよく一致した。クロモフォアによるアポGDHのホロ化も確認された。

こうして、アミン酸化酵素の報告が初めて世に出てから30年を経て、含銅アミン酸化酵素の補酵素がPQQであることが明らかとなった。PQQ酵素が微生物界のみならず哺乳動物にも分布することが、初めて明らかにされた。Duineら⁽²⁶⁾も、カルボニル試薬でアミン酸化酵素の活性カルボニル基を標識してからプロテアーゼ消化して標識付加物を取りだし同様に処理したPQQと比べて、両者のスペクトルやHPLCでの挙動が等しいことから、ウシ血漿アミン酸化酵素の補酵素が共有結合型PQQであることを報告した。イヌ肝臓コリン脱水素酵素⁽²¹⁾も、同様にPQQを共有結合で補酵素としていることがわかっていく。

膜小胞での大腸菌GDH-チトクロム α 系の再構成⁽²⁷⁾

酢酸菌の酸化発酵に関する酵素が細胞膜のどちら側に存在しているか、また電子伝達鎖とどのようにリンクするかなどを知ることは工業的にも意味が大きいので、モデルに大腸菌細胞膜でのGDHを選んでいくつかのことを調べた。

GDHの所在場所を調べるために、大腸菌の膜画分、膜小胞(細胞と同じ向きの閉じた膜)、反転膜小胞(細胞と逆向き)を調製してトリプシンで処理し、SDSゲルで展開後、GDHの抗体を用いてウェスタン・ブロットを行なったところ、GDHは膜小胞では完全に分解されるが反転膜小胞では影響をうけないので、GDHが細胞膜の外表面に位置することが明らかになった⁽²⁴⁾。既述のADH、ALDH、その他の酸化発酵関連のフラビン酵素、PQQ酵素も同様に細胞膜外表に存在していると考えてよい⁽²³⁾。

次に、大腸菌のリン脂質からオクチルグルコシド希釈法によってつくる人工膜に、すでに精製している大腸菌のGDHとチトクロム α およびユビキノ Q_8 をとり込ませてGDH-チトクロム α

図6 再構成した大腸菌グルコース酸化系
大腸菌のリン脂質からオクチルグルコシド希釈法でつくる人工膜に、精製した同菌のグルコース脱水素酵素とチトクロム α 、および CoQ_8 をとり込ませてプロテオリポソームを再構成し、これにPQQを加えるとグルコースを酸化するようになる。

系を再構成し、PQQの働きを調べた⁽²⁸⁾。図6はその再構成プロテオリポソームを示したものである。グルコース酸化系はGDH、 Q_8 、チトクロム α からのみ成り、PQQを加えるとグルコースを酸化し、その活性は膜小胞での代謝回転とほぼ同じであることがわかった。この活性はValinomycinとNigericinを加えると促進されるので、再構成プロテオリポソームが膜電位を形成していると考えられ、カーボシアニン色素を用いて測定したところ124mV(内側が負)であった。大腸菌の末端オキシダーゼであるチトクロム α は、膜を横切る電子の移動を触媒して膜電位を形成することが知られているが、このグルコース酸化系でもチトクロム α が専ら膜電位の形成に関与していると考えて間違いあるまい。最近、筆者らが精製した酢酸菌(*Gluconobacter*)の末端オキシダーゼも大腸菌と同様にチトクロム α であり、ユビキノールを酸化する強い活性を有している。だから、酢酸菌の酸化発酵関連の酵素群も、大腸菌のモデル実験のように、脱水素酵素- Q_{10} (*Gluconobacter*のユビキノ Q_{10})-チトクロム α の系をつくり、エネルギーを生成しているものと考えられ、現在それを確認中である。基本的には*Acetobacter*も同様と思われる。

PQQによる微生物の生育促進⁽²⁹⁾

酢酸菌は合成培地での生育がきわめて悪いので、通常、酵母エキスの天然物を培地に加える。そこで筆者らは、1960年代半ばから酵母エキ

図7 PQQ 標品、ウシのルーメン・ジュース、およびカザミノ酸のセファデックス G-25 カラムクロマトグラムと、その極大画分の蛍光スペクトル

ス中の未知栄養素の単離を試み、同様な成分がペプトン、肉汁、糖蜜、麦芽汁など広く天然物一般に存在して、酵母やカビの生育にも有効であることを観察したので、発酵用培地に添加される天然物すべてと哺乳動物分泌物あるいは各種の食品など、生物起源の多種多様な物質の熱水エキスについて、セファデックス G-25 カラムでゲル濾過して、*A. aceti* の生育促進を指標に有効成分の精製を進めた。その結果、どの天然物エキスからも同じ溶出位置に有効成分が出てくることが、*A. aceti* 以外の各種の細菌の生育に対しても同じ効果を示すことがわかった⁽³⁰⁾。同じ頃、酢酸菌酵素の単離精製を並行して進め、大量の菌体を得るために同一条件で培養を繰り返すうち、培養後のフラスコを洗わないで次の培養に用いると菌の生育が格段に早まることに気がついた。これは大腸菌の培養でも確かめられたので、グルコース無機塩

培地での大腸菌培養液をゲル濾過した結果、他の天然物エキスの場合と同様の溶出区分に *A. aceti* の生育を促進する有効成分が認められた。このほうが夾雑物をはるかに少ないので、有効成分の精製は容易になった。

酢酸菌の膜酵素を次々に精製して、研究室には未同定ながら PQQ の精製標品や理化学的性質の情報が溜まっていた頃、Salisbury らの PQQ の構造決定の報告が出た。ちょうどその頃に大腸菌培養液からの生育促進物質も精製されてきて、これと PQQ の理化学的性質が似ていることに気づいた。そこで、PQQ 株に大腸菌培養液からの精製標品を与えたところ、GDH はみごとに再構成された⁽³¹⁾。こうして、20 年来まったく別々の道を歩いてきた生育促進物質の研究と糖質脱水素酵素の研究が PQQ を接点に劇的に遭遇し

た。幸運と愉悦を味わうことができた。各種の天然物エキスから精製してあった標品のいずれにも PQQ が認められたことはいうまでもない。図7は、PQQ 標品とウシのルーメン・ジュース、カザミノ酸についての溶出パターンとその極大画分の蛍光スペクトルである。

このようにして、PQQ が微生物の増殖に促進活性を示すこと、PQQ が生物起源の天然物に広く分布すること、酢酸菌やメタノール菌をはじめ大腸菌や酵母でさえ、量の多寡はあれ、一般に微生物が PQQ を培地中に生産することが、1983 年の暮に発見された。

生育促進活性については図8および図9に示す2つの型があって、必須栄養素として全菌量を増大させる“ビタミン型”と、全菌量に影響しないが誘導期を短くして生育を速める効果の“ホルモン型”とがある。前者の例はポリビニルアルコール

図 8 ポリビニルアルコール分解菌 *Pseudomonas* sp. VM 15 C の生育に対する PQQ の添加効果

図 9 協会 7 号酵母の生育に対する PQQ の添加効果

ル分解菌の共生の研究で発見され、河合と嶋尾⁽³²⁾がすでに本誌にも紹介した(図 8)。筆者らは、*Saccharomyces rouxii* である種の海洋細菌なども PQQ を必須栄養素とすることを知り、従来の growth factor の研究に PQQ についての検討を加える必要があると考えている。

“ホルモン型”の例は、酢酸菌に対する酵母エキスの効果で見つかった。大腸菌や *Pseudomonas* のように早く生育する菌では工夫しないと見つけ難いが、天然物エキスや培養濾液の添加で誘導期が短くなる微生物は酢酸菌の他にも多い。図 9 は清酒酵母に PQQ を加えた例である。PQQ の“ホルモン型”生理活性の機構はまだ明らかでないが、生育曲線の誘導期にある菌にだけ PQQ 添

図 10 接種菌に付着している PQQ

ポテト斜面培地で培養した酢酸菌 *A. aceti* を水あるいは緩衝液 (pH 3.5) で遠沈洗滌を繰り返すときの上清中の PQQ を測定した。水洗なら 4 回で菌体付着の PQQ はなくなるが、酸性緩衝液で洗うときは PQQ がカルボン酸のために酵素から次々に解離してくることを示している。

●：水，○：酸性緩衝液

加による誘導期の短縮がみられ、対数期に入った菌には何ら影響はない。

誘導期は接種菌量を増すと短くなることが知られているが、PQQ の添加でさらに短縮されるので、接種菌とともに古い培地から PQQ がもち込まれることが考えられる。そこでポテト・スラントで前培養した酢酸菌で調べてみたところ、菌体を殺菌水で 4 回洗うことで漸く菌体外表に付着した PQQ がなくなることがわかった⁽³³⁾(図 10)。したがって、通常の微生物の接種では、接種菌と一緒に PQQ のもち込みがあるものと考えらるべきである。

今後は、PQQ を補酵素とする酵素がもっと見つかるだろうし、PQQ の反応素子としての知見や生理活性についての研究が深まることを期待したい。PQQ の研究は、始まったばかりである。

(PQQ の有機化学については、大城、伊東のすぐれた総説⁽³⁴⁾があるので参照されたい)

文 献

- 1) 飴山 實：現代化学，1985 年 7 月号，p.46.
- 2) J. G. Hauge : *Acta Chem. Scand.*, 13, 2125 (1959).
- 3) C. Anthony & L. J. Zatman : *Biochem. J.*, 104, 953 (1967).
- 4) R. R. Eady & P. J. Large : *Biochem. J.*, 106, 245 (1968).
- 5) S. A. Salisbury, H. S. Forrest, W. B. T. Cruse & O.

- Kennard : *Nature*, **280**, 843 (1979).
- 6) J. A. Duine, J. Jr. Frank & J. K. Van Zeeland : *FEBS Lett.*, **108**, 443 (1979).
 - 7) E. J. Corey & A. Tramontano : *J. Am. Chem. Soc.*, **103**, 5599 (1981).
 - 8) M. Ameyama, M. Hayashi, K. Matsushita, E. Shinagawa & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 561 (1984).
 - 9) E. Shinagawa, K. Matsushita, M. Nonobe, O. Adachi, M. Ameyama, Y. Ohsiro, S. Itoh & Y. Kitamura : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **139**, 1279 (1986).
 - 10) K. Matsushita, M. Yamada, E. Shinagawa, O. Adachi & M. Ameyama : *J. Biochem.*, **93**, 1137 (1983).
 - 11) M. Ameyama, M. Nonobe, M. Hayashi, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1227 (1985).
 - 12) M. Ameyama, M. Nonobe, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Anal. Biochem.*, **151**, 263 (1985).
 - 13) 城戸俊子, 左右田健次 : 生化学, **56**, 952 (1984).
 - 14) K. Matsushita & M. Ameyama : *Methods in Enzymology*, **89**, 149 (1982).
 - 15) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 851 (1981).
 - 16) M. Ameyama, M. Nonobe, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 49 (1986).
 - 17) O. Adachi, E. Shinagawa, K. Matsushita & M. Ameyama : *Agric. Biol. Chem.*, **46**, 2859 (1982).
 - 18) M. Ameyama, K. Osada, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **45**, 1889 (1981).
 - 19) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1001 (1985).
 - 20) F. Kawai, H. Yamanaka, M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1071 (1985).
 - 21) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, K. Takimoto, K. Nakashima & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 3623 (1985).
 - 22) 足立収生 : “生体膜成分の構造と機能”, 鬼頭 誠編, 学会出版センター, 1982, p. 49.
 - 23) 鮎山 實 : “酵素——バイオテクノロジーへの指針-I”, 日本農芸学会 ABC シリーズ, 朝倉書店, 1985, p. 71.
 - 24) K. Matsushita, E. Shinagawa, T. Inoue, O. Adachi & M. Ameyama : *FEMS Microbiol. Lett.*, **37**, 141 (1986).
 - 25) 熊谷英彦, 山田秀明 : 蛋白質 核酸 酵素, **29**, 357 (1984).
 - 26) C. L. Lobenstein-Verbeek, J. J. A. Frank & J. A. Duine : *FEBS Lett.*, **170**, 305 (1984).
 - 27) 松下一信 : 蛋白質 核酸 酵素, **31**, 970 (1986).
 - 28) K. Matsushita, M. Nonobe, E. Shinagawa, O. Adachi & M. Ameyama : *J. Bacteriol.*, **169**, 205 (1987).
 - 29) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 2909 (1984).
 - 30) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 699 (1985).
 - 31) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3099 (1984).
 - 32) 河合富佐子, 嶋尾正行 : 化学と生物, **23**, 148 (1985).
 - 33) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita & O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 853 (1985).
 - 34) 大城芳樹, 伊東 忍 : 化学, 1986年 8月号, p. 495.

書 評

図説 哺乳動物の発生工学実験法

実験書に要求される条件とは、ある程度の基礎知識があれば自ら実験法を修得できるということであろう。この点、アメリカで出版される実験マニュアルは実に細かいところまで記述がゆきとどいており、かねてから感心していた。逆に、日本の生物系の実験者というのは、どちらかと言えば、一部名人芸の發揮できるところがなければ承知しないところがあり、実験書も本来の意味のマニュアルとはなっていないものが多いように思う。自動車で言えば、オートマチックとマニュアルの違いである。この違いについては、一般的にアメリカで実際に実験を行なうのはテクニシャンであり、日本では自ら考えることのできる研究者が自分で動いているためであると説明されている。

しかしながら、科学技術の進歩は限られた実際法にだけ頼ることを許さなくなっている。場合によっては、今まで形態をやってきた研究者が分子レベルの仕事を始めなければならないケースや、また逆のケースもありうる。そのような場合、いかに有能な研究者であっても新しい技法の習得にかなりの時間を費やすであろう。しかし、哺乳類の発生工学をやる立場に立たされた研究者に技術的な隘路を解消してくれる実に有用な実験書が出版された。それが本書である。

この書物は上記の意味では純然たる実験マニュアルとして書かれているように見える。すなわち、門外漢の研究者でも、ある程度の基礎知識があり、目的さえはっきりしていれば、すぐにでも実験が始められるように書かれている。序論として、哺乳動物の精子と卵子に関する基礎的な記述があり、次に基本操作篇として滅菌法、培養液の調製法などの基本的な実験操作上の注意と、基本技術篇として精子と卵子の操作法がある。さらに応用技術篇として、キメラ胚の作出や顕微注入法などの高度な技術が解説されている。

本書の特徴はその表題に示すとおり、各章にわかりやすい図が多く使われていることである。実験書の写真の中には往々にして不鮮明なものがある(本書にも多少)が、本書では必ず写真に図解をつけて理解を助けている点、編者の気配りを感じさせる。さらに章末と巻末には資料として、組換え DNA 実験に関する文書、培養液の組成、器具機材の購入先、さらには用語解説までが収められており、実に配慮がゆきとどいている。

これからこの分野に参加しようとする若手研究者は増えることと思われる。そのような若手に、適切な実習コースが与えられる機会が少ない日本の現状において、本書の果たす役割は大きい。(竹内拓司)

(菅原七郎 編, B5判, 350 頁, 8,500 円,)
(学会出版センター刊, 1986年)