キノプロテインの立体構造と機能

外山博英, 足立収生, 松下一信*

ピロロキノリンキノン (PQQ) を補欠分子族とする酵素はキノプロテインと呼ばれる。キノプロテインは比較的広い基質特異性を示すにもかかわらず、位置特異的・立体特異的な反応を触媒する。この性質から、酸化発酵による産業的に重要な物質転換反応に応用されてきているが、これまでこのユニークな酵素群の基質認識機構は不明であった。最近、キノプロテインの立体構造解析が進んで多くの知見が得られ、基質認識機構について議論できるようになってきた。

昨年、英国科学雑誌 *Nature* に PQQ が哺乳動物のビタミンである可能性が報告され、「50 年ぶりの新規ビタミンの発見」としてマスコミにも大きく取り上げられた⁽¹⁾。PQQ は 1979 年に構造決定され、80 年代にすでにビタミンの可能性が取り沙汰されていたことから、この「発見」という報道には違和感があるが、今後の展開が期待される。本稿では、この PQQ がビタミンであるか否かの議論はさておいて、ここ 10 年間で大きな前進があったキノプロテインの立体構造解析について、まとめて解説することにした。なお、PQQ の化学特性と詳しい生理作用などについては別の総説^(2,3)をご覧ください。

Structure and Function of Quinoproteins

*Hirohide TOYAMA, Osao ADACHI, Kazunobu MATSU-SHITA, 山口大学農学部

きたい。

キノプロテインの構造に基づいた分類^(3,4)

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、細胞表層で呼吸鎖と連結して働いてエネルギー生成に関わっている。キノプロテインは、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 をもつキノヘモプロテインともたないキノプロテインに分類することもできる⁽⁴⁾。

PQQ だけを補欠分子族としてもつ可溶性キノプロテインは、二量体もしくはヘテロ四量体のサブユニット構造をとっている。PQQ に加えヘム c をもつ酵素はキノヘモプロテインと呼ばれ、単量体である。

膜結合型酵素は、明確な膜貫通領域があつて PQQ だけをもつ酵素と、キノヘモプロテインサブユニットとチトクロムサブユニットをもつ酵素に大きく分けられる。前者の代表は膜結合型グルコース脱水素酵素 (mGDH)、後者は酢酸菌由来のアルコール脱水素酵素 (ADH III) である。

図1 ■キノプロテインのアミノ酸配列と立体構造の模式図

キノプロテインの特徴である「W-blade」, チトクロムドメイン, 膜貫通領域を四角形で, ループ構造をその下の太い線で表わした。環状ジスルフィド結合をCCで, qADH間で特に構造が異なる図2で示した領域をS1とS2で表わした。

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。図1に模式的に示したアミノ酸の繰り返し配列 ABCD の D に相当する。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立体構造上の特徴であると考えられている。この配列がマウスゲノム中の機能未知の遺伝子に見つかり, PQQ 依存性の酵素ではないかと報告され, 新規ビタミンが発見されたと報道されたのは上述の通りである。

可溶性キノ(ヘモ)プロテインの立体構造

現在までに6つのキノプロテインのX線結晶構造が明らかにされている(図2)。上述のTrp-モチーフを含む領域はアミノ酸配列の相同性が高く, X線結晶構造解析で明らかになった立体構造でも非常によく似ている。繰り返し配列 W1~W8 は, β シート4つがねじれた逆平行のシートを形成していて(“W”の形の「プロペラの羽」ということで「W-blade」と呼ぶ), W-blade が8枚集まって樽状の構造を形成している(superbarrel構造, 図2参照)。Trp-モチーフは「羽」の一番外側で, barrel構造の周りを取り囲むように位置している。可溶性グルコース脱水素酵素(sGDH)はsuperbarrel構造ではあるがW-bladeが6枚で構成されていて, Trp-モチーフもあまり明確ではなく, 他のキノプロテインとアミノ酸配列上の相同性もほとんどない。

PQQはこのsuperbarrel構造の真ん中に位置している(図2)。キノプロテイン・アルコール脱水素酵素

(qADH) では, PQQの下にはトリプトファン残基があり, 上には隣り合った2つのシステイン残基がジスルフィド結合した8員環(環状ジスルフィド結合)があって, 上から押さえつけるような構造をとっている⁽³⁾。このPQQ結合様式は, 立体構造が明らかでないqADHに関してもアミノ酸配列から保存されていると推測されるが, グルコースなどアルコール以外の基質を酸化するキノプロテインには保存されていない(図1)。PQQの平面に対して水平方向の結合に関与しているアミノ酸残基も, qADHの間ではよく保存されているのに対して, sGDHでは保存されておらず, しかも酵素タンパク質と結合するPQQの面が他の酵素の場合と逆転している(図3)。いずれの酵素もカルシウムイオンがPQQと結合していて活性に必要である。qMDHではストロンチウムイオンやバリウムイオンに置き換えても活性がある⁽³⁾。

可溶性キノプロテインの構造

メタノール脱水素酵素⁽³⁾(qMDH)は最もよく研究されたキノプロテインであり, メタノールを唯一の炭素源として生育できるグラム陰性細菌から得られる。メタノールに対して高い親和性を示し, 他の低分子のアルコールとも反応するが親和性が低い。大小2つのサブユニット2組から構成される。

エタノール脱水素酵素⁽⁵⁾(qEDH)は, シュードモナスなどの酸化細菌がエタノールで生育するときに誘導生産する酵素で, qMDHと構造や酵素化学的性質が似ているが, ホモ二量体であり, メタノールにはあまり反応せ

図 3 ■ PQQ 結合に関わるアミノ酸残基
 qADH間では結合に関わるアミノ酸残基はよく保存されている。sGDHでは結合に関わるアミノ酸残基は異なっていて、PQQが裏返っている。

ず、エタノールなどの炭素鎖の短いアルコールとよく反応する。活性中心に存在するカルシウムイオンに加えて、サブユニット中にもう1つ別のカルシウムイオンをもつ。*Stenotrophomonas maltophilia* から報告されたポリプロピレングリコール脱水素酵素⁽⁶⁾や*Pseudomonas butanovora* のブタノール脱水素酵素 (BOH)⁽⁷⁾、*Pseudomonas putida* の ADH I⁽⁴⁾ も同様の酵素と考えられる。

Pseudogluconobacter saccharoketogenes の L-ソルボースから 2-ケト L-グルコン酸を生産する酵素⁽⁸⁾ (ADH-PS) が、qMDH や qEDH と似たアミノ酸配列をもつサブユニット (65 kDa) 2 つの二量体酵素であることが報告されている。この酵素は糖アルコールよりも 1 級アルコールや 2 級アルコールとの反応性が高いが、qADH に特徴的な環状ジスルフィド結合はない (図 1)。別に報告されたソルボース・ソルボソン脱水素酵素⁽⁹⁾ は異なるサブユニット (64.5 kDa, 62.5 kDa) の二量体であるが、似た基質特異性をもつことから、アミノ酸配列はまだ明らかではないものの同等の酵素と思われる。

sGDH⁽¹⁰⁾ はすでに述べたように、他のキノプロテインとは構造が大きく異なり、さらに W-blade の 2 つ (W3 と W4) には大きなループ構造が挿入され (図 1, 2)、PQQ の結合する面が他の酵素の場合と逆転している (図 3)。PQQ の 5 位のカルボニル基と H144 が最初のプロトン引き抜きに重要であることが推測されている。血糖値測定用の診断酵素として、グルコースオキシダーゼに代わり普及し始めている。

可溶性キノヘモプロテインの構造

この種類の qADH をタイプ II qADH と呼ぶ。*Comamonas testosteroni* の qhEDH のアミノ酸配列が最初に決定され、結晶構造解析がなされた⁽¹¹⁾。また、中鎖アルコールを資化する *P. putida* が炭素源とするアルコールに応じて 3 種類の異なる qADH を生産し、そのうち 2 つはタイプ II qADH であることを筆者らは明らかにし、ブタノールなどの中鎖アルコールで誘導生産されるものを ADH IIB、1,2-プロパンジオールやグリセロールで誘導生産されるものを ADH IIG と名づけた⁽⁴⁾。もう 1 つはエタノールで誘導生産され、上述の qEDH と同様の酵素で ADH I と呼んでいる。最近、ADH IIB、ADH IIG の構造遺伝子をクローニングしてアミノ酸配列を決定し、同時に X 線結晶構造を明らかにした⁽¹²⁾ (ADH IIG のデータは未発表)。それら 3 つのタイプ II qADH の全体構造は互いによく似ていて、立体

的に分離された PQQ ドメインとチトクロムドメイン、そしてそれらをつなぐヒンジ部分からなっている (図 2)。PQQ ドメインは上述の MDH や qEDH とよく似ている。しかし、赤色と青色で示した領域はこれらの酵素の立体構造上で異なっており、他のアミノ酸配列の明らかなタイプ II qADH である *P. butanovora* のブタノール脱水素酵素 (BDH)⁽⁷⁾ や *Ralstonia eutropha* のテトラヒドロフルフリルアルコール脱水素酵素⁽¹³⁾ でもアミノ酸配列上で相同性が低く、さらにアミノ酸残基数もそれぞれ異なっている。この領域にあるアミノ酸残基は、これらの酵素の基質特異性を決定する上で重要な役割を果たしていると考えられる。この点については後でもう一度議論する。

可溶性キノヘモプロテインには人工高分子化合物を基質として分解する酵素がいくつか知られている。ポリビニルアルコール脱水素酵素⁽¹⁴⁾ (PVA-DH) はキノヘモプロテインであるが、タイプ II qADH とは異なりヘムドメインが N 末端側にある (図 1)。また、環状ジスルフィドが他の qADH で見られるような W1 と W2 の間のループには存在せず、W3 の β シート B と C の間にある。それらが qADH のものと同じような 8 員環構造を構成し PQQ の上部にあるかどうかは明らかでない。ポリエチレングリコール脱水素酵素にキノヘモプロテイン型のものが知られているが⁽¹⁵⁾、そのアミノ酸配列はまだ明らかではないので、ドメイン構造が PVA-DH 様であるのか、タイプ II qADH 様であるかはわからない。

ルパニン水酸化酵素⁽¹⁶⁾ は、植物アルカロイドであるルパニンのイミノ基を酸化する脱水素酵素で、その酸化反応の結果形成された 2 重結合が水解されてルパニンが水酸化される。アミノ酸配列は ADH IIB や qhEDH と比較的高い相同性を示す (同一アミノ酸残基が 40% 程度) が、PQQ 結合に関わるアミノ酸基の半分が保存されておらず、また環状ジスルフィド結合もない。

膜結合型キノプロテインの構造⁽¹⁷⁾

mGDH はプロテオバクテリア中に比較的広く分布しているが、その他の膜結合型酵素はほとんどが酢酸菌にのみ存在する。これらの酵素は、X 線結晶構造解析に基づく立体構造については現在までのところ明らかではないが、アミノ酸配列の明らかなキノプロテインがいくつか知られているので、それらの構造についてもまとめてみた。

mGDH は上述の sGDH とはまったく異なる酵素で

ある。大腸菌ゲノム中にも本酵素遺伝子が存在するが、大腸菌はPQQ生合成系がないため補欠分子族をもたないアポ型のmGDHを生産する。PQQが外から与えられれば、この酵素が働いてグルコースを酸化し、酸化生成物のグルコン酸を取り込み利用する代謝系が働くことが明らかにされている。酵素活性発現には、カルシウムイオンではなくマグネシウムイオンが必要である。qADH間ではカルシウム結合に関与するアミノ酸残基はよく保存されている(図3)が、相当する部分のアミノ酸配列の相同性はmGDHでは低い。mGDHとアミノ酸配列上相同性が高いキノ酸脱水素酵素(QDH)も報告されている⁽¹⁸⁾。N末端領域に5つの膜貫通領域をもち、残りのアミノ酸配列(PQQドメイン)は他のキノプロテインとの相同性が比較的高く、Trp-モチーフも8個ある(図1)。アミノ酸配列の相同性から、PQQの下部にはqADHと同じようにトリプトファン残基(W404)があると予想されるが、qADHに見られた環状ジスルフィド結合に相当する部分のアミノ酸配列にはシステイン残基(C265)が1つだけで、PQQの上部には環状ジスルフィド結合はない。活性中心のモデル構造が提唱されている⁽³⁾が、その構造ではH262がPQQの上部のアミノ酸残基とされている。膜貫通領域にユビキノロン反応部位があると予想されていたが、膜貫通領域を取り除いても細胞膜に結合し、しかもユビキノロンと反応できるので、PQQドメイン中にユビキノロン反応部位が存在していることが示された⁽¹⁹⁾。

膜結合型D-ソルビトール脱水素酵素は、*Gluconobacter*属酢酸菌に広く見られる、いわゆる膜結合型グリセロール脱水素酵素と同じ酵素であり、比較的広い基質特異性をもち、多くの糖アルコールを酸化する。しかし、立体特異性と位置特異性が高く、1級水酸基に隣接した2つの2級水酸基がエリスロ配位をとっている糖アルコールの2位を酸化してケトースを生産する、いわゆるベルトラン-ハドソン則に従う。この酵素は、現在工業化されているビタミンCの化学的製造過程において唯一取り入れられている酸化発酵で、D-ソルビトールからL-ソルボースへの特異的転換過程に働いている。アミノ酸配列はmGDHと高い相同性を示すが、膜貫通領域とPQQドメインが2つのサブユニットとして別々の遺伝子にコードされていた⁽²⁰⁾。PQQサブユニット(SldA)は他のキノプロテインとも相同性を示す(図1)。最近筆者らは、この酵素がグルコン酸をも基質とすることができ、5-ケトグルコン酸を生産することを示した⁽²¹⁾。5-ケトグルコン酸はビタミンCや酒石酸の原料となる物質であり、この酵素を利用した酸化発酵でこの

物質を安定的に供給できることが明らかとなった。

膜結合型キノヘモプロテイン・アルコール脱水素酵素の構造^(4,17)

酢酸菌がアルコールから酢酸を生産する、酢酸発酵に関わるアルコール脱水素酵素をADH IIIと呼んでいる。ADH IIIは、PQQとヘムcを有する脱水素酵素サブユニット、3つのヘムcを有するチトクロムサブユニット、そしてシャペロン様の働きが予想されている小サブユニットから成り、前二者の構造遺伝子はオペロンとなっているが、小サブユニット遺伝子はゲノム中の別の位置に存在している。しかし、これが欠損するとアルコール脱水素酵素活性が消失することが示され、ADH IIIの活性発現に必須である。精製した酵素は通常3サブユニットであるが、小サブユニットのない2サブユニット精製酵素も報告されている。細胞膜結合型のこの酵素は、酢酸菌以外の微生物には見つかっていない。

ADH IIIは細胞膜に強く結合していて、可溶化剤を使ってはじめて細胞膜から取り出すことができるが、3つのサブユニットにはいずれも、アミノ酸配列中に膜貫通領域となり得るような疎水性アミノ酸残基の集まった明確な膜結合領域が見られない。この酵素のチトクロムサブユニットを生産できない酢酸菌は、脱水素酵素サブユニットと小サブユニットの複合体を膜に結合しない可溶型で生産するので、チトクロムサブユニットを介して細胞膜へ結合していると考えられ、結合に関わる両親媒性の α ヘリックスの存在が推定されている⁽¹⁷⁾。チトクロムサブユニットは酢酸菌の他の膜結合型酵素(アルデヒド脱水素酵素、FAD-ソルビトール脱水素酵素、グルコン酸脱水素酵素など)にも見られ、30%程度のアミノ酸配列の相同性がある。それらは必ずしもキノプロテインではなく、ユビキノロン還元活性など共通した機能を担っていると考えられることから、それらの構造も興味深い。

ADH IIIの脱水素酵素サブユニットは、タイプII qADHとアミノ酸配列の相同性が高く(図1)、立体構造も似ていることが予想されるが、図2で赤色と青色で示した領域に相当するアミノ酸配列はやはり相同性が低い⁽⁴⁾。

キノプロテインADHの基質認識機構

結晶構造が明らかにされた6つの可溶性キノプロテインのうち、5つはqADHであり、さらに3つのタイプII qADHでは活性中心に反応生成物もしくは基質が結

図 4 ■ 活性中心の構造

活性中心付近のアミノ酸残基を spacefill model で、PQQ はオレンジ色で表わした。基質または生成物は ball-stick model で、活性中心の天井を形成するアミノ酸残基は stick model で表わした。上段：qMDH では W540 (紫色) が活性中心の容積を小さくして、qEDH では対応するアミノ酸残基はなく空間が開いている。中段：(右から順に) ADH IIB のアセトン、1-ヘキサノール、2-ヘキサノールとの複合体の構造。F425 と F378 (緑色) が後者 2 つでは外側に押されて移動している。下段：qhEDH にはテトラヒドロフルフリルカルボン酸が、ADH IIG には 1,2-プロパンジオールが結合している。

合していたため、基質認識の構造的解釈が格段に進んだ。それらの結合様式とそれぞれの酵素の基質特異性の違いを比較すると、基質特異性を規定するアミノ酸残基を決定できると考えられる。3つのタイプ II qADH はいずれも炭素数 4~8 の直鎖 1 級アルコールによく反応し、同時に強い基質阻害が見られる。いずれも S-(+)-2-ヘキサノール、S-(+)-2-オクタノールなど 2 級アルコールの S 体が R 体に比べよりよい基質となる。

ADH IIB の活性中心に結合していたアセトンは、オルトキノン部の真中にカルボニル基の酸素を置くような形で結合し、qhEDH の活性中心に見られたテトラヒドロフラン-2-カルボン酸は、カルボキシル基の酸素の 1 つを PQQ の 5 位のカルボニル基の上に置き、環構造を Y390 のほうへ伸ばしたような形で結合していた (図 4)。ADH IIG には基質の 1,2-プロパンジオールが、2 位の水酸基を PQQ の 5 位のカルボニル基に向け、1 位の水酸基を PQQ の 4 位のカルボニル基に向けた形で結合していた。最近筆者らは、ADH IIB の結晶をアルコール基質でソーキングすることで、ADH IIB の基質-

酵素複合体の X 線結晶構造解析に成功した (未発表データ)。1-ヘキサノールや 2-ヘキサノールでは、ほとんどのアミノ酸残基には変化はなかったが、F425 と F378 が活性中心から外側へ押し出されるように移動していた (図 4)。さらに 2-ヘキサノールの場合、S 体が活性中心にとどまっていた。図のように PQQ を見下ろした場合、qhEDH の場合と同様長い炭化水素鎖は右側の F378 のほうへ伸びていた。qMDH では W540 (図中で紫色のアミノ酸残基) が、qEDH では A553 がその空間を制限している。ADH IIG では F387 と W388 がその空間を埋めている。活性中心の容積を計算すると、MDH や qEDH は $18 \text{ \AA}^3$ や $62 \text{ \AA}^3$ と小さく、ADH IIB や ADH IIG では $120 \text{ \AA}^3$ や $150 \text{ \AA}^3$ と大きい。qMDH がエタノールなどと反応しにくいのは、活性中心の容積が小さく、メタノールより大きい基質が入りにくいからである。qEDH がメタノールと反応しにくい理由は、活性中心の容積が大きくメタノールを PQQ と反応できる位置に固定できないからと考えられる。

qMDH では L556、qEDH では W 557 が活性中心の

天井となっている。これらの残基が基質の出入りの際に回転または移動することが予想されている。タイプ II qADH の活性中心の天井を形成している残基 (ADH IIB の F419, F425, qhEDH の W440, F606, ADH IIG の Y440, F546) と、図 4 の右側にある緑色の残基 (ADH IIB の F378, qhEDH の Y390, ADH IIG の W388) は、各酵素で異なっている。これらのアミノ酸残基は、F606 以外はすべて、各酵素でアミノ酸配列の相同性の低い部分のループ (S1, S2) にある。ヘムドメインは、それら天井を形成するアミノ酸残基のさらに上についていて、しかも qhEDH の F606 はヘムドメインの中にある。このことと PQQ とヘムの 2 面角の違いとをあわせて考えると、基質酸化部位の酵素反応過程での変化が直接伝わり、ヘムドメインが動くことを想像させる。

*

酸化発酵とは、酢酸菌などの酸化細菌が、基質の不完全酸化反応を触媒して中間代謝産物を大量に培地中に蓄積する、有機化合物の微生物変換のことである。アルコールや乳酸などを生産するいわゆる発酵とは異なり、空気酸素を消費して反応が進行する。一方向の反応でキノプロテインが重要な役割を演じている。特に酢酸菌には多くのキノプロテインが細胞膜の外表層に存在しており、また酸化生成物を資化する能力が低くほぼ 100% の転換率が得られることから、多くの工業的に重要な微生物変換に利用されている⁽²²⁾。

前述のように、キノプロテインの特徴として、比較的広い基質特異性を示す一方で、異性体に対する位置特異的・立体特異的な酸化反応をすることが挙げられる。基質に対する親和性は低い、酸化発酵で大量の物質を転換させる上では問題はない。精製酵素を使って異性体の分離などにも応用できる。それら反応の特異性はキノプロテインの活性中心の特異な立体構造に起因するものであり、立体構造を理解することで、それを基にして望み通りの特異性と反応性を付与することが可能になるだろう。残念ながら、多くの工業的に有用なキノプロテインは膜結合型であるために取り扱いが難しく、まだ X 線結晶構造解析に基づく立体構造は明らかにされていない。一方で、前述のように可溶性のキノプロテインは立体構造も、基質認識機構も明らかになってきた。図 1 や図 2 に示すように、PQQ を補欠分子族とするキノプロテインには共通した立体構造 (superbarrel 構造) があることが示され、その構造からはずれて伸長しているループ部分が基質特異性を決定するのに重要であることも明らかとなってきた。mGDH の例で示されたように、

アミノ酸配列から活性中心のモデル構造を構築することも可能となってきた。基質特異性を自由に改変し望み通りの反応性が与えられることも近い将来可能になるであろう。

文献

- 1) T. Kasahara & T. Kato : *Nature*, **422**, 832 (2003).
- 2) 足立収生 : ビタミン, **75**, 355 (2001).
- 3) P.M. Goodwin & C. Anthony : *Adv. Microbial Physiol.*, **40**, 1 (1998).
- 4) H. Toyama *et al.* : *Arch. Biochem. Biophys.*, in press (2004).
- 5) T. Keitel *et al.* : *J. Mol. Biol.*, **297**, 961 (2000).
- 6) S. Tachibana *et al.* : *FEMS Microbiol. Lett.*, **218**, 345 (2003).
- 7) A. Vangnai *et al.* : *J. Bacteriol.*, **184**, 1916 (2002).
- 8) T. Shibata *et al.* : *J. Biosci. Bioeng.*, **92**, 524 (2001).
- 9) A. Asakura & T. Hoshino : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 46 (1999).
- 10) A. Oubrie & B.W. Dijkstra : *Protein Science*, **9**, 1265 (2000).
- 11) A. Oubrie *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **277**, 3727 (2002).
- 12) C.-W. Chen *et al.* : *Structure*, **10**, 837 (2002).
- 13) G. Zarnt *et al.* : *J. Bacteriol.*, **183**, 1954 (2001).
- 14) M. Shimao *et al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 1056 (1996).
- 15) M. Yasuda *et al.* : *FEMS Microbiol. Lett.*, **138**, 23 (1996).
- 16) D. Hopper *et al.* : *Biochem. J.*, **367**, 483 (2002).
- 17) 山田 守, 松下一信 : 生化学, **71**, 413 (1999).
- 18) D.A. Elsemore & L.N. Ornston : *J. Bacteriol.*, **176**, 7659 (1994).
- 19) M.D. Elias *et al.* : *J. Biol. Chem.*, **276**, 48356 (2001).
- 20) T. Miyazaki *et al.* : *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **66**, 262 (2002).
- 21) K. Matsushita *et al.* : *Appl. Environ. Microbiol.*, **69**, 1959 (2003).
- 22) 足立収生 : バイオサイエンスとインダストリー, **61**, 373 (2003).