Euglena の呼吸代謝機構†

重岡 成, 乾 博*

(近畿大学農学部, *奈良文化女子短期大学)

はじめに

Euglena のミトコンドリアには, 他の動植物と同様にエネルギー代謝系の主要成分すなわち TCA 回路, 電子伝達系, 酸化リン酸化系, 脂肪酸の酸化分解系が存在している^(1,2). さらに *Euglena* は独立栄養的にも従属栄養的にも生育できるため, そのミトコンドリアは動物・植物の両方の性質を持ち合わせている. たとえば動物に特有なビタミン B₁₂ の代謝系を持ち, 一方植物のようなシアン耐性呼吸やグリコール酸代謝系を有している. その反面, *Euglena* のミトコンドリアは独自の代謝系も発達させている. その代表的なものとして, ビタミン B₁ 関与の 2-オキソ酸の脱炭酸反応, ワックスエステル発酵に伴う *de novo* の脂肪酸合成そしてシトクロム c の構造的特徴がある.

ところで *Euglena* 細胞はプロテアーゼ処理してスフェロプラスト化した後, 浸透圧ショックを与えることで容易に多量のオルガネラを単離することができる⁽³⁾. この方法で得られたミトコンドリアは形態的にも機能的にも無傷である. これらのミトコンドリアを用いて種々の生化学的特性が明らかにされている. そこで本稿では, *Euglena* の呼吸代謝系のなかで新しく見出された TCA 回路とそれに関与する ビルビン酸と 2-オキソグルタル酸の酸化反応を中心に比較生化学的に概説したい.

1. 新規の TCA 回路

TCA 回路は物質の同化および異化作用すなわち両方向性代謝経路 (amphibolic pathway) であり, 物質代謝の中心的な役割を担っていることは周知の事実である. したがって生物間においてその構成成分は普遍であり, それらの性質も類似している. しかし *Euglena* の

TCA 回路では 2-オキソ酸の酸化的脱炭酸反応において他の生物とは大きく異なっている. すなわち高等動植物や微生物一般に認められるビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体 (ビルビン酸デヒドロゲナーゼ, リボ酸アセチルトランスフェラーゼ, ジヒドロリポアミドデヒドロゲナーゼ) と, 同様に 3 種の酵素からなる 2-オキソグルタル酸デヒドロゲナーゼ複合体が *Euglena* には存在しない. その代わりに NADP⁺-ビルビン酸デヒドロゲナーゼ (NADP⁺-PDH)⁽⁴⁾ と 2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼ (2-OGD)⁽⁵⁾ が新しく見出された. さらに 2-OGD の生成物であるコハク酸セミアルデヒド (SSA) は, NAD⁺ もしくは NADP⁺ と共役する 2 種のコハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ (SSADH) によりコハク酸に代謝される⁽⁵⁾. かくて, *Euglena* の TCA 回路は一般生物にみられる 2-オキソグルタル酸 (2-OG)→スクシニル CoA→コハク酸の経路ではなく, 2-OG→SSA→コハク酸の経路で進行する. 一方, TCA 回路を形成する他のすべての酵素については *Euglena* においても他の生物と類似した酵素の存在が報告されている. 図 1 に *Euglena* の TCA 回路の全体像を示した.

2. NADP⁺-ビルビン酸デヒドロゲナーゼ

ビルビン酸を酸化的に脱炭酸してアセチル CoA を生成する反応には, 高等動植物や酵母のミトコンドリアではビルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体が機能する. 同様の反応を触媒する酵素として嫌気性細菌や藍藻などには NAD⁺ の代わりにフェレドキシンを電子受容体とするビルビン酸: フェレドキシンオキシドレダクターゼ (ビルビン酸シンターゼ) が存在する. ところで, *Euglena* では NADP⁺ を電子受容体とする酵素 NADP⁺-PDH が見出された⁽⁴⁾. 本酵素は同一のサブユニットからなる 2 量体であり, 分子量は 309 kDa であった⁽⁶⁾. NADP⁺ 以外にメチルビオローゲンなどの人工電子受容体とも反応し, またビルビン酸-CO₂ 交換反応も触媒した. これらの性質はビルビン酸: フェレドキシンオキシドレダク

† Mechanism of Respiration in *Euglena*.
Shigeru SHIGEOKA and Hiroshi INUI* (Faculty of Agriculture, Kinki University, Nara 631;
* Nara Bunka Womens' Junior College, Yamatotakada 635)

図 1 *Euglena* の TCA 回路

(1) ピルビン酸デヒドロゲナーゼ, (2) クエン酸シンターゼ, (3) アコニターゼ, (4) イソクエン酸デヒドロゲナーゼ, (5) 2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼ, (6) コハク酸セミアルデヒドデヒドロゲナーゼ, (7) コハク酸デヒドロゲナーゼ, (8) フマラーゼ, (9) リンゴ酸デヒドロゲナーゼ.

ーゼと類似するものである。しかしながら本酵素はホウレン草および *Clostridium* 由来のフェレドキシンとは全く反応しなかった。また NADPH を電子供与体として人工電子受容体を還元するいわゆるジアホラーゼ活性を示した。なお本酵素にはチアミンピロリン酸 (TPP), FAD および Fe-S クラスターが補欠分子族として見出された。

本酵素反応はキネチックスを詳細に検討し、次のような反応機構を明らかにした⁽⁷⁾。ピルビン酸は TPP を含む触媒サイト 1 で酸化的に脱炭酸され、生じた電子はサイト 1 の Fe-S センターからサイト 2 の FAD に渡される。さらにサイト 2 上で FADH₂ から NADP⁺ に電子が渡され、NADPH が生成する。その後、サイト 1 で CoA が反応しアセチル-CoA が生成する。なおメチルピオローゲンを電子受容体とした場合、電子をサイト 1 の Fe-S センターから直接メチルピオローゲンが受け取ることも示された。

ところで、本酵素はピルビン酸：フェレドキシンオキシドレダクターゼと同様に酸素に対しきわめて不安定である⁽⁶⁾。とくにその酵素反応は酸素非存在下では直線的に進行するが、大気下では数分以内に停止する。しかしながら、本酵素はミトコンドリアに局在し TCA 回路に

関与している。したがって、生体内では安定に存在し機能していると考えられる。一般にピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体はリン酸化、脱リン酸化により活性調節を受ける。ところが NADP⁺-PDH における活性調節機構は知られていない。今後、生体内における本酵素の酸素に対する安定化機構の解明および TCA 回路の代謝調節機構における役割を解明することが課題である。

3. 2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼ

2-OG を *Euglena* のホモジネートと反応させると、TPP, Mg²⁺ イオン依存の脱炭酸反応は認められたが、CoA, NAD⁺ 依存性を示さなかった。そしてこの酵素反応は 2-OG を脱炭酸し、化学量論的に CO₂ と SSA を生成した。したがってこの反応を触媒する酵素を 2-オキソグルタル酸デカルボキシラーゼ (2-OGD) と命名した⁽⁵⁾。2-OGD は分子量 250 kDa であり、62 kDa の同一のサブユニットからなる 4 量体である。本酵素は 2-OG に特異的であり、2-OG, TPP および Mg²⁺ イオンに対する *K_m* 値は 330 μM, 56 μM および 93 μM である。また 2-OGD は NADP⁺ により著しい活性化を受けるが、NADP⁺ 自身は全く変化しない。また抗 2-OGD 抗体を用いポリゾーム上から 2-OGDmRNA を精製し、翻訳後その分子量を求めると 65 kDa であった。またイムノブロットにより、*Euglena* のミトコンドリア画分に 62 kDa, 細胞質画分に 65 kDa のタンパク質バンドを検出した。このことから 2-OGD はミトコンドリア局在において 3 kDa 大きい前駆体として生合成されることがわかった。

TCA サイクル中間体および関連化合物の 2-OGD 活性への影響をみると、グルタミン酸 (Glu) の添加により 2-OGD の著しい活性上昇が認められた。タンパク質合成阻害剤の影響、免疫滴定およびイムノブロットングにより、この増加はタンパク質の誘導によることがわかった。さらに Glu 添加により全 mRNA は増加したが、それに先駆け 2-OGDmRNA が活発に誘導されており、2-OGD が Glu 資化に積極的に機能していることが明らかになった⁽⁸⁾。また、2-OGD は TCA 回路中で唯一の不可逆反応であり、かつ NADP⁺ や生成物の SSA により著しい影響を受けることから、重要な調節酵素として機能していると考えられる。

SSADH は高等動物において、γ-アミノ酪酸の代謝系 (GABA シェント) に関与する酵素として知られている。*Euglena* においても GABA シェントが存在し、

この経路に関与するものとして考えられていた。ところが 2-OGD が発見されたことにより、その生成物である SSA を酸化しコハク酸を生成する SSADH は TCA 回路の一員であることが明らかになった。SSADH は NAD^+ 型と NADP^+ 型ともにマトリクスに局在しており、それらの酵素学的諸性質は詳細に報告されている⁽⁹⁾。なお、 NADP^+ 型酵素は Glu の添加により 2-OGD と同様に著しい誘導を受ける。

4. 呼吸活性

Euglena の電子伝達系および酸化的リン酸化系は基本的には動植物と同じ構成成分からなり複合体 I, II, III および IV の存在が確認されている。ただしシトクロム系はその構造に特徴的な性質を有している(後述参照)。単離ミトコンドリアを用いて各呼吸基質の P/O 比をみると、リンゴ酸:2.2, SSA:2.1, コハク酸:1.8 となる。

Euglena の TCA 回路ではピルビン酸、イソクエン酸, SSA, コハク酸そしてリンゴ酸を酸化する酵素群が電子伝達系および酸化的リン酸化と共役するため、ピルビン酸 1 分子の酸化は合計 14 分子の ATP を生成する。一般の TCA 回路にみられるスクシニル CoA シンターゼによる 1 分子の GTP (ATP) 生成が不足する。したがって、ピルビン酸が二酸化炭素と水に酸化分解される反応の自由エネルギー変化は -273 kcal/mol であるから、*Euglena* TCA 回路におけるこの過程でのエネルギー保存効率率は $14 \times 7.3/273$ すなわち 37.4% となる。

おわりに

以上述べてきたように、*Euglena* のミトコンドリアは 2-オキソ酸デヒドロゲナーゼ複合体を持たず、きわめて特異的な TCA 回路を有している。一般に TCA 回路の形成過程を進化的にみると、この回路はグルタミン酸発酵系(ピルビン酸→クエン酸→イソクエン酸→2-OG→グルタミン酸)とプロピオン酸(コハク酸)発酵系(ピルビン酸→オキザロ酢酸→リンゴ酸→コハク酸→プロピオン酸)の両方が合一したことで形成されたと考えられている⁽¹⁰⁾。したがって生物界において両発酵系の接点となる 2-OG→スクシニル CoA (コハク酸)の経路がつながっていない不完全なものが嫌気性生物(緑色硫黄細菌, 酪酸菌, 硫酸塩還元菌, 紅色硫黄細菌), 藍藻(アナベナ属, アナシスチス属, コッコクロリス属)そして原生動物(赤痢アメーバ, トリコモナス, マラリア病原虫)などに見出されている。一方、他の微生物や高等動植物などでは、2-OG デヒドロゲナーゼ複合体を獲得す

ることにより完全に合一したと考えられる。ところが *Euglena* の場合、本複合体酵素の代わりに 2-OGD を獲得し、さらに一般には GABA ジャントに関与する SSADH の共役のもとに完全系を形成したと考えられる。このような経路を有する生物は他に報告がない。また、ピルビン酸デヒドロゲナーゼ複合体の代わりにおそらく嫌気性生物などに存在するピルビン酸:フェレドキシンオキシドレダクターゼが進化した NADP^+ -PDH を獲得したものと考えられる。これらの事実は *Euglena* のミトコンドリアの起源、さらには進化過程における系統分類学的位置づけを明確にする手掛かりとなるものと思われる。

ところで最近 *Euglena* 細胞内でのミトコンドリアの形態について興味ある報告がある。すなわち *Euglena* の細胞周期においてミトコンドリアは常に 1 細胞当たり 1 個であり網目状 (reticulum form) の枝分かれ構造をとり、そして一時期には網目状が融合してマトリクスが巨大化した構造(巨大ミトコンドリアと呼ぶ)をとるとされている⁽¹¹⁾。これらの形態は *Euglena* だけにとどまらず、他の単細胞生物や動物細胞でも観察されており、生物一般に普遍的に認められるものである可能性がある。したがって今後このような構造形態が、呼吸代謝系などへどのような影響を及ぼすか興味ある問題である。

- (1) D. E. Buetow: "The Biology of *Euglena*," Vol. 4, ed. by D. E. Buetow, Academic Press, New York and London, 1989, p. 247.
- (2) 重岡 成:「ユーグレナ——生理と生化学」, 北岡正三郎編, 学会出版センター, 1989, 印刷中.
- (3) 重岡 成, 中野長久: 遺伝, **40**, 60 (1986).
- (4) H. Inui, K. Miyatake, Y. Nakano and S. Kitaoka: *J. Biochem.*, **96**, 931 (1984).
- (5) S. Shigeoka, T. Onishi, K. Maeda, K. Nakano and S. Kitaoka: *FEBS Lett.*, **195**, 43 (1986).
- (6) H. Inui, K. Ono, K. Miyatake, Y. Nakano and S. Kitaoka: *J. Biol. Chem.*, **262**, 9130 (1987).
- (7) H. Inui, K. Miyatake, Y. Nakano and S. Kitaoka: *Arch. Biochem. Biophys.*, in press (1989).
- (8) 花岡 剛, 重岡 成, 大西俊夫, 村上哲男, 飯塚義富, 貴志徳秀, 中野長久, 北岡正三郎: 生化学, **60**, 925 (1988).
- (9) M. Tokunaga, Y. Nakano and S. Kitaoka: *Biochim. Biophys. Acta*, **429**, 55 (1976).
- (10) 中村 運: 蛋白質 核酸 酵素, **32**, 1019 (1987).
- (11) T. Osafune, S. Tukuda, S. Sumida, T. Ehara and E. Hara: *Proc. Photosynth. Res.*, **4**, 609 (1987).