キノプロテイン依存性ペリプラズミック酸化系[†]

松 下 — 信

(山口大学農学部)

ピロロキノリンキノン (PQQ) が NAD や FAD に
つぐ第三の補酵素として生体の酸化還元反応に関与する
ことが示されて以来, 10 数種類の酵素が PQQ を補酵素
とする酸化還元酵素であることが明らかになっている。
また, この間, 共有結合型の PQQ を含むと考えられて
いたアミン酸化酵素やメチルアミン脱水素酵素 (MA
DH) の補欠分子族が, それぞれチロシン誘導体である
トーパキノン⁽¹⁾と2つのトリプトファンが重合してで
きるトリプトフィルトリプトキノン (TTQ)⁽²⁾であるこ
とが示されている。PQQ 自身もチロシンとグルタミン
酸から生合成されると示唆されている⁽³⁾ので, 現在では
これらの補酵素はすべてアミノ酸誘導体キノン化合物と
統一的に考えられている。それゆえ, PQQ を含め, これ
らの補酵素を含む酵素をキノプロテインと総称できる。

これまでに知られているキノプロテインはアミン酸化
酵素やリジル酸化酵素などを除いて, そのほとんどは原
核生物起源であり, しかも, 共通してすべてグラム陰性
細菌のペリプラズムに存在している。現在までのところ
キノプロテインはグラム陽性細菌やグラム陰性細菌の細
胞質には見つかっていない。これらのキノプロテイン
は, グラム陰性細菌の細胞表層において, 細胞質膜に存
在する呼吸鎖と連結し酸化系呼吸鎖を構成して機能して
いる。

ここでは, キノプロテインがペリプラズムと細胞質膜
のペリプラズム面に構築している“ペリプラズミック酸
化系”の構造と機能の特徴について述べる。

1. ペリプラズムの構造と機能

ペリプラズムはグラム陰性細菌の外膜と細胞質膜 (内
膜) とに囲まれた空間と定義され, “periplasmic space”

という言葉に示されるように, そこにはペプチドグリカ
ンが存在する以外にはそれほど多くの成分はなく, 重要
な機能を持たないと考えられてきた。事実, 近年になる
までペリプラズムに存在する酵素およびタンパク質とし
て研究がすすめられていたのは, アルカリ性ホスファ
ターゼや β -ラクタマーゼなどの分解系の酵素とか膜輸送
や走化性に関与する結合タンパク質などに限定されてい
た。このように, ペリプラズムの機能がそれほど重視さ
れなかった背景には, ペリプラズムを取り出すことの技
術的な困難さが影響していたようにも思われるが, また
部分的にはその機能のあまり発達していない腸内細菌の
研究が他を圧していたという微生物学の歪んだ発展と無
関係ではないように思われる。

しかしながら, 近年, ペリプラズムはグラム陰性細菌
の機能の一端を担う重要なコンパートメントであること
が認識され始めてきた。特に, チトクロム成分をはじめ
数多くの電子伝達反応に関与するタンパク質がこの領域
に存在することが示されてきている⁽⁴⁾。また, このペリ
プラズムの“大きさ”についても議論が盛んで⁽⁵⁾, 外膜
と内膜に挟まれたペリプラズム領域の幅 (10 nm から
50 nm) やその容積が細菌細胞全体に占める割合 (10%
から 30%) について意見に相違があるものの, ペリプラ
ズムは以前考えられていたよりはるかに大きな領域を占
めているという点で一致している。

2. ペリプラズミック酸化系

このペリプラズムがいくつかの細菌の代謝上で決定的
に重要な機能を担っていることが, 酢酸菌を中心にした
酸化細菌, メチロトロフおよび化学合成独立栄養細菌
の種々の酸化系の生化学的な研究から明らかになってき
ている。酢酸菌や *Pseudomonas* 属菌などの酸化細菌の
ペリプラズムでは, グルコース, グルコン酸, グリセ
ロール, ソルビトール, さらにアルコールやアルデヒドな
どの種々の糖質の酸化反応が行われている⁽⁶⁾。これらの
糖質酸化系のうち, グルコース酸化系は大腸菌など広範

[†] Quinoprotein-dependent Periplasmic Oxidase System.

Kazunobu MATSUSHITA (Department of Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753)

表 1 キノプロテイン依存性ペリプラズミック酸化系

酸化系	酸化還元酵素	補欠分子族	電子受容体	末端オキシダーゼ	細 菌
メタノール	MDH	PQQ	チトクロム c_L	チトクロム aa_3 チトクロム co	メチロトロフ
メチルアミン	MADH	TTQ	アミシアニン	チトクロム aa_3	メチロトロフ
アルコール	Type I ADH	PQQ	チトクロム c_{551}	チトクロム co	<i>Pseudomonas</i> 属細菌
	Type II ADH	PQQ/heme c	?	チトクロム co	<i>Pseudomonas</i> 属細菌 <i>Comamonas</i> 属細菌
	Type III ADH	PQQ/heme c	ユビキノン	チトクロム o チトクロム a_1	<i>Gluconobacter</i> 属酢酸菌 <i>Acetobacter</i> 属酢酸菌
グルコース	GDH	PQQ	ユビキノン	チトクロム o	グラム陰性菌全般
アルデヒド	ALDH	PQQ/heme c	?	チトクロム o チトクロム a_1	<i>Gluconobacter</i> 属酢酸菌 <i>Acetobacter</i> 属酢酸菌
グリセロール	GLDH	PQQ	?	チトクロム o	<i>Gluconobacter</i> 属酢酸菌

囲のグラム陰性細菌にも見いだされている。C₁ 微生物であるメチロトロフでのメタノールやメチルアミンの酸化もペリプラズムで行われているよく知られた反応である⁽⁷⁾。また、化学合成独立栄養細菌では、硝化細菌によるアンモニアの酸化、水素細菌による水素の酸化、鉄酸化細菌による鉄や無機イオウ化合物の酸化など、種々の酸化反応がペリプラズムで行われていることが示されてきている⁽⁴⁾。

上述のような酸化細菌の糖質酸化系、メチロトロフのメタノールやメチルアミン酸化系、さらに化学合成独立栄養細菌の無機化合物酸化系は、細胞質内に局在している TCA 酵素系とカップルして機能する NADH 酸化系および細胞質膜の内側に結合する酸化還元酵素と連結して機能するコハク酸酸化系や乳酸酸化系のようないわゆる“細胞質内酸化系”に対応して、“ペリプラズミック酸化系”と定義することができる。

ペリプラズムは外膜と内膜に挟まれたいわゆるペリプラズムとそこに面した細胞質膜の表面との基本的に2つの部位から成っており、ペリプラズミック酸化系はこの2つのペリプラズム部位に存在する酸化還元酵素とさらに細胞質膜に内在する呼吸鎖成分、ユビキノンや末端オキシダーゼ、によって構成されている。

3. ペリプラズミック酸化系とキノプロテイン

これらのペリプラズミック酸化系に関する酸化還元酵素の多くが PQQ および類縁キノン化合物を補欠分子族としている(表1)。古くから研究されている代表的なキノプロテインはメチロトロフのペリプラズムに存在するメタノール脱水素酵素(MDH)と大腸菌など広範なグラム陰性細菌の細胞質膜のペリプラズム側に結合して存在しているグルコース脱水素酵素(GDH)であ

る。また、メチロトロフのペリプラズムには、メチルアミンによって誘導的に生成される MADH も存在する。この酵素は、前述したように補欠分子族として PQQ ではなく、類縁キノン化合物である TTQ を共有結合している。

それらに加え、酢酸菌の細胞質膜には、GDH の他にアルコール脱水素酵素(ADH)、アルデヒド脱水素酵素(ALDH)、およびグリセロール脱水素酵素(GLDH)がキノプロテインとして存在し、糖質酸化系を構成している⁽⁶⁾。この ADH は PQQ 以外にヘム c を補欠分子族として含んでいることで特徴的である。最近、その他の酸化細菌から、酢酸菌の ADH とは異なる水溶性 ADH がいくつか見いだされている⁽⁸⁾。*Pseudomonas* 属から分離された ADH は PQQ だけを補欠分子族とするキノプロテインである(Type I ADH)が、*Comamonas* 属や *Pseudomonas* 属から分離された ADH は、単一ペプチドに PQQ とヘム c を各1分子含んでおり、キノヘムプロテインと呼ばれる特異な構造をしている(Type II ADH)。一方、酢酸菌の膜結合型 ADH(Type III ADH)は、PQQ 1分子とヘム c 1分子を含むキノヘムプロテイン、2分子のヘム c を含むジヘムチトクロム c と機能の不明なサブユニットの3つのサブユニットから成っている。

4. キノプロテイン依存性ペリプラズミック酸化系の構造と機能

キノプロテインを初発脱水素酵素とするペリプラズミック酸化系呼吸鎖の概要が最近明らかになり、基本的に2つの呼吸鎖像が固まりつつある⁽⁹⁾。

MDH と MADH は、メチロトロフのペリプラズムから精製される水溶性のチトクロム c_L と銅タンパク質

図 1 キノプロテイン依存性ペリプラズミック酸化系の呼吸鎖とその局在部位
外膜と細胞質膜に挟まれたペリプラズムもしくは細胞質膜のペリプラズム側にそれぞれ水溶性および膜結合型キノプロテイン (PQQ) が存在している。水溶性キノプロテインはチトクロム *c* (Cyt. *c*) を、膜結合型キノプロテインはユビキノ (Q) を介して末端オキシダーゼに連結している。それゆえ、末端オキシダーゼはそれぞれチトクロム *c* オキシダーゼおよびユビキノールオキシダーゼである。

であるアミシアニオンがそれぞれの電子受容体であることが示されている⁽¹⁰⁾。MDH とチトクロム *c_L* との反応性は *in vitro* では非常に低いため、この酸化系に関しては依然不明瞭な部分が多いが、基本的には MDH はまずチトクロム *c_L* と反応し、それを介してペリプラズムに存在する別のチトクロム *c* へ電子伝達すると考えられる。MADH では、この酵素がアミシアニオンと低イオン強度下で複合体を形成することが示されており、この複合体からチトクロム *c* へ電子伝達されることが明らかになっている。Type I と Type II の ADH も同様な機構で機能していることが最近明らかになってきており、これらの水溶性キノプロテインはすべてペリプラズムに遊離した状態でのおおのの電子受容体と相互作用しながら存在し、同様にペリプラズムに遊離しているか、もしくは細胞質膜表面に軽く結合した状態のチトクロム *c* を介して、細胞質膜に内在する末端オキシダーゼのペリプラズム側の部位へと電子伝達していると考えられる (図 1)。

一方、これらの水溶性のキノプロテインと膜結合型である GDH や Type III ADH とは多少様子が異なっている。これらの膜結合型キノプロテインは、上述の MDH や MADH とは異なり、短いイソプレノイド鎖を持つユビキノ類縁体と反応することができるだけでなく本来のユビキノとも適当な界面活性剤で可溶化してやれば十分に反応できる。さらに、GDH や Type III

ADH で構成されるグルコース酸化系やアルコール酸化系は人工膜小胞へ再構成することができる。膜結合型 GDH はどれも、ユビキノを含むリン脂質に末端オキシダーゼであるチトクロム *O* とともに組み込むことで細胞膜に匹敵するグルコース酸化活性を示す人工膜小胞を形成することができる⁽⁹⁾。酢酸菌の ADH も、GDH と同様に、ユビキノそして末端オキシダーゼとともに人工膜小胞に再構成されると、エネルギー生成能を有するエタノール酸化活性を示すことができる⁽¹¹⁾。このようにして、膜結合型キノプロテインはペリプラズム側から細胞質膜に挿入した型で存在し、その中でユビキノに直接電子を渡し、生じたユビキノールが次に末端オキシダーゼによって酸化されることで酸化系全体が構築されていると考えられる (図 1)。

これらのキノプロテイン依存性ペリプラズミック酸化系では、水溶性のキノプロテインと膜結合型キノプロテインに対応して、末端オキシダーゼはそれぞれチトクロム *c* オキシダーゼ (チトクロム *aa₃* もしくはチトクロム *co*) とユビキノールオキシダーゼ (チトクロム *o* もしくはチトクロム *a₁*) であるが、この部位が唯一のエネルギー生成部位である。しかし、これらの末端オキシダーゼは必ずしもペリプラズミック酸化系に独占的に働くものではない。事実、*Acetobacter methanolicus* では、チトクロム *c* オキシダーゼがメタノール酸化系に、ユビキノールオキシダーゼが細胞質内酸化系にと機能分担されて

いる⁽¹²⁾.

5. おわりに

これらのキノプロテインの関与するペリプラズミック酸化系は他の細胞質内酸化系に比べて短絡的である。これは、キノプロテインが他の FAD 酵素や NAD 酵素と比べてその酸化還元電位が高いことと関係していると思われる。また、これらのキノプロテインがすべてペリプラズムに面して機能していることは、これらの酵素の基質がエネルギー消費的な細胞質内への膜輸送を必要としないことを意味している。このようなペリプラズミック酸化系の局在部位や短絡的構成とそのエナジェテックスは、この系が急速で大量の糖質の酸化を行うことに適応していることを示唆している。

- (1) S. M. Janes, D. Mu, D. Wemmer, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. L. Burlingame, and J. P. Klinman : *Science*, **248**, 981—987 (1990).
- (2) W. McIntire, D. E. Wemmer, A. Christoserdov, and M. E. Lidstrom : *Science*, **252**, 817—824 (1991).
- (3) D. R. Houck, J. L. Hasnners, and C. J. Unkefer : *J. Am. Chem. Soc.*, **113**, 3162—3166 (1991).

- (4) S. J. Ferguson : in "Bacterial Energy Transduction," ed. by C. Anthony, Academic Press, Inc., pp. 151—182 (1988).
- (5) J. E. Van Wielink and J. A. Duine : *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 136—137 (1990); S. J. Ferguson : *Trends Biochem. Sci.*, **15**, 377 (1990); L. L. Graham, T. J. Beveridge, and N. Nanninga : *Trends Biochem. Sci.*, **16**, 328—329 (1991).
- (6) 飴山 實 : 微生物, **4**, 21—31 (1988).
- (7) C. Anthony : in "The Biochemistry of Methyloprophs," ed. by C. Anthony, Academic Press, Inc., pp. 204—209 (1982).
- (8) 外山博英 : 醸酵工学会誌, **70**, 222—223 (1992).
- (9) K. Matsushita and O. Adachi : in "Principles and Applications of Quinoproteins," ed. by V. Davidson, Marcel Dekker, Inc., pp. 47—63 (1992).
- (10) C. Anthony : in "Bacterial Energy Transduction," ed. by C. Anthony, Academic Press, Inc., pp. 302—305 (1988).
- (11) K. Matsushita, Y. Takaki, E. Shinagawa, M. Ameyama, and O. Adachi : *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 304—310 (1992).
- (12) K. Matsushita, K. Takahashi, M. Takahashi, M. Ameyama, and O. Adachi : *J. Biochem.*, **111**, 739—747 (1992).