PQQ と PQQ 酵素の電気化学的酸化還元反応と バイオセンサーへの利用†

加納 健司*, 池田 篤治**

(*岐阜薬科大学薬学部, **京都大学農学部)

1. はじめに

1979 年に、酸化還元補酵素ピロロキノリンキノン (PQQ) が発見されて以来、PQQ あるいは PQQ 類似のキノン化合物や PQQ 酵素の研究が活発に行われた^(1,2). さらに最近になって、6-ヒドロキシドーパ (TOPA)⁽³⁾ をはじめとする新規酵素活性中心構造が次々と報告され、PQQ 関連化学の新たな展開がなされている. こうした酵素は基本的に生体内酸化還元反応に関与していることから、その補酵素あるいは活性中心の酸化還元反応を熱力学的に理解すること、さらにはこうした酵素の電子移動を理解することは非常に重要である. 本稿では、これらの問題に関して電気化学の手法を用いるとどのようなことがわかるのかを、著者らの研究を中心に紹介したい. また PQQ 酵素の酵素-電気化学反応に基づく新しいタイプのバイオセンサーについてもふれたい.

2. PQQ および TOPA の酸化還元反応

電気化学的に可逆波が得られる場合には、a) 酸化還元電位の測定はもとより、b) 電子移動に伴うプロトン数の測定、c) 酸化体と還元体の酸解離定数の測定、d) 錯体生成定数の測定ができる. さらに条件によっては e) 電子移動反応機構等の考察もできる. こうした目的に対してサイクリックボルタンメトリー (CV 法) は、簡便で、汎用される手法のひとつである. PQQ の電極反応は、その電子移動が遅く、可逆なサイクリックボルタモグラム (CV 波) を得ることが困難とする報告が多いが、水銀電極、あるいはよく磨いた固体電極では可逆

的な波を得ることができる⁽⁴⁾. 図 1 の実線に、こうして得られた PQQ の酸化還元電位の pH 依存性を示す. PQQ は pH 4.5~8.5 の範囲で 2 プロトン移動を伴う 2 電子移動することがわかる. 一方、PQQ は 3 つのカルボン酸とピリジン骨格を有するうえ、キノン部の水和反応に伴う疑似酸解離も関与しているため、全解離平衡の分光学的解析は困難であった. しかし、図 1 の結果より、スキーム 1 のような酸化体および還元体の酸解離定数を決定することができた⁽⁴⁾.

また、CV 波形の理論的解析により、本 2 電子反応は 2 段階 1 電子反応であることが示された⁽⁴⁾. そして、pH 7.0 ($E^{\circ'}=0.066$ (0.090⁽⁵⁾) V vs. NHE) では、第 1 と第 2 酸化還元電位が 100 mV 以上逆転しているのに対して、pH 13.0 ($E^{\circ'}=-0.239$ (-0.230⁽⁵⁾) V vs. NHE) では、その逆転はわずか 5 mV で、セミキノン中間体ラジカルが高 pH 側で安定化されている. また、そのセミキノンラジカルの水酸基の pK_a ($pK_{a,s}$) も 8.7 と評価でき、その値は ESR 的挙動とよく一致する⁽⁴⁾. ただし、パルスラジオリソンスを用いた間接的測定では、pH 7.0 での電位逆転は、430 mV にも及び、 $pK_{a,s}$ は 6.8 (と 4.6) と報告されている⁽⁶⁾. いずれにしても中性条件下で、遊離 PQQ のセミキノン体の存在は無視しうるほど小さい.

一方、TOPA も可逆な CV 波を与えることがわかった⁽⁷⁾. 図 1 の破線は、この酸化還元電位の pH 依存性を示す. 興味あることに、pH 7.0 での TOPA の酸化還元電位 ($E^{\circ'}=0.079$ V vs. NHE) は、PQQ のそれにはほぼ等しい. ただし、TOPA は、pH 4~9.5 では 3 プロトン移動を伴う 2 電子移動である. 電気化学的に求めたこの酸解離平衡はスキーム 2 で表される⁽⁸⁾. また、セミキノン中間体の一方の水酸基の pK_a は 12.1 となった. ESR の挙動もこれらの値から理解できる⁽⁸⁾. ここで、

† Electrochemical Redox Reactions of PQQ and PQQ Enzymes and Their Use as Biosensors. Kenji KANO* and Tokuji IKEDA** (*Department of Manufacturing Pharmacy, Gifu Pharmaceutical University, Gifu 502; **Department of Agricultural Chemistry, Kyoto University, Kyoto 606)

図 1 PQQ (実線) および TOPA (破線) の酸化還元電位の pH 依存性 (↓および↑はおのおの酸化体および還元体の pK_a を表す). 縦軸の電位は飽和カロメル電極基準の値; 0.241 ボルトを加えれば水素標準電極 (NHE) 基準の値になる.

スキーム 1 PQQ の酸化還元および酸解離平衡. かっこ内の数字は pK_a 値を表す.

スキーム 2 TOPA の酸化還元および酸解離平衡. かっこ内の数字は pK_a 値を表す.

TOPA キノン (TPQ) の水酸基の pK_a (4.0) が異常に小さいことからわかるように, これは *o*-キノン体と *p*-キノン体の中間的な構造と考えるべきであろう.

PQQ とアンモニアとの相互作用についても, 電気化学的手法で追跡できる⁽⁹⁾. PQQ のアンモニア付加体であるイミノキノン体は可逆的に 2 電子還元されたアミノ

フェノール体となるが、その酸化還元電位は PQQ のそれより正側で、そのラジカル中間体は PQQ セミキノンより安定となることは興味深い。

3. PQQ によるアミノ酸の酸化的脱炭酸反応

PQQ のような o -キノン化合物は Strecker 型反応でアミノ酸を酸化的脱炭酸することが知られている⁽²⁾。PQQ 関連化合物についてアミンの酸化的脱アミノ化反応は分光学的に詳しく調べられており、アミンに関して、1 次と 2 次の反応があるとされている⁽¹⁰⁾。こうした場合の PQQ の還元体は、キノール体のみならずアミノフェノール体も含まれ、この反応機構の分光学的解析は複雑である。これに対して、電気化学的手法では、正味の電子移動を観測するため、解析が容易になる。電気化学解析の結果、グリシンに関して 2 次反応であると結論できた⁽⁸⁾。

この PQQ とグリシンの反応を利用した PQQ の定量法、いわゆる酸化還元サイクリング法が提唱された⁽¹¹⁾。本法は高感度であるが、本反応の非特異性による誤差が指摘されている⁽¹²⁾。ただし、HPLC のポストカラムモードで本反応を利用すると、高選択的、高感度な PQQ の定量が可能になる⁽⁸⁾。こうした PQQ の酸化還元触媒能は、NADH に対しても観測され^(13,14)、NADH 依存性酵素のメディエータとして、合成化学的⁽¹³⁾あるいは酵素センサーとしての利用が考えられる。

4. PQQ 酵素の酵素-電気化学反応とそのバイオセンサーへの利用

PQQ 酵素の多くはその酵素触媒反応にフェナジンメトサルフェート (PMS)、ジクロロフェノールインドフェノール (DCIP) やヘキサシアノ鉄 (Ⅲ) 酸イオン ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) のような電子受容体を必要とする。これらの電子受容体は電気化学的に容易に酸化還元できるので、酵素反応で還元された電子受容体は電極反応によって元の酸化型に戻すことができる。したがってごく少量の電子受容体で酵素反応を継続して行わせることができる。この間に電子受容体は酵素反応と電極反応によって酸化還元をくりかえし、そのターンオーバー数だけの電子が電極に渡される。これは電子の流れ、すなわち電流として容易に測定でき、酵素反応と電極反応が電子受容体を介して間接的に共役したことになる。この酵素-電気化学反応を我々はバイオエレクトロカタリシス反応と呼び、反応の理論的検討と実験による検証をおこなった⁽¹⁵⁾。なおこの反応に関与する電子受容体は電子伝達メ

ディエータと呼ばれる。この反応を利用して、アルコールデヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼ、グリセロールデヒドロゲナーゼ、ポリアミンデヒドロゲナーゼなどの PQQ 酵素の酵素触媒反応を測定することができる⁽¹⁵⁾。

ここにあげたような酵素を電極に固定化すれば、それぞれの基質に応答するバイオエレクトロカタリシス型電気化学センサーとなる。なかでも酢酸菌細胞膜由来のアルコールデヒドロゲナーゼ、フルクトースデヒドロゲナーゼは基質選択性にすぐれているのでセンサーとして用いるのに適している。たとえばこの型のフルクトースセンサーで果物中のフルクトース濃度を簡便に測定できる⁽¹⁵⁾。このように PQQ 酵素のバイオセンサーへの利用は最近大きな関心を集めている⁽¹⁶⁾。

細胞膜由来の PQQ 酵素はその疎水的な性質のため、炭素等の電極上によく吸着する。この PQQ 酵素吸着電極、たとえばアルコールデヒドロゲナーゼ吸着電極はメディエータなしでもエタノールを酸化できる⁽¹⁷⁾。これは吸着酵素が電極に直接電子を与えることができることを意味している。用いたアルコールデヒドロゲナーゼは分子量 85,000, 49,000, 14,400 の 3 つのタンパク質から成り PQQ 以外にヘム *c* を 3 つ含んでいる。電極へ電子を与えるのは PQQ 自身なのかそれともヘム *c* なのか大いに興味をそそられるところである。この電極でのエタノールの酵素-電気化学酸化反応を電気化学的手法を用いて検討した結果はヘム *c* の可能性を示唆している⁽¹⁷⁾。結論を得るには電気化学以外の手法による検証が望まれる。現在表面分光法を用いて検討を進めている。酵素-電極間の電子移動の問題はバイオエレクトロニクスの観点からも大変興味深い。なおこのような直接電子移動に基づくバイオセンサーも可能であり⁽¹⁵⁾、次の世代のバイオセンサーとしてその発展が期待される。

5. おわりに

電気化学の方法で PQQ および PQQ 酵素についてどのようなことが調べられるのか、どのような利用ができるのかについて、著者らの仕事を中心にその現状を述べた。PQQ および PQQ 酵素と電極との共役反応系は最近電気化学の分野で注目されており、PQQ, PQQ 酵素の特色ある研究領域として今後ますます発展するものと思われる。

- (1) 松下一信, 足立収生: 生化学, 63, 218—221 (1991)。

- (2) Y. Ohshiro and S. Itoh : *Bioorg. Chem.*, **19**, 169—189 (1991).
- (3) S. M. Janes, D. Mu, D. Wemmer, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. L. Burkingame, and J. P. Klinman : *Science*, **248**, 981—987 (1990).
- (4) K. Kano, K. Mori, B. Uno, T. Kubota, T. Ikeda, and M. Senda : *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **23**, 227—238 (1990); K. Kano, K. Mori, B. Uno, T. Kubota, T. Ikeda, and M. Senda : *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **24**, 193—201 (1990).
- (5) J. A. Duine, J. Frank Jzn. and P. E. J. Verweil : *Eur. J. Biochem.*, **118**, 395—399 (1981).
- (6) R. B. McWhirter and M. H. Klapper : *Biochemistry*, **29**, 6919—6926 (1990).
- (7) K. Kano, B. Uno, M. Goto, T. Ikeda, and M. Senda : Presented at 2nd International Symposium on PQQ and Quinoproteins (Yamaguchi), 1991, Abstract, p. 30.
- (8) 加納ら : 投稿準備中.
- (9) K. Kano, K. Mori, B. Uno, and M. Goto : *J. Electroanal. Chem.*, **293**, 177—184 (1990).
- (10) E. J. Rodriguez and T. C. Bruice : *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7947—7956 (1989).
- (11) R. Flückiger, T. Woodtli, and P. M. Gallop : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **153**, 353—358 (1988); M. A. Paz, P. M. Gallop, B. M. Terrello, and R. Flückiger : *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 1330—1337 (1988).
- (12) R. A. van der Meer, B. W. Groen, J. A. Jongejan, and J. A. Duine : *FEBS Lett.*, **261**, 131—134 (1990).
- (13) S. Itoh, M. Kinugawa, N. Mita, and Y. Ohshiro : *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1989**, 694; S. Itoh, N. Mita, and Y. Ohshiro : *Chem. Lett.*, **1990**, 1949.
- (14) K. Sugioka, M. Nakano, I. Naito, S. Tero-Kubota, and Y. Ikegami : *Biochim. Biophys. Acta*, **964**, 175—182 (1988).
- (15) 池田篤治 : 食品工業, **34**(16), 31—42 (1991); **35** (4), 52—61 (1992).
- (16) V. L. Davidson : *Am. Biotechnol. Lab.*, **8**, 32—34 (1990).
- (17) T. Ikeda, S. Miyaoka, F. Matsusita, D. Kobayashi, and M. Senda : *Chem. Lett.*, **1992**, 847—850.