微生物の生育とPQQ†

足立 収 生

(山口大学農学部)

微生物の合成培地に酵母エキスやその他の天然物エキスを少量添加すると、栄養要求性のない野生株でもエキス無添加に比べて、はるかに速い生育をすることはしばしば経験する。単純な組成の合成培地においても旺盛な生育を示す微生物もあるが、生育させるのが厄介な微生物も多い。格別の栄養要求性もないのに、機嫌をうまくとってやらないと、良好な生育を示さないものに酢酸菌をあげることができるだろう。そのような酢酸菌が食酢やグルコン酸の製造やビタミンC工業におけるソルボース製造など、酸化醗酵工業で重要な微生物であることはよく知られている。どうして酢酸菌は耐糖性や耐酸性にすぐれていて、しかも、たいへんな速さで酸化醗酵生成物を高濃度に培養液中に蓄積するのであろうか。また、そのときのエネルギー生成機構はどうなっているのだろうか。著者らは、このようなところに尽きない興味を覚えて、酸化醗酵の機構について調べている。そのためには、まず、初発の糖質脱水素酵素から末端酸化酵素にいたるまで、酸化醗酵に関係している酵素の諸性質が明らかにされなければならない。酸化醗酵に関係している酵素のすべてが細胞質膜に結合している細胞膜酵素である。細胞膜酵素を単離、精製するためには培養によって酢酸菌細胞を入手することから作業が開始される。この際培地組成として高濃度に酵母エキスを添加しないと、粒揃いのよい菌を手に入れるのが難しく、以後の酵素の精製もうまくゆかない。

そこで、酸化醗酵に関係している酵素の精製やそれらの諸性質を調べることは別に、酵母エキスに存在して酢酸菌の生育を促進する物質の検索を行った。酵母エキスが微生物起源のものであるので当然といわれるかもしれないが、細菌や糸状菌の菌体や培養濾液中にも微生物

の生育促進物質が存在していることも明らかになった。カザミノ酸、肉エキスのような動物起源のものや、麦芽エキス、大豆粕など植物起源のものにも等しく存在することもわかってきた⁽¹⁾。酵母エキスや天然物を含まないグルコース・無機塩培地に生育した大腸菌の培養濾液から、酢酸菌の生育に著しい効果を示す画分を精製した⁽²⁾。酵母エキスや大腸菌の培養濾液から得られた精製標品の分光学的性質がPQQのそれと似ていることや、何よりも精製標品に微弱ながらもPQQ活性が検出されることから、それらはPQQまたはPQQに何かが結合したものと結論された⁽³⁾。本稿では、主としてその辺の研究の現状について述べることにする。

1. PQQによる微生物の生育促進効果

酢酸菌、たとえば *A. aceti* の合成培地にPQQを添加した場合には、PQQ無添加の場合に比べて明らかに生育の誘導期が短縮される。酢酸菌の生育を濁度法によって測定するわけであるが、バイオアッセイは手慣れるまでは熟練を要する作業であり、分析機器が発達した今日ほとんど見掛けなくなった手法である。しかしながら、ここではそのクラシックな方法が他のいかなる方法よりもすぐれている。バイオアッセイで再現性のよい結果を得るために、培地組成の検討を行って次の組成の培地を設定した⁽⁴⁾：グリセロール 4.6 g, グルタミン酸ナトリウム 6 g, グルタチオン 20 mg, K_2HPO_4 および KH_2PO_4 各 500 mg, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 200 mg, $FeSO_4 \cdot H_2O$, NaCl および $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 各 10 mg, 塩酸チアミン, ニコチン酸, パントテン酸カルシウム 各 400 μg および *p*-アミノ安息香酸 100 μg (いずれも培地 1 l 当たり)。きわめて微量のPQQやPQQ付加物をこの培地に添加して、*A. aceti* の洗浄菌体の懸濁液を接種すると、酵母エキスの添加で観察されたのと同じ生育促進効果がみられる。このPQQの作用機構は現在明らかではないが、PQQが細胞分裂の初期過程を促進する生理活性を示すものと理解できる。培地の調製時にPQQを添

† Growth Stimulating Activity of PQQ for Microorganisms.

Osao ADACHI (Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, Yamaguchi 753)

図 1 PQQ 付加物の生成

PQQ と L-セリンを反応させたのち、反応液を HPLC で展開したクロマトグラムと得られた PQQ 付加物の吸収スペクトルとその化学構造を示す。A, 標準 PQQ; B, pH3.5 で反応させた場合; C, pH8.0 で反応させた場合。

加したり、誘導期の初期に PQQ を添加すると PQQ の添加効果がみられて誘導期が短縮され生育が促進される。しかし、PQQ を無添加で培養を開始して、対数増殖期に到達した以降の時点で PQQ を添加しても、もはや PQQ の添加効果はみられず、PQQ 無添加の場合と同様の生育の経過を示す。これらの事実は PQQ が細胞分裂の初期過程で促進効果を示すことを、そして、対数増殖期にある細胞は PQQ を外部に依存せず、必要な PQQ を自給していることを示している。

このように PQQ が細胞分裂の初期過程に作用していることは、もうひとつの別の実験からもいえる。微生物を用いて濁度法によってバイオアッセイを行う際には、用いる接種菌液の調製に注意が必要である。通常は何回か滅菌水で細胞の洗浄を繰返したのち、適当な濁度に調節して接種菌液とする。酢酸菌で接種菌液を調製するときに、洗浄時の上清液に PQQ が検出される⁽⁶⁾。接種菌体の表面には洗浄によって除去可能な PQQ が存在していることを示していて、不十分な洗浄で接種菌液を調製して PQQ のバイオアッセイを行うと、PQQ 添加区も無添加区も区別なく良好な生育がみられる。ほとんどすべての微生物は量の多少にちがいはあるものの、PQQ

を生成し、時には培地中に PQQ が蓄積される⁽⁶⁾。野生の大腸菌や *Pseudomonas* 属菌のように、単純な合成培地でよく生育する菌株でも、注意深く接種菌液を調製してバイオアッセイを行うと、PQQ の添加によって生育促進効果が観察される。

2. PQQ 付加物の生成と生育促進活性

自然界では PQQ は様々な物質と付加物を形成しており、補酵素としては不活性な形で存在している。PQQ のオルトキノン構造は特に反応性に富んでいて、種々の物質と容易に付加物を形成する。通常、PQQ を酵素法によって定量する場合には、調製が容易なグルコース脱水素酵素 (GDH) のアポ酵素を用いて、酵素活性の発現強度から存在する PQQ 量を求めている⁽⁷⁾。これには、GDH がほとんどアポ酵素として含まれている大腸菌の細胞膜が、PQQ 合成能の欠損した *Acinetobacter calcoaceticus* の細胞膜を用いている。PQQ とアポ GDH とを接触させると、ホロ GDH に変換されて酵素活性が現れる。アミノ酸のような PQQ と付加物をつくりやすい物質が共存していると、PQQ のオルトキノン部位とアミノ酸とで付加物を形成する。このような PQQ 付加物を補酵素としてアポ GDH に与えると、PQQ 付加物は

図 2 PQQ および PQQ 付加物による微生物の生育の促進
A, 図 1B に示された PQQ 付加物 (PQQ-serine) および PQQ を
図中に示した濃度を与え, *A. aceti* の生育を測定した. PQQ 付加物
のほうが PQQ より生育促進効果が顕著であること, および, PQQ
濃度が高くなると対照区よりも生育が遅れることを示している. B,
大腸菌の生育の誘導期も PQQ と PQQ 付加物によって短縮される
ことを示す. 図 1C で得られる PQQ 付加物を用いても, 図 1B
の PQQ 付加物と同一の生育促進活性がみられる.

アポ GDH に結合するが, 反応部位を持たないために, GDH 活性の発現が大きく抑制される⁽⁸⁾. PQQ にカザミノ酸や酵母エキスを加えると, 同様に PQQ の補酵素活性が著しく減少し, 理論値の 1% 以下の補酵素活性しかみられなくなるのはこのためである. 種々のアミノ酸で PQQ 付加物を作るときの反応条件を調節することによって, グリシン以外のほとんどのアミノ酸から 2 種類の付加物が得られる. L-セリンと PQQ との付加物の生成の状況を図 1 に示した. すなわち, アルカリ性側 (pH 8.0) と酸性側 (pH 3.5) とで別々に反応させると, それぞれ異なった PQQ 付加物が得られる⁽⁹⁾. HPLC からの溶出位置, 吸収スペクトルや化学構造も両者で互いに異なっている. 2 つの PQQ 付加物間には互変性はみられ

ない. 酸性下で調製した PQQ 付加物はとくに安定性にくすぐれている. このようにして得られた PQQ 付加物も PQQ と同様に微生物の生育を促進する (図 2A). 経験的には PQQ よりも PQQ 付加物のほうが微生物の生育促進効果が, 低濃度でも顕著に現れる. PQQ を高濃度に加えると逆に生育を抑制するし, もっと大量に加えると生育は完全に阻害される. このことは, 異常に高濃度の PQQ が動物に毒性を示すが, PQQ 付加物では毒性が顕著に緩和されることと似ていて興味深い⁽¹⁰⁾.

3. PQQ による微生物の生育促進活性の発現機構

前項でも述べたように, 単純な合成培地でもよく生育する大腸菌でも, 注意深くバイオアッセイを行うと, PQQ も, PQQ 付加物も生育促進活性を示し, 対照区に

図 3 推定される PQQ による微生物の生育促進機構

くらべて、その誘導期が短縮される(図 2B)。かつて、大腸菌が PQQ を作ることを報告した⁽¹²⁾際に、一部の研究者から反論されたことがあった⁽¹¹⁾。しかしながら、最近になって大腸菌も PQQ を作ることがいくつかの研究グループによって確認されている^(12~14)。PQQ の生育促進活性の発現機構については現在明らかでないが、これまでの実験結果から図 3 に示すような図式が想定される。なるほど教科書によれば、微生物の増殖に際し、糖(グルコース)は取込まれ炭素源、エネルギー源として代謝される。PTS 系によって糖を取込み、EMP 経路や TCA サイクルによってエネルギーが獲得されるわけであるが、これらの系は駆動し始めると確かに効率よくエネルギーが獲得される。しかしながら、それらを駆動させる初発エネルギーはどこから得られるのであろうか。ここで、PQQ や PQQ を補酵素とするキノプロテインにその役割を負わせてみると、図 3 に示すような図式が考えられる。GDH はほとんどすべての微生物に存在していて、グルコースを酸化して酸化エネルギーを容易に生成する。PQQ 酵素のみで細胞の増殖に必要な全エネルギーを賄うことは、エネルギー効率上からも有利でない。しかし、GDH によって酸化エネルギーがあるエネルギーレベルに到達して、PTS、EMP や TCA を駆動させるようになれば、ずっと効率よくエネルギーが生成されるようになる。その時点で、PQQ とキノプロテインの役割は終了すると考えられる。図 2B の実験で、PQQ や PQQ 付加物が添加された培地中で生育する大腸菌に含まれる GDH 活性は、菌の増殖が始まる前の段

階ですでに、十分に洗浄した接種菌液にみられる GDH 活性をはるかに凌駕した比活性を示す。洗浄が不十分な接種菌液を用いると、PQQ の添加区と無添加区の判別が難しくなるのも説明できる。微生物の増殖に際し、誘導期には以後の細胞の増殖に必要な初発エネルギーの蓄積を行っていると考えてみよう。すると、PQQ は細胞増殖のきわめて初期過程に必要であるといえる。この論によれば、対数増殖期にある微生物は EMP や TCA を大いに駆動させてエネルギーを得ており、キノプロテインにはもはや機能を有していない。対数増殖期の微生物に PQQ を添加しても、PQQ の添加効果がみられないのも当然である。酢酸菌による酢酸酸酵の際にも同様の図式をあてはめることが可能なようだ。この場合には、アルコール脱水素酵素とアルデヒド脱水素酵素の 2 つのキノプロテインに初発エネルギー獲得のための機能を持たせることができるだろう。通気攪拌培養ばかりでなく、静置培養においても、両酵素の比活性が著しく高くなったのちに菌体の増殖が始まるのが観察される⁽¹⁵⁾。酢酸菌のこれら 2 つのキノプロテインは誘導期を経て対数増殖期にはいると、専ら酸化酸酵生産物の生成へとその役割を変え酵素活性はさらに増大する。そのために、大腸菌の場合と異なって、キノプロテインが初発エネルギーの獲得にのみ機能している過程と酸化酸酵の段階とに分けて考えなければならない。この図式が正しいかどうかを証明するために、標識した PQQ を使ったり、種々な代謝欠損変異株を調製して実験をすすめているところである。

-
- (1) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, and O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 699—709 (1985).
- (2) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, and O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 3099—3107 (1984).
- (3) M. Ameyama : in "PQQ and Quinoproteins," ed. by J. A. Jongejan and J. A. Duine, Kluwer Academic Publishers, pp. 149—157 (1989).
- (4) O. Adachi, K. Okamoto, K. Matsushita, E. Shinagawa, and M. Ameyama : *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 2751—2752 (1990).
- (5) M. Ameyama, E. Shinagawa, K. Matsushita, and O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 853—854 (1985).
- (6) M. Ameyama, M. Hayashi, K. Matsushita, E. Shinagawa, and O. Adachi : *Agric. Biol. Chem.*, **48**, 561—565 (1984).
- (7) M. Ameyama, M. Nonobe, E. Shinagawa, K. Matsushita, and O. Adachi : *Anal. Biochem.*, **151**, 263—267 (1985).
- (8) O. Adachi, K. Okamoto, E. Shinagawa, K. Matsushita, and M. Ameyama : *BioFactors*, **1**, 251—254 (1988).
- (9) H. Fujii, O. Adachi, M. Ameyama, and K. Matsushita, Proc. 2nd Int. Symp. PQQ & Quinoproteins, p. 67 (1991).
- (10) 浦上貞治 : 農化, **65**, 682 (1991).
- (11) V. A. G. van Kleef, P. Dokter, A. C. Mulder, and J. A. Duine : *Anal. Biochem.*, **162**, 143—149 (1987).
- (12) O. M. M. Bouvet, L. Pascal, and P. A. D. Grimont : *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 61—67 (1989).
- (13) F. Biville, E. Turlin, and F. Gasser : *J. Gen. Microbiol.*, **137**, 1775—1782 (1991).
- (14) M. Yamada and S. Asaoka : Proc. 2nd Int. Symp. PQQ & Quinoproteins, p. 25 (1991).
- (15) 飴山 實, 松田泰樹, 久保田昭正, 滝本晃一, 足立収生 : 日本醸造協会誌, **82**, 638—642 (1987).
-