

総 説

新規生理活性因子：ピロロキノリンキノン (PQQ)

森下 恵美¹⁾, 成田 宏史²⁾

A Novel Bioactive Factor: Pyrroloquinoline Quinone (PQQ)

Emi Morishita and Hiroshi Narita

はじめに

ピロロキノリンキノン Pyrroloquinoline quinone (PQQ) が FAD, NAD に次ぐ第三の補酵素として生体内酸化還元反応に関与していることが報告されたのは1979年である。最近になって、これまで PQQ と思われていたいくつかの酵素の共有結合型の補欠因子がチロシンやトリプトファン誘導体であることが明らかにされ、これらのキノン系補欠因子を持つ蛋白質(キノプロテイン)が脚光を浴びている。一方、PQQ は、微生物に対する増殖因子活性、花粉の発芽促進、肝障害・白内障の予防効果を示すこと、さらにはマウスで PQQ 欠乏症が観察されたことから、新たな生理活性物質としても注目されている。また、PQQ のユニークな生合成経路も明らかにされつつあり、PQQ 研究は今佳境に入ったといえよう。

I. 酵素の補欠因子としての PQQ

PQQ は1979年にメタノール資化性細菌のメタノール脱水素酵素の補酵素として発見され¹⁾、当初はメトキサチンと命名されたが、現在ではその特徴的な構造に従って PQQ と呼ばれている(図1)。

PQQ は中性水溶液中において249 nm と330 nm に吸収極大を持ち、400~600 nm の広い吸収により赤紫色を示す。また、還元されると318 nm に吸収極大を示すようになる(PQQH₂, 図1)。PQQ の

補酵素活性はこの O-キノン部における電子の授受に起因している。現在のところ確実に PQQ を補酵素として有している酵素はグラム陰性菌を中心とした原核微生物に限られている。これらの酵素と PQQ との結合は非共有結合であり、その結合にはカルシウムが関与している。また、これらの酵素はホロ型で安定であるが、*Comamonas testosteroni* のアルコール脱水素酵素のようにアポ型として容易に単離可能な酵素も存在する²⁾。

一方、これまで PQQ と思われていたアミノ酸化酵素³⁾ やメチルアミン脱水素酵素⁴⁾ の共有結合型補欠因子は、それぞれ酵素分子内の特定のチロシン残基やトリプトファン残基の翻訳後修飾によって生じた TOPA キノン (TPQ) やトリプトファントリブ

表1 PQQに対して得られたモノクローナル抗体 (Narita and Morishita⁵⁾ より改変)

No.	種類	PQQ-BSA	TOPA-BSA	遊離 PQQ
2	IgG1	+	-	+
9	IgG1	+	-	+
1	IgM	+	-	-
6	IgM	+	-	-
7	IgM	+	-	-
3	IgM	+	+	-
5	IgM	+	+	-

PQQ は低分子化合物であるので抗原性がないため、PQQ を BSA に結合させた PQQ-BSA を抗原として、7つのモノクローナル抗体を得た。これらのうち3番と5番は非特異的であり、1, 6, 7番は結合状態の PQQ しか認識せず、2番と9番は遊離の PQQ も認識した。2番と9番が PQQ に対してもっとも特異性の高い抗体である。

¹⁾ 京都大学大学院農学研究科

²⁾ 京都女子大学家政学部食物栄養学科食品学第一研究室

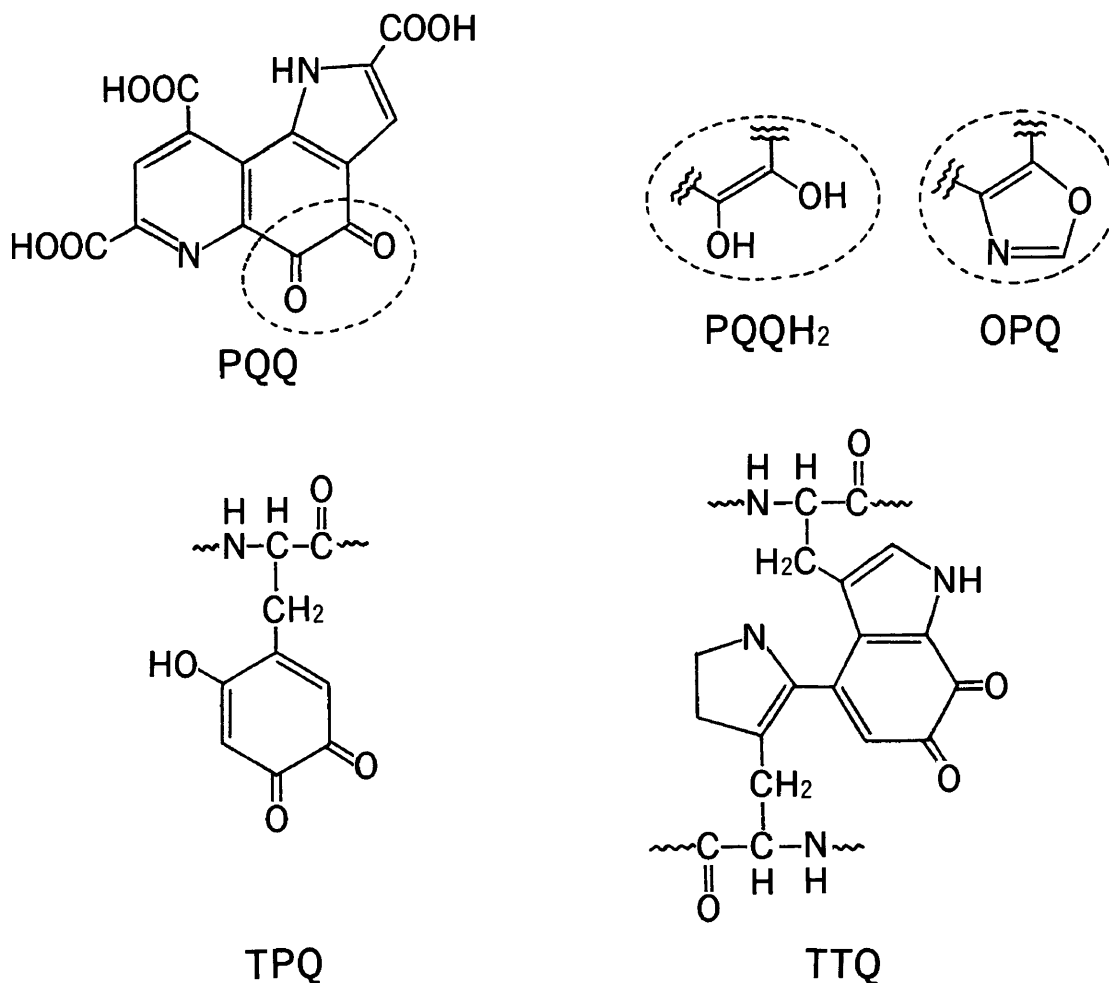


図1 PQQ およびその関連化合物の構造

トフィルキノン (TTQ) であることが最近明らかにされつつある (図1)。我々も PQQ に対するモノクローナル抗体を作製し (表1), これらを用いた免疫化学的解析から同様の結論を得ている⁵⁾。すでに他のグループによるポリクローナル抗体⁶⁾, モノクローナル抗体⁷⁾ を用いた報告があるが, これらは特異性が甘かったため誤った結論に至っていた。現在これらのキノン系補欠因子を持つ蛋白質はキノプロテインと総称され, その構造と機能の解明ならびに新たなキノプロテインの検索が活発な研究対象となっている⁸⁾。

II. PQQ の生合成

メタノール資化性菌は培地に多量の PQQ を蓄積し, その量は条件によっては培地1リットルあたり1gにも達する。現在のところ, 量の多少に違いはあるものの, ほとんどの微生物に PQQ 産生能が

あると考えられているが, 動植物における PQQ 産生は疑問である。

PQQ の生合成経路に関してはトレーサー実験の結果から, 図2⁹⁾ に示すようなグルタミン酸とチロシンを前駆体とした経路が予想されている。一方, Goosen ら¹⁰⁾ は *Acinetobacter calcoaceticum* の PQQ 生合成能欠損株の相補実験から, 4つの翻訳可能領域をコードしている5000塩基対の PQQ 合成系遺伝子を単離した。もっとも小さい翻訳可能領域は24アミノ酸からなるペプチドをコードしており, 部位特異的変異を用いた解析により, このペプチドの16番目のグルタミン酸と20番目のチロシンが PQQ 合成に必須であることが明らかになった。さらに *Klebsiella pneumoniae* の PQQ 合成系遺伝子には, 同様のペプチドに加えて分子量84kDaのプロテアーゼ様の蛋白質もコードされていた¹¹⁾。これらの結果から, PQQ は遊離のグルタミン酸とチロシンからで

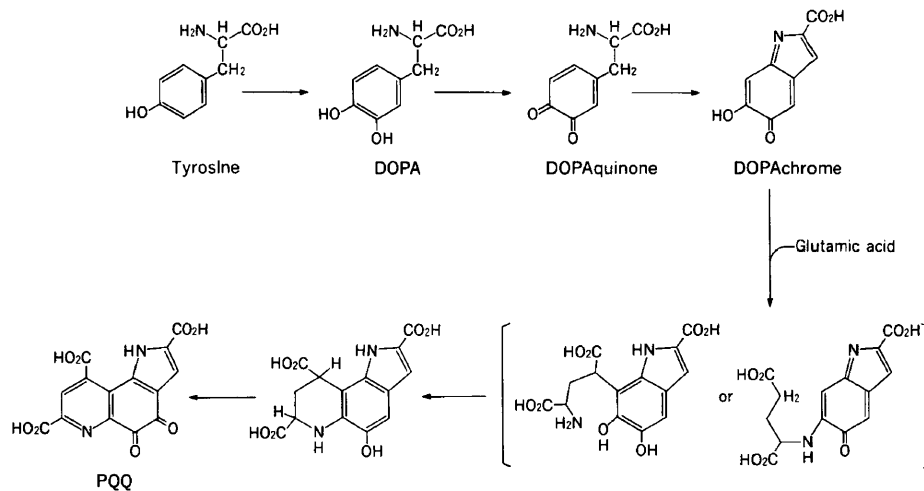


図2 PQQ の予想される生合成経路 (MAG van Kleef and JA Duine⁹⁾)

きるのではなく、ペプチド鎖内に離れて存在しているグルタミン酸残基とチロシン残基が結合した後切り出されて生じる、という極めてユニークな合成経路の存在が示唆されている。この切り出し機構、他の翻訳産物の機能ならびに、PQQ 生合成系の発現調節機構が興味深い。

III. 定 量

PQQ のバイオアッセイ法としては、アポ型のグルコース脱水素酵素¹²⁾ やアルコール脱水素酵素²⁾ のホロ化にともなう酵素活性の回復を指標とした方法がある。逆相カラムを用いた HPLC による定量¹³⁾ では、紫外吸収、蛍光、電気化学法など、検出法が工夫されている。簡便で感度もよいため汎用されているのは、PQQ がアミノ酸を脱炭酸し自

らは還元される性質を利用した酸化還元サイクル法である¹⁴⁾。本法では遊離のみならず結合体の PQQ も測定できるが、特異性の点で注意を要する。¹³C-PQQ を内部標準に用いたガスクロマトグラフィー質量分析法 (GC-MS 法) は簡便さには劣るがもっとも信頼できる方法と思われる。表 2^{15,16)} に本法による PQQ 定量値をまとめた。

著者らはモノクローナル抗体 (表 1) を用いた酵素抗体法による PQQ 及びそのグリシン付加体であるオキサゾピロキノリン (OPQ, 図 1) の高感度定量法を開発し¹⁷⁾、ヒト、ウシ胎児血清、牛乳、卵白、食酢に数 nM の PQQ の存在を確認している。これまで天然物、食品、生体試料中の PQQ 含量は過大評価されており、再評価する必要があると思われる。いずれの方法を用いるにしろ、測定法の特長、試料の前処理、他法との比較などを含めて結果を解釈する必要がある。

表2 GC-MS法による PQQ 定量値
(Kumazawa A, et al 1992¹⁵⁾, 1993¹⁶⁾ より抜粋)

試料	PQQ (ng/g 湿重量, ml)	
ヒト	小腸	1.9±0.3
	肝臓	1.0±0.9
	腎臓	2.0±0.9
	脳	—
	血清	1.7±0.6
ラット	尿	0.8±0.2
	小腸	1.6±1.0
	肝臓	1.0±0.4
ニワトリ	腎臓	—
	脳	—
	卵白	4.1±2.6
ウシ	乳	3.4±0.4

—: 検出不能

IV. 生理作用

PQQ は微生物の生育促進活性を示す。この場合、全菌体量を増加させる「ビタミン型」と、誘導期を短縮させる「ホルモン型」があるが、補酵素活性との関連は不明である¹⁸⁾。植物に対しても花粉の発芽促進作用が報告されているがその生理的意味も不明である¹⁹⁾。

すでに述べたように、現在のところ動物の酵素で PQQ を補酵素として要求するものはないし、動物における PQQ 生合成の報告もない。しかし動物は飲料水や食料、腸内細菌から PQQ を摂取している。Killgore ら²⁰⁾ はマウスを離乳時から PQQ を含まない配合飼料 (腸内細菌の生育を抑えるための抗生物

質を含む)で飼育すると、2週間目あたりから成長が遅延しはじめ、8週間後には20~30%のマウスで皮膚の脆弱化、脱毛、猫背(骨軟化)などの症状が現れたと報告している。このとき、40匹中8匹が死亡し、うち3匹には大動脈瘤、腹腔内出血が観察された。生化学的には、PQQ欠乏により皮膚における抽出可能コラーゲン量が倍増し、リシル酸化酵素活性が10~30%に低下していた。この酵素活性の低下がコラーゲンの成熟を遅らせ、皮膚の脆弱化、骨軟化につながっているものと思われる。また、8~9週間PQQ欠乏にした雌マウスは、不妊になるか出産直後に子どもを食べてしまう。これらの症状は対照群では見られなかったし、PQQ投与により改善された。このようにPQQは動物の成長と生殖にとって重要な因子(ビタミン)かもしれない。ピオチンやビタミンKのように健常人ではPQQ欠乏症は問題とならないようであるが、乳幼児や、長期間にわたる輸液あるいは抗生物質使用時には考慮する必要があるかもしれない。

V. 薬理作用

PQQはin vitroでアスコルビン酸より強力なラジカルスカベンジャー活性を示す²¹⁾。また、PQQは四塩化炭素やD-ガラクトサミンなどによって誘発されるラット肝障害²²⁾やカラゲニン惹起ラット足浮腫の発症²¹⁾、あるいはヒドロコルチゾン投与による鶏胎児の白内障形成²³⁾(表3)を抑制する。これらの炎症は組織内グルタチオン量がO₂などのラジカルによる酸化ストレスを十分解消できないために生じると考えられている。PQQがin vivoにおいて良好なラジカルスカベンジャーとして機能するならば、アルコール性肝障害や脳卒中、痴呆などの脳の酸化ストレス障害に対しても効果が期待される。また、糖尿病性白内障に対してもPQQの抑制効果が期待されている。本症は水晶体に蓄積したグルコースがアルドース還元酵素の作用により細胞外に排出されないソルビトールに変換され、浸透圧増加をきたして水晶体が膨潤、白濁することが一因として考えられている。PQQは本酵素の阻害活性を持っている²⁴⁾

一方、PQQ(11.5 mg/kg)を4日間ラットに腹腔内投与すると血中尿素態窒素や血清クレアチニン濃度が著しく上昇し、尿中の蛋白質、糖、ケトン体、潜血反応が陽性となり腎障害が見られる²⁵⁾。このとき、肝臓や膵臓では大きな変化は見られないが、腎障害は2.9 mg/kgの投与でも見られる。マウスで

表3 ヒドロコルチゾン投与によるニワトリ胎児の白内障形成に対するPQQの予防効果(Nishigori H, et al 1989²³⁾)

処置	白内障の程度			
	I	II	III	IV-V
対照 ^a	20	0	0	0
ヒドロコルチゾン (0.1 mg)	0	0	0	20
ヒドロコルチゾン+PQQ (mg/卵) ^b				
(0.1)	0	0	0	20
(0.5) ^c	5	3	5	7
(0.5)	9	5	6	0
(1.0)	6	1	3	0

受精鶏卵の15日目胎児に0.1 mgのコハク酸ヒドロコルチゾンを注入すると、48時間後にはすべての胎児が白内障(IV-V)となるが、PQQ投与によりそれが軽減される。

数字は卵の数。

^a PQQの代わりに酢酸カリウムを投与

^b ヒドロコルチゾン投与の3, 10, 20時間後にPQQを投与

^c ヒドロコルチゾン投与の3, 10時間後のみPQQを投与

のPQQのLD₅₀は約70 mg/kgとされている。なお、OPQはPQQと同等あるいはそれ以上の薬理活性を持つうえ腎毒性を示さず、LD₅₀は約1 g/kgと高い²⁴⁾。また、OPQがin vivoで神経成長因子分泌促進活性を示すことも報告されている²⁶⁾。このほかにもPQQ及びその誘導体にいくつかの薬理作用が報告されているが、まだ不明な点が多く今後の進展が期待される。

文 献

- 1) S. A. Salisbury, H. S. Forrest, W. B. T. Cruse, and O. Kennard: *Nature* **280**, 843 (1979)
- 2) B. W. Groen, M. A. G. van Kleef, and J. A. Duine: *Biochem. J.* **234**, 611 (1986)
- 3) S. M. Janes, D. Mu, D. Wemmer, A. J. Smith, S. Kaur, D. Maltby, A. L. Burlingame, and J. P. Klinman: *Science* **248**, 981 (1990)
- 4) W. S. McIntire, D. E. Wemmer, A. Chistoserdov, and M. E. Lindstrom: *Science* **252**, 817 (1991)
- 5) H. Narita, and E. Morishita: *J. Biochem.*, **117**, 830 (1995)
- 6) G. Citro, A. Verdina, R. Galati, G. Floris, S. Sabatini, and A. Finazzi-Agro, A.: *FEBS lett.*, **247**, 201 (1989)

- 7) S. Marini, B. Giardina, G. F. Fasciglione, and A. Finazzi-Agro: *J. Biol. Chem.*, **268**, 13352 (1993)
- 8) J. P. Klinman, and D. Mu: *Annu. Rev. Biochem.*, **63**, 299 (1994)
- 9) M. A. G. van Kleef, and J. A. Duine: *FEBS Lett.* **237**, 91 (1988)
- 10) N. Goosen, R. G. M. Huinen, and P. van de Putte: *J. Bacteriol.*, **174**, 1426 (1992)
- 11) J. J. M. Meulenbergh, E. Sellink, N. H. Riegmans, and P. W. Postma: *Mol. Gen. Genet.*, **232**, 284 (1992)
- 12) M. Ameyama, M. Nonobe, E. Shinagawa, K. Matsushita, and O. Adachi: *Anal. Biochem.*, **151**, 263 (1985)
- 13) J. A. Duine, Jzn. Jr. Frank, and J. A. Jongejan: *Anal. Biochem.*, **133**, 239 (1983)
- 14) M. A. Paz, P. M. Gallop, B. M. Torrelino, and R. Fluckiger: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **154**, 1330 (1988)
- 15) T. Kumazawa, H. Seno, T. Urakami, T. Matsumoto, and O. Suzuki: *Biochim. Biophys. Acta*, **1156**, 62 (1992)
- 16) T. Kumazawa, H. Seno, and O. Suzuki: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **193**, 1 (1993)
- 17) 成田宏史, 森下恵美: モノクローナル抗体を用いた PQQ, OPQ の解析 バイオサイエンスとインダストリー **51**, 30 (1993)
- 18) M. Ameyama, K. Matsushita, E. Shinagawa, and O. Adachi: *Vitamins and Hormones*, (D. B. McCormick ed.), **46** p. 229, Academic Press, New York (1991)
- 19) L. B. Xiong, J. Sekiya, and N. Shimose: *Agric. Biol. Chem.*, **54**, 249 (1990)
- 20) J. Killgore, C. Smidt, L. Duich, N. Romero-Chapman, D. Tinker, K. Reiser, M. Melko, D. Hyde, and R. B. Rucker: *Science*, **245**, 850 (1989)
- 21) Y. Hamagishi, S. Murata, H. Kamei, T. Oki, O. Adachi, and M. Ameyama: *J. Pharm. Exp. Ther.*, **255**, 980 (1990)
- 22) A. Watanabe, N. Hobara, and T. Tsuji: *Curr. Ther. Res.*, **44**, 896 (1988)
- 23) H. Nishigori, M. Yasunaga, M. Mizumura, J. W. Lee, and M. Iwatsuru: *Life Sci.*, **45**, 593 (1989)
- 24) 浦上貞治: 補酵素 PQQ 及び PQQ 誘導体の毒性と薬理作用について 日本農芸化学会誌, **65**, 682 (1991)
- 25) A. Watanabe, N. Hobara, T. Ohsawa, T. Higashi, and T. Tsuji: *Hiroshima J. Med. Sci.*, **38**, 49 (1989)
- 26) K. Yamaguchi, A. Sasano, T. Urakami, T. Tsuji, and K. Kondo: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1231 (1993)