

新しい補酵素 PQQ の機能・特性評価と補酵素型バイオセンサーの開発

Evaluation for function and property of new coenzyme PQQ and development of coenzyme biosensor

代表研究者	岐阜薬科大学教授 Prof., Gifu Pharmaceutical Univ. Masashi Goro	後藤 正志
協同研究者	岐阜薬科大学助教授 Assoc. Prof., Gifu Pharmaceutical Univ. Kenji KANO	加納 健司
	岐阜薬科大学助手 Res. Assoc., Gifu Pharmaceutical Univ. Bunji UNO	宇野 文二

New quinoid cofactors, pyrroloquinoline quinone (PQQ) and 6-hydroxydopa quinone (TPQ) have been characterized electrochemically and spectroscopically. It has been found that each of PQQ and TPQ gives a reversible cyclic voltammogram ascribed to a two-step one-electron redox reaction ($ox \rightleftharpoons sem \rightleftharpoons red$) of the quinone moiety in aqueous solution. From the analysis of the standard redox potential vs. pH relationships, the acid dissociation constants of PQQ_{ox} , PQQ_{sem} , PQQ_{red} , TPQ_{ox} , TPQ_{sem} , and TPQ_{red} have been determined. Spectroscopic analysis of TPQ indicates that TPQ has an intermediate electronic structure between *p*-quinone and *o*-quinone forms. The interaction of PQQ with ammonia has also been investigated.

Kinetic analysis of oxidative decarboxylation of glycine with PQQ revealed that glycine plays a role as a catalyst as well as a reductant in this reaction. This reaction mechanism is proposed. TPQ shows no oxidative activity toward glycine. In the presence of ferricyanide ion (as a oxidant), glycine is effectively oxidized during the redox cycle of PQQ.

PQQ can serve as an electron acceptor of NADH while TPQ does not work as a mediator for the electrochemical oxidation of NADH. In this study, we have found that each of Cu^{2+} and Zn^{2+} forms a complex with PQQ and accelerates the electron (or hydride ion) transfer from NADH to PQQ.

Based on the evaluated characteristics of PQQ, several detection methods of PQQ have been developed. Derivatization of PQQ to its acetone adduct allowed a high-performance liquid chromatographic (HPLC) determination of PQQ down to 2 pmol. Capillary isotachopheresis is also applicable to quantification of PQQ and its adducts. Electrochemical detection in HPLC coupled with the redox catalytic function of PQQ in the glycine-ferricyanide ion system allowed a selective and sensitive detection of free PQQ down to 0.2 pmol. This method was applied to quantification of free PQQ in biological fluids. Capillary zone electrophoresis has been successfully applied to well-separated detection of PQQ and its oxazole adducts resulted from non-redox reaction between PQQ and amino acids.

Although PQQ itself is found to possess characteristic redox-catalytic activity toward several biological components, fabrication of PQQ coenzyme-type biosensor would not be variable due to high reactivity of PQQ to nucleophiles. In contrast, quinoproteins are potent redox enzymes in development of new types of electrochemical biosensors. Some applications are discussed here.

研究目的

1979年に第3の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およびキノプロテイン(元来PQQを補酵素とする酵素の総称)の研究が、精力的になされてきた。そして、哺乳類のアミノキシダーゼに共有結合した補酵素がPQQであると提唱され、血清中での遊離PQQの存在も報告されると、PQQの存在意義は、著しく高まった。しかし、共有結合型PQQの、明確かつ合理的な実験事実は欠如しており、また、血清中での遊離PQQの存在に対しても反論が出されていた。

1990年に、これまでPQQ酵素といわれてきた牛血漿アミノキシダーゼの活性中心が、6-オキシド-パキノン(TOPAキノン; TPQ)と報告されたのを機に、従来共有結合型PQQ酵素といわれてきた活性中心の見直しが始められに。そして1991年には、PQQ酵素と信じられてきたガラクトースオキシダーゼ、メチルアミノキシダーゼの活性中心は、各々システインとチロシンがチオエーテル結合したもの、トリプトファン-トリプトフィルキノン(TTQ)であることが相次いで提唱された。このような経緯から、PQQの哺乳類における存在意義は、しだいに薄れるかに思われた。しかし一方では、PQQの哺乳類に対する生理活性が実験的に示され、また最近、哺乳類中でのPQQの存在、およびその存在意義を支持する報告もなされ、PQQおよびPQQ関連の話題は、今まで以上に活発に論議されている。このようなある意味で混沌とした状況になった一因として、こうしたキノン系活性中心のキャラクタリゼーションが、十分にはなされていないことと、またその結果として、PQQの信頼性のある分離、定量法が確立されていないことが考えられる。

こうした背景から、我々は、PQQおよびTPQの電気化学的および分光化学的キャラクタリゼーションと、それに基づいたPQQの高感度分離定量法、さらにはPQQの機能を用いた補酵素型バイオセンサーの開発を目的とした。

研究経過

我々は計画に従い、電気化学測定(特にサイク

リックボルタンメトリー: CV)、電子スペクトル(UV-VIS)、電子スピン共鳴(ESR)などの機器分析法を用いてPQQの機能と特性に関する研究を展開し、所期の目的を達成したと考える。しかし、先に述べたように、本研究助成出願時とは大きく変わりつつあるPQQを取り巻く状況を鑑みて、PQQのみならず類似のキノン系活性中心であるTPQにも焦点をあて、そのキャラクタリゼーションを行った。さらに、ここで得られたPQQの機能・特性を考慮し、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、細管式等速電気泳動(CITP)、およびキャピラリーゾーン電気泳動(CZE)によるPQQおよびその誘導体の高感度検出法を開発し、生体試料への応用を試みた。一方、上記の研究より、PQQは特異な触媒能を有することが分かったが、その求核試薬に対する高い反応性のゆえ、これを直接固定化した補酵素型バイオセンサーは実用性がないと判断し、ここではむしろPQQ酵素を固定化したバイオセンサーについての考察を行った。

研究成果

a. PQQの酸化還元

PQQの発見後、米国を中心として、その電気化学的研究も始められたが、可逆的な波は得難いとする論文が多く発表され、その解析もほとんどなされなかった。我々は、PQQのキノン部位に由来する完全可逆波が、水銀電極上で測定できること、さらに固体電極、たとえば白金電極、グラッシーカーボン電極でも可逆的なCV波を測定できることを見いだした。こうしてCV法により、PQQの酸化還元電位のpH依存性の詳細を明らかにすることが出来た(Fig. 1)。そして酸化還元電位のpH依存性の熱力学的解析より、中性条件下での、PQQ/キノールの2電子移動は2プロトン移動を伴うことがわかり、またそれまで分光化学などの手法では、評価できなかった近接したいくつかの酸解離定数(pKa)とキノンカルボニル基の水和に基因する擬pKa(10.3)を決定した(Fig. 2)。ここでPQQのピリジニウム窒素のpKa(=0.3)が異常に小さいことが特徴的である。これは、ピリジン骨格に結合した二つのカルボキシル

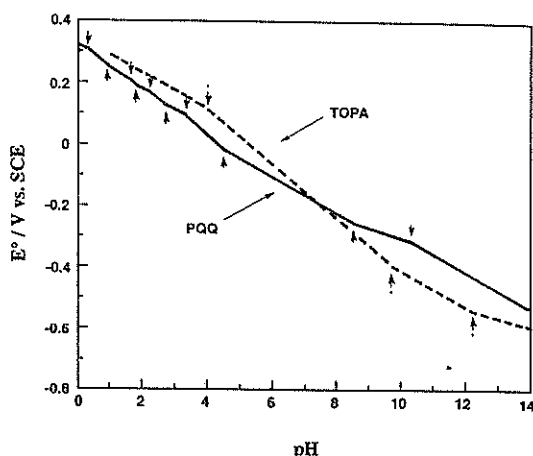


Fig. 1. pH dependence of the redox potentials of PQQ and TPQ. Arrows indicate pKa.

基と隣接するキノン部位の電子吸引性に基因する。一方、デジタルシミュレーションによるCV波の厳密な電流-電圧曲線の解析およびESR測定から、本反応は2段階1電子反応であることを明らかにした。そして、その電位分離にも成功し、セミキノン中間体の生成定数を評価した。更に、1電子移動過程の酸化還元電位のpH依存性からセミキノン体のpKa (=8.5)も評価した。これらの結果を基に、電子スペクトルあるいはESRスペクトルの挙動を合理的に説明できた。また中性条件では第1第2酸化還元電位は約100 mV逆転しており、遊離PQQセミキノンの分率はきわめて小さいが、塩基性条件でのそれはかなり大きくなることが示された。

b. TPQの酸化還元

TOPAは非常に酸化され易く、その2電子酸化体であるTPQ自身の安定性も低いことから、この酸化還元反応の詳細は、ほとんど調べられていない。しかし、PQQの場合と同様TOPAについても、水銀電極で、TOPA/TPQの可逆CV波を観測することに成功した。白金電極、金電極でも、適当な電極の電解前処理を施せば、可逆的な波が測定できることがわかった。

TPQの酸化還元電位は、pH 7.0では、PQQのそれとほぼ等しいが、電位のpH依存性は両者で大きく異なる (Fig. 1)。特に、中性領域では、PQQ

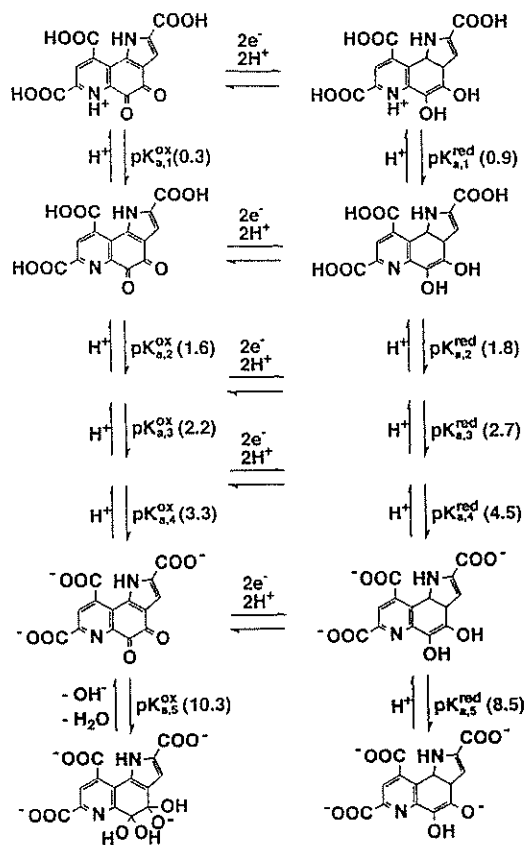


Fig. 2. Acid-base and redox equilibria of PQQ.

と異なり2電子3プロトン移動反応である。このpH-電位曲線の解析から、TPQとTOPAの水酸基のpKaを決定した (Fig. 3)。TOPAの空気酸化によって一時的に生成させたTPQの電子スペクトルのpH依存性は、電気化学的知見と良く一致した。また、電流-電圧曲線の理論解析およびESR測定の結果から、この酸化還元反応も、2段階1電子反応であることを明らかにした。ここで、TPQの第1のpKa (=4.0)が、フェノール性水酸基のpKaとしては異常に小さいこと、およびTPQのUV-VISスペクトルや、TPQラジカルのESRスペクトルの分子軌道解析の結果などから、TPQはオルトキノン型とパラキノン型の中間的な性格を有する特異的な電子構造であると結論した。

c. PQQとアンモニアの相互作用

アンモニウム塩はある種のPQQ酵素の賦活剤として働くことから、PQQの酸化還元反応に及ぼすアンモニアの効果について検討した。ここでは、PQQとアンモニアによるイミノキノン生成と、そのアミノフェノールへの可逆的酸化還元反応を電気化学測定法と電子スペクトル法により追跡し、その平衡論的解析を行った。その結果、本反応に関与するのは NH_4^+ ではなく NH_3 であることが分かり、イミノキノンの酸化還元反応中間体としての5-イミノールラジカルの存在をESR的に証明した。ここで、イミノキノン体はPQQ

に比べて、電子受容能が高いこと、またその中間体ラジカルの分率が大きいことは注目すべき点である。

d. PQQによるグリシンの酸化的脱炭酸反応

アミノ酸は、PQQにより酸化的に脱炭酸されることが知られているが、その速度論的解析は行われていない。我々は、この反応がアミノキシダーゼによる酵素反応との類似性が考えられることと、(g)で述べるように、特にグリシンとの反応がPQQの定量に応用できることを考え、詳細に検討した。

嫌氣的条件下で、PQQとグリシンとの反応によってキノールとアミノフェノールが生成するが、分光法ではこの両者の和あるいは一方だけを検出するのは困難であることから、回転電極法を用いて、正味の電子移動を測定した。詳細な反応速度の解析から、グリシンは、アンモニアの場合と同様に $-\text{NH}_2$ 型でPQQと反応し、カルビノールアミン中間体を経てグリシンおよび酸触媒が関与して還元体が生成すると考えた (Fig. 4)。

また、アンモニアは本反応を著しく促進することが分かった。(c)の結果と考え合わせ、この促進効果は、イミノキノン体生成によるものと考えられ、結果としてイミノキノン体は、PQQに比べ約9.6倍のグリシン酸化活性を有すると評価できる。また、フェリシアンカリウムも本酸化反応を促進あるいは触媒することが分かり、この現象を(g)で応用したが、その詳細については現在検討中である。

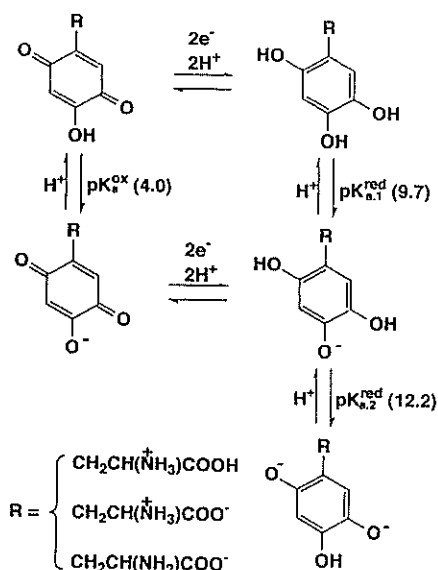


Fig. 3. Acid-base and redox equilibria of TPQ.

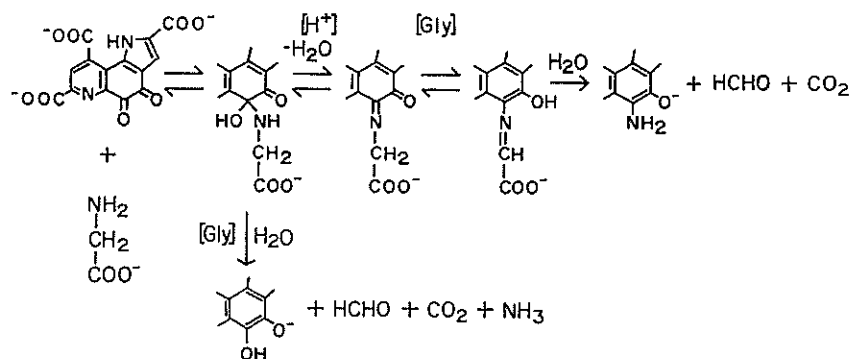


Fig. 4. Proposed mechanism of oxidative de-carboxylation of glycine by PQQ.

一方、TPQがアミノキシダーゼの活性中心と提唱されているにもかかわらず、遊離TPQはグリシンやベンジルアミン等の酸化的脱アミノ化反応そしてまた後述のNADHの酸化反応も触媒しなかった。遊離TPQの触媒活性の欠如は、その電子状態へのパラキノン型構造の寄与によると考えた。

e. PQQによるNADHの還元とそれに及ぼす金属イオンの影響

PQQは他のオルトキノンと同様、NADHの電子受容体として作用する。この意味で、NAD酵素を用いたバイオセンサーあるいはバイオリクターへの利用も考えられる。また、フラビン酵素の電子受容体として機能することも示唆されている。PQQの機能を考える上で、これら酸化還元補酵素間の電子移動を明らかにすることは重要である。そこで、本研究では、PQQによるNADHの酸化反応に焦点を絞り、電気化学的および分光学的に検討した。

PQQを電子受容体とした場合、NADHの酸化は、グリシンのそれに比べて、約40倍(pH9)速い。また、pH9以下ではその反応速度は、pHにほとんど依存しない。さらに注目すべきことに、 Cu^{2+} あるいは Zn^{2+} を共存させると、NADHの酸化速度は著しく向上することが分かった。一方、PQQはこれら金属イオンと1:1錯体を形成し、かつ金属イオン自体にはNADH酸化能がないことを分光学的に明らかにした。これらの結果から、この促進効果は、PQQと金属イオンとの錯形成によるものと考えた。PQQ酵素の中には Cu^{2+} や Fe^{3+} がコファクターとして関与するものも報告されていることとの関連や、哺乳類に対するPQQの生理活性を考える上でも、この結果は重要である。

f. PQQのHPLCおよびCITP分析

PQQの生体中での存在の有無あるいはその存在形態を明らかにすることは、緊急の課題である。そこで、PQQの特性を考慮して、各種クロマトグラフ法により、その分離分析法の開発を行った。

遊離PQQをグラジェント法を併用しない通常

の逆相HPLCカラムで直接分離すると、ブロードなピークとなってあらわれる。したがって本研究ではPQQの求核試薬との反応性を利用した誘導体化HPLC分析を試みた。種々の求核試薬について検討した結果、アセトンとの反応で容易に生成する5-アセトニールPQQがシャープなHPLCピークを与えることが分かった。

PQQとアセトンの反応機構および生成物の安定性を検討した結果、塩基触媒のアルドール生成反応としてよく説明でき、pH8~10では短時間で単一の5-アセトニールPQQを与える。しかし、pH10以上ではこの付加体は不安定になることが分かった。これらの特性を考慮して、誘導体化および分離条件の最適化を行った結果、検出限界2 pmolを得た。

一方、(a)で得られたPQQの酸解離平衡に関する知見、特にpH4~10の広範囲でトリアニオンとして存在することに注目し、電気泳動法を用いた分離についても検討した。本節では、CITPを用いた分離法について述べる。PQQのpKaを考慮してリーディングとターミナル液を選定し、分離条件を決定した。比較的高濃度のPQQあるいは5-アセトニールPQQを注入した場合、明瞭なゾーンを形成し、また微量注入でも、UV検出で明瞭なピークとして検出できることが分かった(検出限界: 1 pmol)。ただし、ゾーン形成しないほど微量の場合、付加体間の分離は必ずしも良好ではなかった。これは電荷が等しく、移動度に大きな差がないことによると考えられる。

g. PQQの酸化還元サイクルを組み入れた高感度HPLC分析とその応用

グリシンとの反応で生成するPQQの還元体を再酸化することにより、PQQをメディエーターとするグリシンの触媒的酸化反応が起こる。しかし、電極界面でPQQを再生する場合、PQQとグリシンの反応速度の問題から、十分な酸化還元サイクルを実現することは困難である。そこで、溶液中での酸化還元サイクルの利用(Fig. 5)を検討した。その結果(d)でも述べたようにフェリシアン化カリウムを酸化剤として用いると、効率的な触媒酸化が進行することを見いだした。

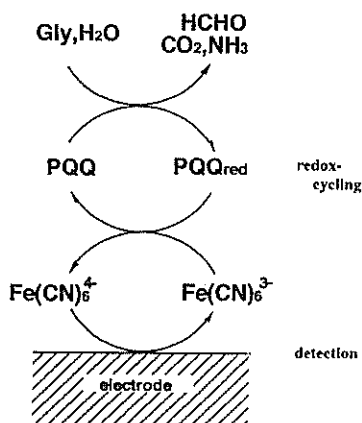


Fig. 5. Redox cycling reaction of PQQ.

この酸化還元サイクル反応をPQQの高感度分析に応用した。すなわち、フェリシアン化カリウムを含む溶離液で、PQQを逆相カラム上で分離した後、ポストカラムモードでグリシンを含む反応液と混合し、グリシンの触媒酸化反応で生成するフェロシアンイオンを、電気化学的に検出した。このPQQの酸化還元サイクル反応を組み込むことにより、直接電気化学検出に比べ、約100倍のピークが得られ、0.2 pmolまでの遊離PQQの検出を可能とした。

本法を、ブタ血清、牛乳、および食酢中のPQQの検出に適用したところ、いずれの試料中においても(10^{-9} M以上の)遊離PQQは検出することはできなかった。むしろ、これらの試料にPQQを添加した場合、遊離PQQは経時的に消失するとともに、上記酸化還元サイクル反応活性を有する別のクロマトグラフィックピークが現れることがわかった。現在、この物質の同定に取り組んでいる。いずれにしても、こうした生体試料中で、PQQはその遊離型としては存在しにくく、付加体など何らか別の型に変換されていると考えられる。

h. PQQおよびその各種アミノ酸とのオキサゾール付加体のCZE分析

PQQとアミノ酸の反応は、(d)で述べた酸化還元反応の他に、オキサゾール付加体生成反応が知られている。そして生体試料中でのPQQの存在形態として、このオキサゾール体が最も考えられ

るもののひとつといわれている。しかし、反応するアミノ酸の違いによる幾種ものオキサゾール体を、HPLCにより一斉に分析することは容易ではない。また、オキサゾールの酸加水分解によるPQQの変換も試みたが、すべてのオキサゾール体をPQQへ再変換することはできなかった。そこで、PQQおよびそのオキサゾール付加体のもつ電荷と、CZEの分解能が高いことに注目し、CZEによるPQQおよびオキサゾール付加体の一斉分析を検討した。

緩衝液のみを移動相とすると、非常に不安定なエレクトロフェログラムしか得られなかったが、混合溶媒系を検討した結果、10%アセトニトリルを含むリン酸緩衝液を用いることにより、短時間で良好な一斉分離ができることを明らかにした。このアセトニトリルの効果として、試料のキャピラリーへの吸着性の低下も挙げられるが、その他の因子も含まれていると考えている。この点については、現在発展段階にあるCZEの問題点として非常に興味深いだが、ここではその詳細は省略する。

本法を用いて、代表的なアミノ酸とのオキサゾール生成反応を追跡したところ、これまでの報告とは異なり、一つのアミノ酸からの生成物は必ずしも一つではないこと、また生成するオキサゾール体の推定構造の一部に誤りがあることが示唆された。現在、新規構造と思われる付加体の単離・同定を進めている。本法を用いて、この反応を速度論的に追跡することができるとともに、生体試料中のオキサゾール体の検出、あるいはPQQの状態分析に応用できると考えられる。

i. PQQ酵素のバイオセンサーへの応用

PQQ酵素である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などは、基質選択性に優れている。また、細胞膜由来のPQQ酵素は疎水の性質を有し、固体電極によく吸着する。さらに、PQQ酵素の多くは酸素以外の電子受容体が関与している。したがって、こうしたPQQ酵素を電極に固定し、さらに適当な電子受容体をメディエーターとして、酵素と電極間を電気的に結合すれば、良好な電気化学バイオセンサーを構

築することができる。

一方、キノン系補酵素は、基本的にはフラビン系補酵素と同様、可逆電極反応する。したがって、キノプロテインやフラボエンザイムは電極との直接電子移動が期待される。ただし、これまでのところ、フラボエンザイムと電極間の直接電子移動は明確には示されていない。しかし、PQQ 酵素であるアルコールデヒドロゲナーゼを固定化した電極では、メディエーターなしで、酵素から電極へ直接電子を渡し得ることが示された。この点について更に詳細な検討が必要であるが、今後、キノプロテイン型バイオセンサーはこうした直接電子移動に基づく次世代バイオセンサーの発展に重要な位置を占めると考えられる。

今後の課題と発展

PQQ の諸性質についてはかなり明らかになってきた。しかしながら、哺乳類に対する PQQ の生理活性を知る上では、微生物の遺伝子レベルでの生合成系の解明とともに、PQQ と他の生体構成成分との相互作用、相互電子移動の解明や PQQ の状態分析が非常に重要な課題である。本研究を更に発展すれば、こうした相互作用あるいは電子移動に関するいくつかの課題は解明できると思われる。状態分析法の開発は途についたばかりであるが、本研究で示したように、CZE による分析を軸として、実現できると思われる。

他の新規活性中心である TPQ あるいは TTQ についての化学情報は、PQQ のそれに比べて乏しい。TPQ については、本研究でその特性の一端を明らかにできたが、今後は、TPQ と生体成分との相互作用を解明し、さらに PQQ のそれと比較検討する必要がある。また、TOPA (あるいは TPQ) は、DOPA とは対照的に神経毒性を有することが報告されている。この点についても今後研究を進展させる必要がある。一方、TTQ は、ごく最近そのモデル化合物の合成が報告され、今後、これに関する精力的な研究が展開されるものと思われる。しかし、TPQ や TTQ は生体中で遊離型として存在することは考えられないので、今後こ

れらを含むペプチド鎖の合成研究と、そのペプチドの酸化還元特性あるいはより一般の化学的諸性質を明らかにする必要があると思われる。

一方、PQQ 酵素 (あるいはキノプロテイン) を利用した電気化学バイオセンサーについては、先に述べたようにメディエーターを用いる第 2 世代センサーとして実用性が大いに期待でき、さらに酸化還元酵素と電極との直接電子移動の基礎研究あるいは直接電子移動を利用した第 3 世代センサーへの発展が期待できる。

発表論文リスト

- 1) K. Kano, K. Mori, B. Uno, T. Kubota, T. Ikeda and M. Senda: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **23**, 227-238 (1990).
- 2) K. Kano, K. Mori, B. Uno, T. Kubota, T. Ikeda and M. Senda: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **24**, 193-201 (1990).
- 3) K. Kano, K. Mori, B. Uno and M. Goto: *J. Electroanal. Chem.*, **293**, 177-184 (1990).
- 4) 加納健司, 後藤正志: *ぶんせき*, **1990**, 981-986.
- 5) K. Kano, B. Uno, C. Kawasaki, K. Horiki and S. Kawai: *Anal. Sci.*, **7**, 737-739 (1991).
- 6) M. Goto, K. Horiki, B. Uno and K. Kano: *Anal. Sci. (Supple.)*, **7**, 281-284 (1991).
- 7) T. Mori, K. Kano, Y. Esaka, B. Uno and M. Goto: Abstract, *Rev. Polarogr. (Kyoto)*, **37**, 29 (1991); **38**, 58 (1992).
- 8) 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.
- 9) 後藤正志, 加納健司: 文部省科学研究費総合研究 (A)-研究成果報告書, pp. 78-84, 1992.
- 10) Y. Esaka, K. Kano, M. Sugeguchi and M. Goto: *Anal. Sci.*, accepted.
- 11) 森 利夫, 加納健司, 江坂幸宏, 宇野文二, 後藤正志: 日本薬学会第 112 年会 (福岡), 1992, 講演要旨集 Vol. 4, p. 146.
- 12) 加納健司, 池田篤司: *日本農芸化学会誌*, **66**, 1661-1664 (1992).
- 13) 江坂幸宏, 加納健司, 後藤正志: 日本分析化学会第 41 年会 (京都), 1992, 講演要旨集, p. 521.
- 14) 江坂幸宏, 山口恭生, 加納健司: 第 12 回キャビラリー電気泳動シンポジウム (姫路), 1992, 講演要旨集, p. 77.
(口頭発表については、論文誌に未発表のものに限った。)