

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 10 日現在

機関番号：15501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660068

研究課題名(和文)還元型PQQ生成酵素を求めて：生理機能不明及び新規PQQキノプロテインの機能解析

研究課題名(英文)Functional analysis of physiological function-unknown or novel quinoprotein to seek an enzyme generating reduced PQQ

研究代表者

松下 一信 (Matsushita, Kazunobu)

山口大学・創成科学研究科・教授(特命)

研究者番号：50107736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：生理学的機能不明なAcinetobacterの水溶性キノプロテイン・グルコース脱水素酵素(sGDH)とPQQ易脱離性の原理および理由が明らかになっていない酢酸菌膜結合型キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素(GLDH)の酵素反応におけるラジカル・スカベンジャーの影響を解析した。それらの電子受容体や補酵素PQQの化学的ラジカル生成能と含めて解析した結果、今回の研究では確定はできなかったが、これらの酵素がアルカリpHで「還元型」PQQ(PQQH₂)を生成・解離していると仮定すると説明可能な結果が得られた。

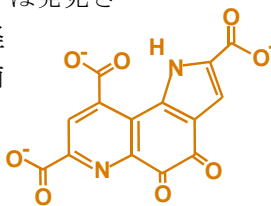
研究成果の概要(英文)：In this study, the effect of radical scavengers was examined on the enzyme activities of Acinetobacter soluble quinoprotein, glucose dehydrogenase, of which the physiological role is still unknown, and also of Gluconobacter membrane-bound quinoprotein, glycerol dehydrogenase, from which the mechanism of PQQ release has not been solved. Together with examination of the radical generation ability of cofactor PQQ and/or electron acceptors, we have proposed one speculation that these quinoproteins are able to release PQQH₂ from the protein at alkaline pH and thus to generate O₂⁻.

研究分野：応用微生物学

キーワード：PQQ キノプロテイン sGDH グリセロール脱水素酵素 Acinetobacter 酢酸菌 還元型PQQ

1. 研究開始当初の背景

PQQ (右図) を補欠分子族とするキノプロテイン (PQQ 酵素) は発見されてから既に 30 年が経過した。その間、酢酸菌やメタノール酸化性菌に加えて、植物と共生・寄生関係にある限定された細菌 (α , β , γ -プロテオバクテリア) 間に、大腸菌のアルドール脱水素酵素に代表される新規ないくつかのキノプロテインが見つけられている。これらの新規なキノプロテインは、古くから知られている *Acinetobacter calcoaceticus* の水溶性グルコース脱水素酵素 (sGDH) と同様、水溶性で、その生理的な電子受容体が見つかっていない。特に、sGDH の場合は、本酵素を遺伝子的に欠損させても、膜結合型のキノプロテイン・グルコース脱水素酵素が存在するために、そのグルコース酸化能は消失することはない。このようにして、新規なキノプロテインやこの sGDH は、現在に至るまで、その生理学的な役割は不明のままである。一方、酢酸菌の膜結合型キノプロテイン・グリセロール脱水素酵素 (GLDH) は種々の糖アルコールの酸化反応を担うことが明らかになっているが、PQQ を失ったアポ型酵素が多くの割合で存在し、その PQQ 易脱離性の原理および理由が明らかになっていない。後述するように、本酵素には 2 つの至適 pH が存在しており、そのアルカリ側の活性の生理学的な役割も不明なままである。



2. 研究の目的

水溶性キノプロテインの代表としての *Acinetobacter* sGDH の生理学的機能、さらに膜結合型の GLDH のアポ化現象の生理学的な機能を解明するために、これらの酵素の基質酸化と PQQ 還元反応、生成される PQQH₂ の酸素反応における役割、そして生成 PQQH₂ の生理学的な役割を明らかにすることを目的として解析を行った。

3. 研究の方法

(1) *Acinetobacter* sGDH の機能解析：*Acinetobacter calcoaceticus* の sGDH を大腸菌高発現株から精製し、その精製酵素を用いて、①酵素触媒活性に及ぼすラジカルスカベンジャー (Radical Scavenger: RS) の影

響、②酵素反応における電子受容体の役割、③酵素反応時における PQQH₂ の反応液中への放出の分光学的解析を行う。

(2) PQQH₂ のラジカル生成反応の解析：PQQ は DTT (dithiothreitol) によって還元される。そこで、①DTT 存在下での PQQ (PQQH₂) の酸素との反応を酸素電極を用いて、また②ラジカル生成反応を NBT (Nitro blue tetrazolium) の還元反応を用いて解析した。

(3) 酢酸菌 GLDH の精製とその機能解析：①酢酸菌 *Gluconobacter frateurii* CHM 43 の細胞膜からの GLDH の精製を行うために、GLDH 精製の妨害物としてのキノプロテイン・アルコール脱水素酵素 (ADH) の欠損株を作成し、引き続き、この株に GLDH 遺伝子を高発現する菌株を作成した。得られた菌株から本酵素を Midol-10 で可溶化し、DEAE-Toyopearl 及び CM-Toyopearl を用いて精製を行った。②得られた酵素及び *Gluconobacter thailandicus* Strain NBRC 3255 から精製された GLDH を用いて、その酵素活性の解析と、RS の影響を調べた。

4. 研究成果

(1) *Acinetobacter* sGDH の機能解析

大腸菌高発現株から精製した sGDH を用いて、その酵素活性に対する RS の影響を調べた。先づ、RS として知られている Mn (0.1 mM) の酵素活性 (PMS-DCIP 還元活性) への影響をみると、アルカリ領域 (pH 7.5~8.5) での活性が抑制されることが示された (図 1)。

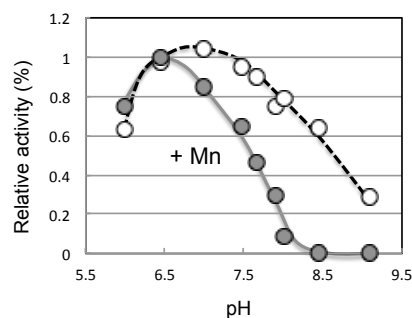


図 1. sGDH 活性の Mn による阻害

そこで、その他の RS である SOD を含め、酸性とアルカリ性での活性阻害を調べた (図 2A) ところ、Mn, SOD ともに、アルカリ (pH 8.5) 側でのみ酵素活

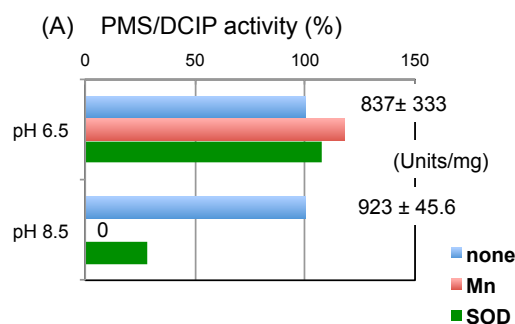


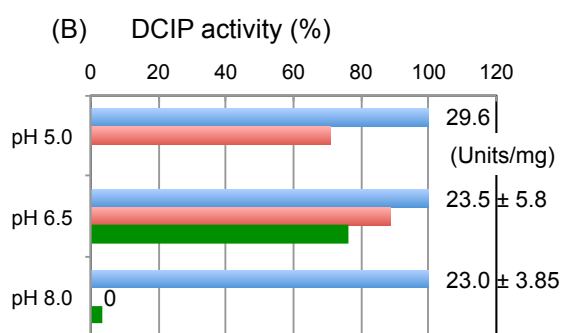
図 2. sGDH の酵素活性に及ぼす Mn 及び SOD の影響 (0.1 mM Mn, 150U/mL SOD)

性を阻害した。後述するように、本酵素活性測定では、PMS が電子受容体として用いられており、それを介して生成される O_2 が本反応に関与している可能性がある。そこで、活性としては低くなるが、PMS を含まない DCIP 還元酵素活性に対する影響も調べた (図 2B)。この場合も、pH 5.0 や pH 6.5 では、Mn もしくは SOD の影響は見られないのに対し、pH 8.0 もしくは pH 8.5 (data not shown) では、Mn, SOD とともに強くその活性を阻害した。このようにして、アルカリ側での酵素活性は O_2 を介して行われている可能性が示唆された。

次項で示すように、酵素反応中に生成される PQQH₂ がこの反応を媒介していると考えられた。そこで、本酵素反応中に生成される PQQH₂ の反応液中への脱離があるか否かを分光学的に調べた。しかしながら、少なくとも 1.75 μM sGDH (3.82U) / 250 μL では、反応液中に高濃度の PQQH₂ 生成を認めることはできなかった。同様に、PQQH₂ 依存の O_2 生成反応を NBT 還元反応として計測したが、少なくとも 0.955U sGDH/mL では、NBT 還元を認めることはできなかった。

(2) PQQH₂ のラジカル生成反応の解析

sGDH の酵素反応におけるラジカル生成について解析するためには、この酵素反応に関与する電子受容体である PMS, DCIP 及び PQQ 自身によるラジカル生成能について検証する必要がある。そこで、これら化合物の O_2 との反応及び O_2 生成反応を解析した。PMS は sGDH から電子を受け取ると、その還元体 PMSH₂ は O_2 と速やかに反応する (97.7 ± 5.85 at pH 6.5; 436 ± 64.5 at pH 8.5 with 87 pmol of sGDH) が、上述した



ように、PQQ は sGDH によって還元されない (遊離の PQQH₂ を生成しない)。しかし、PQQ は DTT によって化学的に還元されることが明らかになったので、DTT で還元・生成される PQQH₂ 及び PMSH₂ の酸素との反応を解析した (表 1)。結果、PQQ (PQQH₂) は pH 6.5, pH 8.5 どちらにおいても、酸素と反応し、その反応は SOD によって完全に阻害されると言うよりは、その添加によって逆に酸素濃度の増加 (O_2 ↑: 消費された酸素の回復) が見られた。一方で、Catalase は 60-70% の反応阻害を起こしたが、Mn は、酸性では効果がなく、アルカリ側でその反応を活性化した。PMS (アルカリ側でのみ DTT によって還元される) の場合、その酸素との反応は、SOD, catalase によって部分的に阻害されたが、Mn は PQQ と同様に活性化した。この Mn の効果は説明できないが、少なくとも SOD/Catalase の効果は、PQQH₂ や PMSH₂ が酸素と反応する時、 O_2 もしくは H_2O_2 の生成をとまっていることを示唆している。

そこで、さらに進んで、NBT 還元反応によって、それらの化合物によるラジカル (O_2) 生成能の解析を試みた。両化合物とも、アルカリ側でだけ NBT 還

1. PQQ 及び PMS の酸素との反応特性

O_2 (natom O/min)	pH 6.5	pH 8.5	
DTT-10 μM PQQ	130.3 ± 16.3 (5)	123.1 ± 40.4 (5)	
Residual activity	+ SOD	0%, 0% O_2 ↑	0%, 0% O_2 ↑
	+ Catalase	22.40% 34.00%	41% 33%
	+ Mn	92.50% 87.80%	440%
DTT-6 μM PMS	0	83.6 ± 2.95 (3)	
Residual activity	+ SOD		41%
	+ Catalase		34%
	+ Mn		215%

DTT (1mM) donates electrons to PQQ or PMS

元反応を示したが、PMS による反応は、DTT による還元が起こりにくいことが原因とも考えられるが、顕著ではなかった。一方、PQQ では強い NBT 還元反応が認められた (図 3)。そこで、低濃度の PQQ による NBT 還元反応 (pH 8.0) を解析したところ、この反応は SOD 及び Mn によって 70% 阻害、Catalase によって 50% 阻害が観察された。

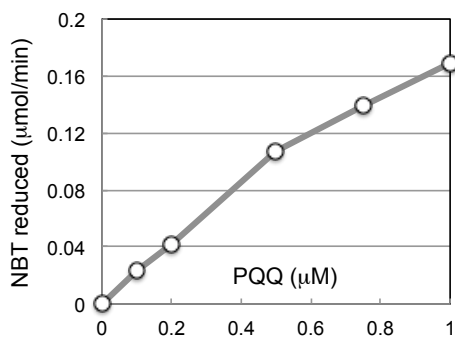


図3. PQQ-dependent NBT reduction.
40 μM NBT was reduced by PQQH₂ generated with 1 mM DTT.

なお、DCIP (DCIPH₂) では、O₂ もしくは NBT の還元反応は見られなかった。

(3) 酢酸菌 GLDH の精製と機能解析

酢酸菌 *G. thailandicus* Strain 3255 から精製された GLDH が酸性域に加え、アルカリ側で酵素活性を持つことが明らかになっている (図 4)。しかしながら、その役割は不明なままである。

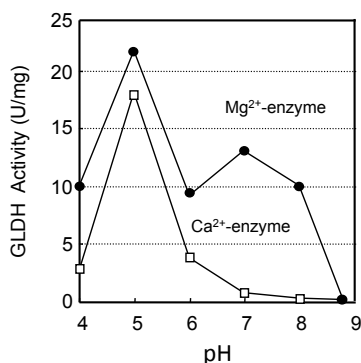


図 4. 3255-GLDH の Mg 酵素及び Ca 酵素の至適 pH

そこで、別の酢酸菌である *Gluconobacter frateurii* CHM43 を用いて、その普遍性を確認するとともに、大量の GLDH 取得の道の本研究において探った。そのため、先づ

本菌の ADH 欠損株を作成し精製を行ったが、精製酵素の収率が悪かったため、さらにこの欠損株の GLDH 過剰発現株を作成し、そこから精製することでその Purity 及び回収率に優れた精製酵素を得ることができた。本酵素の酵素活性 (PMS-DCIP) も 3255 株から精製された酵素と同様、2 つの至適 pH (5.0, 8.0) を

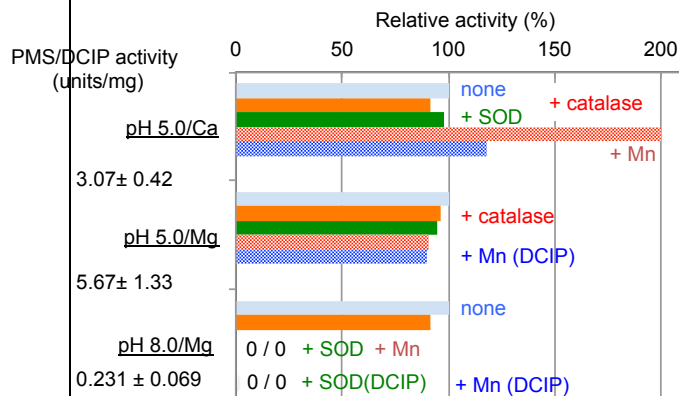


図 5. GLDH 活性に及ぼす RS の影響

有すること、それぞれ Ca 及び Mg で PQQ のホロ化が可能なが明らかとなった。そこで、この CHM 43-GLDH を用いて、酸性・アルカリでの酵素活性の RS の影響を調べた (図 5)。その結果、sGDH と同様に、アルカリ側 (pH 8.0: Mg-ホロ化) の活性のみ SOD 及び Mn によって阻害されること (ともに、活性の逆転、還元型 DCIP の再酸化反応が見られる) が示された。しかしながら、GLDH の場合、アルカリ側においても、Catalase による反応阻害はみとめられなかった。

また、sGDH と同様、GLDH でも、少なくとも 0.06U 酵素/mL 濃度では、直接の NBT 還元反応は認められなかった。

(4) まとめ

これらの結果から、アルカリ pH では sGDH 及び GLDH とともに、O₂⁻ を介した酵素反応 (DCIP 還元) が起こっていると推測された。この現象は、もしこれらの酵素が基質によって還元された PQQH₂ を酵素触媒部位から、アルカリ pH に限って解離できるとすれば、うまく説明することができる。

しかしながら、今回の研究では、使用する酵素のスケールもしくは検出技術の問題で、PQQH₂ のリリースを検出することはできなかった。

今後、このあたりを改善して、その反応を証明することができれば、リリースされる PQQH₂ による近年明らかになってきたそのラジカル・スカベンジング能によって、これら生理学的役割の明らかでないキノプロテイン及び不明なキノプロテイン反応の役割が解明できるかもしれない。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 10 件)

1) Ano Y, Hours RA, Akakabe Y, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K, Adachi O. Membrane-bound glycerol dehydrogenase catalyzes oxidation of D-pentones to 4-keto-D-pentones, D-fructose to 5-keto-D-fructose, and D-psicose to 5-keto-D-psicose. *Biosci Biotechnol Biochem.* **81**: 411-418 (2017) 査読有り

2) Matsutani M, Hirakawa H, Hiraoka E, Theeragool G, Yakushi T, Matsushita K: Complete genome sequencing and comparative genomic analysis of the thermotolerant acetic acid bacterium, *Acetobacter pasteurianus* SKU1108, provide a new insight into thermotolerance. *Microbes Environ* **31**: 395-400 (2016) 査読有り

3) Sainz F, Jesús Torija M, Matsutani M, Kataoka N, Yakushi T, Matsushita K, Mas A. Determination of dehydrogenase activities involved in D-glucose oxidation in *Gluconobacter* and *Acetobacter* Strains. *Front Microbiol* **7**: 1358 (2016) 査読有り

4) Matsushita K, Azuma Y, Kosaka T, Yakushi T, Hoshida H, Akada R, Yamada M: Genomic analyses of thermotolerant microorganisms used for high-temperature fermentations. *Biosci Biotechnol Biochem.* **8**: 655-668 (2016) 査読有り

5) Saichana N, Matsushita K, Adachi O, Frébert I, Frébertová J. Acetic acid bacteria: A group of bacteria with versatile biotechnological applications. *Biotechnol Adv* **33**: 1260-1271 (2015) 査読有り

6) Matsutani M, Ito K, Azuma Y, Ogino H, Shirai M, Yakushi T, Matsushita K. Adaptive mutation related to cellulose producibility in *Komagataeibacter medellinensis* (*Gluconacetobacter xylinus*) NBRC3288. *Appl Microbiol Biotechnol.* **99**: 7229-7240 (2015) 査読有り

7) Charoenyingcharoen P, Matsutani M, Yakushi T, Theeragool G, Yukphan P, Matsushita K. A functionally critical single

nucleotide polymorphism in the gene encoding the membrane-bound alcohol dehydrogenase found in ethanol oxidation-deficient *Gluconobacter thailandicus*. *Gene* **567**: 201-207 (2015) 査読有り

8) Kataoka N, Matsutani M, Yakushi T, Matsushita K. Efficient production of 2,5-diketo-d-gluconate via heterologous expression of 2-keto-gluconate dehydrogenase in *Gluconobacter japonicus*. *Appl Environ Microbiol* **81**: 3552-3560 (2015) 査読有り

9) Matsutani M, Fukushima K, Kayama C, Arimitsu M, Hirakawa H, Toyama H, Adachi O, Yakushi T, Matsushita K. Replacement of a terminal cytochrome *c* oxidase by ubiquinol oxidase during the evolution of acetic acid bacteria. *Biochim Biophys Acta Bioenergetics* **1837**:1810-1820 (2014) 査読有り

10) Nishikura-Imamura S, Matsutani M, Insomphun C, Vangnai AS, Toyama H, Yakushi T, Abe T, Adachi O, Matsushita K. Overexpression of a type II 3-dehydroquininate dehydratase enhances the biotransformation of quinate to 3-dehydroshikimate in *Gluconobacter oxydans*. *Appl Microbiol Biotechnol* **98**:2955-2963 (2014) 査読有り

[学会発表] (計 7 件)

1) 松下一信: 実験室進化・適応育種に基づく耐熱性機構の解析と高温発酵系の開発 シンポジウム2SY05「応用微生物学」最新事情～探索から育種まで～; 日本農芸化学会 2017年度大会, 3月17~20日, 2017 (京都女子大学; 京都市)

2) 尾崎聖士朗, 鳥飼敬弘, 松谷峰之介, 片岡尚也, 薬師寿治, 松下一信: *Gluconobacter*属酢酸菌における膜結合型グリセロール脱水素酵素の過剰発現; 日本農芸化学会中四国支部第47回講演会(例会) 1月28日, 2017 (島根大学; 松江市)

3) 寺田優花, 尾崎聖士朗, 片岡尚也, 足立収生, 赤壁善彦, 薬師寿治, 松下一信: *Gluconobacter*属酢酸菌のキノプロテイン・グリセロール脱水素酵素における新しい基質特異性と反応メカニズムの提唱; 日本農芸化学会2016年度中四国支部大会(46回講演会) 9月15日, 2016 (高知大学; 高知市)

4) 松下一信, 松谷峰之介, 西倉慎頭, 秦野智之, Natsaran Saichana, Uraivan Masud-Tippayasak, 服部浩美, 貝沼(岡本)章子, 兼崎友, 石川森男, 片岡尚也, 薬師寿治: *Acetobacter pasteurianus* SKU1108の高温適応耐熱化株TH-3の発現・機能解析から見え

る耐熱性機構；日本農芸化学会2016年度大会，3月27日~30日，2016（札幌コンベンションセンター；札幌市）

5) 片岡尚也，吉田知世，種場理絵，阿野嘉孝，松谷峰之介，薬師寿治，松下一信：*Gluconobacter oxydans*による5-ケトグルコン酸発酵におけるグルコノ- δ -ラクトナーゼの役割；日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同支部会，9月17~18日，2015（愛媛大学；松山市）

6) 数田皓平，数井彩加，松谷峰之介，薬師寿治，松下一信，阿野嘉孝：*Gluconobacter thailandicus*に見出された*sldBA*パラログ遺伝子の機能解析；日本農芸化学会2015年度中四国・西日本支部合同支部会，9月17~18日，2015（愛媛大学；松山市）

7) 片岡尚也，松谷峰之介，薬師寿治，松下一信：2-ケト-D-グルコン酸脱水素酵素の異種発現による*Gluconobacter japonicus*での効率的2,5-ジケト-D-グルコン酸生産；日本農芸化学会2015年度大会，3月27日~29日，2015（岡山大学；岡山市）

〔図書〕（計 1 件）

Kazunobu Matsushita & Minenosuke Matsutani: Chapter 7. Distribution, evolution and physiology of oxidative fermentation, “Acetic acid bacteria: Ecology and Physiology”, K. Matsushita et al. (eds.), Springer, pp. 159-178 (2016) (総 350 ページ)

〔産業財産権〕

○出願状況（計 1 件）

名称：耐熱性微生物の作製方法
発明者：赤田倫治，星田尚司，山田守，村田正之，高坂智之，松下一信，薬師寿治，ナンタポン・ナワラート，東慶直
権利者：山口大学・近畿大学
種類：特許
番号：特願 2014-159048
出願年月日：平成 26 年 8 月 4 日
国内外の別：国内

○取得状況（計 1 件）

名称：高温酢酸発酵酢酸菌
発明者：松下一信、秦野智行、薬師寿治、足立收生、ガンジャンナ・ティーラグール
権利者：山口大学
種類：特許
番号：第 5470807 号
取得年月日：平成 26 年 2 月 14 日
国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松下一信 (MATSUSHITA KAZUNOBU)

山口大学・創成科学研究科・教授

(特命)

研究者番号：50107736

(2) 研究分担者

片岡尚也 (KATAOKA NAOYA)

山口大学・創成科学研究科・助教

研究者番号：50713509

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()