

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780124

研究課題名（和文）ビタミン候補物質ピロロキノリンキノン（PQQ）と結合する蛋白質の同定と機能解析

研究課題名（英文）Identification and characterization of protein binding to pyrroloquinoline quinone (PQQ), a vitamin-like substance

研究代表者

赤川 貢（AKAGAWA MITSUGU）

大阪府立大学・生命環境科学研究科・講師

研究者番号：70405356

研究成果の概要（和文）：ピロロキノリンキノン（PQQ）は、細菌類の脱水素酵素の酸化還元補酵素であり、哺乳類においては重要な栄養素、または、ビタミンである可能性が指摘されている。本研究では、PQQのビタミンとしての可能性を探るために、マウス由来のNIH3T3線維芽細胞からPQQ結合蛋白質の探索を行った。その結果、細胞骨格タンパク質、熱ショック蛋白質ファミリー、炭水化物代謝酵素、解糖系酵素などで同定することができた。

研究成果の概要（英文）：Pyrroloquinoline quinone (PQQ), a redox cofactor for bacterial dehydrogenases, has been implicated to be an important nutrient or vitamin in mammals functioning. In the present study, to investigate the potential of PQQ as vitamin, we searched for PQQ-binding protein in mouse NIH3T3 fibroblasts. We found cytoskeletal proteins, heat shock protein families, carbohydrate metabolic enzyme, and glycolytic enzyme as novel PQQ-binding proteins.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4030,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農芸化学・食品科学

キーワード：ピロロキノリンキノン、ビタミン、酸化還元補酵素、キノン、機能性食品因子

1. 研究開始当初の背景

ピロロキノリンキノン（PQQ）は、メタノール資化性細菌のメタノール脱水素酵素の酸化還元補酵素として1979年に同定された化合物であり、その後、原核生物においていくつかのPQQ依存性脱水素酵素の存在が明らかになっている。PQQは野菜や肉類などの食品にも含有され、PQQの生合成能を持たないヒトの組織においても検出されるために、我々は食事からPQQを摂取していると考えられている。1989年に、Ruckerらの

グループによってPQQ欠乏餌を与えたマウスが発育不良、皮膚の脆弱化、および繁殖能力の低下等の異常を呈することが報告され、哺乳類におけるPQQの栄養学的な重要性が初めて示された。これらの症状は、微量のPQQを与えることによって改善されることから、PQQは哺乳類においても補酵素として機能するビタミンの一種ではないかと推測された。最近になって、笠原らがマウスのリジン代謝酵素の一つであるアミノアジピン酸セミアルデヒド（AAS）脱水素酵素中に

PQQ が結合する特徴的なアミノ酸配列を見出すとともに PQQ 欠乏マウスにおけるリジン代謝の異常を明らかにした。しかしながら、PQQ が AAS 脱水素酵素と結合して補酵素として機能するという直接的な証明はなされておらず、PQQ は未だビタミンとしては認定されていない。その栄養生理学的な側面に加えて、PQQ は抗酸化作用、繊維芽細胞増殖促進作用、神経細胞保護作用などの生理作用を持つことが見い出され、その薬理的効能も注目されている。このように PQQ は、ビタミン候補物質として挙げられているだけではなく、我々の健康の維持および増進に貢献する有望な機能性食品因子であると考えられている。近年、機能性食品成分が細胞内外の酵素、受容体、輸送担体、転写因子等の蛋白質と相互作用することによってその生理機能を発現することが解明されつつあり、その重要性が国内外において注目されている。現在までに、PQQ と細胞内において相互作用する蛋白質の網羅的な解析は行われておらず、細胞内における PQQ の作用機序に関する知見は極めて乏しいため、研究の進展が期待されていた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、哺乳類の培養細胞中から PQQ 結合蛋白質を同定し、その機能および PQQ の作用を調べることによって、PQQ がビタミンである可能性を探るとともに、PQQ の持つ生理機能の作用機序を解明することである。

3. 研究の方法

① PQQ アフィニティービーズの作製とその評価

(1) PQQ アフィニティービーズの作製

スパーサーを介してアミノ基を持つアガロースビーズ (EAH Sepharose 4B) にカルボジイミド (EDC) を用いたカップリング反応によって PQQ を固定化させた。

(2) PQQ アフィニティービーズおよびプローブの評価

PQQ は、3つのカルボキシル基を持つためランダムかつ複数のアミノ基とのカップリング反応が起こる可能性がある (図1)。本研究では、その反応を制御し最適な反応条件を探るために *Acinetobacter calcoaceticus* 由来の PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼのアポ体を調製し、PQQ アフィニティービーズとの結合を SDS-PAGE によって評価した。また、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を測定することによって PQQ アフィニティービーズの補酵素としての機能性を評価した。

② 培養細胞からの PQQ 結合蛋白質の精製と

プロテオミクスによる同定

マウス由来の繊維芽細胞株 NIH3T3 細胞を培養し、細胞内からの PQQ 結合蛋白質の探索を行った。

(1) 細胞溶解液を PQQ アフィニティービーズとインキュベートし、pull-down アッセイによって PQQ 結合蛋白質を精製した。

(2) 得られた PQQ 結合蛋白質を SDS-PAGE によって解析した。分離された PQQ 結合蛋白質をゲルからピッキングし、トリプシンによるゲル内消化を行った後、ペプチド断片を MALDI TOF/MS により分析した。得られたペプチドマップをもとにペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) 法による MASCOT 解析を行い、PQQ 結合蛋白質を同定した。

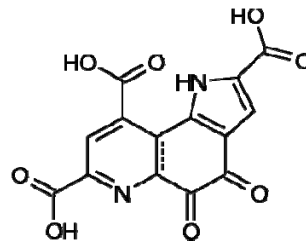


図1 PQQ の構造

4. 研究成果

本研究では、PQQ 結合蛋白質を同定するため PQQ アフィニティービーズを作製し、微生物由来の既知の PQQ 依存性酵素を機能性の評価系に利用することでより効果的なアフィニティー素材の開発を行った。PQQ アフィニティービーズは、スパーサーを介してアミノ基を持つ EAH Sepharose 4B に架橋剤である EDC を用いたカップリング反応によって作製した。作製したアフィニティービーズの評価を行うために *Acinetobacter calcoaceticus* 由来の PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼのアポ体を調製し、検討を行った。その結果、PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼのアポ体は、EAH Sepharose には結合せず、PQQ アフィニティービーズにのみ結合することを SDS-PAGE によって明らかにした (図2)。また、アポ体とアフィニティービーズの複合体がグルコースデヒドロゲナーゼ活性を有することが確認され、その機能性が明らかになった。

次に、作製した PQQ アフィニティービーズを使用することで PQQ による細胞増殖促進作用が報告されているマウス由来の NIH3T3 繊維芽細胞から PQQ 結合蛋白質の探索を行った。細胞溶解液と PQQ アフィニティービーズをインキュベートして pull-down 法によって PQQ 結合蛋白質のアフィニティ

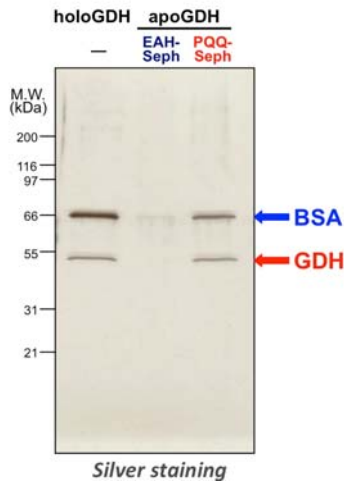


図2 PQQ アフィニティービーズとアポPQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) の結合の SDS-PAGE による解析

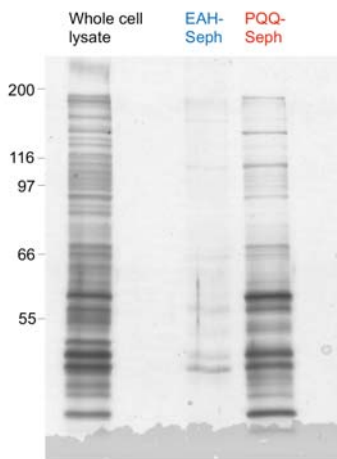


図3 PQQ アフィニティービーズによる NIH3T3 細胞中の PQQ 結合蛋白質の分離と SDS-PAGE による解析

一分離を行い、結合した蛋白質を SDS-PAGE によって分析した (図3)。その結果、アフィニティービーズに特異的に結合する蛋白質バンドが検出された。その蛋白質バンドをピックアップし、トリプシンによるゲル内消化を行った後、MALDI-TOF MS によって解析を行った。その結果、表1に示す myosin や actin などの細胞骨格タンパク質、HSP ファミリータンパク質、炭水化物代謝酵素である aldose reductase、解糖系酵素である pyruvate kinase、伸長因子である elongation factor-2 を同定することができた。

今後は、同定された蛋白質と PQQ の結合によってもたらされる蛋白質機能の解析、お

よび細胞応答の解析を進めていく。そして、PQQ の新規な生理作用やビタミン様作用の機序の解明を目指す。

表1 同定された PQQ 結合蛋白質

Band No.	Protein name	Taxonomy	Nominal mass	Score	Sequence coverage (%)
S03	Myosin-9 isoform 1	Mus musculus	227,429	137	37
S06	Alpha-actin-4	Mus musculus	105,368	89	34
S07	Elongation factor 2	Mus musculus	96,222	115	44
S08	Heat shock protein 8	Mus musculus	70,056	100	38
S09	Heat shock protein 8	Mus musculus	70,056	109	30
S10	Pyruvate kinase isozymes M1/M2	Mus musculus	58,378	249	59
S12	Gamma-actin	Mus musculus	41,335	121	36
S13	Aldose reductase	Mus musculus	36,052	110	34

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8件)

- ① Takada, M., Sumi, M., Maeda, A., Watanabe, F., Kamiya, T., Ishii, T., Nakano, M., and Akagawa, M. Pyrroloquinoline quinone, a novel protein tyrosine phosphatase 1B inhibitor, activates insulin signaling in C2C12 myotubes and improves impaired glucose tolerance in diabetic KK- A^y mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2012 Nov. 16; **428**(2): 315–320. 査読有り
- ② Kimura, K., Takada, M., Ishii, T., Tsuji-Naito, K., and Akagawa, M. Pyrroloquinoline quinone stimulates epithelial cell proliferation by activating epidermal growth factor receptor through redox cycling. *Free Radic. Biol. Med.* 2012 Sep. 15; **53**(6): 1239–1251. 査読有り

[学会発表] (計10件)

- ① 赤川 貢、新規食品素材ピロロキノリンキノン (PQQ) の機能探索、PQQ のレドックスサイクリングを介した上皮細胞増殖促進作用、日本農芸化学会 2013 年度大会、2012 年 3 月 27 日、仙台
- ② 峰松 謙治、幾島 知世、太田 優香、石井 剛志、赤川 貢、ビタミン様化合物ピロロキノリンキノンと結合する細胞内蛋白質の探索、第 17 回日本フードファクター学会 (JSofF) 学術集会・第 9 回日本カテキン学会総会 合同大会 2012 (静岡)、2012 年 11 月 10 日
- ③ Mayumi Takada, Kazuki Kimura, Takeshi Ishii, Kentaro Naito, and Mitsugu Akagawa: Pyrroloquinoline quinone (PQQ)

activates insulin signaling in mouse C2C12 myotubes by inhibiting protein tyrosine phosphatase 1B. 2011 International Conference of Food Factors (Taipei, Taiwan), 2011年11月21日

科・講師
研究者番号：80405357

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計2件）

名称：表面プラズモン共鳴法を用いたピロロキノリンキノンの検出法

発明者：池本 一人、三毛門 毅、赤川 貢

権利者：三菱ガス化学株式会社、公立大学法人大阪府立大学

種類：特許

番号：特願 2012-025063

出願年月日：2012年2月8日

国内外の別：国内

○取得状況（計0件）

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

赤川 貢 (AKAGAWA MITSUGU)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究科・講師

研究者番号：70405356

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

石井 剛志 (ISHII TAKESHI)

静岡県立大学・大学院生活健康科学研究科・助教

研究者番号：50448700

谷 修治 (TANI SHUJI)

大阪府立大学・大学院生命環境科学研究