

Enacyloxin Oxidase の電子受容体に関する研究

渡邊 敏彦・加藤 亮*・工藤 憲信**

Studies on the Electron Acceptors of Enacyloxin Oxidase

Toshihiko WATANABE, Akira KATO and Kazunobu KUDO

(1997年10月7日受理)

Enacyloxin oxidase can oxidize enacyloxin IVa (ENX IVa) to enacyloxin IIa (ENX IIa). Redox cofactor PQQ was active for enzyme reaction, even though the enzyme presumably has a cofactor different from PQQ. When we searched for other cofactors active for the enzyme activity, PQQ, Wurster's Blue and several quinones were found able to stimulate the enzyme reaction. As molecular oxygen seemed to be a terminal electron acceptor of this reaction, the reaction was carried out under both aerobic and anaerobic conditions. Wurster's Blue and p-quinone were active under both conditions, while PQQ and the isolated cofactor had no activity under anaerobic condition. These results seem to indicate that Wurster's Blue or p-quinone functions as an electron reservoir.

1. はじめに

Enacyloxin oxidase (ENX oxidase) は Watanabe *et al* が発見した新規酸化酵素である。その発見の歴史を簡単に述べると、約20年前に Watanabe が発見した Enacyloxin (以下 ENX, 最初の鎖状ポリエーテル抗生物質)¹⁾ から始まる。以来多くの研究者の協力の下に、ENX の性状(構造, 同属体の発見, 新しい作用機作の解明等)^{2,3,4,5)} が明らかにされてきた。これら一連の研究中に於て、培養経過の厳密な観察, 生産物の同定から ENX oxidase が発見された。⁶⁾ ENX 生産菌である *Frateuria* sp. W-315 株はその培養中期から培地中に ENX IVa を排出するが、その後、ENX IIa が新たに培地中に見出だされるようになる。両化合物の相違点は15'位の酸化状態だけである。更なる研究より、本生産菌は培養中期に ENX IVa と ENX oxidase を菌体外に排出する。そして培養液中において ENX oxidase が ENX IVa を酸化して ENX IIa が培養液中に蓄積されるようになったことが証明された。

本酵素は新規酵素であり、ゲル電気泳動で単一バンドを与えるまで精製され、分子量73 kDa の単量体である。Redox cofactor (補酵素) が本酵素より抽

出され、PQQ の同族体と考えられたが、蛍光分光光度計による測定より明らかに PQQ とは異なっていた。しかしながら PQQ そのものも補酵素活性を示した。なお、抽出補酵素の構造は未定である。

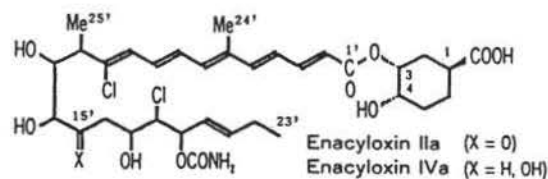


Fig. 1 Chemical structures of enacyloxins (ENXs)

2. 実験方法

A. 酵素標品 (Holo-enzyme) の製法は文献6)を参照されたい。Holo-enzyme から補酵素を除いた Apo-enzyme の作成 (酵素の Apo 化) は完全には行えないので、部分的に Apo 化した Apo-enzyme を使用した。この Apo-enzyme は失活し易いため保存が出来ず、実験の直前に毎回調製した。

B. 無酸素状態 (Ar 封入) の作り方

次のCに示した反応液を入れた、吸引用アーム付き短小試験管に、ブチル製ダブルゴムキャップを装着し、3方コックに真空ポンプと Ar ガスポンベと上記試験管をつなぎ、直ちに脱気と Ar ガス充填を

* 大蔵省印刷局, ** 中外製薬

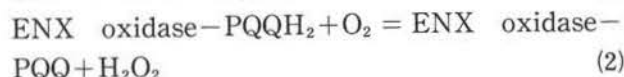
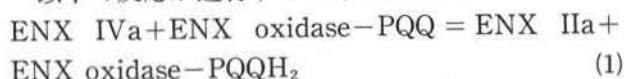
数回繰り返した。最後は Ar ガスを充填した。

C. 酵素反応の条件は以下に示した。

ENX IVa solution (2.3×10^{-8} g/ μ l)	20
Apo-enzyme solution	10
cofactor solution, if necessary	5
Tris-HCl (5×10^{-2} M, pH 7.6)	15
Total volume	50 μ l

Incubated at 30°C for 30 min

以下の反応が進行すると考えられる。



反応終了後、反応液は -80°C にて反応を停止後、生成した ENX IIa を HPLC により定量した。⁶⁾ 使用した試薬類は和光純薬製を用いた。

3. 結果と考察

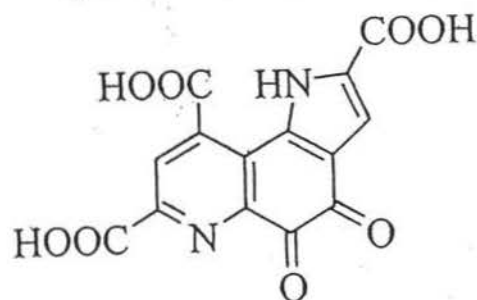
酸化酵素は一般に酵素部分 (Apo-enzyme) と補酵素 (cofactor) が結合 (通常は 1 : 1) して初めて活性を示す酵素 (Holo-enzyme) となる。ENX oxidase はカルボニル試薬により失活することよりキノプロテインと呼ばれる一群の酸化酵素に属すと考えられている。キノプロテインはその補酵素として Pyrrolo-quinoline quinone (PQQ) あるいはその同属体を要求する。先に述べたように本酵素の補酵素は単離されているが、PQQ と類似の構造を有するものの PQQ とは異なるとされている。

キノプロテインの補酵素は Apo-enzyme と共有結合しているものと、非共有結合しているものがある。前者としては広く動物に存在する amine oxidase の Topa Quinone (TPQ) が、後者としては細菌のメタノール脱水素酵素の PQQ が有名である。本酵素の補酵素は非共有結合型であり、Triton X-100 あるいはエーテル処理により Holo-enzyme から遊離するが、不完全な分離に止まる。完全な分離を試みたが、Apo-enzyme が失活してしまうことより、本実験では Triton X-100 処理により、部分的に Apo 化した酵素標品を用い、そこへ各種電子受容体を添加することでその効果を調べた。なおこれらの処理により酵素活性は変動するので、無処理の Holo-enzyme の活性測定は本実験では行っていない。

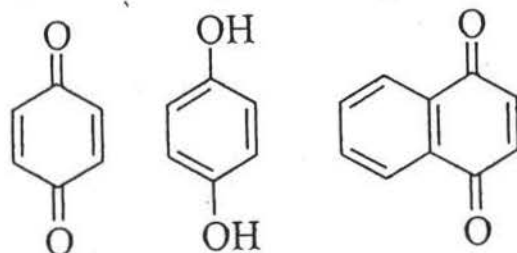
供試電子受容体は Fig. 2 に示した。PQQ 及び Quinone 化合物としては p-Quinone, Hydroquinone, α -naphthoquinone を用いた。またキノプロテインの電子受容体として報告されている Wurster's Blue (Tetramethyl-p-phenylenediamine)⁷⁾ 及び生物細胞の還元力検出に用いられる Methylene Blue も用いた。

最初の実験は分子状酸素存在下で電子受容体の濃度を変化させた場合の酸化量の変動である (Table 1)。コントロール (部分的に補酵素を持っているために示される endogenous な酸化量) の値を 1 とした場合、PQQ は 1×10^{-4} M で 1.52 に対し、より低濃度の 1×10^{-6} M は 1.66 とより高い活性が示された。これに対し、Wurster's Blue および p-Quinone は

Pyrrolo-Quinoline Quinone (PQQ)



p-Quinone Hydroquinone α -Naphthoquinone



Wurster's Blue



Methylene Blue

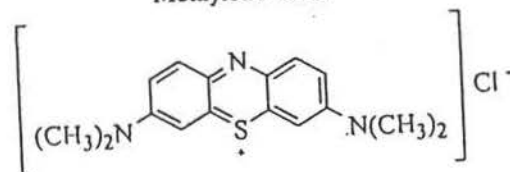


Fig. 2 Chemical structures of electron acceptors tested

Table 1 Effects of various electron acceptors on ENX oxidase

Addition	Conc(x10 ⁻⁴ M)	ng ENX IIa formed /min/mg prot.	Ratio	Conditions
Control * (without cofactor)		2.38	1.00	Air
PQQ	1	3.62	1.52	Air
PQQ	0.01	3.95	1.66	Air
Wurster's Blue	1	4.43	1.86	Air
Wurster's Blue	0.01	2.15	0.90	Air
p-Quinone	1	3.60	1.51	Air
p-Quinone	0.01	2.16	0.91	Air

* Apo-enzyme was prepared by treatment with Triton X-100 just before every experiment shown in Tables 1, 2 and 3.

高濃度の場合には PQQ と同レベルか、やや勝っていたが、低濃度の場合にはほぼコントロールの値まで低下した。この結果は PQQ と、Wurster's Blue および p-Quinone との間には、明らかに電子の授受に関して性質が異なることを示している。

補酵素はその性質よりして、受け取った電子は直ちに次の電子受容体（本酵素の場合は分子状酸素）に渡されるものと考えられる。PQQ 添加の場合、低濃度で高い活性が得られていることは、この濃度でも補酵素は十分量存在していることを意味する。またあまりに高濃度だとやや阻害的に働くようである。Wurster's Blue および p-Quinone に関しては、低濃度添加でコントロールよりやや低い値まで低下したことは、電子に対する親和性が PQQ より著しく低い場合か、或いは一度結合した電子を遊離し難いためと考えられる。

Ohshiro *et al*⁸⁾ は還元型 PQQ がその電子を分子状酸素に渡す速さを詳細に測定している。そして非常に速やか (pH 7.43 で 30 秒以内) に分子状酸素に電子を渡して酸化型に復帰することが示されており、代謝回転速度 (turn over rate) が大きいものと思われる。Table 1 の結果のうち、PQQ が低濃度添加でも大きな活性が得られていることは、電子の速やかな移動を示すものであり、Ohshiro *et al* の結果とよ

く一致している。そして Wurster's Blue および p-Quinone については電子の遊離する速さが遅いため電子をある量だけ保持し続けている可能性が推定された。そこで分子状酸素の存在および非存在下に於ける活性の変動を検討し、Table 2 に示した。

2 回の実験を行い、前半では PQQ の濃度を 100 倍量変動させても、無酸素下では全く活性が検出されなかった。電子受容体である分子状酸素が無いと PQQ 濃度に拘らず活性が認められないと言う事は、次に電子を渡す相手がいない場合、PQQ は電子を受け取らないか或いは受け取っても保持し続けることが出来ないことを示している。

後半の実験では Table 1 で活性が示された電子受容体やその関連化合物などを高濃度で添加した。受容体としての効果が示されなかった α -Naphthoquinone, Methylene Blue を除いて、いずれも無酸素下でも活性が示された。活性が示された化合物については酸素存在下での値の方がより大きいことより、この差の部分が分子状酸素へ電子が移行した部分であり、無酸素下での値は電子の保持能力と関係するものと思われる。但し、Hydro-quinone でも活性が示されたことは、試薬中に p-Quinone が含まれていたためと考えられる。 α -Naphthoquinone 及び Methylene Blue では奇妙な結果が示された。酸素

Table 2 Effects of molecular oxygen on ENX oxidase activity with various electron acceptors

Addition (Exp. 1)	Conc(x10 ⁻⁴ M)	ng ENX IIa formed /min/mg prot.	Ratio	Conditions
Control (without cofactor)		2.25	1.00	Air
Control (without cofactor)		0.02>	0.01>	Argon
PQQ	6	2.92	1.30	Air
PQQ	6	0.02>	0.01>	Argon
PQQ	0.06	3.69	1.64	Air
PQQ	0.06	0.02>	0.01>	Argon
(Exp. 2)				
Control (without cofactor)		2.38	1.00	Air
Control (without cofactor)		0.02>	0.01>	Argon
PQQ	0.06	3.90	1.64	Air
PQQ	0.06	0.02>	0.01>	Argon
Wurster's Blue	1	4.43	1.97	Air
Wurster's Blue	1	2.94	1.31	Argon
p-Quinone	1	3.60	1.60	Air
p-Quinone	1	3.19	1.42	Argon
Hydroquinone	1	3.50	1.47	Air
Hydroquinone	1	2.95	1.24	Argon
α -Naphtoquinone	1	2.40	1.01	Air
α -Naphtoquinone	1	2.35	0.99	Argon
Methylene Blue	1	2.42	1.02	Air
Methylene Blue	1	2.35	0.99	Argon

Table 3 ENA oxidation with isolated cofactor and PQQ

Addition	Conc($\times 10^{-4}$ M)	ng ENX IIa formed /min/mg prot.	Ratio	Conditions
Control (without cofactor)		2.38	1.00	Air
Control (without cofactor)		0.02>	0.01>	Argon
Isolated cofactor **		3.90	1.64	Air
Isolated cofactor		0.02>	0.01>	Argon
PQQ	0.06	3.69	1.55	Air
PQQ	0.06	0.02>	0.01>	Argon

** Cofactor was isolated from holo-enzyme by ether-treatment.

Concentration of cofactor was not estimated.

存在下では全く効果を示さないが、無酸素下では酸素存在下での control とほぼ同様な結果が得られている。これは無酸素下ではあたかも本来ある補酵素からの電子を受けとったためとも考えられるが、いずれにしても更に検討が必要と考えられる。

最後に、ENX oxidase が本来持っている補酵素と PQQ との相違点を酸化活性を測定することで検討した。Table 3 に示すとおり、酸素の存在下は勿論、非存在下でも単離補酵素 (isolated cofactor) は PQQ とほぼ同様な結果がえられた。このことは単離補酵素が PQQ 類似化合物であるとの以前得られた結果⁷⁾を補強するものであると共に、分子状酸素を補酵素とする酸化酵素の研究の際に、酸素の存在、非存在下で活性測定を行う重要性をも示すものと考えられる。

4. 要 約

- (1) 新規酸化酵素 ENX oxidase に対し、電子受容体活性を有する化合物を検討した。
- (2) 電子の授受に関係すると考えられる化合物のうち 6 種類を選び、Apo-enzyme に対する添加効果を測定した。
- (3) 末端電子受容体である分子状酸素存在下で PQQ, Wurster's Blue および p-Quinone は Apo-enzyme の活性を回復した。 α -Naphthoquinone, Methylene Blue は無効であった。

(4) 分子状酸素非存在下では、PQQ とそれ以外の化合物とははっきりと挙動が異なっていた。ENX oxidase からの補酵素及び PQQ は分子状酸素非存在下では全く活性を示さず、補酵素と電子受容体との簡便な見分け方が示された。

5. 謝 辞

本研究を行うにあたり種々ご助言を頂いた伊崎和夫東北大学農学部名誉教授 (現東北工大教授) ならびに杉山長美東北大学農学部助教授に感謝致します。なお本研究の一部は 1995 年度日本農芸化学会全国大会で発表されたものである。また本研究の費用の一部は(財)日本化学研究会助成金より支出されたものであり謝意を表する。

6. 文 献

- 1) T. Watanabe, K. Izaki & H. Takahashi: *J. Antibiotics*, **35**, 1141 (1982)
- 2) T. Watanabe, T. Sugiyama, M. Takahashi, J. Shima, K. Yamashita, K. Izaki, K. Furihata & H. Seto: *J. Antibiotics*, **45**, 470 (1990)
- 3) T. Watanabe, T. Sugiyama, K. Chino, T. Suzuki, S. Wakabayashi, H. Hayashi, R. Itami, J. Shima & K. Izaki: *J. Antibiotics*, **45**, (1992)

- 4) T. Watanabe, T. Suzuki & K. Izaki: *J. Antibiotics*, **44**, 1457 (1991)
- 5) R. Cetin, I.M. Krab, P.H. Anborgh, R.H. Cool, T. Watanabe, T. Sugiyama, K. Izaki & A. Parmeggiani: *The EMBO Journal*: **15**, 2604 (1996)
- 6) R. Oyama, T. Watanabe, H. Hanzawa, T. Sugiyama & K. Izaki: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **57**, 1914 (1994)
- 7) T. Watanabe, R. Oyama, H. Hanzawa, T. Sugiyama & K. Izaki: *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 123 (1995)
- 8) S. Itoh, Y. Ohshiro & T. Agawa: *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **59**, 1911 (1986)