

# バイオミメティクスにつながる異化代謝プラットフォーム

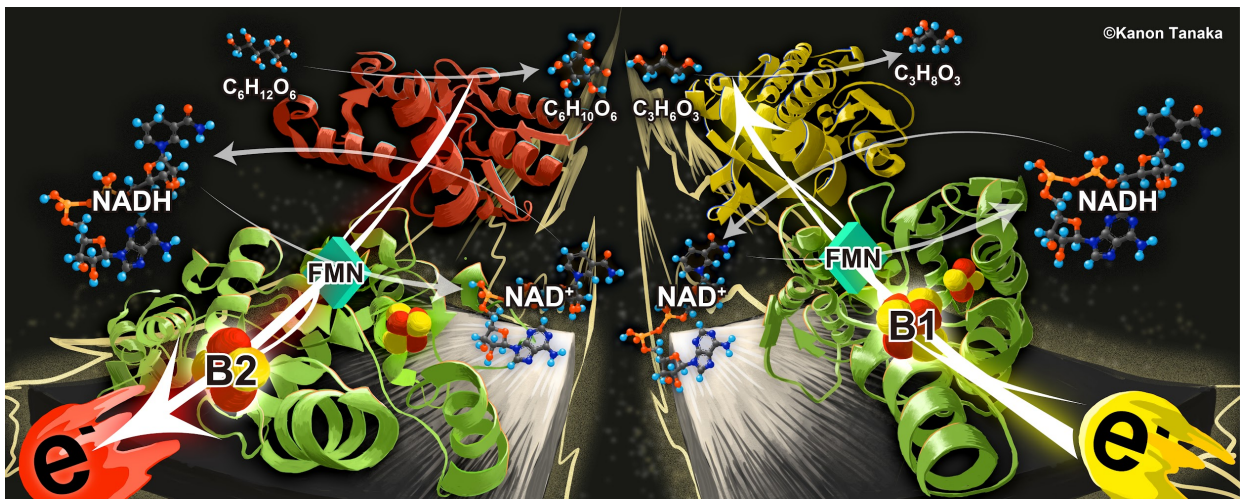
—自然に学ぶモノづくりを目指して—

## 概要

京都大学大学院農学研究科の槇塚太紀 修士課程学生（研究当時）、宋和慶盛 同助教、片山志織 同研究員、北隅優希 同助教、由里本博也 同准教授、阪井康能 同教授、白井理 同教授らのグループは、*Methylobacterium extorquens* AM1 というメタノール資化性菌（葉圏共生微生物の 1 種）<sup>※1</sup> 由来のギ酸脱水素酵素（FoDH1）<sup>※2</sup> の新規変異体を創出し、高効率な異化代謝プラットフォームの構築と共役モデルの実証に成功しました。

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）は、生体内の異化代謝<sup>※3</sup> に関わる補酵素で、本補酵素が必要な NAD 依存性酵素は酸化還元酵素の約 30%を占めます。天然に存在する多種多様な NAD 依存性酵素を利用した生体模倣技術（バイオミメティクス）は、バイオ燃料電池やバイオセンサ、バイオリアクタなどの幅広い応用展開が期待されていますが、補酵素である NAD を再生するための異化代謝プラットフォームが必要です。今回、効率的な NAD<sup>+</sup>/NADH 再生系を実現するために、FoDH1 の  $\beta$  サブユニット単独発現体（FoDH1B）の発現系を構築し、直接電子移動型酵素電極反応（DET 型反応）<sup>※4</sup> によって、NAD<sup>+</sup>/NADH の再生効率を約 2.5 倍に改善しました。また、本再生系と NAD 依存性酵素の共役にも成功し、グルコース燃焼やグリセロール合成をモデル系として実証しました。さらに、数理解析モデルに基づいて FoDH1B の DET 型反応を解析し、NADH および NAD<sup>+</sup> の酸化還元触媒反応における電子移動経路を推定しました。今回の研究成果は、異化代謝を模倣したバイオテクノロジーの創出に向けた共通基盤技術として期待されます。

本研究成果は、2023 年 8 月 1 日に、国際学術誌「*Electrochimica Acta*」（IF: 6.6）にオンライン掲載されました。



FoDH1B による NAD<sup>+</sup>/NADH 再生系と NAD 依存性酵素の共役

## 1. 背景

持続可能な低炭素社会の実現に向けて、化石燃料からの脱却と持続可能なエネルギーの活用が求められています。生体触媒である酸化還元酵素は、穏和な条件における高い触媒能と基質選択性を有するため、バイオマス燃料の高効率エネルギー変換や、有用化合物（機能性化学品や医薬中間体など）の選択的生産を可能にする触媒材料として注目されています。

私たちは、約 2,000 種類の酸化還元酵素のうち約 30%を占める NAD 依存性酵素に注目しています。本酵素は  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  酸化還元対を補酵素として利用する酵素であり、生体内における多種多様な異化代謝において重要な役割を担っています。本反応を生体模倣することで、様々なバイオテクノロジー（バイオリアクタ、バイオ燃料電池、バイオセンサなど）への応用が期待されていますが、こうした革新的技術の創出に向けて、補酵素を再生する異化代謝プラットフォーム（ $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  再生系）が不可欠です。特に、DET 型反応を利用した  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  再生系は、常温常圧中性という穏和な条件で高い活性を示すだけでなく、環境負荷も小さいことから、省エネルギーと経済性の両立が求められる未来社会の実現に大きく貢献できます。DET 型反応によって  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  の相互変換を触媒できる酵素として FoDH1 が知られています（図 1）。本酵素による  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  再生は既の実証されていますが、その触媒電流は小さく、NAD 依存性酵素と共役させるには十分な性能には至っていません。

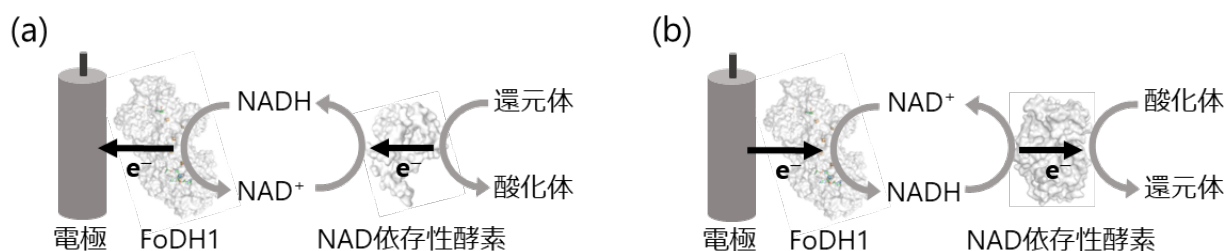


図 1 : (a)DET 型  $\text{NAD}^+$ 再生系と NAD 依存性酵素の共役  
(b)DET 型  $\text{NADH}$  再生系と NAD 依存性酵素の共役

## 2. 研究手法・成果

### 2-1. DET 型 $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ 再生系の効率化に成功

図 2 (a)は先行研究によって解明された FoDH1 の立体構造です。FoDH1 は 110 kDa の  $\alpha$  サブユニット（ピンク色）と 60 kDa の  $\beta$  サブユニット（緑色）から構成されるヘテロダイマー<sup>\*5</sup>です。 $\beta$ サブユニットは、 $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  の酸化還元を触媒するジアフオラーゼユニットとも呼ばれていることから、DET 型  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  再生には  $\beta$  サブユニットしか関与しないと推定できます。そこで、より効率的な補酵素再生系を志向して、 $\beta$  サブユニット単独発現体（FoDH1B）の同種発現系を構築しました。FoDH1B と FoDH1 の DET 型反応を電気化学的に評価した結果、FoDH1B 修飾電極において約 2.5 倍の触媒電流が記録されました（図 2 (b)）。FoDH1B は FoDH1 の約 3 分の 1 の大きさであるため、電極表面の酵素吸着量の増加によって電流値が増加したと考えられます。また、FoDH1B により効率化された DET 型  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  再生系と NAD 依存性酵素の共役を試みました。 $\text{NAD}^+$ 再生系をグルコース脱水素酵素（GDH）<sup>\*6</sup> によるグルコース酸化触媒反応と、 $\text{NADH}$  再生系をグリセロール脱水素酵素（GLDH）<sup>\*7</sup> による DHA 還元触媒反応とそれぞれ共役させることで、明瞭な触媒波を確認できました（図 3）。これらの共役系は、今後バイオマスの多段階完全酸化系や有用物質生産への応用が期待できます。

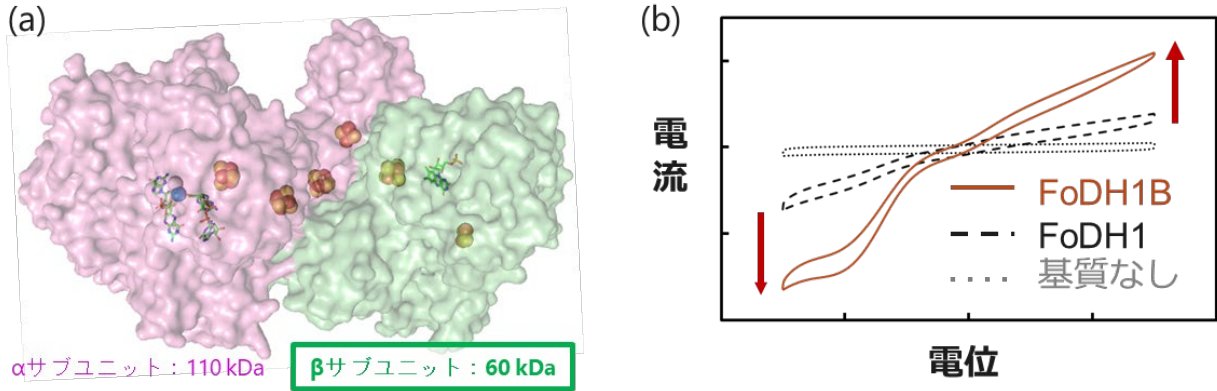


図 2 : (a)FoDH1 の立体構造と各サブユニットのサイズ、(b)FoDH1B と FoDH1 の電流値の比較

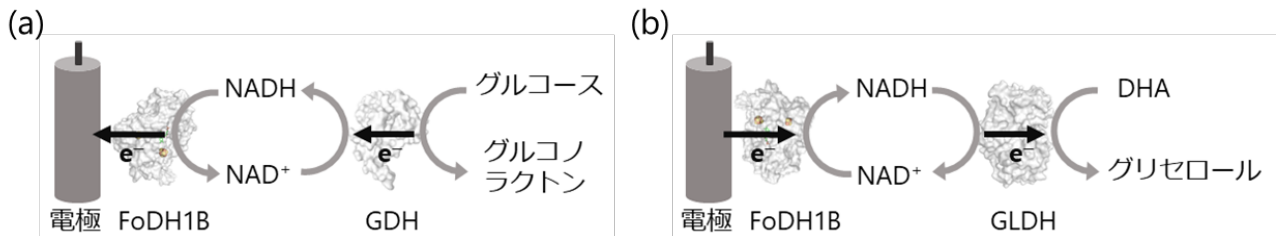


図 3 : (a)FoDH1B による DET 型  $NAD^+$ 再生系と GDH によるグルコース酸化触媒反応の共役  
(b)FoDH1B による DET 型  $NADH$  再生系と、GLDH による DHA 還元触媒反応の共役

## 2-2. FoDH1B の DET 型反応における電子移動経路を推定

図 2 (b)の結果から、 $NADH$  酸化と  $NAD^+$  還元の生物電気化学的応答が異なるため、両者で異なる DET 型反応機構を持つことが示唆されました。そこで、数理解析モデルに基づいてボルタモグラム<sup>\*8</sup>の解析を行いました。図 4 は、解析結果と FoDH1 の立体構造情報を元に推定した電子移動経路です。フラビンモノヌクレオチド (FMN) は  $NAD^+/NADH$  の酸化還元反応を触媒する活性部位であり、B1、B2 は  $\beta$  サブユニットに存在する 2 つの鉄硫黄クラスター (FeS) を示しています。それぞれの反応で、異なる電極反応部位を利用していると結論づけました。これらの DET 型反応機構の解明によって、より高効率な補酵素再生系に向けた酵素-電極デザインが期待できます。

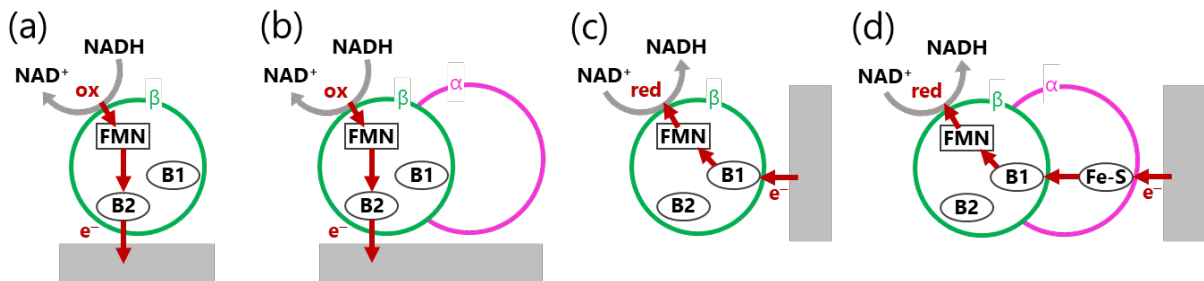


図 4 : FoDH1B と FoDH1 における DET 型反応機構

(a) FoDH1B の  $NADH$  酸化、(b) FoDH1 の  $NADH$  酸化、(c) FoDH1B の  $NAD^+$ 還元、(d) FoDH1 の  $NAD^+$ 還元

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究は、異化代謝を模倣したバイオテクノロジーの創出に向けた共通基盤技術になります。まずは、バイオマスを活用した発電デバイス（バイオ燃料電池）への展開性を考えています。今後、補酵素再生系に関わる酵素の活性向上や酵素-電極界面のデザイン、NAD 依存性酵素との共役デザインを進めることで、最高エネルギー効率（省エネルギー）の異化代謝バイオミメティクスの創出に繋げ、持続可能なバイオデバイスによって環境/エネルギー問題に貢献します。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、日本学術振興会 科学研究費助成事業（JP21H01961、JP22K14831）、環境省・（独）環境再生保全機構の環境研究総合推進費（JPMEERF20232R01）、京都大学創立 125 周年記念ファンド「くすのき・125」、京都大学への寄附金（加来裕生氏、王厚龍氏、濱野泰如氏）の支援のもとで実施されました。

#### <用語解説>

- ※1 **メタノール資化性細菌**：メタノールを炭素源として増殖できる細菌で、植物葉面の優占種として棲息し、植物に対して生長促進効果を示すものもいる。
- ※2 **ギ酸脱水素酵素**：本酵素の生理的役割はギ酸からのエネルギー獲得ですが、DET 型反応<sup>\*4</sup>によって NADH から NAD<sup>+</sup>への酸化、NAD<sup>+</sup>から NADH への還元を触媒できます。
- ※3 **異化代謝**：外から取り入れた物質を小さな構成要素に分解してエネルギーを取り出す生体内での反応。
- ※4 **直接電子移動型酵素電極反応**：酵素反応と電極反応が共役した反応を“酵素電極反応”と呼びます。その中でも、酵素が電極と直接的に電子移動できるものを直接電子移動型と呼び、本文中では DET 型反応と記載しています。
- ※5 **ヘテロダイマー**：2 種類の異なるタンパク質が結合したものの。
- ※6 **グルコース脱水素酵素**：グルコースをグルコノラクトンに酸化する酵素。
- ※7 **グリセロール脱水素酵素**：DHA（ジヒドロキシアセトン）をグリセロールに還元する酵素。
- ※8 **ボルタモグラム**：電極に対して電位を掃引した際に流れる電流を測定して得られる電流-電位曲線。図 2 (b)のような波形が得られます。

#### <参考文献>

Tatsushi Yoshikawa, Fumiaki Makino, Tomoko Miyata, Yohei Suzuki, Hideaki Tanaka, Keiichi Namba, Kenji Kano, Keisei Sowa, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Multiple electron transfer pathways of tungsten-containing formate dehydrogenase in direct electron transfer-type bioelectrocatalysis, *Chem. Commun.*, **58**, 6478 (2022)

Kento Sakai, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, Kazuyoshi Takagi, Kenji Kano, Direct electron transfer-type four-way bioelectrocatalysis of CO<sub>2</sub>/formate and NAD<sup>+</sup>/NADH redox couples by tungsten-containing formate dehydrogenase adsorbed on gold nanoparticle-embedded mesoporous carbon electrodes modified with 4-mercaptopyridine, *Electrochem. Commun.*, **84**, 75 (2017)



### <研究者のコメント>

人類が直面するエネルギー／環境問題に対して、バイオミメティクスが大きなブレイクスルーになると考えています。特に、DET 型反応を実現できる酵素に関する基礎研究は、持続的な未来社会を構築する上で、学術的にも社会的にも大きな意義を持ちます。自然が創り出した高度な触媒機能を利活用することで、人類と地球を豊かにする革新的な技術を実現し、研究成果の社会実装に取り組みます。（宋和 慶盛）

### プロフィール写真（宋和）



### <論文タイトルと著者>

タイトル：An Enhanced Direct Electron Transfer-type  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  Regenerating System Using the Diaphorase Subunit of Formate Dehydrogenase 1

（ギ酸脱水素酵素ジアフォラーゼユニットを用いた直接電子移動型  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  再生系の効率化）

著者：Taiki Makizuka, Keisei Sowa, Shiori Katayama, Yuki Kitazumi, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, Osamu Shirai

掲載誌：*Electrochimica Acta* DOI：10.1016/j.electacta.2023.142954