

複雑な酵素反応を数理モデルで解析

—熱力学と速度論を駆使した新しい理論で酵素電極反応のメカニズムに迫る—

概要

京都大学大学院農学研究科の市川小夏 修士課程学生、足立大宜 同特定研究員、北隅優希 同准教授、白井理 同教授、宋和慶盛 同助教らの研究グループは、*Gluconobacter oxydans* という酢酸菌^{*1}由来のアルデヒド脱水素酵素（ALDH）^{*2} およびその変異体の特性評価より、ALDH の膜結合サブユニットが触媒活性の向上に寄与することを明らかにしました。また、酵素の触媒反応を解析するための数理モデルを構築し、ALDH の膜結合サブユニット欠損変異体（ ΔC_ALDH ）の触媒反応に関する熱力学および速度論的パラメータを解明しました。

酸化還元酵素は、呼吸や光合成といった生体内電子移動において重要な役割を担う生体触媒です。中でも、一部の酵素は、「直接電子移動型酵素電極反応(DET 型反応)」^{*3} と呼称される反応を進行し、酸化還元に伴う電子を電極に直接的に伝達できます。DET 型反応が可能な酵素（DET 酵素）の中でも、ALDH は卓越した DET 活性^{*4} を有します。本酵素は、呼吸鎖電子伝達^{*5} を担う三量体膜酵素であり、生体内反応では、アセトアルデヒド酸化とユビキノン還元を触媒します。一方、DET 型反応では、アセトアルデヒド酸化に伴う電子を電極に受け渡すことが可能です。本研究では、ALDH の膜結合サブユニットの働きに着目し、 ΔC_ALDH を開発しました。 ΔC_ALDH と野生型組み換え ALDH（rALDH）の比較より、膜結合サブユニットの存在が、ALDH の活性向上に寄与していることを証明しました。さらに、 ΔC_ALDH の活性と酵素－基質間の電位差に理想的な直線自由エネルギー関係（LFER）^{*6} が成立することを発見し、LFER に基づく新しい酵素反応解析モデルを構築することで、 ΔC_ALDH の触媒反応定数(k_{cat})は $5000 \pm 2000 \text{ s}^{-1}$ と算出されました。本成果は、酵素の触媒反応機構を解明し、より高活性な DET 酵素開発に貢献する点で、学術的かつ社会的な波及効果が期待されます。

本研究成果は、2025 年 4 月 18 日に、国際学術誌「*ACS Catalysis*」にオンライン掲載されました。



図 1： ΔC_ALDH によるアセトアルデヒド酸化反応

1. 背景

酸化還元酵素は、常温・常圧・中性条件で反応を進行できる触媒です。近年、酸化還元酵素の基質選択性や生体/環境適合性を利用した、バイオセンサやバイオリアクタの研究開発が進められています。中でも、酵素と電極が直接電子を授受する「直接電子移動型酵素電極反応（DET 型反応）」は、限られた酸化還元酵素でのみ報告されている非常にユニークな反応であり、人工の電子仲介物質が不要であるためエネルギー変換効率に優れています。DET 型反応の社会応用に向けて様々な研究が行われている一方で、DET 型反応のメカニズム解明や機能向上に向けた知見は、いまだ完全には解明されていません。私たちは、上記課題の解決に向けて、DET 型反応が可能な酵素（DET 酵素）における構造の共通点に着目しました。DET 酵素の中でも、酢酸菌由来の三量体膜結合型脱水素酵素は、卓越した DET 活性（最大 30 mA cm^{-2} を超える触媒電流密度 ※典型的な報告例の 30 倍以上）を示すことが知られています。さらに、これらの酵素は、相同性の高い膜結合サブユニットを有する点で共通しています。そこで、卓越した DET 活性と膜結合サブユニットの関係を調べるために、モデル酵素として酢酸菌由来 DET 酵素であるアルデヒド脱水素酵素（ALDH）に着目しました。本酵素は、触媒反応部位であるモリブデンコファクター（Moco）と 5 つの電子伝達コファクター（2×鉄硫黄コファクター（FeS）、3×ヘム c）を有しており、Moco におけるアセトアルデヒド酸化に伴う電子は、電子伝達コファクターを介して、生体内ではユビキノンを⁷、DET 型反応では電極に受け渡されます。本研究では、ALDH の膜結合サブユニット欠損変異体（ ΔC_ALDH ）を開発し、野生型組み換え ALDH（rALDH）と比較することで、ALDH の DET 型反応や酵素内電子伝達について考察しました。

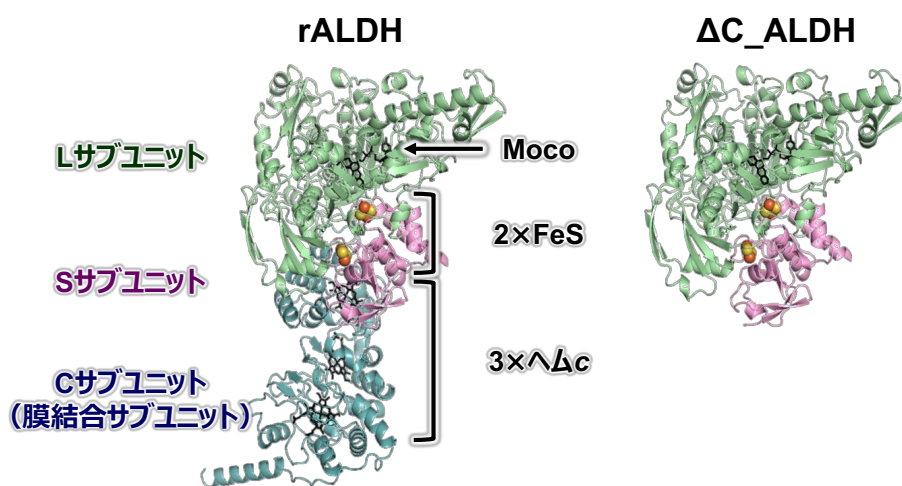


図 2：rALDH（左）と ΔC_ALDH （右）の構造

2. 研究手法・成果

2-1. rALDH と ΔC_ALDH の電気化学測定を行い、速度論解析を用いて DET 型反応を定量的に比較

電極上に酵素を修飾した酵素機能電極を用いて、pH 2.5 から 8 における rALDH と ΔC_ALDH の電気化学測定を行いました。サイクリックボルタンメトリー（CV）⁸ によって測定された電流-電圧曲線より、両酵素の電気化学特性が異なっていることが明らかになりました（図 3）。膜結合サブユニット欠損による電流-電圧曲線の微妙な変化を定量的に比較するために、DET 型反応の理論式を用いて、電流-電圧曲線の数値解析⁹を行いました。速度論解析の結果、酵素の電極反応部位¹⁰の電位（ $E^{\circ'}_E$ ）と基質の電位（ $E^{\circ'}_D$ ）の差（ $E^{\circ'}_E - E^{\circ'}_D$ ）が大きいほど、DET 型反応による触媒電流密度（ j_{cat} ）が向上していることが示唆されました（図 4）。さらに、rALDH における $E^{\circ'}_E - E^{\circ'}_D$ の値が ΔC_ALDH よりも大きいことから、膜結合サブユニットの存在が、酵素-基質間の電位差を増加させ、ALDH の触媒活性向上に起因していることを明らかにしました。

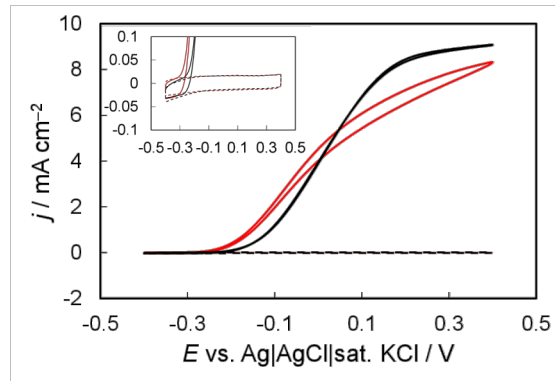


図 3：酵素機能電極を用いて測定された電流－電圧曲線（黒：rALDH、赤： ΔC_ALDH ）

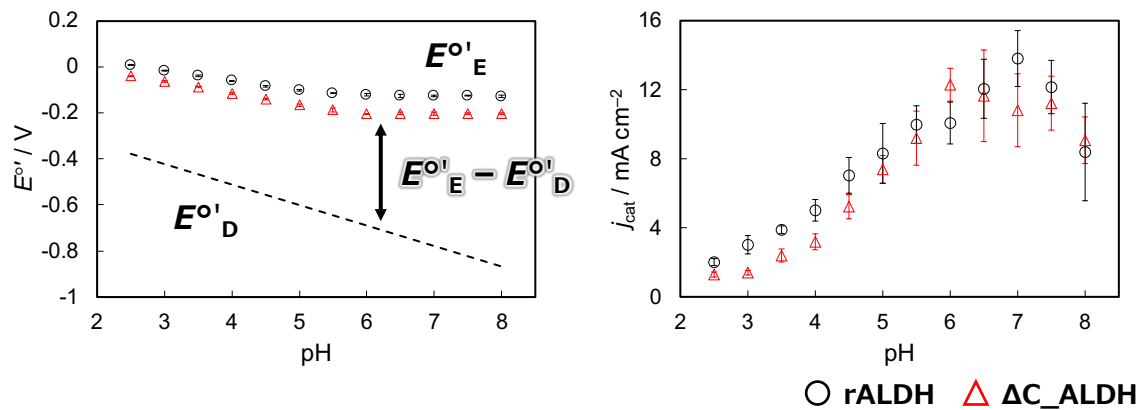


図 4：電流－電圧曲線の速度論解析によって算出された $E^{\circ'}_E$ と j_{cat}

2-2. 直線自由エネルギー関係 (LFER) に基づく触媒反応の解析

上述の解析より、電位差と DET 活性の関係が示唆されたため、 $E^{\circ'}_E - E^{\circ'}_D$ と j_{cat} について、LFER を用いたさらなる速度論解析を行いました。LFER とは、速度論的パラメータが熱力学的パラメータに対して指数関数的に応答する関係のことです。本実験において、速度論的パラメータは酵素活性や触媒電流密度、熱力学的パラメータは電位差を意味します。解析の結果、両酵素の $E^{\circ'}_E - E^{\circ'}_D$ に対する $\log(j_{cat} / \text{mAcm}^{-2})$ プロットは、LFER を示唆する直線領域を有していました。さらに、 ΔC_ALDH の領域では、 $E^{\circ'}_E - E^{\circ'}_D$ と j_{cat} の関係が理想的な LFER に従うことが分かりました。これは、 ΔC_ALDH の DET 型反応の主たる駆動力が、酵素－基質間の電位差であることを意味します。また、 ΔC_ALDH の DET 型反応において、非熱力学的な相互作用が寄与しないことも明らかになりました。

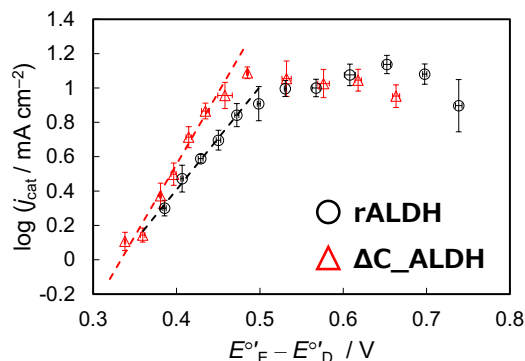


図 4： $E^{\circ'}_E - E^{\circ'}_D$ に対する $\log(j_{cat} / \text{mAcm}^{-2})$ プロット（点線はそれぞれの LFER 領域）

2-3. ΔC_ALDH の触媒反応に関する熱力学/速度論的パラメータの算出

ΔC_ALDH が LFER に従う理想的なモデル酵素であることを利用して、触媒反応に関する熱力学/速度論的パ

ラメータの算出を試みました。DET 型反応において、 ΔC_ALDH は、アセトアルデヒド酸化と電極への電子伝達を触媒します。一方でフェリシアンを電子受容体とした溶液活性測定においては、アセトアルデヒド酸化とフェリシアン還元が触媒されます。両反応の共通点、相違点に着目した反応モデルから、LFER に基づく新規解析式を DET 活性と溶液活性のそれぞれに対して構築しました。解析の結果、 ΔC_ALDH の触媒反応定数 (k_{cat}) は、 $5000 \pm 2000 \text{ s}^{-1}$ と算出されました。さらに、酵素－電極間の電子移動速度定数や電極上の酵素吸着量など、重要なパラメータを定量化することに成功しました。

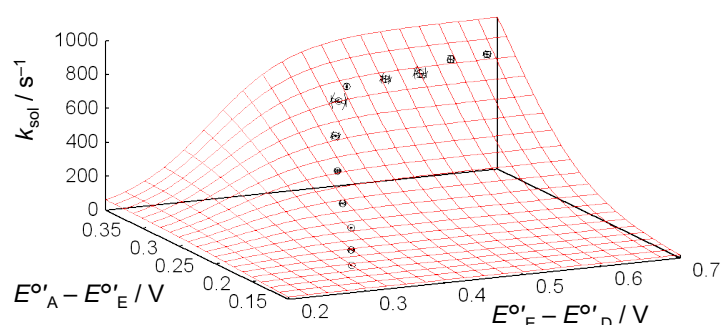


図 5：LFER に基づく ΔC_ALDH 溶液活性の速度論解析結果

3. 波及効果、今後の予定

DET 型反応は、生体や環境負荷の少ない次世代生物電気化学デバイスの基盤技術として期待されています。本研究成果は、DET 酵素である ALDH に着目し、本酵素の膜結合サブユニットの意義を解明しました。さらに、DET 型反応メカニズムや酵素内電子伝達に着目し、新しい数理モデルを用いてその詳細を明らかにしました。本研究成果は、いまだ詳細な理解が進んでいない DET 型反応のメカニズム解明に繋がります。また、本研究で得られたパラメータは、DET 酵素の合理的設計を可能にし、DET 型反応の社会実装に貢献します。

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 (JP23K19281、JP22K14831)、国立研究開発法人科学技術振興機構 革新的 GX 技術創出事業 (GteX) (JPMJGX23B4)、京都大学創立 125 周年記念ファンド「くすのき・125」、京都大学 L-INSIGHT (世界視力を備えた次世代トップ研究者育成プログラム)、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 **酢酸菌**：食酢の製造に用いられる微生物。
- ※ 2 **アルデヒド脱水素酵素**：アセトアルデヒドを酢酸に酸化する酵素。
- ※ 3 **直接電子移動型酵素電極反応 (DET 型反応)**：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。
- ※ 4 **DET 活性**：DET 型反応で観測できる触媒電流のこと。
- ※ 5 **呼吸鎖電子伝達系**：複数の酸化還元反応を組み合わせ、生物がエネルギーを獲得する代謝系。
- ※ 6 **直線自由エネルギー関係 (LFER)**：速度論的パラメータの熱力学的パラメータに対する指数関数的な応答を表した関係。
- ※ 7 **ユビキノ**：コエンザイム Q_{10} のこと。生体内で ALDH の電子供与体として働きます。
- ※ 8 **サイクリックボルタンメトリー (CV)**：電気化学測定手法の一つ。電極電位を直線的に掃引し、応答電流を測定する手法。
- ※ 9 **速度論解析**：理論式に基づく実験データの回帰分析。速度論解析により、反応に関わる各種パラメータを定量的に推定できます。
- ※ 10 **電極反応部位**：DET 型反応において、電極への電子伝達を担う酵素内コファクターのこと。

<研究者のコメント>

「DET 型反応を酸化還元酵素の特性評価系として利用することで、酵素反応に伴う種々のパラメータを定量的に評価することができました。今後も DET 型反応の研究に携わり、DET 酵素の機能向上や次世代生物電気化学デバイスの開発に貢献します。」(市川 小夏)

「一見複雑に思える酵素反応が、単純なパラメータ同士の比例関係で規定されていることが分かり、生物の代謝がいかに合理的であるのかを痛感しました。本研究成果を活用し、様々な酵素における DET 型反応メカニズムの解明に挑戦し続けたいと思います。」(足立 大宜)

「電気化学的な手法を駆使してさまざまな生命現象をモデル化し、今後も生命の理解を深めてゆきたいと思っています。」(北隅 優希)

「新しい数理モデルを駆使することで、卓越した DET 活性を持つ ALDH の反応メカニズムの一端を明らかにすることができました。今回の成果により、DET 酵素のより詳細な理解だけでなく、合理的で戦略的な酵素創出も期待できます。今後、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 (左から市川、足立、宋和)

<論文タイトルと著者>

タイトル: Quantitative Elucidation of Catalytic Reaction of Truncated Aldehyde Dehydrogenase Based on Linear Free Energy Relationship

(小型化アルコール脱水素酵素の触媒反応における直線自由エネルギー関係を用いた定量評価)

著 者: Konatsu Ichikawa, Taiki Adachi, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, and Keisei Sowa

掲 載 誌: *ACS Catalysis*, 15, 7283 (2025) DOI: 10.1021/acscatal.4c07978