

# 構造情報と計算科学を駆使して膜酵素を可溶化

## —酵素を利用した生物電気化学デバイスの機能向上に貢献—

### 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（現・博士課程学生）、足立大宜 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、大阪大学大学院生命機能研究科 日本電子 YOKOGUSHI 協働研究所の宮田知子 特任准教授（常勤）、牧野文信 同招へい准教授、難波啓一 同特任教授（常勤）らの共同研究グループは、*Gluconobacter oxydans* という酢酸菌<sup>※1</sup>由来の膜結合型アルコール脱水素酵素（ADH）<sup>※2</sup>の膜結合領域を同定し、界面活性剤フリーの ADH 可溶化変異体を開発しました。また、本変異体の電極触媒活性が野生型組み換え ADH（rADH）の約 2 倍程度に向上していることを明らかにしました。

酸化還元酵素は、常温・常圧・中性で高い選択性を有する生体触媒です。中でも、一部の酸化還元酵素は、「直接電子移動型酵素電極反応（DET 型反応）」<sup>※3</sup>と称される反応を進行し、酸化還元に伴って生じる電子を電極に直接授受することができます。DET 型反応が可能な酵素（DET 酵素）の中でも、ADH は卓越した DET 活性<sup>※4</sup>を有しており、DET 型エタノール酸化反応を触媒します。本反応は、バイオセンサやバイオ燃料電池などへの応用が期待されている一方、ADH が膜酵素であることが産業利用における課題の一つとなっていました。そこで本研究では、ADH の構造情報と計算科学的手法を活用し、本酵素の膜結合領域を推定しました。また、推定した膜結合領域を欠損させ、界面活性剤フリーの ADH 可溶化変異体（sADH）を構築しました。sADH は可溶性画分から単離・精製され、クライオ電子顕微鏡（Cryo-EM）<sup>※5</sup>によってその構造が解明されました。さらに、電気化学特性評価の結果、sADH の DET 活性は、rADH の約 2 倍程度に増加していました。

本研究成果は、2026 年 3 月 12 日に、国際学術誌「*Chemical Communications*」にオンライン掲載され、Inside Front Cover に採択されました。

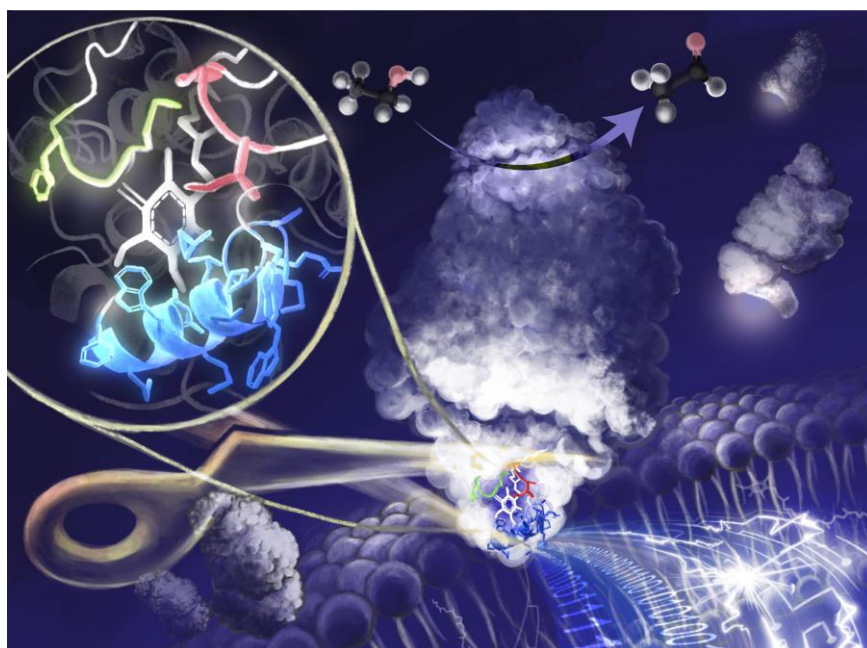


図 1：ADH の膜結合領域同定と sADH の構築

©京都大学（イラストレーター：田中 花音）

## 1. 背景

酸化還元酵素は、生体内電子伝達において重要な働きを担う触媒であり、常温・常圧・中性条件で高い基質選択性を有します。近年、酸化還元酵素と電極が直接電子を受受する「直接電子移動型酵素電極反応 (DET 型反応)」が、生体/環境適合性の高い反応系として注目されています。DET 型反応が可能な酵素 (DET 酵素) の中でも、酢酸菌 *Gluconobacter* 属由来の膜結合型脱水素酵素群は、卓越した DET 活性を有するモデル酵素として研究されてきました。一方、本酵素群が膜酵素であることに起因して、産業利用に向けたいくつかの課題が存在しました。第一に、膜酵素は一般的に疎水性が高く、ミスフォールディングが起きやすいため、異種大量発現系の構築が困難です。また、膜酵素の精製には、界面活性剤を用いた長時間の可溶化プロセスが必須であり、精製コストの増加や酵素の失活を引き起こします。さらに、膜酵素に共存する界面活性剤が、DET 型反応に影響を及ぼすことも知られています。よって、高い DET 活性を維持した状態で、膜酵素を可溶化酵素にする手法が求められていました。そこで本研究では、*Gluconobacter oxydans* 由来の ADH に着目しました。本酵素は、ヘテロ三量体の膜酵素であり、触媒反応部位であるピロロキノリンキノン (PQQ) とヘム *c* (ヘム *c<sub>L</sub>* と呼称) を有する L サブユニット、3 つのヘム *c* (N 末端からヘム 1*c*、2*c*、3*c* と呼称) を有し、膜結合を担う C サブユニット、S サブユニットから構成されます。基質であるエタノールは PQQ で酸化され、酸化反応に伴って生じる電子は、ヘム *c* を介して生体内では疎水性電子受容体であるユビキノ (UQ) <sup>\*6</sup> に、DET 型反応では電極に受け渡されます。ADH の全体構造は、2023 年に解明された一方、本酵素の膜結合領域は未知でした。本研究では、ADH の膜結合領域を同定し、ADH の DET 活性を低下させることなく、界面活性剤フリーの ADH 可溶化変異体 (sADH) を構築することを目的としました。

## 2. 研究手法・成果

### 2-1. ADH の膜結合領域推定と可溶化変異のデザイン

ADH の膜結合領域を予測するため、ADH の Cryo-EM マップ (図 2A、EMDB : EMD-34368) と PDB 構造 (図 2B、PDB : 8GY2) に着目しました。Cryo-EM マップの赤点線で囲まれた部分に、界面活性剤由来のノイズを確認することができます。本ノイズは、C サブユニットの一部が局所的に疎水性を有していることを示しています。また、本ノイズに対応する位置に、疎水性電子受容体である UQ の結合領域が存在していました。UQ 周辺のアミノ酸に着目すると、側鎖が溶媒側に露出した疎水性アミノ酸残基が多数存在していました (図 2C)。これらの構造的特徴に基づき、C サブユニット内に 3 つの膜結合領域 (領域 1 : P77-I78、領域 2 : W159-F174、領域 3 : G212-M215) を推定しました。

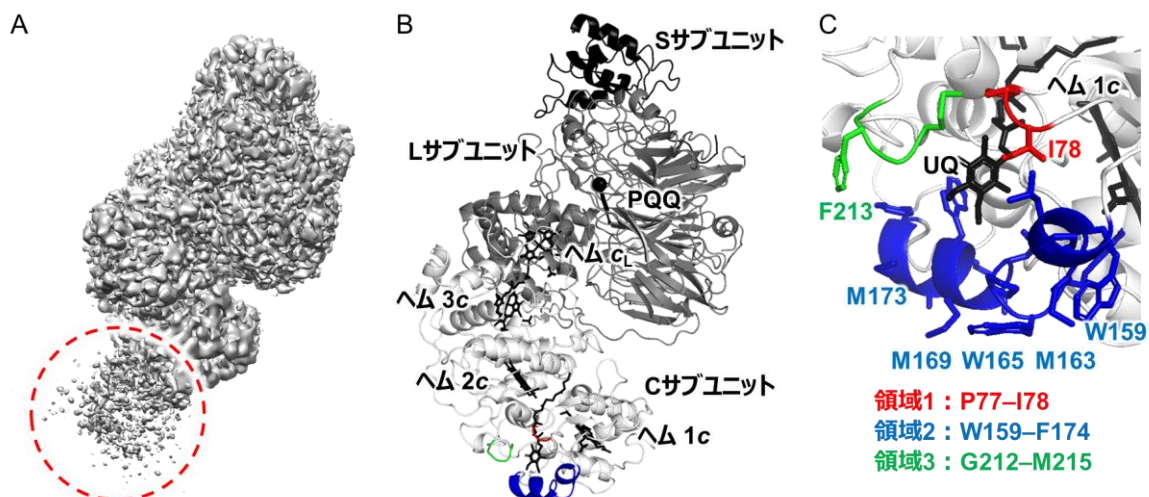


図 2 : (A) ADH の Cryo-EM マップ。(B) ADH の PDB 構造。(C) ユビキノ結合領域周辺の拡大図。

また、膜結合領域の欠損による構造変化や安定性低下を防ぐため、欠損領域にグリシンリンカーを挿入しました。構造予測ツール AlphaFold3 で生成した予測構造に基づいて、各領域の変異 ( $\Delta 1$ : P77-I78 をジグリシンリンカーに置換、 $\Delta 2$ : W159-F174 をテトラグリシンリンカーに置換、 $\Delta 3$ : グリシンリンカー無しで G212-M215 を欠失) を設計しました。

## 2-2. 膜結合領域の同定と sADH の開発

野生型組み換え ADH (rADH) と単一および多重欠失 ADH 変異体 ( $\Delta 1$ 、 $\Delta 2$ 、 $\Delta 3$ 、 $\Delta 1\Delta 2$ 、 $\Delta 1\Delta 3$ 、 $\Delta 2\Delta 3$ 、 $\Delta 1\Delta 2\Delta 3$ ) を構築し、粗酵素溶液における可溶性画分と膜画分の酵素活性局在を評価しました (図 3)。rADH では、総活性の  $77 \pm 4\%$  が膜画分に存在していた一方で、 $\Delta 2$  変異体では、総活性の  $90 \pm 3\%$  が可溶性画分に存在していました。本結果は、領域 2 が ADH の膜結合において重要な役割を担うことを示しています。全ての変異体の中で、 $\Delta 1\Delta 2\Delta 3$  変異体は、可溶性画分において最も高い相対活性 ( $95 \pm 3\%$ ) を示し、3 つの推定膜結合領域が全て膜結合に関与していることが示唆されました。また、3 領域が膜結合に関与していることは、脂質膜-ADH 複合体の分子動力学シミュレーション<sup>\*7</sup>の結果からも支持されました。よって、 $\Delta 1\Delta 2\Delta 3$  変異体を ADH 可溶化変異体 (sADH) とし、可溶性画分から界面活性剤を用いずに精製することに成功しました。

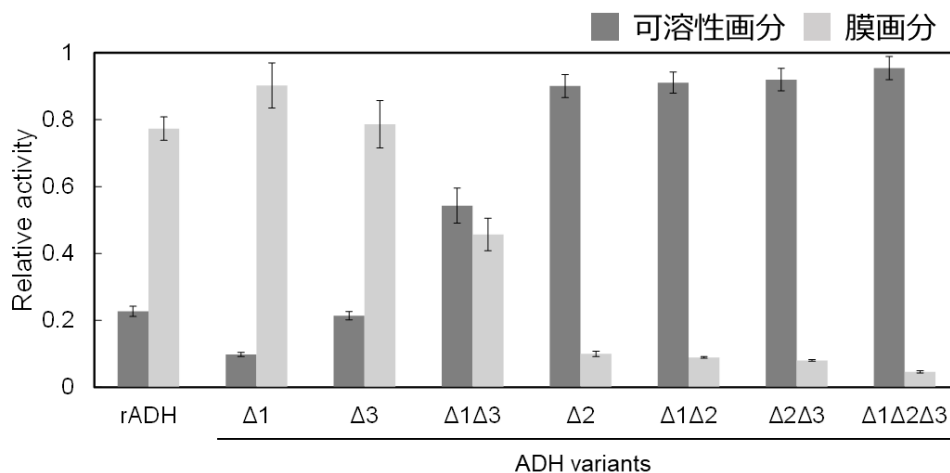


図 3: rADH および構築された ADH 変異体発現株の粗酵素溶液におけるエタノール酸化活性の局在。

## 2-3. sADH の特性評価

Cryo-EM を用いた構造解析の結果、sADH が 2 つの構造を有することを確認しました (図 4)。両構造を比較すると、赤点線で示した変異導入部位周辺に構造変化があることがわかります。この結果は、本可溶化手法が予期せぬ構造変化を完全には防げなかったことを示しています。一方で、C サブユニットの大部分やサブユニット界面は安定して保存されていました。また、rADH および sADH を用いて酵素機能電極を作製し、両電極の DET 活性を評価しました (図 5)。sADH は明瞭な DET 活性を示し、DET 活性を維持した状態での可溶化変異導入に成功したことが示されました。さらに、sADH の DET 活性が rADH と比較して約 2 倍に増加していることが確認できました。本結果は、変異導入により酵素配向が改善され、DET 型反応に有効な酵素吸着量が増加したことを示唆しています。

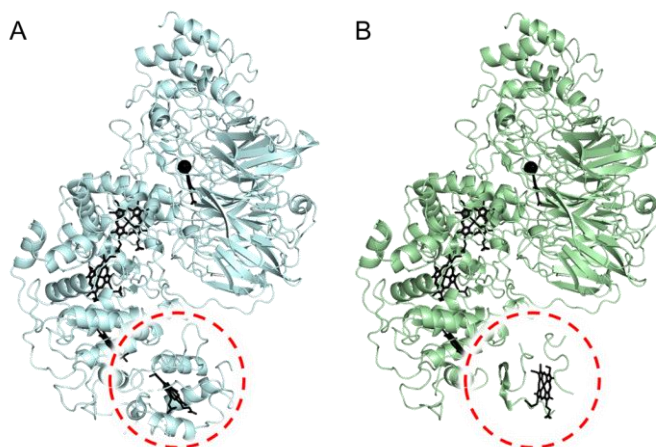


図 4 : sADH の構造。(A) Form 1 (PDB : 9X0Q)、(B) Form 2 (PDB : 9X0R)。

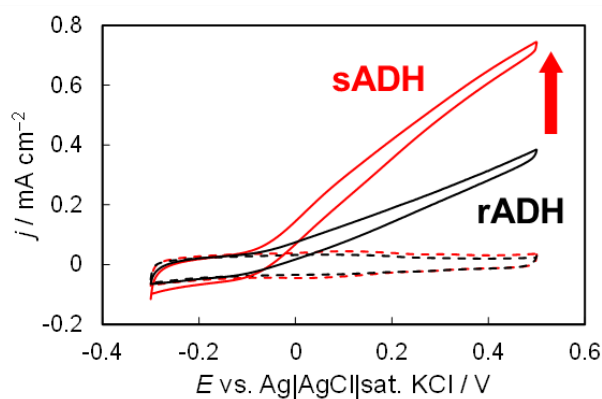


図 5 : 酵素機能電極を用いて測定された電流－電圧曲線。  
(黒 : rADH、赤 : sADH、実線 : 基質あり、破線 : 基質なし)

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究では、膜結合型 DET 酵素である ADH に着目し、ADH の膜結合領域を推定しました。変異体設計や脂質膜-酵素複合体の再現に計算科学的手法を取り入れ、界面活性剤不要の ADH 可溶化変異体を構築しました。また、構造解析および電気化学測定により sADH の特性評価を行い、sADH が高い DET 活性を有することが示されました。本研究で着目した領域 1 から 3 は、同じく酢酸菌 *Gluconobacter* 属の膜結合型 DET 酵素であるアルデヒド脱水素酵素、フルクトース脱水素酵素にも保存されています。本可溶化手法をこれら酵素に応用することで、膜結合領域の相同性に基づく生理機能の解明に繋がります。さらに本研究は、応用利用に向けた DET 酵素の機能向上と、生体/環境適合性の高い生物電気化学デバイス構築に貢献します。

### 4. 研究プロジェクトについて

本研究は、国立研究開発法人 日本医療研究開発機構 AMED BINDS 制度 (JP25ama121003)、日本学術振興会 科学研究費助成事業 (JP25K18412、JP24K17827)、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 アルコール脱水素酵素 : エタノールをアセトアルデヒドに酸化する酵素。

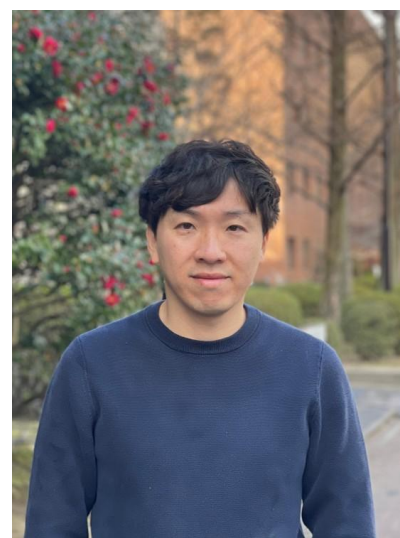
- ※3 **直接電子移動型酵素電極反応 (DET 型反応)**：酵素反応と電極反応が共役した反応を「酵素電極反応」と呼ぶ。その中でも、酵素が電極と直接的に電子移動できるものを直接電子移動型と呼び、本文中では DET 型反応と記載する。
- ※4 **DET 活性**：DET 型反応で観測できる触媒電流のこと。
- ※5 **クライオ電子顕微鏡**：タンパク質などの生体試料を含む溶液を急速凍結し、薄い氷に包埋することで、生理的な環境に近い状態で観察できる電子顕微鏡。
- ※6 **ユビキノン**：コエンザイム  $Q_{10}$  のこと。生体内で ADH の電子供与体として働く。
- ※7 **分子動力学シミュレーション**：タンパク質や核酸などの分子に働く力を物理法則に基づいて計算し、それらの時間発展を追跡することで、分子の構造変化や運動を原子レベルで解析できる計算手法。

#### <研究者のコメント>

私たちの研究チームは、これまで電気化学と構造解析を主軸に DET 型反応の研究を進めてきました。本研究では、新たに計算科学的手法を駆使し、変異体の設計や仮説検証に取り組みました。今後も新しいアプローチを積極的に取り入れながら、DET 酵素の高機能化と応用利用に向けた研究に取り組んでいきます。(市川 小夏)

本研究では、タンパク質構造の隅々まで目を凝らすという人間の知恵と努力に加え、計算科学的な仮説検証を融合することで、酵素の高機能化を達成しました。今後も Dry と Wet のアプローチを両立させながら酵素機能の謎に迫っていきたいと考えています。(足立 大宜)

本研究は、2022 年に 40 年以上未解明だった膜結合型酢酸菌酵素群の立体構造を私たちが世界で初めて解明した成果を礎としています。今回、これらの酵素群の一つである ADH において、その膜結合機構を理解し、膜結合型タンパクのボトルネックの一つである酵素の可溶性に成功しました。今後、加速度的に発展している計算科学の知見を積極活用し、優れた酵素を開発できると確信しており、社会実装に向けた学術研究に挑戦し続けていきます。(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： Structure-guided engineering of membrane-binding regions for surfactant-free solubilization of direct electron transfer-type alcohol dehydrogenase

(直接電子移動型アルコール脱水素酵素の可溶化に向けた構造情報に基づく膜結合領域の設計)

著者： Konatsu Ichikawa, Taiki Adachi, Tomoko Miyata, Fumiaki Makino, Keiichi Namba, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai, and Keisei Sowa

掲載誌： Chemical Communications, in press, DOI: 10.1039/d6cc00143b