

# 電気と酵素の力で補酵素 NAD を再生

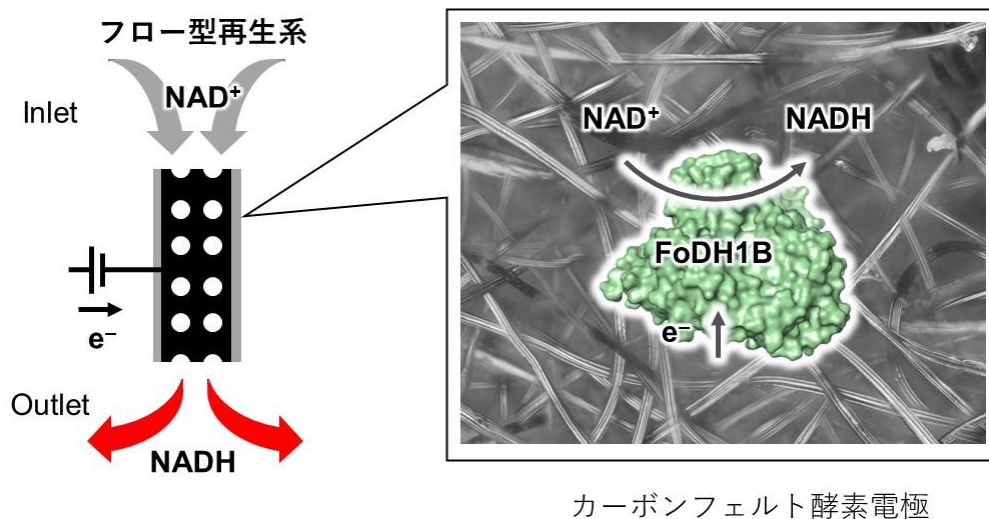
## —新規 DET 型酵素による高速化と省エネルギーの実現—

### 概要

京都大学大学院農学研究科の紀之定玲司 修士課程学生、武部幸佳 修士課程学生（研究当時）、足立大宜 同特定研究員、宋和慶盛 同助教、北隅優希 同准教授、白井理 同教授、株式会社村田製作所の生出伸一博士（研究当時）らの共同研究グループは、*Methylobacterium extorquens* AM1 というメタノール資化性細菌<sup>\*1</sup>由来ギ酸脱水素酵素<sup>\*2</sup>のβサブユニット単独発現体<sup>\*3</sup>（FoDH1B）を用いたニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NAD）<sup>\*4</sup>再生系を構築しました。

NAD は生物の異化代謝において必須の補酵素であり、NAD 依存性酵素を用いた物質生産にも利用されています。本物質生産において、酸化型 NAD (=NAD<sup>+</sup>) を還元型 NAD (=NADH) に再生する技術が重要であり、特に、「直接電子移動型酵素電極反応（DET 型反応）<sup>\*5</sup>」による犠牲基質<sup>\*6</sup>なしの高効率な NADH 再生系の実現が期待されています。本研究では、高効率な異種発現<sup>\*7</sup>系である大腸菌発現系によって取得した FoDH1B を用い、NAD<sup>+</sup>/NADH 変換に伴う明瞭な DET 型反応を確認しました。また、優れた DET 型活性を活用することで、高性能なフロー型<sup>\*8</sup>NADH 再生系の構築に成功しました。

本研究成果は、2026 年 4 月 30 日に国際学術誌「*Bioelectrochemistry*」にオンライン掲載されました。



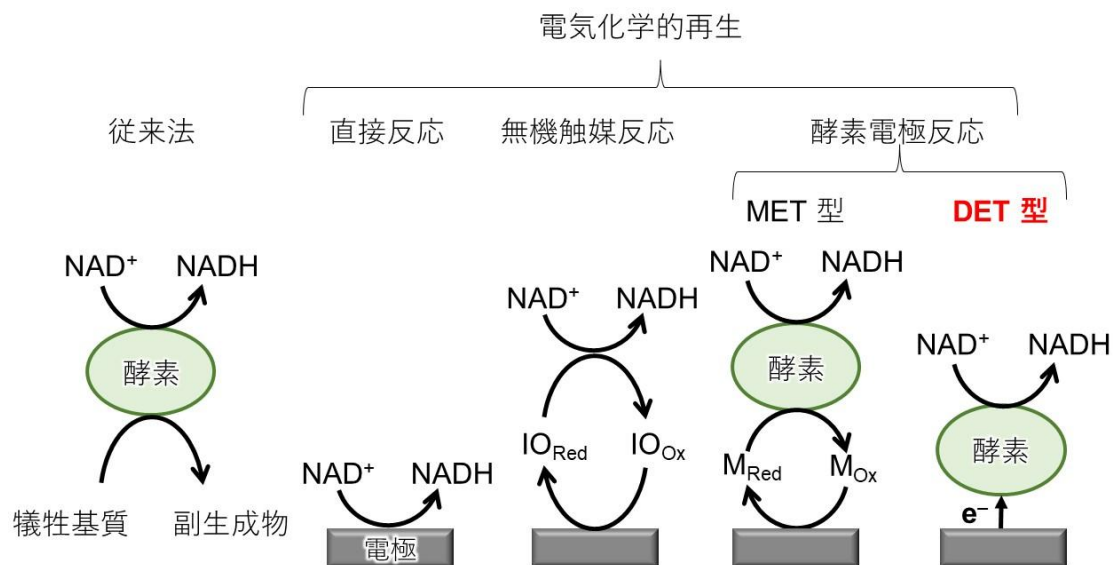
作成：京都大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 生体機能化学研究室

## 1. 背景

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) は、生体内の酸化還元酵素のうち 30%が利用する酸化還元補酵素で、生体内の電子移動を媒介するエネルギー運搬体として機能します。NAD は酸化体である  $\text{NAD}^+$  と還元体である  $\text{NADH}$  として存在します。特に  $\text{NADH}$  は、還元力を供給する目的で、位置選択性・立体選択性を必要とする物質生産に利用されていますが、 $\text{NADH}$  は高価なため、大規模利用にはコスト面での課題があります。したがって、物質生産で消費された  $\text{NAD}^+$  から  $\text{NADH}$  を再生する「 $\text{NADH}$  再生系」が必要とされています。

これまで主流であった  $\text{NADH}$  再生系は、一般的な酵素や微生物を触媒として利用していますが、犠牲基質として電子供与体を必要とすることが課題となっていました。そこで、電気エネルギーを利用して電極から電子を供給する、犠牲基質を用いない電気化学的  $\text{NADH}$  再生系が求められています。電気化学的  $\text{NADH}$  再生系には、電極単体による直接反応、無機触媒 ( $\text{IO}_{\text{Ox/Red}}$ ) を利用した反応がある一方で、ターンオーバー数<sup>\*9</sup>・選択性ともに優れた「酵素電極反応」を利用したものが注目されています (図 1)。酵素電極反応は、電極-酵素間の電子移動を仲立ちする低分子の酸化還元メディエータ ( $\text{M}_{\text{Ox/Red}}$ ) を利用するメディエータ型酵素電極反応 (MET 型反応) と、メディエータなしで反応する直接電子移動型酵素電極反応 (DET 型反応) に分類できます (図 1)。後者は、副反応リスクを高めるメディエータを用いないため、より効率的で電子移動が可能となると期待されています。しかし、DET 型酵素<sup>\*10</sup> はわずかな種類しか存在しないことがボトルネックとなっていました。

私たちの研究室は、DET 型酵素の 1 つであるメタノール酸化性細菌 *Methylobacterium extorquens* AM1 由来ギ酸脱水素酵素 (FoDH1) にこれまで注目してきました。近年では、FoDH1 の  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  変換を担う  $\beta$  サブユニットに単独発現を行い、ダウンサイズ効果<sup>\*11</sup> による電流上昇に成功しました。



## 2. 研究手法・成果

### 2-1. 大腸菌異種発現 FoDH1B の構築と DET 型特性評価

私たちは、FoDH1B の高効率な発現系である大腸菌発現系を構築しました。また、大腸菌で発現させた FoDH1B が、炭素平板電極上 (図 2a) で  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  を基質とした可逆な DET 活性を示すことを確認しました (図 2b)。さらに、 $\text{NAD}^+$  から  $\text{NADH}$  への還元反応に最適な pH を探索するため、各 pH において、条件

酸化還元電位 ( $E^{\circ'}$ )<sup>\*12</sup> を基準とした一定の過電圧 ( $=E-E^{\circ'}$ ) における触媒電流値を比較しました。結果としては、pH 8.0 において最大の触媒電流密度 ( $-3.4 \text{ mA cm}^{-2}$ ) が得られました。本電流密度は、メタノール酸化性菌でのホモ発現系と比べ、約 10 倍高い DET 活性に相当します。

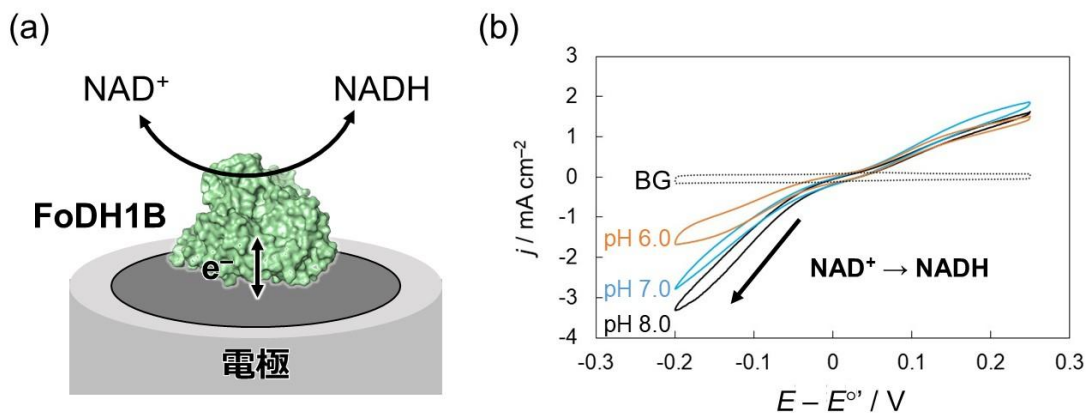


図 2 : (a)炭素平板電極上での DET 型反応の概略、(b)各 pH における DET 型反応特性

## 2-2. フロー型 NADH 再生系の構築

続いて、DET 型酵素である F0DH1B を用いたフロー型 NADH 再生系を構築しました。本再生系構築においては、反応面積の増加による再生効率上昇のため、カーボンフェルト電極 (CFE、容積 0.5 mL) に酵素修飾を行い (表紙画像)、NADH 再生能を電気化学的に評価しました。

まずは、各電位において NADH 再生能を評価したところ、ターンオーバー数 (TOF) は、過電圧が  $-0.10 \text{ V}$  において最大値  $4,000 \text{ h}^{-1}$  に達することが分かりました (図 3a)。多くの MET 型再生の場合、より大きな過電圧を必要とすることを踏まえると、DET 型再生系では、反応に必要な余分な電圧が低減され、エネルギー損失の少ない効率的な変換反応が進行していることが分かります。

また、酵素吸着量が過剰な場合、電気化学的に無効な酵素が増大する結果、有効酵素吸着量<sup>\*13</sup> の割合が減少し、結果的に TOF が低く見積もられると考えられます。したがって、修飾する酵素吸着量を低減し、TOF の最大化を試みた結果、TOF を  $10,000 \text{ h}^{-1}$  まで上昇させることができました (図 3b)。本性能は、犠牲基質を用いた NADH 再生系で報告されている TOF ( $3,900 \text{ h}^{-1}$ ) の約 2.5 倍に相当します。さらに、本系におけるファラデー効率<sup>\*14</sup> は 90% を超えており、酵素の特徴を生かした高選択な NADH 再生系の構築に成功しました。

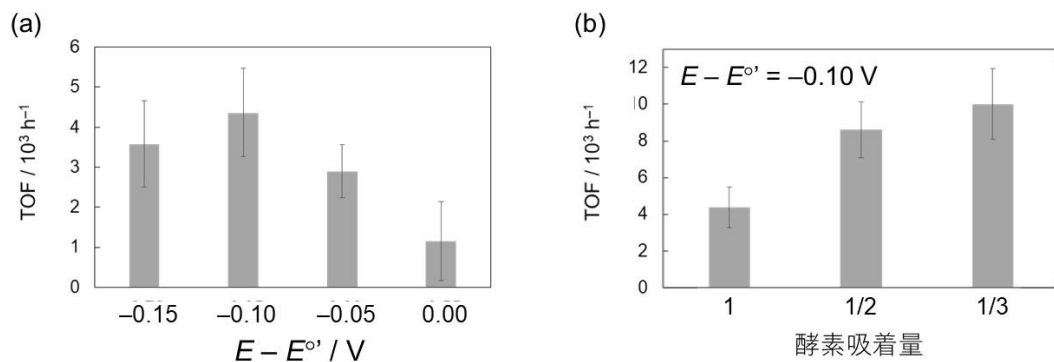


図 3 : DET 型 NADH 再生系の TOF 評価結果

(a)過電圧の影響、(b)酵素吸着量の影響 (※(a)での酵素吸着量を 1 として表示)

### 3. 波及効果、今後の予定

本研究では、FoDH1B の大腸菌発現系を構築し、DET 活性を評価しました。また、新しい DET 型酵素による高効率な電気化学的 NADH 再生系を構築しました。今後は、FoDH1B を他の NAD 依存酵素と共役させた物質生産系の確立や、酵素工学的手法による安定性の向上を目指しています。そのため本研究は、高い学術的意義を有するのみならず、高エネルギー効率での物質生産技術の基盤となることで、持続可能な社会の実現に貢献します。

### 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 (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、瀧野泰如氏) の支援のもとで実施されました。

#### <用語解説>

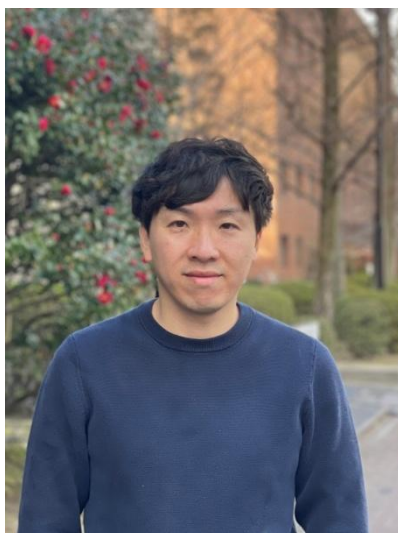
- ※1 **メタノール資化性細菌**：メタノールを単一の炭素・エネルギー源として生育することができる細菌。
- ※2 **ギ酸脱水素酵素**：生体内において、ギ酸イオン ( $\text{HCOO}^-$ ) を  $\text{CO}_2$  に酸化し、 $\text{NAD}^+$  を  $\text{NADH}$  に還元する役割を担う酵素。
- ※3  **$\beta$  サブユニット単独発現体**：ギ酸脱水素酵素は  $\text{HCOO}^-/\text{CO}_2$  変換を担う  $\alpha$  サブユニット、 $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  変換を担う  $\beta$  サブユニットからなるが、このうち、 $\beta$  サブユニットのみを発現させたもの。
- ※4 **ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD)**：生体内の電子移動に関わる補酵素。酸化体として  $\text{NAD}^+$ 、還元体として  $\text{NADH}$  の 2 つの状態を持ちます。
- ※5 **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、酵素が電極から直接的に電子移動するものを「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。
- ※6 **犠牲基質**：化学反応において、目的生成物を得るために消費される物質。NADH 再生では、酸化され消費される。
- ※7 **異種発現**：ある生物由来の遺伝子を他の生物に導入し、その遺伝子がコードするタンパク質を発現させること。
- ※8 **フロー型**：原料を流路に流しながら連続的な反応を行う方法。物質移動による反応の効率化が期待されています。
- ※9 **ターンオーバー数**：触媒 1 分子当たりが、単位時間あたりに何分子の基質を反応させられるかを指し示す数値。本研究では実際に電極平面に吸着した酵素量を見積もることは難しいため、電極作成時にアブライした全酵素を酵素吸着量とした。
- ※10 **DET 型酵素**：DET 型反応が可能な酵素。
- ※11 **ダウンサイズ効果**：酵素サイズが減少することにより電極上単位面積あたりに修飾される酵素の物質質量が増加し、触媒電流が上昇すること。
- ※12 **条件酸化還元電位 ( $E^{\circ'}$ )**：ある pH 条件下において反応が平衡となる電位。理論的な反応電位。
- ※13 **有効酵素吸着量**：電極上に適切に吸着し、DET 型反応を行うことができる DET 型酵素の量。
- ※14 **ファラデー効率**：電気化学反応によって生じる電気量を基準として、反応生成物の物質質量を電気量に換算したときの割合。値が 100%に近いほど副反応が少ないことを意味します。

### <参考文献>

Taiki Makizuka, Keisei Sowa, Shiori Katayama, Yuki Kitazumi, Hiroya Yurimoto, Yasuyoshi Sakai, Osamu Shirai, An enhanced direct electron transfer-type NAD<sup>+</sup>/NADH regenerating system using the diaphorase subunit of formate dehydrogenase 1, *Electrochim. Acta*, **465**, 142954 (2023)

### <研究者のコメント>

NAD はあらゆる生命の異化代謝に関わる重要補酵素です。今回、卓越した DET 型活性を持つ FoDH1B を大腸菌発現系で創出することに成功し、電気エネルギーによって、高速かつ高選択的に NAD<sup>+</sup>を NADH に変換できました。また、本反応系は NADH を NAD<sup>+</sup>に変換することも可能であり、NAD の酸化還元状態を自由自在に制御できます。本技術をプラットフォームとして活用することで、バイオリアクタだけでなく、バイオセンサやバイオ電池への応用も視野に入れています。今後、生体内の代謝を模倣したバイオミメティクスの社会実装に向けて、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 (宋和)

### <論文タイトルと著者>

タイトル： Direct electron transfer-type NADH regeneration flow reactor with recombinant diaphorase subunit of formate dehydrogenase 1

(ギ酸脱水素酵素の組換えジアフォラーゼサブユニットによる直接電子移動型 NADH 再生フローリアクタの構築)

著者： Reiji Kinoshita, Sachika Takebe, Taiki Adachi, Shinichi Oide, Yuki Kitazumi, Osamu Shirai and Keisei Sowa

掲載誌： *Bioelectrochemistry*, **171**, 109314 (2026) DOI : 10.1016/j.bioelechem.2026.109314