2025 年 3 月 25 日

国立大学法人筑波大学
国立研究開発法人科学技術振興機構（JST）

複雑に相互作用する酵素を細胞内で直接調べる新技術を開発

私たちの細胞内では多くの酵素が電子をやり取りしながら協力して働いていますが、酵素の働きを直接観察することは難しい課題でした。本研究では、電極から電子を注入することで複雑に相互作用する呼吸関連の酵素を駆動し、その機能を詳しく分析する新技術を開発しました。

私たちが呼吸する際には、特定の酵素間で電子のやり取りが起こり、酸化や還元といった重要な化学反応がとても効率的に進行します。このような複雑な細胞内の酵素の働きを理解することは、科学の発展や新薬の開発などの幅広い分野で重要です。これまで、細胞内で単独で機能する限られた酵素の研究はなされてきましたが、呼吸に関わる酵素のように複雑に相互作用する酵素の働きを詳しく調べることはできませんでした。

本研究では、微生物細胞内に電極を使って高速に電子を注入することで呼吸酵素を駆動し、その働きを電流で測定、解析する新しい手法を開発しました。微生物の細胞膜は電気を通さない性質を持っていますが、本研究では細胞内への電子移動を加速させる電子ミディエーターという分子を用いることでこの問題を解決しました。この手法により、酵素反応を電流として測定・解析することが可能になります。さらに、多数のサンプルの同時測定ができる独自開発した電気化学装置と組み合わせ、細胞内の酵素の働きを効率的に分析する技術の開発にも成功しました。

これまで、細胞内は多くの生体高分子で混み合っているために、酵素反応がその影響を大きく受けるとされていました。本研究では、酵素反応はそのような高分子混雑効果による影響よりも、細胞内の異なる酵素との電子伝達作用による影響をより大きく受けていることを初めて示しました。

この技術を使えば、呼吸に関連したさまざまな酵素の細胞内での働きを明らかにできる可能性があり、今後、複雑な細胞内の酵素間の相互作用を理解するための基盤技術としての活用が見込まれます。また、酵素をターゲットとする新規薬剤の開発などにも役立つと考えられるため、病原性細菌の殺菌剤の開発や酵素に関連する疾患の治療法開発など医療分野への展開も期待されます。

研究代表者
筑波大学生命環境系
徳納　吉秀　助教

研究の背景

私たちの体の中では酵素と呼ばれるタンパク質がさまざまな化学反応を起こしています。例えば、呼吸をする際には、細胞内の酵素同士が巧みに協調することで、電子のやり取りが起こり、化学反応が進行します。このような複雑な環境における酵素活性[注1)]を測定することができれば、生体が酵素の働きを制御する仕組みの理解や、酵素をターゲットとする新規薬剤の開発などにつながることが期待できます。しかし、これまでの方法では生体内の酵素活性の測定は難しく、単独で機能する特定の酵素しか解析することができませんでした。

研究内容と成果

本研究では、電極を使って微生物細胞内に電子を注入することで呼吸酵素[注2)]を駆動し、その働きを電流測定によって解析する「ラベルフリーin-situ 電気化学測定法」を新たに開発しました（図 A)。これまでにも電極と微生物を組み合わせて測定を行う手法の開発は盛んに進められてきましたが、微生物の細胞膜を介した電子伝達効率が低く、電極を使って細胞内の酵素反応を電気的に検知することは困難とされてきました。この新技術では、電子ミディエーター[注3)]という細胞内への電子移動を加速させる分子を添加することで、細胞膜を介した電子伝達を十分に促進し、細胞内酵素の反応速度を測定することが可能となりました（図 A)。

シュワネラ属の一つである *Shewanella oneidensis* MR-1（シュワネラ菌）[注4)]という微生物は、外膜シトクロム酵素と呼ばれる細胞膜に電子を流すタンパク質を有しており、本研究ではまずこの特性を利用して測定系を確立しました。シュワネラ菌の持つ 2 種類の呼吸酵素 NrfA（亜硝酸還元酵素）と FccA（フマル酸還元酵素）を分析し、どちらも酵素活性を測定することができました。本手法によって測定された NrfA の酵素活性は既報（E. T. Judd, M. Youngblut,A. A. Pacheco, S. J. Elliott, *Biochemistry* 51, 10175-10185 (2012).）と一致しており、ラベルフリーin-situ 電気化学測定法が正確に細胞内の酵素活性を測定できることが強く示唆されました。

一方、興味深いことに FccA は細胞内外で異なる反応速度を示すことが判明しました。酵素活性を示すパラメーターである K_m[注5)]を算出したところ、細胞内での酵素活性が細胞外で測定したものよりも大幅に大きいことが分かりました。この結果は、細胞内の FccA は細胞外環境に比べ、基質との親和性が低いことを示しています。これにより、細胞内では酵素が周囲の環境に影響を受け、単純な溶液中の動態とは異なる働きをすることが明らかになりました。

これまでに細胞内外での酵素反応速度を変化させる要因として、細胞内の生体高分子濃度の高さによる影響（高分子混雑効果[注6)]）が考えられていました。そこで、細胞膜の透過性を向上させることで細胞内の生体高分子濃度を低下させたところ、予想に反し、K_m に変化はありませんでした。すなわち、細胞内環境が FccA の酵素動態に与える影響が他の要因によるものであることが示唆されました。ここで、FccA に電子を伝達する CymA というタンパク質を持たない遺伝子欠損株を用いたところ、FccA の K_m が、CymA が存在している状態よりも小さくなりました（図 B)。これは、CymA との相互作用によって FccA の酵素反応速度が制御されていることを示しています。これにより、FccA の反応速度を変化させる要因として、細胞内におけるタンパク質間の相互作用が高分子混雑効果より重要であることが初めて明らかになりました。

本研究ではさらに、ラベルフリーin-situ 電気化学測定法に、独自開発したハイスループット測定が可能な 96 ウェル電気化学システムを組み合わせ、本技術の高い汎用性を示しました（図 C)。実験の再現性を確保するには、相当数の電気化学実験が必要となりますが、このシステムを開発したことで、基質濃度や遺伝子欠損株の違いをはじめとする複数の異なる条件の下でのミカエリス・メンテン（Michaelis-

Menten）解析[注7)]を効率的に行うことが可能となりました。その結果、サフラニンという可溶性の分子を電子ミディエーターとして用いることでラベルフリーin-situ 電気化学測定法を大腸菌（*Escherichia coli*）[注8)]にも適用できることが実証できました。

大腸菌はシュワネラ菌と異なり、外膜シトクロムを持っておらず細胞外の電極との電子の授受が難しいとされています。今回の結果は、ラベルフリーin-situ 電気化学測定法がシュワネラ菌のような特殊な微生物に限らず、幅広い種類の微生物における酵素の機能を同時に比較できることを示すもので、高い汎用性があることが分かりました。

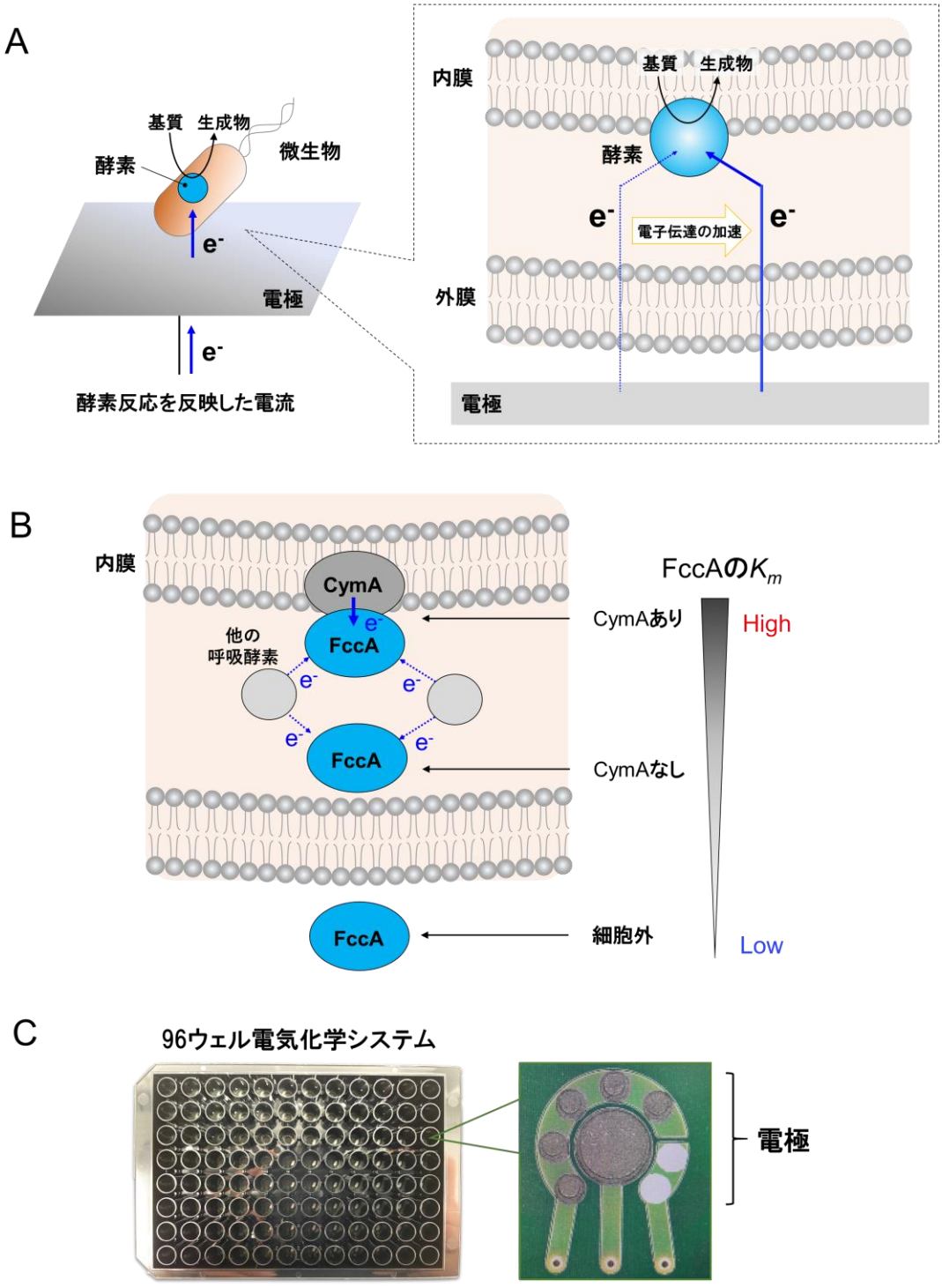
今後の展開

本研究で開発したラベルフリーin-situ 電気化学測定法は、今後さまざまな細胞内の酵素の働きを明らかにできる可能性があります。このため、体の仕組みを理解するための基盤技術としての活用や、微生物によるものづくりに役立つ酵素の開発への展開が期待できます。

また、酵素をターゲットとする新規薬剤の開発などにも役立つと考えられ、病原性細菌の殺菌剤の開発や酵素に関連する疾患の治療法開発など医療分野への展開も見込めます。例えば、呼吸酵素が関わるエネルギー生産異常はがん細胞の増殖に強く影響することが知られています。動物細胞に対して膜透過性を示す電子ミディエーターが見つかれば、ラベルフリーin-situ 電気化学測定法をがん細胞研究に活用できるかもしれません。

さらに本研究では、ラベルフリーin-situ 電気化学測定法のハイスループット化への筋道も示すことができました。今後の薬剤開発を高速かつ高精度に進めることを可能とする新たな基盤技術となることが期待されます。

参考図



図：A. 「ラベルフリーin-situ 電気化学測定法」の概略図。電極上の微生物細胞に電子を注入することで呼吸酵素の酵素動態パラメーターを計測する。検討の結果、ラベルフリーin-situ 電気化学測定法を実現するカギは、微生物細胞膜を介した電子伝達を電子ミディエーター（今回はリボフラビンを使用）により高速化することだと分かった。B. ラベルフリーin-situ 電気化学測定法により明らかになった FccA の K_m 変化。シュワネラ菌の中では、FccA は CymA と作用することで K_m が増加する。C. ハイスループット電気化学測定のために開発したウェルプレート。1 枚のプレートには 96 の穴（ウェル）があり、ラベルフリーin-situ 電気化学測定法が実施できるよう、それぞれのウェルの底部に電極がデザインされている。本システムを開発したことで同時に複数の条件検討を行うことが可能となり、シュワネラ菌に比べて細胞外の電極との間での電子の授受が難しいとされる大腸菌でも呼吸酵素を測定できることを実証した。

用語解説

注１）　酵素活性

酵素は、適合する基質（亜硝酸還元酵素 NrfA であれば亜硝酸）を取り込み酵素-基質複合体を形成し、その後基質が生成物に変化する。この反応の速度と性質を評価するための指標。具体的なパラメーターとして、K_m、、K_i、　k_{cat}などがある。K_m：最大反応速度の半分の反応速度を示す基質濃度。　K_i：阻害薬の作用強度を示す阻害定数。k_{cat}：１秒間に酵素が反応する基質の数。

注２）　呼吸酵素

呼吸に関わる酵素。私たちが呼吸をしてエネルギーを作り出すのと同じように、微生物も細胞内で酵素を使った呼吸によりエネルギーを作り出している。呼吸によるエネルギー獲得に伴い、酵素間で電子が流れる。

注３）　電子ミディエーター

他の分子から電子を受け取り、さらに他の分子に電子を渡すことのできる分子。本研究では、電極から電子を受け取り、微生物（シュワネラ菌、大腸菌）の細胞内の酵素に電子を渡すことのできる分子を指す。

注４）　*Shewanella oneidensis* MR-1（シュワネラ菌）

本研究ではシュワネラ属の一つである *Shewanella oneidensis* MR-1 を用いた。鉄還元細菌と呼ばれる代表的な微生物で、細胞外の電極や鉱物と電子の授受をすることができる。

注５）　K_m

酵素活性を示すパラメーターの一つ。最大反応速度の半分の反応速度を示す基質濃度。K_mが大きいほど酵素と基質の親和性が低い。

注６）　高分子混雑効果

細胞の中の酵素は、細胞外と異なる挙動を示すことが多い。その原因の一つとして、細胞内生体高分子の濃度が非常に高いことが挙げられる。こうした高濃度の高分子による影響を高分子混雑効果という。

注７）　ミカエリス・メンテン（Michaelis-Menten）解析

ミカエリス・メンテン式は酵素反応を記述する、酵素反応速度論の基本的な式である。酵素学研究では、単離精製された酵素の酵素反応速度を実験的に計測し、この式に照らし合わせることで酵素動態パラメーター（K_m, K_i, k_{cat}など）を取得することができる。本研究においては、ラベルフリーin-situ 電気化学測定法から細胞内酵素の反応速度を計測し、この式を用いて酵素動態パラメーターを明らかにした。

注８）　大腸菌（*Escherichia coli*）

微生物学研究、細菌学研究で使用される代表的な微生物。シュワネラ菌とは異なり細胞外との電子の授受の効率は低い。本研究では、大腸菌のような電気的な相互作用が生じにくい微生物でもラベルフリーin-situ 電気化学測定法を適用できることを実証した。

研究資金

本研究は、科学技術振興機構（JST）　革新的ＧＸ技術創出事業（GteX）（JPMJGX23B4、JPMJGX23B2）の一環として実施されました。また、JST 戦略的創造研究推進事業 ACT-X（JPMJAX211C）、同 創発的研究支援事業（JPMJFR231H）、科研費（20K15428、22KK0242、23K23532）、筑波大学（幸多き人生 100 年時代を創る『知』活用プログラム）の支援を得て行われました。

掲載論文

【題　名】　Decoding in-cell respiratory enzyme dynamics by label-free in situ electrochemistry
（ラベルフリーin-situ 電気化学による細胞内呼吸酵素動態の解明）

【著者名】 徳納吉秀（筑波大学 助教、物質・材料研究機構 客員研究者）
山崎智彦（物質・材料研究機構 主幹研究員、北海道大学 客員准教授）
藤川昂（物質・材料研究機構 研究員）
岡本章玄（物質・材料研究機構 グループリーダー、筑波大学 連携大学院教授、北海道大学 客員教授、東京科学大学総合研究院 特定教授）
責任著書：徳納吉秀、岡本章玄

【掲載誌】 *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*
【掲載日】 2025 年 3 月 21 日
【DOI】　https://doi.org/10.1073/pnas.2418926122

問合わせ先

【研究に関すること】
徳納　吉秀（とくのう　よしひで）
筑波大学生命環境系　助教
TEL: 029-853-5079
E-mail: tokunou.yoshihide.ga[at]u.tsukuba.ac.jp
URL: https://trios.tsukuba.ac.jp/ja/researcher/0000004401
https://sites.google.com/view/tokunoulab

【取材・報道に関すること】
筑波大学広報局
TEL: 029-853-2040
E-mail: kohositu[at]un.tsukuba.ac.jp

科学技術振興機構広報課
TEL: 03-5214-8404
E-mail: jstkoho[at]jst.go.jp

【JST事業に関すること】
波羅　仁（はら　まさし）
科学技術振興機構未来創造研究開発推進部ＧｔｅＸ推進グループ
TEL: 03-3512-3543
E-mail: gtex[at]jst.go.jp