

[NiFe]ヒドロゲナーゼを用いた新規酵素プローブに関する研究

日大生産工（院）○伊藤 圭佑 日大生産工 吉宗 一晃 産総研 三重 安弘
日大生産工 小森谷 友絵 日大生産工 神野 英毅 日大生産工（日大院総科）野呂 知加子

1. 緒言

ヒドロゲナーゼは水素の合成・分解を触媒する酵素であり、この水素発生触媒機能は高効率の水素生産の可能性、また水素分解の触媒反応は新規の燃料電池開発等の可能性から注目されている¹⁾。本研究では、大腸菌由来の酵素[NiFe]ヒドロゲナーゼ (Hya)を使用する²⁾³⁾。この酵素は、 H^+ と電子から H_2 を生成し、逆に H_2 から H^+ と電子を生成する。通常この様な反応系では酵素-電極間でメディエーターと呼ばれる酸化還元物質を電子移動媒体とするが、[NiFe]型と[FeFe]型ヒドロゲナーゼは、メディエーターを必要とせずに直接酵素-電極間で電子のやり取りができる。また[NiFe]型酵素は[FeFe]型よりも酸素耐性が高いため、[NiFe]ヒドロゲナーゼを用いた新しい酵素電極の作成が可能である。

本研究では酵素電極への応用、特に酵素プローブへの応用を目的として *Escherichia coli* 由来[NiFe]ヒドロゲナーゼの性質を検討した。

2. 実験方法

2.1 使用菌体および plasmid

本研究では *hya* の核酸供与体として One Shot® BL21 (DE3) Chemically Competent *E. coli* (Invitrogen)を使用した。また、組換え plasmid のクローニングには TOP10 Chemically Competent *E. coli* cells (Invitrogen)を使用した。plasmid には pET-100/D-TOPO vector (Invitrogen) 及び pET-101/D-TOPO vector (Invitrogen)を使用した。

2.2 遺伝子抽出

E. coli BL21 からのゲノム DNA の抽出は Magstration System 6GC (Precision System Science) を用いて行った。

2.3 組換え plasmid の作製と形質転換

抽出したゲノム DNA から PCR 法を用いて目的の遺伝子 *hya A*、*hya B* を増幅し、それぞれ制限酵素処理を行い、両 DNA を DNA Ligation Kit Ver.2.1 (TaKaRa Bio)を用いて Ligation を行い、両 DNA を結合した。結合した DNA を plasmid (pET100)と混合して、組換え plasmid を作成した。

E. coli TOP10 のコンピテントセルに得られた組換え plasmid を加え、30 分間氷上インキュベート後、42°C でヒートショック処理により、形質転換をおこなった。その後 S.O.C.培地を加え 37°C で 1 時間攪拌インキュベートした後、ampicillin を含む LB 寒天培地に菌液を塗布し、一晚培養して耐性菌選択を行った。培地に生育したコロニーをコロニーPCR法によりスクリーニングし、目的の遺伝子を含むコロニーを LB 液体培地で培養後、組換え plasmid を回収した。

2.4 IPTG によるタンパク質の発現誘導

得られた組換え BL21 は ampicillin 入り M9CA(6 g Na_2HPO_4 , 3 g KH_2PO_4 , 1 g NH_4Cl , 0.5 g $NaCl$, 5 g casamino acid, 1 mg thiamine, 2 mM $MgSO_4$, 0.1 mM $CaCl_2$, 1 w/v% glycerol)液体培地で一晚攪拌培養 (18 hr, 37°C)を行った。この培養液を新たな培地に継代して 3 時間培

Study on Novel Enzyme-probe by [NiFe] hydrogenase from *Escherichia coli*

Keisuke ITOU, Kazuaki YOSHIMUNE, Yasuhiro MIE,
Tomoe KOMORIYA, Hideki KOHNO and Chikako YOSHIDA-NORO

養後、0.2 mM IPTG を添加してさらに 3 時間培養した。この培養液は遠心分離 (10000×g, 10 min)を行い、得られたペレットを 100 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)で懸濁した後超音波破碎し、遠心分離(10000×g, 10 min)により上清を回収した。これらの上清を SDS-PAGE を用いてタンパク質発現の確認を行った。

2.5 酵素の精製と活性測定

組換え素精製酵素をニッケルカラムを用いて精製し、透析により imidazole を除去した後、酵素活性測定を行った。酵素活性測定には酸化還元指示薬である Methyl viologen (MV)を用いて行った。アルゴンガスで置換した 100 mM リン酸カリウム緩衝液(pH 7.0)に終濃度 4 mM になるように MV を添加し、そこに 50 mM sodium dithionite (DTT)を加え、Methyl viologen を還元した。その後、酵素を加え溶液の色の変化と OD₆₀₀ により酵素の活性の有無を調べた。

2.6 酵素の電気化学的測定

pyrolytic graphite の edge 面を露出させた電極(PGE)に酵素を疎水性相互作用により固定化し、固定化前後で測定を行った。

3. 結果および考察

E. coli BL21 から抽出した DNA を鋳型とし、設計した Primer を用いて PCR を行い、アガロースゲル電気泳動を用いて確認した。その結果、*hya* A、*hya* B 共に目的とする分子量付近にそれぞれのバンドが確認できたので、いずれも目的部位の増幅に成功したと考えられる。また増幅した両 DNA を制限酵素処理し、Ligation した結果やその結合した DNA を plasmid に導入した結果もアガロースゲル電気泳動を用いて確認したところ、目的とする分子量付近にそれぞれのバンドが確認できた。このことから、組換え plasmid の作製に成功したと考えられる。

得られた組換え plasmid を用いて BL21 を形質転換したものを培養し IPTG 誘導した。こ

れを超音波破碎した後、遠心分離により上清を回収した。この上清はタンパク質発現の確認のため SDS-PAGE を行った。その結果、目的とする分子量付近にそれぞれのバンドが確認できたので、それぞれ目的のタンパク質が発現したと考えられる。

精製した酵素の活性を測定したところ 0.27 U/mg であった。なお 1U は 1 分間に 1 μmol の MV を酸化する酵素量とした。

電気化学的測定では-0.2V 前後を境に、負の電圧では負の電流が増加し、正の電圧では正の電流が増加し、それぞれ水素生成および水素酸化に対応していると考えられる(Fig. 1)。

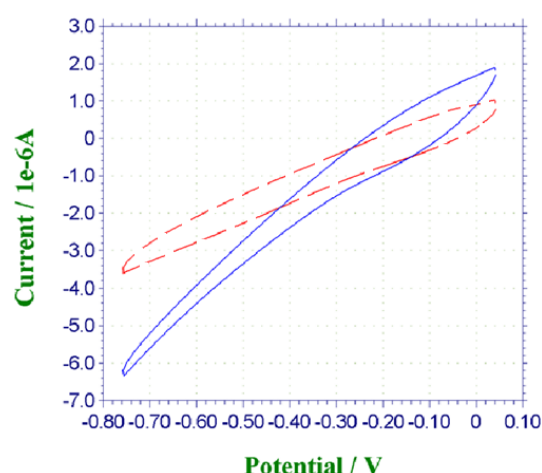


Fig. 1 Electrochemical measurement

4. まとめ

酵素を精製、透析後に酵素の活性を測定し、精製した酵素と熱処理を行い失活した酵素とでは活性に顕著な差を確認できた。さらに酵素の電気化学測定では水素生成および酸化に対応している電流の増加を確認できた。現在、酵素の電気化学測定と酵素電極への有用性を確認している。

5. 参考文献

- 1) Y. Higuchi et al. *Biophysical Society*, **40**, 249-253 (2000)
- 2) Kim et al. *Microbial Cell Factories*, **9**, 54-64 (2010)
- 3) K. Morimoto et al. *FEMS Microbiology Letters*, **246**, 229-234 (2005)