

ヒドロゲナーゼを用いた酵素電極の開発

日大生産工（院）○伊藤 圭佑 日大生産工 吉宗 一晃
日大生産工 小森谷 友絵・神野 英毅・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]-hydrogenase (以下 *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 を分解すると 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、今回使用する酵素 *hya* 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可能となる。これは酵素の活性中心に金属 (Ni, Fe)があり、これらが触媒の役割を果たしているためと考えられるからである。これにより酵素電極の装置そのものが簡便になる。

また現在、電極と酵素が直接電子授受する反応系としてヘム酵素(活性中心に鉄ポルフィリン錯体を持つ酵素)であるシトクロム P450 を用いた血中の薬品濃度の高感度測定系が既に知られている。これは本研究の酵素 *hya* でも応用が可能であると考えられる。

これらのことから、*hya* の水素合成反応では、生成される水素を目的とした酵素電池を、水素分解反応では、生成される電子を用いた酵素センサーへと応用が期待できる。

そこで本研究では、ヒドロゲナーゼを用いて、酵素電池や酵素センサーにも応用可能な酵素電極の開発を目的とする。

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

1) 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 plasmid (pET101)に挿入し、組換え plasmid を作成した。*E. coli* TOP10 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) 上記で得られた組換え plasmid 中の *hya A* を鋳型に、上流に制限酵素部位、下流に His

Development of Enzyme Electrodes using Hydrogenase

Keisuke ITOU, Kazuaki YOSHIMUNE,
Tomoe KOMORIYA, Hideki KOHNO and Chikako YOSHID-NORO

タグを持つように Primer を設計し PCR 法で増幅した。増幅した *hya* A、*hya* B に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、上記と同じ方法で最終的な組換え plasmid を作製した。得られた組換え plasmid を用いて *E. coli* BL21 の形質転換を上記と同じ方法で行った。

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 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超音波破碎又は液体窒素を用いた凍結融解した後、それぞれ遠心分離(10000×g, 10 min)により上清を回収した。これらの上清はタンパク質発現の確認のためと、超音波破碎と凍結融解ではどちらの方法がよりタンパク質の抽出効率が高いかの確認を SDS-PAGE を用いて行った。

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 *E. coli* BL21 の形質転換を行い、得られた組換え BL21 に 0.2 mM IPTG を添加してタンパク質

の発現誘導を行った。この IPTG 誘導された菌体を超音波破碎又は凍結融解した後、それぞれ遠心分離により上清を回収した。これらの上清はタンパク質発現の確認のため、SDS-PAGE を行った(Fig. 1)。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。また超音波破碎と凍結融解とでは超音波破碎を行った方がバンドが濃いように思われるため、今後は超音波破碎のみで行っていく。

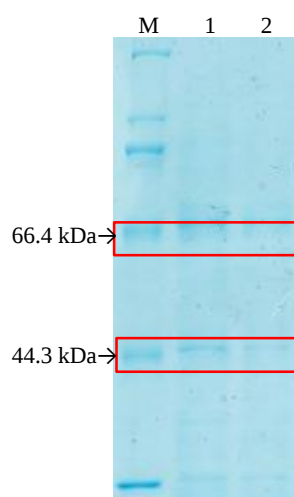


Fig. 1 SDS-PAGE analysis of recombinant BL21 from M9CA (induced by 0.2 mM IPTG). M: Protein Molecular Weight Marker (Broad, TAKARA), 1: supernatant after sonication of recombinant BL21, 2: supernatant after freeze-thawing of recombinant BL21

4. まとめ

SDS-PAGE によりタンパク質の発現が確認出来たので、今後は AKTA (GE Healthcare)を用いてタンパク質の精製を行い、*hya* の酵素電極としての性能を確認する。

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)