

ヒドロゲナーゼの安定化・酸素耐性化

伊原正喜

信州大学農学部 応用生命科学科

要約 ヒドロゲナーゼは、プラチナなどの希少金属を用いることなく、常温常圧で効率よく水素分子の分解と生産を触媒することから、水素エネルギー社会の実現を望む人たちから熱い視線を注がれている。しかし、ヒドロゲナーゼは大気中の酸素分子によって活性を失うという問題を抱えている。ヒドロゲナーゼの応用には酸素耐性化が必要であり、そのような取り組みは、ヒドロゲナーゼによる生物学的な水素生産や、バイオ燃料電池の開発のみならず、水素分子に関する触媒化学の発展にも貢献できるだろう。ここでは、ヒドロゲナーゼ酸素耐性化に関する動向や、我々の取り組みについても紹介したい。

キーワード：ヒドロゲナーゼ・水素・酸素耐性・蛋白質工学

1. ヒドロゲナーゼ

ヒドロゲナーゼは、フェレドキシンなどの電子伝達蛋白質や NADH などの電子供与分子から電子を受け取り、プロトン還元して水素分子を生成する反応 ($2\text{H}^+ + 2\text{e}^- \rightarrow \text{H}_2$) と、水素分子をプロトンと電子に分解し ($\text{H}_2 \rightarrow 2\text{H}^+ + \text{e}^-$)、その電子 (還元力) を電子伝達蛋白質や NAD⁺ に渡す反応を触媒する酵素である。ヒドロゲナーゼは、触媒中心である金属イオン錯体の違いによって、大きく 3 つに分類することができる。

まず、2 つの鉄イオンからなる二核錯体 (図 1 A) を有する [FeFe]-ヒドロゲナーゼが挙げられる。[FeFe]-ヒドロゲナーゼにおいて、鉄二核錯体は、図 1 A に示すように、鉄硫黄クラスター [4Fe-4S] とシステイン側鎖のチオール基によって架橋され、蛋白質内部に保持されている。その主な生理的役割は、生体内の余剰電子を水素分子として放出することであり、[4Fe-4S] は電子伝達蛋白質から鉄二核錯体への電子伝達を仲介する役割を担って

いる。このヒドロゲナーゼは、酸素分子とは直ちに反応して、不可逆的に不活化される。

2 つ目のヒドロゲナーゼは、ニッケルと鉄イオンのヘテロ二核錯体 (図 1 B) を有する [NiFe]-ヒドロゲナーゼであり、主に水素分子の取り込みを行っている。4 次構造としては、触媒中心であるニッケル-鉄錯体を有するラージサブユニットと、電子伝達ユニットである 3 つの鉄硫黄クラスター ([4Fe-4S] もしくは [3Fe-4S]) を持つスモールサブユニットからなるヘテロダイマーを基本とするが、膜結合ドメインや NAD⁺還元機能を有するジアホラーゼドメインなどを有するヒドロゲナーゼも多く知られている。一般に [NiFe]-ヒドロゲナーゼは、[FeFe]-ヒドロゲナーゼと比較して酸素耐性や安定性は高く、酸素分子と反応して活性を失っても、還元的雰囲気下で再活化されることが多い。

3 つ目のヒドロゲナーゼは、[Fe]-ヒドロゲナーゼと呼ばれ、メタン生成古細菌から発見された。このヒドロゲナーゼはニッケルも鉄硫黄クラスターも含まれておらず、代わりに鉄含有補助因子が含まれる。その生理的役割は、二酸化炭素をメタンへ

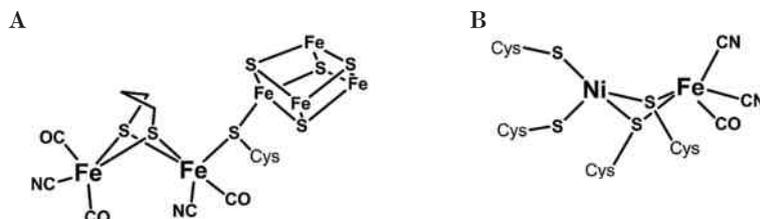


図 1 ヒドロゲナーゼ触媒中心

受理日 2010年12月10日

採択日 2011年1月24日

と代謝する過程において、 N^5 , N^{10} -methenyltetrahydromethanopterin と水素分子との反応によって N^5 , N^{10} -methylene tetrahydromethanopterin を生成する反応を触媒するというもので、ほかの蛋白質との間で電子授受を行わない。

2. ヒドロゲナーゼの酸素失活

水素分子は化石燃料に代わるクリーンな次世代のエネルギーキャリアとして注目されていることから、水素分子の生成能と分解能を有するヒドロゲナーゼもまた大きな注目を集めている。たとえば、ヒドロゲナーゼと光合成反応中心を組み合わせた光駆動水素生産系が提案されている (図2)¹⁻³⁾。光合成反応中心蛋白質は、太陽光を吸収することで、蛋白質内部で光誘起電子移動が起こり、還元力と酸化力が生じる。特に植物や藻類などが持つ光化学系I (Photosystem I, PSI) では、プロトン還元に必要な還元力電位 ($E_0 = -420\text{mV}$) を生じるために、光化学系Iからヒドロゲナーゼへの電子伝達によって生物学的な光水素生産が可能になる。また、ヒドロゲナーゼの水素分子分解能は、燃料電池の白金電極の代替や、燃料電池の安全性を確保するための水素センサーにも利用できる^{4,5)}。

しかし、先述の通り、ヒドロゲナーゼは酸素分子と反応して失活する。その酸素感受性は、酸素発生型の光合成と組み合わせた光水素生産を不可能にしており、また、バイオ燃料電池への応用も大きく制限することになっている。

酸素失活の機構は、 $[\text{FeFe}]$ -ヒドロゲナーゼと $[\text{NiFe}]$ -ヒドロゲナーゼについて、それぞれ研究が進められている。 $[\text{FeFe}]$ -ヒドロゲナーゼは、

図1Aに見られるように、鉄二核錯体と鉄硫黄クラスターを有しているが、活性型である還元型の酸化還元状態は、 $\text{Fe (I) Fe (I) - [4Fe-4S]}^{2+}$ 、もしくは、ヒドライド付加体として、 $\text{Fe (II) Fe (II) -H}^- \text{- [4Fe-4S]}^{2+}$ のように記述できる。一方、酸素非存在下での酸化型では、 $\text{Fe (II) Fe (II) - [4Fe-4S]}^+$ となり、鉄二核錯体は酸化型となるが鉄硫黄クラスターが還元型であり活性を保持している。しかし、酸素存在下では鉄硫黄クラスターが酸素分子と反応して錯体構造が破壊され、さらに鉄二核錯体が蛋白質外へと放出されることによって、不可逆的に活性を失うとされている⁶⁾。

$[\text{NiFe}]$ -ヒドロゲナーゼは、ニッケル-鉄錯体に加えて、3つの鉄硫黄クラスターを有しており、酸化還元状態は複雑で未知の部分も多い。現在までに、電子スピン共鳴法 (EPR) や赤外分光法 (IR)、電気化学実験から、活性型として、Ni-S (水素分子非結合状態)、Ni-C (水素分子結合状態)、Ni-R (高還元状態) の3つの状態、不活性型として、Ni (III) の Ni-A (もしくは Ni_a^*) と Ni-B (もしくは Ni_b^*) の2つの状態が提案されている (図3)⁷⁾。Ni-A は、酸化的環境下で酸素分子と反応することで観測される状態で、ヒドロペルオキシド ($-\text{OOH}$) がニッケルと鉄を架橋する形で配位していることが示唆されている。Ni-B は、還元的環境下で酸素分子と反応した際に観測される状態で、ヒドロキシド ($-\text{OH}$) が配位していると予想されている⁸⁻¹⁰⁾。Ni-A の状態は“un-ready 状態”と呼ばれ、水素分子との反応によって活性型に変換されるまでに数十分から数時間を要するのに対して、“ready 状態”と呼ばれる Ni-B 状態からは、数秒のうちに活性型へと変換される。Ni-A からさらに

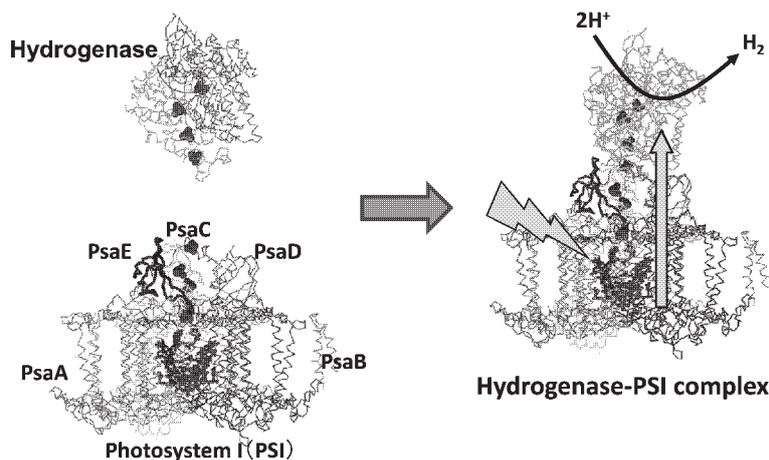


図2 ヒドロゲナーゼと光化学系Iとの複合体



図3 不活性型 [NiFe] -ヒドロゲナーゼ触媒中心

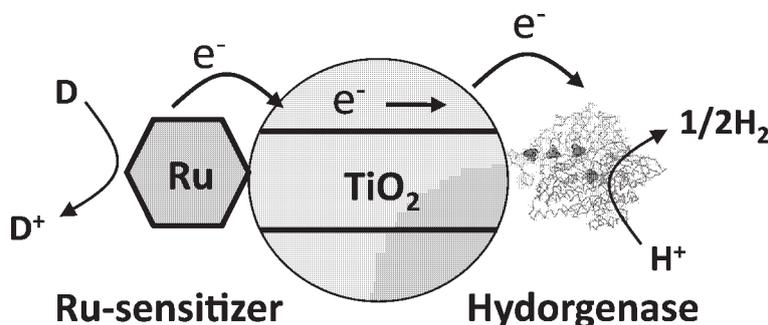


図4 ルテニウム錯体-酸化チタン- [NiFeSe] -ヒドロゲナーゼによる光水素生産

酸化を受けた場合には、不可逆的失活状態になるが、一般に [FeFe] -ヒドロゲナーゼと比較して、不可逆的失活速度は遅い。

[NiFe] -ヒドロゲナーゼの中でも、水素酸化細菌から単離された [NiFe] -ヒドロゲナーゼは酸素耐性が高く、大気中の酸素濃度においても Ni-A 状態になりにくいことが知られている¹¹⁻¹³。水素酸化細菌は、水素分子を唯一の栄養源として、好氣的呼吸によってエネルギーを得ていることから、水素酸化細菌内の [NiFe] -ヒドロゲナーゼは、酸素存在下で水素分子から還元力を引き抜き、電子伝達系（呼吸鎖）へと送らなければならない。そのような生理学的要求から、水素細菌由来の [NiFe] -ヒドロゲナーゼは、現在知られているヒドロゲナーゼの中で最も酸素耐性が高い。

水素細菌の中でも最も精力的に研究されている *Ralstonia eutropha* は、それぞれ生理学的役割も4次元構造も異なる3種類の [NiFe] -ヒドロゲナーゼが存在している。細胞質に存在する NAD⁺還元ヒドロゲナーゼ (SH)、細胞膜に結合し膜結合シクロムドメインを介して電子伝達系に電子を供給する膜結合ヒドロゲナーゼ (MBH)、および水素分子センシングを担う水素センサーヒドロゲナーゼ (RH) である。それぞれの酸素耐性獲得機構について様々な議論が展開されており、現在のところ以下のような機構が有力視されている。

SH においては、Ni 上に CN⁻イオンが配位していることが示唆されているが、そのような CN⁻イオンは他の酸素感受性（容易に Ni-A 状態になる）

の [NiFe] -ヒドロゲナーゼでは観測されていないことから、酸素分子から活性中心を守る役割を担っていると考えられている¹⁴⁻¹⁶。一方 RH では、蛋白質表面からニッケル鉄錯体へと通じる水素ガスチャンネルが、酸素分子が通過できない幅になっていることが構造予測から示唆されており、実際に水素ガスチャンネルを拡張するアミノ酸変異を導入すると酸素感受性となることが示されている。よって、水素ガスチャンネルの選択性が高い酸素耐性を実現していると考えられている^{17,18}。MBH の酸素耐性機構に関しては、十分に解明されていないが、SH や RH で提案されている機構を有しておらず、高い水素分子親和性と低い酸素分子親和性に起因すると想像されており、それはニッケル鉄錯体近傍のスペースが原因と考えられる¹⁹。

3. ヒドロゲナーゼの応用

近年、酸素耐性の高いヒドロゲナーゼを用いて、いくつかのプロトタイプが報告されている。

Armstrong らは、ルテニウム錯体を光増感剤としてコートした酸化チタンに [NiFeSe] -ヒドロゲナーゼを吸着させて、可視光による光水素生産に成功している (図4)²⁰。[NiFeSe] -ヒドロゲナーゼは、[NiFe] -ヒドロゲナーゼファミリーに属するが、Ni に配位しているシステインの一つが、セレノシステイン（システイン側鎖の硫黄がセレンに置換されている修飾アミノ酸）に置き換わっているヒドロゲナーゼであり (図5)、セレノシステイン

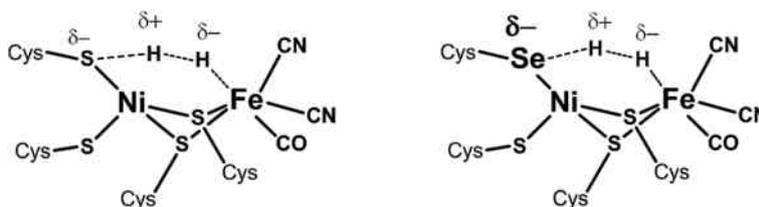


図5 [NiFe]-ヒドロゲナーゼと [NiFeSe]-ヒドロゲナーゼ

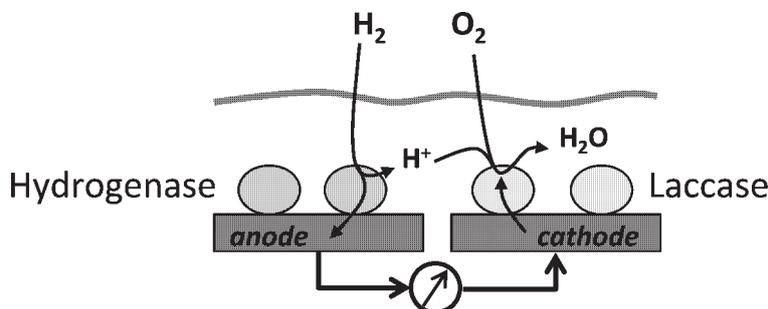


図6 ヒドロゲナーゼとラッカーゼによるオープン燃料電池

の高い酸性度のために、一般的な [NiFe]-ヒドロゲナーゼよりも水素発生能に優れていると考えられている²¹⁾。まず Armstrong らは、*Desulfomicrobium baculatum* から酸素耐性の高い [NiFeSe]-ヒドロゲナーゼを単離し、酸素失活成分の再活性化速度が十分に速く、1%酸素存在下においても僅かではあるが水素分子生産能を保持していることや、水素分子に対する親和性も低く反応物阻害を受けにくいことなどを確認した²¹⁾。続いて、光増感剤と酸化チタンとを組み合わせることで、微量酸素存在下において水素分子の発生を確認している。

別の例として、Armstrong と Friedrich らは、酸素耐性ヒドロゲナーゼを組み込んだオープン燃料電池を作製し、3%の水素分子を含んだ空気中で起電力を得ることに成功している⁹⁾。彼らは、アノード側に *Ralstonia metallidurans* 由来の膜結合型の [NiFe]-ヒドロゲナーゼを固定化し、カソード側には酸素分子を還元できるラッカーゼを固定化した (図6)。2つの電極は pH5 のクエン酸バッファーに浸され、3%の水素分子含有空気中に置かれると、950mV の起電力が生じた。また、3つのセルを直列に接続する事で、最終的には2.7V を得ることができ、実際に腕時計を動かすことも確認されている。この燃料電池は、ヒドロゲナーゼとラッカーゼの、それぞれ水素分子及び酸素分子に対する高い選択性のために、水素と酸素を分離することなく混合気体として利用することができ、またプロトン交換膜を必要としないオープン燃料電池として機能することができた。

4. ヒドロゲナーゼ酸素耐性化の試み

ヒドロゲナーゼの酸素耐性という言葉は、いくつかの意味で使われている。①酸素存在下で保存可能であること (酸素存在下で不活化しても、還元的な雰囲気下や水素分子存在下で再活性化を受ける)、②“ready 状態”である Ni-B 不活性型を維持して、より酸化状態の高い“un-ready 状態”である Ni-A 不活性型に陥らないこと、③酸素存在下で水素分子分解もしくは水素生産活性を有すること、などである。これまでに述べてきたように、多くの [NiFe]-ヒドロゲナーゼは①の意味での酸素耐性である。②での意味の酸素耐性を有するヒドロゲナーゼとして、水素細菌などの [NiFe]-ヒドロゲナーゼが挙げられる¹³⁾。さらに、水素細菌などの [NiFe]-ヒドロゲナーゼは、酸素存在下においても水素の分解活性を有することから、③の意味での酸素耐性を有していると言えるかもしれない。しかし、③についてももう少し掘り下げて考える必要がある。水素分子分解反応は、言うまでもなく、水素分子存在下で行う。その際にヒドロゲナーゼは酸素分子による不活性化と水素分子による活性化を同時に受けることになるが、水素細菌 [NiFe]-ヒドロゲナーゼのように活性化速度が速い場合には、活性型がある程度の割合で存在することになり、水素分解を持続的に行うことができる。また、水素生産反応は、プロトン還元に必要な-420mV 以下の低い酸化還元電位で行う。よって、ここでも酸素分子によ

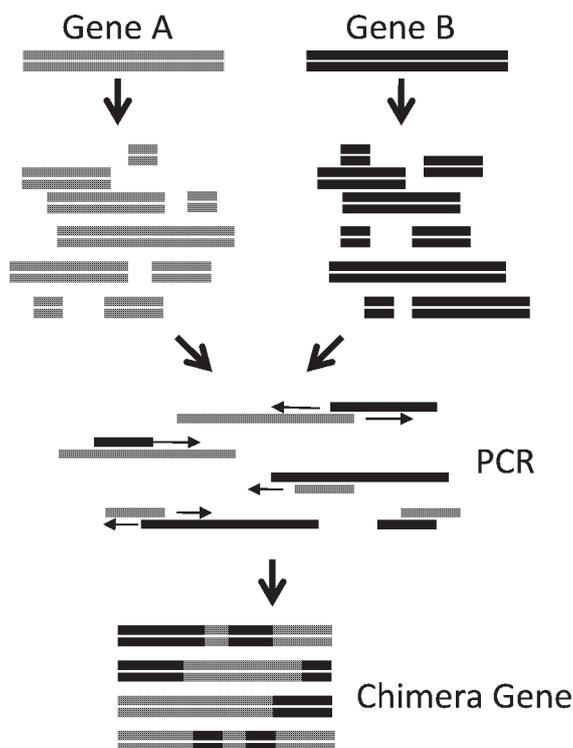


図7 DNA Shuffling

る不活性化と低い酸化還元電位による活性化を同時に受けることになり、活性化速度が速い場合に水素生産を行うことができる。③の意味での酸素耐性ヒドロゲナーゼは、酸素分子と反応し不活化されるヒドロゲナーゼを含んでおり、“④酸素存在下でも不活化しない、もしくは、不活化が非常に遅い (Ni-A や Ni-B 状態が形成されない、もしくは、形成されにくい)” という意味での酸素耐性は、水素細菌内に存在する水素センサー [NiFe] -ヒドロゲナーゼで報告されているのみである^{17,22)}。

これまで報告されているヒドロゲナーゼの酸素に対する耐性向上の試みは、非常に限られたものであるが、3つに分けることができる。つまり、(1)自然界からの酸素耐性ヒドロゲナーゼの探索、(2)ヒドロゲナーゼへのアミノ酸置換導入、(3)ヒドロゲナーゼの固定化である。

(1)の試みは今後もますます重要になってくると思われる。④の意味での酸素耐性 (酸素存在下でも不活化しにくい) を有する水素細菌の水素センサー [NiFe] -ヒドロゲナーゼは、活性が非常に低く、また酸素存在下での水素分子生産能については不明である。よって、④の意味での酸素耐性を持ち、且つ、高活性なヒドロゲナーゼの探索が求められる。

(2)の例としては、*Azotobacter vinelandii* ヒドロゲナーゼの鉄硫黄錯体に配位しているシステイン残

基の一つをセリンに置換したアミノ酸置換体において、③の酸素耐性が向上したという報告がある²³⁾。天然型 *Azotobacter vinelandii* ヒドロゲナーゼは酸素濃度 $76\mu\text{M}$ において水素分解活性がほぼ完全に阻害されるが、アミノ酸置換体は上記酸素濃度下においても酸素非存在下と同様の活性を保持していた。この結果は、アミノ酸置換体の酸素耐性が向上したことを示唆している。しかし、アミノ酸置換体の水素分解速度は $16\text{ nmol/min/gram of cell}$ であり、この速度は酸素非存在下における天然型の $24500\text{ nmol/min/gram of cell}$ と比較して、1,500分の1と劇的に低い。従って、このアミノ酸置換は、酸素耐性を与えるものの、ヒドロゲナーゼの電子授受機能に大きな影響を与えるために本来の活性が著しく低下するという問題を抱えている。

また、分子進化工学的手法によるヒドロゲナーゼの改良の試みも始まっている。Nagyらは、[FeFe] -ヒドロゲナーゼ・変異体ライブラリーを DNA-shuffling 法によって調製している²⁴⁾。DNA-shuffling 法とは分子進化工学において非常に多く用いられているライブラリー作製法であり、相同性を有する2つもしくはそれ以上の遺伝子をそれぞれランダムに切断し、断片を混合してプライマーを加えず PCR を行うことで、様々にキメラ化された遺伝子を得ることができる (図7)。この方法では、

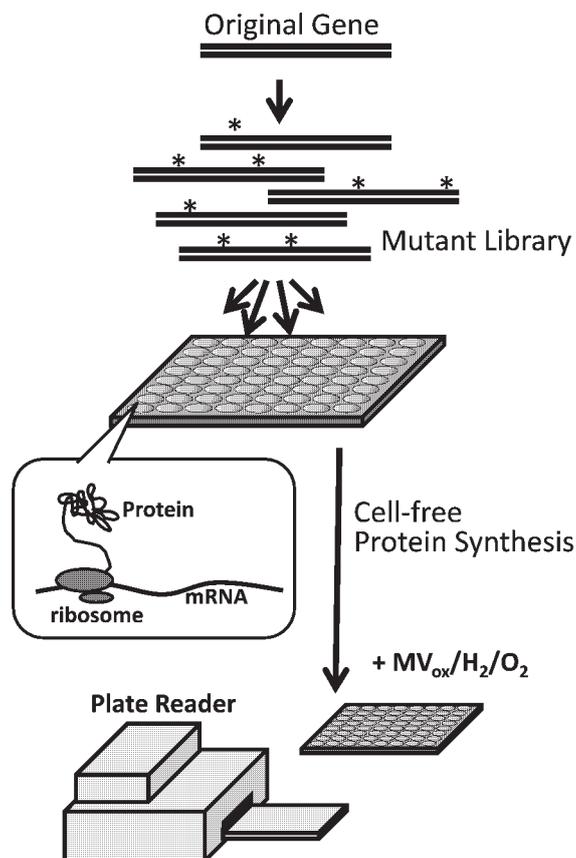


図8 スクリーニング系

数十アミノ酸単位で置換が起こるために、進化の速度を加速させることができるだけでなく、相同蛋白質は同様の蛋白質構造を持っているために、アミノ酸配列の置換が構造的・機能的に大きなマイナス要因になりにくいことが大きな利点である。Nagy らは、*Clostridium acetobutylicum* 及び *Clostridium saccharobutylicum* 由来の [FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子間で DNA-shuffling を行い、22 クローンのキメラヒドロゲナーゼについて蛋白質発現・精製を行い、比活性が約 2 倍向上した変異体の単離に成功している。

分子進化工学的手法において、優れたスクリーニング系の確立が成功のカギを握っている。[FeFe]-ヒドロゲナーゼは、[NiFe]-ヒドロゲナーゼと比較して成熟過程に関わるアクセサリ蛋白質が少なく、無細胞発現系を利用した発現系がすでに報告されており²⁵⁾、マイクロプレートのウェル内でヒドロゲナーゼ変異体を発現・評価することが可能になっている。Stapleton らは、突然変異率を高く設定した PCR (エラーブローン PCR) を行って *Chlamydomonas reinhardtii* [FeFe]-ヒドロゲナーゼ遺伝子にランダムな変異を導入し、その結果

得られた 30,000 クローンについて、それぞれマイクロプレートで発現させ、スクリーニングを行った (図 8)。有意に酸素耐性の向上した変異体ヒドロゲナーゼを単離することはできなかったものの、嫌気的環境下で比活性が約 4 倍向上した変異体の作製に成功している。この手法は機械化が可能であり、DNA-shuffling などによってライブラリーの質を上げることで、酸素耐性を向上させることは十分に可能であろう。

(3)の例としては、ヒドロゲナーゼをシリカゲルや高荷電ポリマーなどに固定化することで酸素失活を抑制した研究例を挙げることができる^{26,27)}。Klibanov らは、高塩濃度水溶液中ではガス溶解度が低下する“salting out”という現象に着目し、高塩濃度条件と同様な環境にあると考えられる DEAE-セルロースのポリカチオン表面に *Clostridium pasteurianum* [FeFe]-ヒドロゲナーゼを吸着させた。その結果、遊離ヒドロゲナーゼの半減期は 4 分程度であるのに対して、DEAE-セルロース吸着ヒドロゲナーゼでは 100 分程度と半減期が 25 倍となり、酸素分子のヒドロゲナーゼへの接近を十分に防ぐことが証明された。この効果は、ポリマー

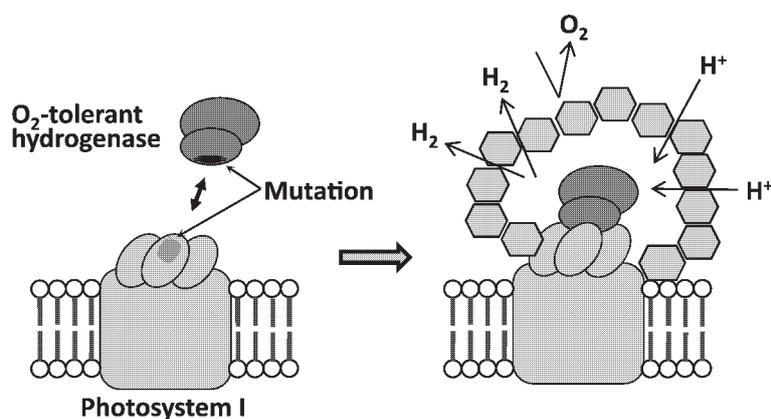


図9 ヒドロゲナーゼ-光化学系I複合体の改良

やバッファー条件にも大きく依存し、最適化を行った結果、poly(L-Lysine)-セファロースとTris-H₃PO₄バッファーの組み合わせで、最終的には、2週間で約30-40%の活性を保持できることが明らかとなった。このようなポリカチオン性ポリマーと結合したヒドロゲナーゼには、水素分子の接近も阻害されるために水素分解活性は著しく失われたが、プロトンの移動は可能であるために、還元力の供給が可能となれば空気中でのプロトン還元による水素生産反応に応用できると考えられる。

“salting out”のような効果によって、物理的に酸素分子をヒドロゲナーゼ近傍から排除する方法論は、酸素存在下で水素生産系を設計する上で、極めて有効であると考えられる。活性型ヒドロゲナーゼの触媒中心金属錯体は、非常に低い酸化還元電位を有しており、強い酸化剤である酸素分子と極めて反応性が高いことは、必然的であろう。よって、蛋白質などの構造物で触媒中心を守らなければならない。実際、一般的なヒドロゲナーゼでは、水素分子の通り道であるガスチャンネルの存在や、構造揺らぎによって、容易に酸素分子の侵入を許し酸化を受けるが、水素細菌の水素センサーヒドロゲナーゼでは、ガスチャンネルなどからの酸素分子の侵入を許容しないことが、高い酸素耐性の要因の一つであることが示唆されている^{17,18)}。ただし、水素センサーヒドロゲナーゼでは、水素分子の蛋白質内移動速度が抑えられ、その結果、活性が低い。このジレンマ（水素細菌にとっては、センサーヒドロゲナーゼが高活性である必要がないためにジレンマではないが）の解決が今後の課題であるが、ヒドロゲナーゼ蛋白質単独では限界があると思われ、ヒドロゲナーゼの外側に気体分子選択性の高い構造体を設ける必要があるのでないだろうか。

生体内には酸素分子を遠ざけるための他とは隔離された区画が知られている。一部の繊毛虫や菌類などに見られる水素とATPを産生する機能を持つ小器官であるハイドロジェノソーム²⁸⁾や、藻類などの葉緑体において炭素固定を担うカルボキシソーム（ピレノイド）²⁹⁾などがそれである。また、好気生物の酵素の中には、単離精製した場合、空気中では極めて低い活性しか示さないが、嫌気的環境下で高活性を示すものがあり、まだ知られていない酸素分子を遮断した区画や、未知の仕組みが隠されているかもしれない。そのような戦略は、大いに参考になると思われる。

著者は、ヒドロゲナーゼと酸素発生型光合成との組み合わせによる光水素発生を目指している。酸素発生型光合成において2つの反応中心、光化学系Iと光化学系IIが存在しており、光化学系IIによって水分子からの電子の引き抜きを可能にし、光化学系Iによって二酸化炭素の還元（固定化）を可能にしている。光化学系Iではプロトン還元が可能な還元電位が発生するために、二酸化炭素固定の代わりに、水素分子生産を行うことが理論的には可能である。しかし、光化学系IIで水分子の分解によって生じる酸素分子が問題となる。酸素分子存在下で、光化学系Iからヒドロゲナーゼへと還元力を伝達し、プロトンを還元して水素生産を行うためには、以下のような戦略が考えられる。まず、ヒドロゲナーゼ蛋白質構造の安定化と酸素耐性化（前述の③や④の意味での）、高活性化が必要であろう。さらに、ヒドロゲナーゼと光化学系Iの複合体の設計と、複合体内の効率的な電子伝達経路、複合体を取り囲むような構造体の設計（図9）によって、ヒドロゲナーゼと酸素発生型光合成との組み合わせによる光水素発生が実現すると考えられる。

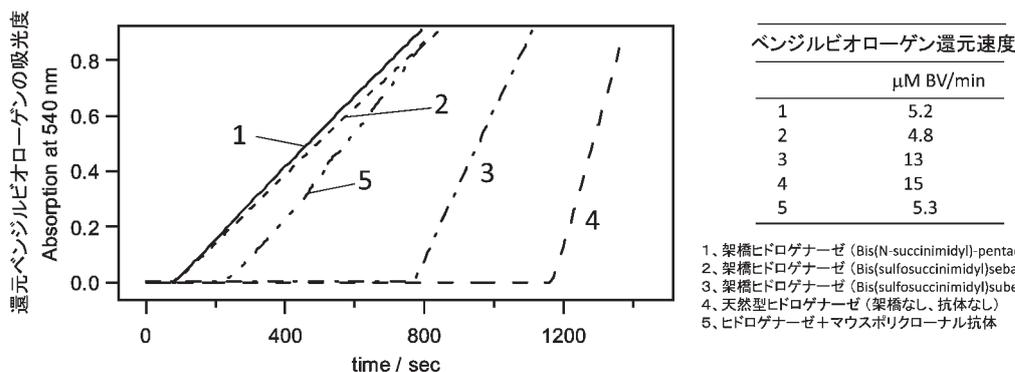


図10 分子内架橋ヒドロゲナーゼ及び抗体結合ヒドロゲナーゼの酸素耐性

これまで著者は、ヒドロゲナーゼと光化学系Iの複合体の設計を行ってきたが^{1,2)}、ヒドロゲナーゼの安定化や、ヒドロゲナーゼを取り囲む構造体設計の支柱となる抗ヒドロゲナーゼ抗体の単離なども並行して試みている。以下に、そのような取り組みの一つである、ヒドロゲナーゼ表面の分子内架橋や抗体結合による修飾による安定化を紹介する。

これまでに、ヘキサメチレンジイソシアネートや1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC) のような架橋剤を用いて、蛋白質表面残基間で共有結合を形成させて、 α -ガラクトシダーゼ³⁰⁾やキモトリプシン³¹⁾の耐熱性やプロテアーゼ耐性の向上に成功した研究例が報告されている。一方、抗体による酵素の安定に関しては、ガラクトシダーゼ³⁰⁾、RNase³²⁾、パパイン³³⁾、グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ³⁴⁾について、それぞれに対する抗体を含んだ血清と混合することによって、その熱耐性もしくはプロテアーゼ耐性、変性剤耐性が改善したことが報告されている。以上の研究から、分子内架橋や抗体は蛋白質の構造揺らぎを軽減する効果があることが示めされた。

そこで、*Desulfovibrio vulgaris Miyazaki F* 由来 [NiFe] -ヒドロゲナーゼに対し、Bis (N-succinimidyl) -pentaethylene glycol ester (スペーサー長22Å)、Bis (sulfosuccinimidyl) sebacate (スペーサー長14Å)、Bis (sulfosuccinimidyl) suberate (スペーサー長11Å) の3つの架橋試薬を用いて分子内架橋を行った。また同ヒドロゲナーゼに対する抗血清とヒドロゲナーゼを混合して、ヒドロゲナーゼと抗ヒドロゲナーゼ抗体との複合体を作製した。

3種の分子内架橋ヒドロゲナーゼ、抗体結合ヒドロゲナーゼ、および無処理ヒドロゲナーゼを、それぞれ最終濃度が約0.05μMとなるように、3 mM ベンジルピオローゲン溶液 (トリス緩衝液、

pH7.3) に加えた。このヒドロゲナーゼ溶液 1 ml 程度に水素ガスを15分間吹き付けて、ヒドロゲナーゼを活性化した。ヒドロゲナーゼの活性化は、ベンジルピオローゲンの還元によって呈する紫色により確認した。次に、活性化したヒドロゲナーゼ溶液を空气中で攪拌した。攪拌はじめて数秒のうちに、紫色を呈していたベンジルピオローゲンが酸化され無色となり、ヒドロゲナーゼ溶液中に酸素分子が溶解しはじめたことが確認できた。空气中で5分間攪拌した後のヒドロゲナーゼ溶液20μlを、水素ガスで飽和させた3mlの3mM ベンジルピオローゲン溶液 (トリス緩衝液、pH7.3) に加えた。ヒドロゲナーゼ溶液の吸光度 (540nm) を経時的に測定したところ、空气中での攪拌で不活性化していたヒドロゲナーゼの再活性化が起こるために、はじめの数分間はベンジルピオローゲンの還元が起こらず、吸光度は上昇しなかった。その後、ヒドロゲナーゼの再活性化が十分に進み、ベンジルピオローゲンが還元されて溶液が紫色に呈色し、吸光度が上昇した。吸光度が上昇し始めるまでの時間を、空气中での攪拌で不活性化していたヒドロゲナーゼが再活性化されるまでの時間 (ラグタイム) とした。また、ヒドロゲナーゼの活性は、ベンジルピオローゲンの還元速度 (吸光度曲線の勾配) を測定することによって求めた。

その結果、ラグタイムは無処理ヒドロゲナーゼでは約20分間であるのに対し、抗体結合によって約5分間に、分子内架橋によって約1分間に短縮され、“un-ready 状態” である Ni-A 不活性型への抵抗性 (前述②の意味での酸素耐性) が向上したことが明らかとなった (図10)。しかし、活性は無処理ヒドロゲナーゼと比較して大きく低下していた。

現在、活性を低下させない抗ヒドロゲナーゼ抗体の取得を目指して、モノクローナル抗体の単離を行

っており、それぞれの安定化や酸素耐性化への影響について調べている。得られたモノクローナル抗体を利用して、GroELやウイルスのカプシドのような構造体へのヒドロゲナーゼの取り込み実験を計画している。また、これらと並行して、水素センサー・ヒドロゲナーゼの高活性化と光水素発生系への応用を目指して、宿主ベクター系による発現系の構築と変異導入を試みている。

5. おわりに

エネルギー問題は、資源の乏しい我が国において、常に大きな問題である。今後、石油などの化石燃料の価格高騰や枯渇などがより顕著化してくることが予想され、エネルギー自給率を少しでも上げることが切望されている。自給率向上には、太陽光、風力、潮力、地熱などの自然エネルギーの有効利用が考えられているが、そのような様々な方法で回収したエネルギーは、水素ガスという媒体に形を変えて貯蔵や運搬をすることが可能であり、またそれを効率的に利用することが検討されている。よって、水素の生産や分解を触媒するヒドロゲナーゼは、大きな可能性を秘めている。ヒドロゲナーゼの酸素耐性化は、ヒドロゲナーゼの応用に不可欠であるが、関係する研究者もまだ少なく、十分に研究が進んでいない。しかも、道のりは決して平坦なものではない。我々の取り組みも始まったばかりであるが、社会的にも蛋白質工学的にも意義あることから、多くの研究者の協力が望まれる。

この研究は、独立行政法人科学技術振興機構・戦略的創造研究推進事業さきがけ「光エネルギーと物質交換」の助成を受けて行っている。本研究を遂行するにあたりご助力頂いた、独立行政法人理化学研究所前田瑞夫主任研究員、茨城大学農学部西原宏史准教授、Humboldt UniversityのFriedrich教授、同じくLenz博士、東京工業大学生命理工学研究科大倉一郎教授、同じく蒲池利章准教授、埼玉大学理学部仲本準准教授に深く感謝申し上げます。

6. 参考文献

- 1) Ihara, M., Nishihara, H., Yoon, K. S., Lenz, O., Friedrich, B., Nakamoto, H., Kojima, K., Honma, D., Kamachi, T., and Okura, I., Light-driven hydrogen production by a hybrid complex of a NiFe-hydrogenase and the cyanobacterial photosystem I,

Photochem. Photobiol., **82**, 676-682, 2006.

- 2) Ihara, M., Nakamoto, H., Kamachi, T., Okura, I., and Maeda, M., Photoinduced hydrogen production by direct electron transfer from photosystem I cross-linked with cytochrome c3 to NiFe-hydrogenase, *Photochem. Photobiol.*, **82**, 1677-1685, 2006.
- 3) Schwarze, A., Kopczak, M. J., Rogner, M., and Lenz, O., Requirements for Construction of a Functional Hybrid Complex of Photosystem I and NiFe-Hydrogenase, *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**, 2641-2651, 2010.
- 4) Lutz, B. J., Fan, Z. H., Burgdorf, T., and Friedrich, B., Hydrogen sensing by enzyme-catalyzed electrochemical detection, *Anal. Chem.*, **77**, 4969-4975, 2005.
- 5) Vincent, K. A., Cracknell, J. A., Clark, J. R., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., and Armstrong, F. A., Electricity from low-level H₂ in still air - an ultimate test for an oxygen tolerant hydrogenase, *Chem. Commun.*, **48**, 5033-5035, 2006.
- 6) Stripp, S. T., Goldet, G., Brandmayr, C., Sanganas, O., Vincent, K. A., Haumann, M., Armstrong, F. A., and Happe, T., How oxygen attacks Fe-Fe hydrogenases from photosynthetic organisms, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **106**, 17331-17336, 2009.
- 7) Saggi, M., Zebger, I., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., Hildebrandt, P., and Lenzian, F., Spectroscopic Insights into the Oxygen-tolerant Membrane-associated NiFe-Hydrogenase of *Ralstonia eutropha* H16, *J. Biol. Chem.*, **284**, 16264-16276, 2009.
- 8) Volbeda, A., Martin, L., Cavazza, C., Matho, M., Faber, B. W., Roseboom, W., Albracht, S. P. J., Garcin, E., Rousset, M., and Fontecilla-Camps, J. C., Structural differences between the ready and unready oxidized states of NiFe-hydrogenases, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **10**, 239-249, 2005.
- 9) Lamle, S. E., Albracht, S. P. J., and Armstrong, F. A., Electrochemical potential-step investigations of the aerobic interconversions of NiFe-hydrogenase from *Allochrocatium vinosum*: Insights into the puzzling difference between unready and ready oxidized inactive states, *J. Am. Chem. Soc.*, **126**, 14899-14909, 2004.
- 10) Ogata, H., Hirota, S., Nakahara, A., Komori, H., Shibata, N., Kato, T., Kano, K., and Higuchi, Y., Activation process of NiFe-hydrogenase elucidated by high-resolution X-ray analyses: Conversion of the ready to the unready state, *Structure*, **13**, 1635-1642, 2005.
- 11) Friedrich, B., and Schwartz, E., Molecular biol-

- ogy of hydrogen utilization in aerobic chemolithotrophs, *Ann. Rev. Microbiol.*, **47**, 351–383, 1993.
- 12) Vignais, P. M., and Billoud, B., Occurrence, classification, and biological function of hydrogenases: An overview, *Chem. Rev.*, **107**, 4206–4272, 2007.
- 13) Surerus, K. K., Chen, M., Vanderzwaan, J. W., Rusnak, F. M., Kolk, M., Duin, E. C., Albracht, S. P. J., and Munck, E., Further characterization of the spin coupling observed in oxidized hydrogenase from *Chromatium vinosum* - A Mossbauer and multifrequency EPR study, *Biochemistry*, **33**, 4980–4993, 1994.
- 14) Burgdorf, T., Loscher, S., Liebisch, P., Van der Linden, E., Galander, M., Lenzian, F., Meyer-Klaucke, W., Albracht, S. P. J., Friedrich, B., Dau, H., and Haumann, M., Structural and oxidation-state changes at its nonstandard Ni-Fe site during activation of the NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha* detected by X-ray absorption, EPR, and FTIR spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 576–592, 2005.
- 15) Van der Linden, E., Burgdorf, T., Bernhard, M., Bleijlevens, B., Friedrich, B., and Albracht, S. P. J., The soluble NiFe-hydrogenase from *Ralstonia eutropha* contains four cyanides in its active site, one of which is responsible for the insensitivity towards oxygen, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **9**, 616–626, 2004.
- 16) Happe, R. P., Roseboom, W., Egert, G., Friedrich, C. G., Massanz, C., Friedrich, B., and Albracht, S. P. J., Unusual FTIR and EPR properties of the H₂-activating site of the cytoplasmic NAD-reducing hydrogenase from *Ralstonia eutropha*, *FEBS Lett.*, **466**, 259–263, 2000.
- 17) Buhrke, T., Lenz, O., Krauss, N., and Friedrich, B., Oxygen tolerance of the H₂-sensing NiFe hydrogenase from *Ralstonia eutropha* H16 is based on limited access of oxygen to the active site, *J. Biol. Chem.* **280**, 23791–23796, 2005.
- 18) Duche, O., Elsen, S., Cournac, L., and Colbeau, A., Enlarging the gas access channel to the active site renders the regulatory hydrogenase HupUV of *Rhodobacter capsulatus* O₂ sensitive without affecting its transducing activity, *FEBS J.*, **272**, 3899–3908, 2005.
- 19) Cracknell, J. A., Vincent, K. A., Ludwig, M., Lenz, O., Friedrich, B., and Armstrong, F. A., Enzymatic oxidation of H₂ in atmospheric O₂: The electrochemistry of energy generation from trace H₂ by aerobic microorganisms, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 424–425, 2008.
- 20) Reiser, E., Fontecilla-Camps, J. C., and Armstrong, F. A., Catalytic electrochemistry of a NiFeSe-hydrogenase on TiO₂ and demonstration of its suitability for visible-light driven H₂ production, *Chem. Commun. (Camb)*, **5**, 550–552, 2009.
- 21) Parkin, A., Goldet, G., Cavazza, C., Fontecilla-Camps, J. C., and Armstrong, F. A., The difference a Se makes? Oxygen-tolerant hydrogen production by the NiFeSe-hydrogenase from *Desulfomicrobium baculatum*, *J. Am. Chem. Soc.*, **130**, 13410–13416, 2008.
- 22) Bernhard, M., Buhrke, T., Bleijlevens, B., De Lacey, A. L., Fernandez, V. M., Albracht, S. P. J., and Friedrich, B., The H₂ sensor of *Ralstonia eutropha* - Biochemical characteristics, spectroscopic properties, and its interaction with a histidine protein kinase, *J. Biol. Chem.*, **276**, 15592–15597, 2001.
- 23) McTavish, H., Sayavedrasoto, L. A., and Arp, D. J., Substitution of *Azotobacter vinelandii* hydrogenase small-subunit cysteines by serines can create insensitivity to inhibition by O₂ and preferentially damages H₂ oxidation over H₂ evolution, *J. Bacteriol.*, **177**, 3960–3964, 1995.
- 24) Nagy, L. E., Meuser, J. E., Plummer, S., Seibert, M., Ghirardi, M. L., King, P. W., Ahmann, D., and Posewitz, M. C., Application of gene-shuffling for the rapid generation of novel FeFe-hydrogenase libraries, *Biotechnol. Lett.*, **29**, 421–430, 2007.
- 25) Stapleton, J. A., and Swartz, J. R., A cell-free microtiter plate screen for improved FeFe-hydrogenases, *PLoS One*, **5**, e10554, 2010.
- 26) Hatchikian, E. C., and Monsan, P., Highly active immobilized hydrogenase from *Desulfovibrio gigas*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **92**, 1091–1096, 1980.
- 27) Klivanov, A. M., Kaplan, N. O., and Kamen, M. D., A rationale for stabilization of oxygen-labile enzymes: Application to a clostridial hydrogenase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **75**, 3640–3643, 1978.
- 28) Muller, M., The hydrogenosome, *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 2879–2889, 1993.
- 29) Shively, J. M., and English, R. S., The carboxysome, A prokaryotic organelle - A minireview, *Can. J. Botany-Revue Can. De Botanique*, **69**, 957–962, 1991.
- 30) Snyder, P. D., Wold, F., Bernlohr, R. W., Dullum, C., Desnick, R. J., Krivit, W., and Condie, R. M., Enzyme therapy .2. Purified human alpha-galactosidase A - stabilization to heat and protease degradation by complexing with antibody and by

- chemical modification, *Biochim. Biophys. Acta*, **350**, 432-436, 1974.
- 31) Torchilin, V. P., Maksimenko, A. V., Smirnov, V. N., Berezin, I. V., Klibanov, A. M., and Martinek, K., Principles of enzyme stabilization .3. Effect of length of intramolecular cross-linkages on thermostability of enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **522**, 277-283, 1978.
- 32) Younus, H., Owais, M., Rao, D. N., and Saleemuddin, M., Stabilization of pancreatic ribonuclease A by immobilization on Sepharose-linked antibodies that recognize the labile region of the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta. -Protein Structure and Molecular Enzymology*, **1548**, 114-120, 2001.
- 33) Khan, S. A., and Iqbal, J., Polyclonal-antibody-mediated insolubilization and stabilization of papain, *Biotechnol. Appl. Biochem.*, **32**, 89-94, 2000.
- 34) Kahn, A., Boivin, P., Leger, J., Cottreau, D., and Hollard, D., Stabilization and activation of a human glucose-6-phosphate-dehydrogenase variant with enzyme deficiency by specific Antibody, *Biochim. Biophys. Acta*, **343**, 431-434, 1974.
-

Attempts for stabilization of hydrogenase against O₂ attack

Masaki IHARA

Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Shinshu University

Summary

Hydrogenase has received growing attentions by researchers who are planning to realize the Hydrogen-Society, because it enables the cleavage and the production of hydrogen gas in the mild condition without using rare and costly metals such as Pt. Hydrogenase, however, is inactivated quickly by oxygen molecules, which significantly limits its industrial applications. Therefore, researches for stabilization of hydrogenase against oxygen molecules should contribute not only to development of bio-hydrogen production system and bio-fuel cells, but also to evolution of catalytic chemistry involved in hydrogen molecule. We herein introduce latest reports about naturally-occurring robust hydrogenases and the mechanism of oxygen-inactivation, attempts for oxygen-stabilization.

Key word : Hydrogenase • Hydrogen • O₂-tolerance • Protein engineering