

大腸菌の代謝改変およびタンパク質改変による水素ガスの高度生産化

Metabolic Engineering and Protein Engineering for *Escherichia coli* to Enhance Bacterial Hydrogen Production

前田憲成*, 尾川博昭

TOSHINARI MAEDA and HIROAKI I. OGAWA

九州工業大学大学院生命体工学研究科 〒 808-0196 北九州市若松区ひびきの 2-4

* TEL: 093-695-6064 FAX: 093-695-6012

* E-mail: toshi.maeda@life.kyutech.ac.jp

Department of Biological Functions and Engineering, Graduate School of Life Science and Systems Engineering, Kyushu Institute of Technology, 2-4 Hibikino, Wakamatsu-ku, Kitakyushu 808-0196, Japan

キーワード: 水素発酵, 代謝工学, タンパク質工学, 遺伝子工学

Key words: Hydrogen Fermentation, Metabolic Engineering, Protein Engineering, Genetic Engineering

(原稿受付 2009 年 10 月 13 日 / 原稿受理 2009 年 11 月 10 日)

1. はじめに

現在, 原油や石油製品などの高騰化, および原油枯渇の危機が深刻な問題となりつつある状況の中, 今後は石油代替エネルギーの創成技術に関する研究開発は, 必要不可欠となってきた。世界のエネルギー事情は, 現在の化石燃料などへの依存から水素ガスとメタンガスへと将来的に移り変わると言われており¹⁾, 水素ガスの需要 (自動車燃料や燃料電池など) は, 益々増加することが予想されている。水素ガスは, 燃焼しても水を生成するのみであると共に, ガソリンの 3 倍の燃焼エネルギーを持つことなどから次世代エネルギー源として期待されている²⁾。従来までの水素ガスの生産法は, 石油類を原料として水蒸気改質法や熱化学分解などの化学的方法^{3,4)} や水の電気分解法などがあるが, これらの方法は「脱石油」を達成できていない点や高コスト化などの問題点があり, 有効な手段とは言えない。一方, 生物学的な水素ガスの生産は低コスト化が期待できる³⁾。現在, 生物学的な水素生産に関して, 主に光合成細菌と発酵細菌に関する研究が報告されているが, 発酵細菌からの水素生産量は光合成細菌よりも多いと言われており⁵⁾, 発酵細菌を用いた水素生産に関する研究は重要な取組みと考えられる。すなわち, 発酵細菌による水素生産では, 図 1 に示すように遺伝子工学技術を駆使することにより, 微生物が保持する「水素ガスを作る」という機能を最大限に高めることができる。また, ギ酸, グルコースのみならず, 生ごみ, 廃木材や米などの再生可能資源からの水素生産化にも有益であり, 自動車燃料や燃料電池などの未来型エネルギーの源になる可能性が十分にある。

しかしながら, 発酵細菌から生産される水素ガスの量は, まだまだ石油に代わるレベルには到達しておらず⁶⁾,

今後実用的な量の水素ガスを生産するためには, さらに水素生産効率を高める研究を行う必要がある。本総説では, 発酵細菌の中でも遺伝子工学技術が進展している大腸菌の代謝改変およびタンパク質改変による水素生産の高度生産化に向けた取組みについて述べることにする。

2. 大腸菌による水素発酵

大腸菌は, 4 つのヒドロゲナーゼ (Hydrogenase 1, Hydrogenase 2, Hydrogenase 3, Hydrogenase 4) を保持している (図 2)。そのうち, Hydrogenase 1 と Hydrogenase 2 は, 水素ガスを消費する活性のみを持つ⁷⁾。報告されているヒドロゲナーゼの多くは, 両方向性の活性 (すなわち, 水素ガスの生産と消費) を示す⁸⁾ のに対し, これらのヒドロゲナーゼと比較的の同種性が高い Hydrogenase

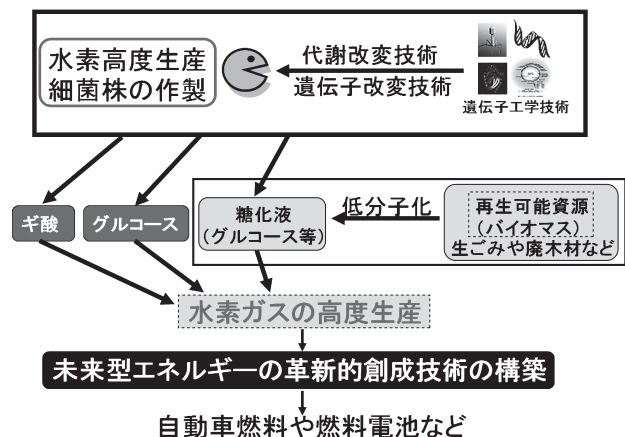


図 1. 水素ガスの高度生産化における未来構想

1 と Hydrogenase 2 が、水素消費活性のみしか持たないことは興味深い点である⁹。一方、大腸菌からの水素ガスは、図3に示すように、Hydrogenase 3⁹と Formate dehydrogenase-H (FdhF)¹⁰から形成される FHL (Formate Hydrogen Lyase) 複合体がギ酸を触媒する反応過程により生産される¹¹。具体的には、FHL 複合体における FdhF がギ酸を変換する際に生じる電子が、HycB, HycF, HycG, 最終的にはラージサブユニットである HycE に移動し、ニッケルイオンなどが配位している活性部位での触媒反応により水素ガスが生産される⁹。

3. 大腸菌の利点

大腸菌は、遺伝子工学技術を駆使して水素生産性を高めることを意図した研究には、最適な微生物の一つであると言える。その理由として、①大腸菌のゲノム解読が終了している点¹²、②過去からの研究データの蓄積により、遺伝子機能の一部が明らかになっている点、③変異株ライブラリー、P1 トランスダクションや DNA マイクロアレイなどの遺伝子工学技術が確立・発展している点が挙げられる。特に、大腸菌変異株ライブラリーの中でも KEIO コレクションの使用は、図4に示すように、1つの菌株の中に多くの遺伝子変異を導入することを可能にする¹³。従来までは、フレームシフト変異やトランスポゾン変異などにより変異株が作製されてきたが、これらの遺伝子変異は比較的不安定であること、および遺伝子変異導入の確認に選択マーカー（薬剤耐性遺伝子）を利用するため、多重変異株の作製に制限があった。一方、KEIO コレクションは欠失遺伝子変異であること、および本システムは、図4に示したように、カナマイシン耐性遺伝子の両側に FRT (Flippase Recognition Target) 配列が座位しており、pCP20 プラスミドから発現される遺伝子組換えタンパク質が、この FRT 配列の部分で組換えを誘発することで、カナマイシン耐性遺伝子カ

セットを取り除くことができる¹⁴。また、その組換え誘発プラスミドは、温度感受性のレプリコンから構成されているので、容易に脱落させることもできる。すなわち、カナマイシン耐性遺伝子のみで、P1 トランスダクションと上述の選択マーカー除去システムを利用することにより、多重変異株の作製が容易となる。

4. 代謝改変による水素ガスの高度生産化

大腸菌は、貧酸素条件下でギ酸を触媒する反応から水素ガスを生産する。そこで、上述した発達している遺伝子工学技術を駆使して、ギ酸から水素ガスを高度生産するようにデザインした。水素ガスの生産性を高める戦略の一つとして、水素ガスの生産を担う FHL 複合体 (Hydrogenase 3 と FdhF) の遺伝子発現を誘導することが有効な手段であると考えられる。図2に示すように、転写調節タンパク質である FhlA は、UAS (Upstream Activate Site) 配列に結合して、Hydrogenase 3 および FdhF の遺伝子発現に寄与している^{15,16}。そこで、大腸菌内で FhlA の発現を増やすために、FhlA 発現系プラスミド (pCA24N-FhlA) を大腸菌株に導入した。また、Hydrogenase 3 の発現を負に制御している *hycA* 遺伝子⁹を欠失させ、水素発酵の活性化を図った。さらに、水素ガスの消費活性を保持する Hydrogenase 1 および Hydrogenase 2 を欠失するため、それぞれの複合体の活性部位であるラージサブユニット HyaB および HybC の遺伝子を破壊した。次に、大腸菌における水素ガスの原料であるギ酸が、水素生産のみに使用されるように、①ギ酸の細胞外輸送に関与している FocA¹⁷、②機能はまだ不明であるが、FocA と高い相同性を持つ FocB¹⁸、③ギ酸を消費する活性を持つ Formate dehydrogenase-N¹⁹ のラージサブユニット (FdnG) および Formate dehydrogenase-O^{19,20} のラージサブユニット (FdoG)、および④ Formate dehydrogenase-N とリンクして機能する Nitrate

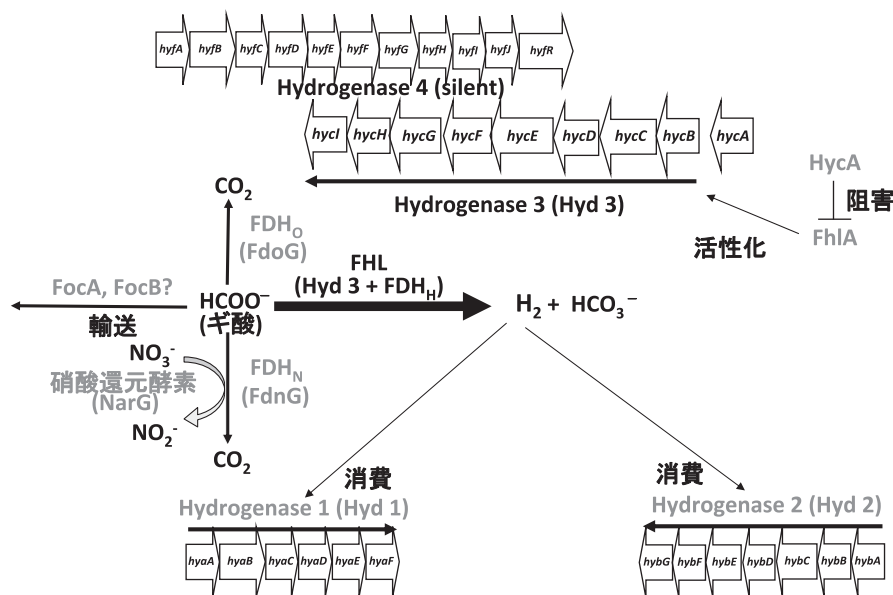


図2. 大腸菌の水素生産を高めるための代謝改変デザイン (FDH_O: Formate dehydrogenase-O, FDH_N: Formate dehydrogenase-N, FDH_H: Formate dehydrogenase-H)

reductase A²¹⁾ の α -サブユニット (NarG) の遺伝子に対して、様々なパターンの多重遺伝子変異株を作製し、水素ガス高度生産化における効果を追究した²²⁾。その結果、結論を言えば、*hycA*, *hyaB*, *hybC*, と *fdoG* の4つの遺伝子変異、および *FhlA* の遺伝子発現は水素ガスの高度生産化に有効であった。図5に示すように、5つの細工を施した大腸菌株 (*E. coli* BW25113 *hyaB hybC hycA fdoG/pCA24N-FhlA*) は、ギ酸から親株 (*E. coli* BW25113/pCA24N) よりも最大で141倍高い水素生産性を示した。また、本菌株はギ酸1モルから水素1モルを生産するという、理論値通りの水素生成能を持っていることも明らかとなった²²⁾。最近では、これらの遺伝子とは別に、*iscR* および *nikR* 遺伝子の変異が水素高度生産化に有用であることが分かってきた。図3に示すように、FHL複合体の中のHycBおよびHycFの内部には、電子の移動に関与していると考えられる鉄-硫黄(Fe-S)クラスターが存在している⁹⁾。IscRタンパク質は、タンパク質内でのこのクラスターの形成を負に制御していると考えられており²³⁾、この遺伝子の欠失により、成熟したFHL複合体の量が増加して、水素生産に影響を及ぼしたものと考えられる。また、同様にFHL複合体のHycEの活性部位には、水素生産を触媒しているニッケルイオンが配位している(図3)。ニッケルイオンの

タンパク質内への導入を負に制御する機能を持っている *NikR*²⁴⁾ タンパク質が不活性化することにより、FHL複合体の活性が向上して水素ガスの生産性が高まったものと考えられる。

5. タンパク質改変による水素ガスの高度生産化

次に、水素生産性を高めるために、水素生産に関わるタンパク質の遺伝子を改変し、触媒機能の向上化を図った。遺伝子内での塩基配列の変化は、コドン変化、アミノ酸変化、タンパク質の構造変化を生み、最終的には触媒機能が変化するという原理である。ここでは、水素生産に関わるFHL複合体の中で、水素生産の活性部位を持つ *hycE* 遺伝子 (569アミノ酸残基) を標的とした。図6に示したように、*hycE* 遺伝子を pBS (Kan) の *lac* プロモーターの下流にクローニングして作製した pBS (Kan) *HycE* をテンプレートとして、①変異性ポリメラーゼ鎖反応 (ep-PCR)、②DNA シャッフリング、および③飽和変異導入法の3つの手法を用いて、この *hycE* 遺伝子内にランダム変異を導入した。次に、作製した変異ライブラリーを水素消費活性および水素生産活性を持たない株、すなわち Hydrogenase 1, Hydrogenase 2, および Hydrogenase 3 のそれぞれのラージサブユニットが欠失した3重変異株 (*E. coli* BW25113 *hyaB hybC hycE*) に形質転換して、カナマイシンを含有した LB 培地で選択をかけた。その後、生育したクローンを、ギ酸を含有した寒天培地に播種して、さらに12時間嫌気ボックスで培養した。水素生産性が向上したクローンを探索するため、その寒天培地上のコロニーに濾紙(コロニーが直接水素センサ膜に付着することを防止するため)および水素センサ膜を続けて押しつけ、水素センサ膜上での色の変化を観察した(図6)。この水素センサ膜は、水素ガスを膜上で検知すると青色に呈するという性質をもっており²⁵⁾、「青色に早く変化するクローン」または「濃い青色を示すクローン」を選び、水素ガスの生産性などをガスクロマトグラフにより測定²⁶⁾して、高い水素生産性を示すクローンを特定した²⁷⁾。

はじめに、ep-PCRによるランダム変異導入法により遺伝子変異を導入して研究を行った。本手法は、4種類のデオキシリボヌクレオシド三リン酸をアンバランスな濃度で混合した条件、かつマンガンイオン存在下で Taq ポリメラーゼを用いて PCR 反応を行うものであり²⁸⁾、

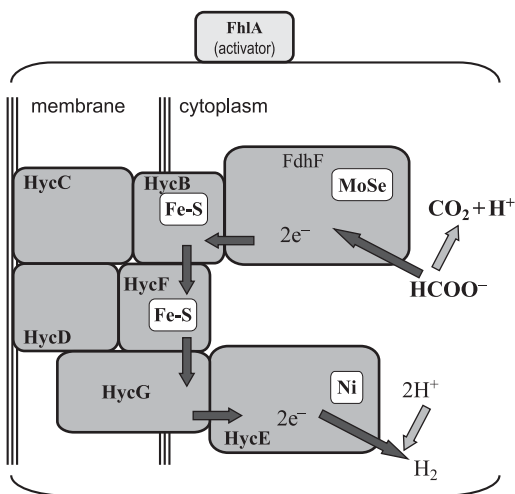


図3. 大腸菌の水素生産酵素 FHL 複合体の形成

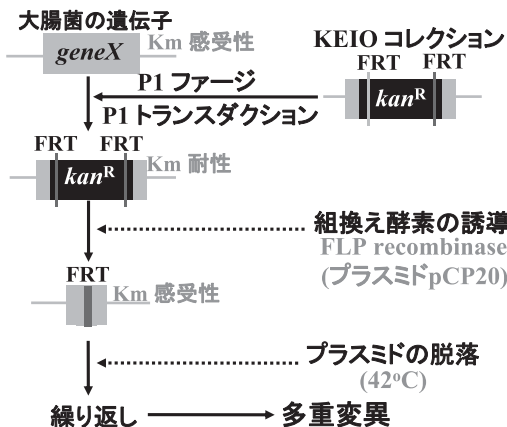


図4. 多重変異株の作製方法のスキーム

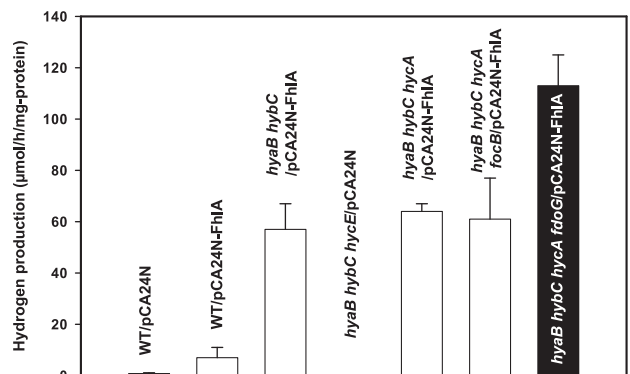


図5. 代謝改変した菌株の水素ガスの生産性

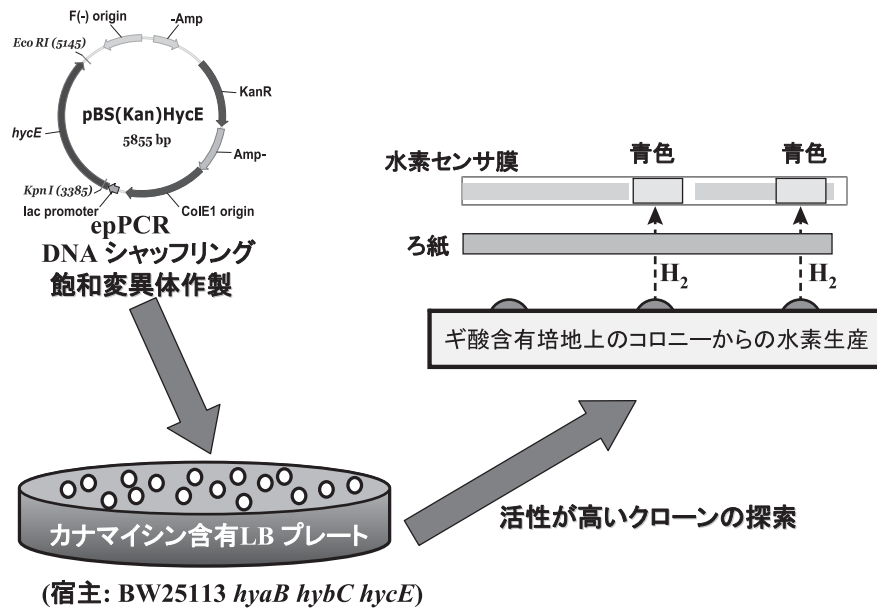


図 6. 水素生産活性が向上した変異体の探索方法

1000 bp に 5 個程度の塩基変化を導入することが可能である。この手法によって作製したクローン (4540 クローン) を探索したところ、7 クローンが野生型の HycE よりも高い水素生産活性を示した (図 7)。その中で最も高い水素生産活性を示した epHycE95 の活性は、野生型 HycE の活性よりも 17 倍高かった。また、DNA シークエンスにより、塩基配列の変化からアミノ酸変化を特定したところ (表 1)、2 ~ 8 個のアミノ酸残基が変化していることがわかった。

次に、7 つの HycE 変異体のうち、特に水素生産活性が高かった epHycE21, epHycE67, および epHycE95 を用いて、DNA シャッフリングを行い、epHycE95 よりも活性が高い変異体の探索を行った。DNA シャッフリングは、標的の DNA 産物を DNA 分解酵素により断片化した後、その断片化 DNA 産物から標的遺伝子に再編成する過程にランダムに変異を導入するという手法である²⁹⁾。4080 クローンをスクリーニングした結果、1 クローンのみ (shufHycE1-9) が、epHycE95 よりも高い水素生産活性を示した。この変異体の DNA シークエンスを行ったところ、1 つの塩基配列の変化が特定され、その変異は HycE の 464 番目のコドンの部位に終始コドンが入ったナンセンス変異であった。この shufHycE1-9 は、野生型 HycE よりも 23 倍高い水素生産活性を示した。

表 1 に示した ep-PCR の結果より、変異体の中でも高い水素生産活性を示した epHycE67 および epHycE95 において、共通の変異位置である HycE の 2 番目のコドン (セリン残基) と 366 番目のコドン (スレオニン残基) が、水素生産の活性向上に重要であると考え、これらの 2 か所の部位にて飽和変異導入法により、それぞれの部位に全てのアミノ酸および 1 つの終始コドンを当てはめ、その中から epHycE95 よりも高い水素生産活性を示すクローンを探索した。その結果、HycE の 2 番目の部位での飽和変異導入では活性が向上したクローンは獲得することができなかったものの、366 番目の位置では、活性が向上したクローンが 4 つ見つかった。これらのク

ローンの DNA シークエンスを行ったところ、全てのクローンにおいて、366 番目の部位に終始コドンが導入されていた。この HycE 変異体 satHycE12T366 は、野生型 HycE と比較して 30 倍高い水素生産活性を保持していた。

以上のように、ep-PCR, DNA シャッフリング, および飽和変異導入法により野生型 HycE よりも水素生産活性が高い変異体の作製を行ってきたが、一つの特徴として、これらの 3 つのいずれの手法においても、ナンセンス変異 (終始コドン) を持った変異体が多数見つかった。C 末端側の 16 残基 (epHycE39), 78 残基 (epHycE70), 106 残基 (shufHycE1-9), および 204 残基 (satHycE12T366) が切断された HycE は、SDS-PAGE により確認された。元来、HycE は、タンパク質が成熟する過程において C 末端側の 32 残基がプロテアーゼ活性を持つ HycI によって切断されることによって活性化される³⁰⁾。したがって、今回の結果のように、さらに 32 残基よりも長く切断されることによってタンパク質が効率良く成熟化することで、活性が増加した可能性が考えられる。一方、HycE の活性に必要な鉄イオンとニッケルイオンは、241 番目, 244 番目, 531 番目, および 534 番目のシステイン残基と配位しているという報告がある³¹⁾。今回、最も水素生産活性が高かった satHycE12T366 は、531 番目と 534 番目のシステイン残基が欠落しており、過去の報告とは食い違う結果を示している。今後は、その水素生産の活性向上のメカニズムの解明を行い、さらなる検討を進めたい。

6. おわりに

現在まで作製した菌株の水素生成能をもとに、この菌株が実用化に向けてどの程度有効であるかを次のように評価した。1 キロワットの電力を発生させるのに、1 時間あたり 23.9 モルの水素が必要とされている³²⁾。1 モルのギ酸から理論値通りの 1 モルの水素を生産する菌株を

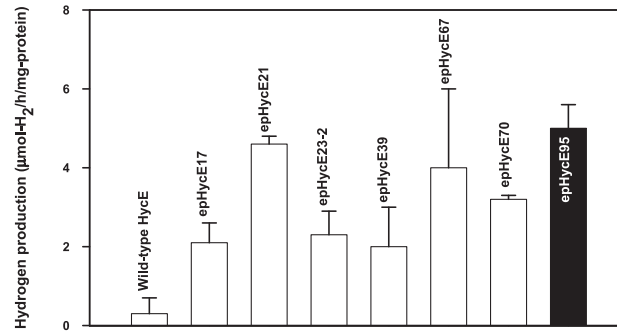


図7. 変異性 PCR 法によって得られた HycE 変異体の水素生産性

表1. 変異性 PCR 法によって得られた HycE 変異体におけるアミノ酸変化

HycE 変異体	HycE アミノ酸変化
epHycE17	F297L, L327Q, E382K, L415M, A504T, D542N
epHycE21	Q32R, V112L, G245C, F409L
epHycE23-2	D210N, I271F, K545R
epHycE39	I333F, K554*
epHycE67	S2P, E4G, M314V, T366S, V394D, S397C
epHycE70	D202V, K492*
epHycE95	S2T, Y50F, I171T, A291V, T366S, V433L, M444I, L523Q

用いて、ギ酸から水素ガスを作ることを想定する。ギ酸の1キログラムあたりの価格を1,000円と仮定すると、1キロワットの電力を1年間にわたり発生させるのに、1年にそれぞれ763万円の費用がかかるということになる。現在の電気料金では、同等の電力はおおよそ年間14万円で供給されており、まだ50倍以上の開きがある。

以上のように、応用化・実用化に向けては、さらに水素ガスを高度に生産できる菌株を構築して、コストを低減化する取組みが必要である。また、食料生産と競合しない再生可能資源を利用して、水素ガスなどのバイオエネルギーを生産するさらなる取組みも必要である。これらの大きな課題に取組み、今後のエネルギー問題に向けてさらに検討を進めていきたい。

謝 辞

本研究において、有益なご助言を頂いた米国テキサス A&M 大学工学部化学工学科教授・WOOD Thomas 先生に厚く御礼申し上げます。また、本研究の一部を支援して頂いた日本学術振興会の科学研究費補助金若手（スタートアップ）の補助金に対しても深謝致します。

文 献

- Dunn, S. 2002. Hydrogen futures: toward a sustainable energy system. *Int. J. Hydrogen Ener.* 27: 235–264.
- Hansel, A., and P. Lindblad. 1998. Toward optimization of cyanobacteria as biotechnologically relevant producers of molecular hydrogen, a clean and renewable energy source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 50: 153–160.
- Das, D., and T. N. Veziroglu. 2001. Hydrogen production by biological processes: a survey of literature. *Int. J. Hydrogen Ener.* 26: 13–28.
- Yi, K. B., and D. P. Harrison. 2005. Low-pressure sorption-enhanced hydrogen production. *Ind. Eng. Chem. Res.* 44: 1665–1669.
- Yoshida, A., T. Nishimura, H. Kawaguchi, M. Inui, and H. Yukawa. 2005. Enhanced hydrogen production from formic acid by formate hydrogen lyase-overexpressing *Escherichia coli* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 6762–6768.
- Vardar-Schara, G., T. Maeda, and T. K. Wood. 2008. Metabolically engineered bacteria for producing hydrogen via fermentation. *Microb. Biotechnol.* 1: 107–125.
- Forzi, L., and R. G. Sawers. 2007. Maturation of [NiFe]-hydrogenases in *Escherichia coli*. *Biometals* 20: 565–578.
- Tamagnini, P., R. Axelsson, P. Lindberg, F. Oxelfelt, R. Wüschiers, and P. Lindblad. 2002. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66: 1–20.
- Bagramyan, K., and A. Trchounian. 2003. Structural and functional features of formate hydrogen lyase, an enzyme of mixed-acid fermentation from *Escherichia coli*. *Biochemistry (Mosc)* 68: 1159–1170.
- Axley, M. J., D. A. Grahame, and T. C. Stadtman. 1990. *Escherichia coli* formate-hydrogen lyase. Purification and properties of the selenium-dependent formate dehydrogenase component. *J. Biol. Chem.* 265: 18213–18218.
- Woods, D. D. 1936. Hydrogenlyases: The synthesis of formic acid by bacteria. *Biochem. J.* 30: 515–527.
- Blattner, F. R., G. Plunkett, 3rd, C. A. Bloch, N. T. Perna, V. Burland, M. Riley, J. Collado-Vides, J. D. Glasner, C. K. Rode, G. F. Mayhew, J. Gregor, N. W. Davis, H. A. Kirkpatrick, M. A. Goeden, D. J. Rose, B. Mau, and Y. Shao. 1997. The complete genome sequence of *Escherichia coli* K-12. *Science* 277: 1453–1474.
- Baba, T., T. Ara, M. Hasegawa, Y. Takai, Y. Okumura, M. Baba, K. A. Datsenko, M. Tomita, B. L. Wanner, and H. Mori. 2006. Construction of *Escherichia coli* K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular Systems Biology* 2: 2006.0008.
- Datsenko, K. A., and B. L. Wanner. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using

- PCR products. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A 97: 6640–6645.
- 15) Korsá, I., and A. Bock. 1997. Characterization of *fhla* mutations resulting in ligand-independent transcriptional activation and ATP hydrolysis. J. Bacteriol. 179: 41–45.
 - 16) Schlensog, V., S. Lutz, and A. Böck. 1994. Purification and DNA-binding properties of FHLA, the transcriptional activator of the formate hydrogenlyase system from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 269: 19590–19596.
 - 17) Suppmann, B., and G. Sawers. 1994. Isolation and characterization of hypophosphite-resistant mutants of *Escherichia coli*: identification of the FocA protein, encoded by the *pfl* operon, as a putative formate transporter. Mol. Microbiol. 11: 965–982.
 - 18) Andrews, S. C., B. C. Berks, J. McClay, A. Ambler, M. A. Quail, P. Golby, and J. R. Guest. 1997. A 12-cistron *Escherichia coli* operon (*hyf*) encoding a putative proton-translocating formate hydrogenlyase system. Microbiology 143: 3633–3647.
 - 19) Rossmann, R., G. Sawers, and A. Böck. 1991. Mechanism of regulation of the formate-hydrogenlyase pathway by oxygen, nitrate, and pH: definition of the formate regulon. Mol. Microbiol. 5: 2807–2814.
 - 20) Benoit, S., H. Abaibou, and M. A. Mandrand-Berthelot. 1998. Topological analysis of the aerobic membrane-bound formate dehydrogenase of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 180: 6625–6634.
 - 21) Bertero, M. G., R. A. Rothery, M. Palak, C. Hou, D. Lim, F. Blasco, J. H. Weiner, and N. C. Strynadka. 2003. Insights into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A. Nat. Struct. Biol. 10: 681–687.
 - 22) Maeda, T., V. Sanchez-Torres, and T. K. Wood. 2008. Metabolic engineering to enhance bacterial hydrogen production. Microb. Biotechnol. 1: 30–39.
 - 23) Akhtar, M. K., and P. R. Jones. 2008. Deletion of *iscR* stimulates recombinant clostridial Fe-Fe hydrogenase activity and H₂-accumulation in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Appl. Microbiol. Biotechnol. 78: 853–862.
 - 24) De Pina, K., V. Desjardin, M. A. Mandrand-Berthelot, G. Giordano, and L. F. Wu. 1999. Isolation and characterization of the *nikR* gene encoding a nickel-responsive regulator in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 181: 670–674.
 - 25) Seibert, M., T. Flynn, D. Benson, E. Tracy, and M. Ghirardi. 1998. BioHydrogen, p. 227–234, Zaborsky, O. R. ed. Plenum Press, New York.
 - 26) Maeda, T., G. Vardar, W. T. Self, and T. K. Wood. 2007. Inhibition of hydrogen uptake in *Escherichia coli* by expressing the hydrogenase from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. BMC Biotechnol. 7: 25.
 - 27) Maeda, T., V. Sanchez-Torres, and T. K. Wood. 2008. Protein engineering of hydrogenase 3 to enhance hydrogen production. Appl. Microbiol. Biotechnol. 79: 77–86.
 - 28) Cadwell, R. C., and G. F. Joyce. 1992. Randomization of genes by PCR mutagenesis. PCR Methods Appl. 2: 28–33.
 - 29) Stemmer, W. P. C. 1994. DNA shuffling by random fragmentation and reassembly: in vitro recombination for molecular evolution. Proc. Nat. Acad. Sci. 91: 10747–10751.
 - 30) Drapal, N., and A. Böck. 1998. Interaction of the hydrogenase accessory protein HypC with HycE, the large subunit of *Escherichia coli* hydrogenase 3 during enzyme maturation. Biochemistry 37: 2941–2948.
 - 31) Magalon, A., and A. Böck. 2000. Analysis of the HypC-hycE complex, a key intermediate in the assembly of the metal center of the *Escherichia coli* hydrogenase 3. J. Biol. Chem. 275: 21114–21120.
 - 32) Levin, D. B., L. Pitt, and M. Love. 2004. Biohydrogen production: prospects and limitations to practical application. Int. J. Hydrogen Ener. 29: 173–185.