

## F206

## エアリフト懸濁させた蟻酸脱水素酵素封入りポソームの活性に及ぼす炭酸ガス通気の影響

(山口大院医) ○ (正) 吉本 誠\*, (学) 山下 孝幸, (山口大工) 山城 卓哉

## 1. 緒言

蟻酸脱水素酵素 FDH は還元型補酵素 NADH の共存下、二酸化炭素の還元による蟻酸の生成反応を触媒する。FDH 反応操作には、炭酸ガスの連続的供給が可能なエアリフト気泡塔が適している。先に<sup>1)</sup>、外部循環式エアリフト気泡塔内において、FDH の脂質二分子膜ベシクル (リポソーム) 内封入により、気液界面における酵素の失活が著しく抑制されることを示した。本研究では、炭酸ガスを通気したエアリフトにリポソーム内に封入された FDH/NADH 反応系を懸濁して、FDH/NADH による炭酸ガス還元活性を調べた。

## 2. 実験

**2.1 FDH/NADH 封入りポソームの調製** 乾燥脂質膜 (1-Palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine) を 10 g/L FDH 及び 30 mM NADH を溶解した 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.5) で水和し 7 回凍結融解後、Extrusion によりリポソーム径を約 100 nm とした。リポソーム外水相の FDH/NADH をゲルろ過で分離してリポソーム内封入 FDH/NADH を得た。リポソーム系の FDH 活性はリポソームをコール酸で可溶化後、25 °C で 1.5 mM NAD<sup>+</sup>/FDH 触媒下、300 mM 蟻酸の酸化による NADH の生成速度を A<sub>340</sub> で追跡して決定した。NADH, NAD<sup>+</sup>各濃度は A<sub>340</sub>, A<sub>260</sub> から決定した<sup>1)</sup>。

**2.2 炭酸ガス通気エアリフトにおける反応操作** ライザー内径 8.0 mm, ダウンカマー内径 4.8 mm の小型化した外部循環式エアリフト気泡塔に 10 mL のリポソーム内封入 FDH/NADH 懸濁液または遊離 FDH/NADH 溶液を仕込んだ。気泡塔を恒温槽中に入れて 45 °C とした。フィルター、加湿器を通過させた炭酸ガスをガス空塔速度  $U_G = 2.0$  cm/s で通気して、各触媒系における NADH, NAD<sup>+</sup>各濃度を 6 h 追跡した。リポソーム系の NADH 濃度は脂質膜をコール酸で可溶化後測定した。エアリフト反応操作後のリポソーム懸濁液をゲル濾過することにより、反応操作中にリポソーム外水相に漏出した補酵素を分離定量した。

## 3. 結果及び考察

**3.1 リポソーム内 FDH/NADH の特性** リポソーム 1 個当たり平均 1.7 分子の FDH が封入された。リポソーム内水相の NADH 濃度は 12.4 mM であった。また、リポソーム調製中における NADH の NAD<sup>+</sup> への変化量は仕込み NADH の 7% と低レベルであった。

**3.2 エアリフト懸濁させたリポソーム内 FDH/NADH の炭酸ガス還元活性** エアリフト中の Tris 緩衝液 (pH 8.5) に炭酸ガスを通気すると、pH が 6.6 まで低下した。そこで、NADH の安定性に及ぼす pH の影響を試験管内の静止液系で検討した。Fig.1 に 45 °C, pH 8.5 と 6.6 における 0.2 mM NADH の安定性の経時変化を示す。FDH 非共存下では、pH 6.6 において NADH が不安定であることがわかる。一方、pH 6.6 において 30 U/L FDH を共存させたところ、NADH の安定性が著しく増大することがわかる。Fig.2 に炭酸ガスを

通気したエアリフトに懸濁させたリポソーム内封入 FDH/NADH 系における NADH 転化率の経時変化を示す。炭酸ガス通気の影響を明らかにするために、pH 6.6 で窒素ガスを通気した場合の結果を併せて示す。炭酸ガスを通気した場合、6 h の反応操作中、NADH が着実に NAD<sup>+</sup> へ酸化されている。窒素ガスを通気した場合、NADH 転化率は 5.1% である。6 h の操作中、リポソーム内から漏出した補酵素は初期の 9.3% であった。一方、遊離 FDH/NADH 系を用いてエアリフト反応操作を行った場合、窒素ガス通気条件下 (pH 6.6) の方が NADH 濃度の低下が大きい結果が得られた。これは、遊離系では、気泡群との接触により酵素の失活が顕著となり<sup>1)</sup>、pH 6.6 で NADH が不安定になったためである。したがって、遊離 FDH 触媒下の炭酸ガス還元反応は殆ど進行しないことが示唆される。

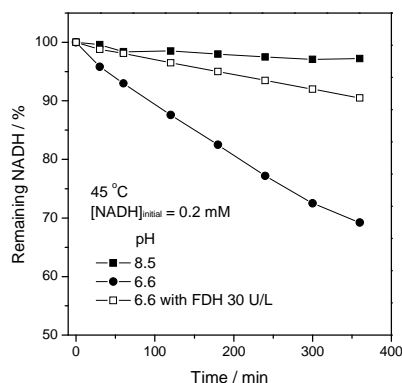


Fig. 1 Effects of pH and FDH on stability of 0.2 mM NADH.

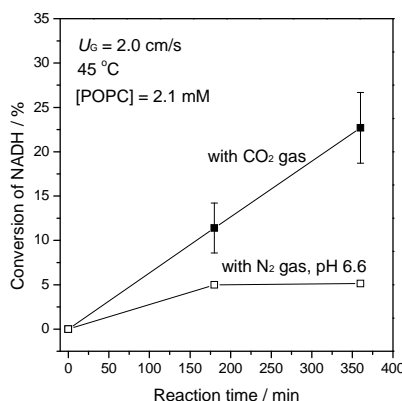


Fig. 2 Time courses of NADH conversion catalyzed by liposomal FDH/NADH in the airlift.

## 4. 結言

炭酸ガスを通気したエアリフト型気泡塔に懸濁させたリポソーム内封入 FDH/NADH 系では、炭酸ガス還元に伴う NADH の酸化反応が安定に進行することがわかった。

文献 1) 山下ら: 化学工学会第 41 回秋季大会, AE3P08 (2009)

E-mail: yosimoto@yamaguchi-u.ac.jp