

(北陸先端科技大、材料) ○斉藤郁雄、横山憲二、阪口利文、民谷栄

NAD⁺依存性脱水素酵素は数多く存在し、それらの酵素反応は水溶液系において、バイオセンサーやバイオリアクターへの応用が多数試みられている。しかし有機溶媒系への応用例はほとんどなく、脱水素酵素反応を有機溶媒中で電気化学的に制御することができれば、疎水性物質に対するバイオセンサーやバイオリアクターなどに応用できると考えられる。本研究では、有機溶媒中で電気化学的にNADHを酵素に有用な形でNAD⁺に変換することができる系を確立し、さらにNAD⁺を補酵素とする脱水素酵素の有機溶媒中での電気化学的特性についても併せて検討していくことを目的としている。

電気化学測定は主にサイクリックボルタンメトリーにより行なった。反応系溶媒は、ジメチルスルホキシド(DMSO)を選択した。メディエーターとしてMeldora's Blueや1-Methoxy PMS等の酸化還元色素を用いた。まずDMSO中でこれらメディエーターの酸化還元挙動を観察した。その結果、後者では電極表面への還元種の強い吸着が見られた。またNADHをこの反応系に添加することで、これらメディエーターによるキャタリティックなNADHの酸化電流が、+100mV(vs.Ag/AgCl)付近で観測された。この時、0.2mMのメディエーターのバックグラウンド電流に対して、1mMのNADHを添加することで約10倍の酸化電流値の増幅が得られた。さらに、NADHの電気化学的な酸化反応によるNAD⁺の生成を確認するために、脱水素酵素反応を調べた。酵素にはL-乳酸デヒドロゲナーゼ(LDH)を選択し、酵素表面のアミノ基にポリエチレングリコール(PEG)を塩化シアヌルを介して修飾し、DMSOに溶解させた。メディエーター+NADH+PEG-LDHの反応系で得られるバックグラウンド電流に対して、基質となるL-乳酸を1~10mM添加することで、酵素反応による酸化電流値の増幅を得ることができた。

Electrochemistry of NADH and enzyme reaction of dehydrogenase in organic solvent.

○Ikuro Saito, Kenji Yokoyama, Toshifumi Sakaguchi, Eiichi Tamiya
(School of Materials Science, JAIST)

NADH oxidation, organic solvent, mediator, dehydrogenase

(滋賀県大・工・材料) ○広原日出男 (住化・生命研) 西沢完治、
大神恭孝 (住化・農研) 松尾憲忠、岸田博

【目的】 *Pseudomonas cepacia* リパーゼ (PCL) は有機合成に最も度々用いられる酵素の一つであり、触媒作用を受ける方の対掌体は経験則で予測でき、二級アルコールに対する選択性は厳格であることが知られている。この対掌体選択性を反応機構に基づき解明する事を目指し、PCLによる加水分解反応の定常状態の動力学研究を行った。

【方法及び結果】 一級、二級置換エチルアルコールの (R)-, (S)- 対掌体及びアキラルな類縁体の酢酸エステルを基質とし、次の点が明らかとなった。

(a) 基質は全て類似の様式で酵素に取り込まれる。(b) 反応を受けない対掌体は、キラル中心に結合している中間的大きさの置換基の立体障害によって、His285 から脱離基へのプロトン移動が妨げられ、律速段階である四面体中間体の崩壊が起こらないために反応が進行しない。

Mechanistic implications for the enantioselective catalysis of *Pseudomonas cepacia* lipase through a kinetic study on chiral and achiral substrates.

○Hideo Hirohara (Dept. Mater. Sci., Univ. Shiga Pref.), Kanji Nishizawa, Yasutaka Ohgami, Noritada Matsuo, Hiroshi Kisida (Sumitomo Chem.)

【keywords】 *Pseudomonas cepacia* lipase, tetrahedral intermediate, kinetics