

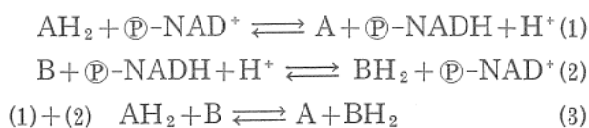
NAD⁺ の高分子化と バイオリアクターへの応用

岡田 弘 輔*

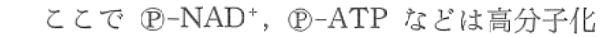
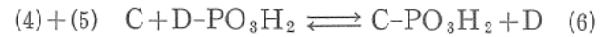
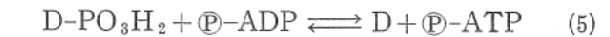
固定化酵素の技術は過去10年間に著しく進歩し今日ではすでに医療分析用、工業生産用に実用化され工業化されている。この技術は生物の生産する酵素を加工して反応塔の中で生命反応と同じ事を行なわせようとするものである。しかし現在固定化に成功しているのは、加水分解酵素、異性化酵素などで酵素蛋白質のみを不溶性担体に結合させればよい場合に限られている。酵素の中には、酵素蛋白の他に低分子の特殊な物質、補酵素を必要とする反応があるが、酵素蛋白と解離性の補酵素、NAD, NADP や ATP を必要とする反応では酵素蛋白のみの固定化では問題が解決しない。

例えば酵素反応 $A \rightarrow B$ が酵素蛋白 E によって触媒されているときは、E 蛋白を固定化して反応塔につめ A を上部から流せば、下部から B が回収できる。これに反して解離性の補酵素を必要とする反応では、例えば、 $AH_2 + NAD^+ \rightleftharpoons A + NADH + H^+$ が酵素 E で触媒されていると酵素 E を固定したのみでは反応塔の上部から AH_2 と NAD^+ を流して下部から A と $NADH$ を回収することになる。しかし補酵素の価格が高く、とうてい使い捨てにできない。したがって経済的にリアクターを運転するためには補酵素を回収して再活性化し、循環使用するためには補酵素を修飾して高分子化させ、なおかつ水溶性で高い補酵素活性をもっているものを調整する必要がある。

もし上述のような高分子化補酵素ができれば再活性化は適当な再生用酵素反応と組合せればよく、例えば NAD^+ 依存の反応では



同様に ATP を要求する kinase の反応では



ここで $\textcircled{P}-NAD^+$, $\textcircled{P}-ATP$ などは高分子化した NAD^+ や高分子化した ATP をさしている。 AH_2 と C は反応基質であり B と $D-PO_3H_2$ は再生用基質を示している。したがって (1), (4) の反応が目的反応で (2) と (5) の反応は再生用の反応と云うことになる。もちろん (2) や (5) の反応を目的反応に使うこともできるがその時は (1) や (4) の反応を再生用の反応として使用すればよい。

したがって高分子化補酵素、目的反応の酵素再生反応の酵素を半透膜で囲んだ空間（例えば半透膜を付した超ろ過器、マイクロカプセル、ゲル内等）中に封入し、外部から 2 種の基質を加えると (3) または (6) の反応が起こり、高分子化補酵素は turn-over してリアクターは連続的に作動することになる。この技術は生体内で行なわれている反応を生体外に取出し、人工を加えた上でリアクターの中で行なわせようとするものである。

しかし問題は高分子化して高い補酵素活性をもつものが合成できるかどうかにかかっている。高分子化した補酵素と高分子化合物である酵素蛋白質との結合が当然立体障害をうけるであろうし、そのために補酵素活性を低下させるであろうに相像させられる。本技術解説では、上の目的のために開発された NAD^+ の高分子化法と、バイオリアクターを用いた連続反応への応用について述べる。

高分子化 NAD^+ の調製

NAD^+ が高分子化され、しかも補酵素活性を失わないためには、当然 NAD^+ が酵素と複合

* 岡田弘輔 (Hirotsuke OKADA), 大阪大学, 工学部, 醸酵工学, 教授, 工学博士

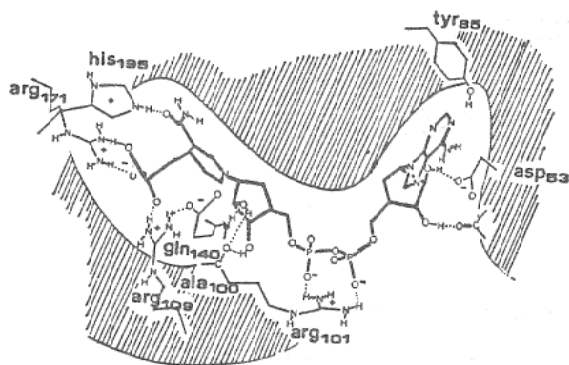


図1 家兎筋肉の乳酸脱水素酵素-NAD⁺-ピルビン酸複合体の配置模式図¹⁾

体を作っているとき結合に関与している残基は修飾できない。図1は NAD⁺ と酵素蛋白が結合している立体配置図の1例である¹⁾。これは兎筋肉の乳酸脱水素酵素 (lactate + NAD⁺ ⇌ pyruvate + NADH + H⁺) とピルビン酸、NAD⁺ が複合体を作っている模型図である。NAD⁺ とピルビン酸は酵素蛋白中のクレバス中にはまり込み、NAD⁺ 分子中のリボース2分子の4つのOH、ホスホジエステル2つの解離性-OH、ニコチンアミド環のC=Oはいずれも酵素蛋白の残基と相互作用をしており、これらの残基の修飾すると補酵素活性は直ちになくなる²⁾。図中 arg, ala, gln, his, tyr, asp はそれぞれアルギニン、アラニン、グルタミン、ヒスチジンチロシンとアスパラギン酸で数字は酵素蛋白中のアミノ末端から数えたアミノ酸の番号であ

る。したがって NAD⁺ の修飾はアデニン環に限定され N⁶ のアミノ基と8位の炭素原子に対してのみ成功している。

修飾方法は次の3つに大別できる。

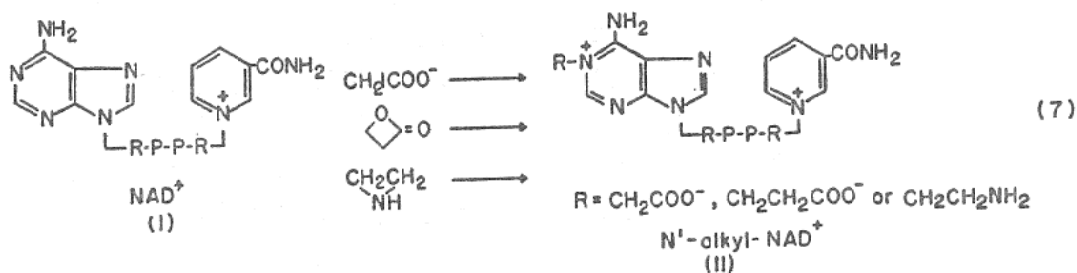
1) アデニン環の N¹ 位をアルキル化したのち、Dimroth 転移反応を用いて N⁶ に移転させる方法

2) アデニン環の N⁶ を直接アシル化する方法

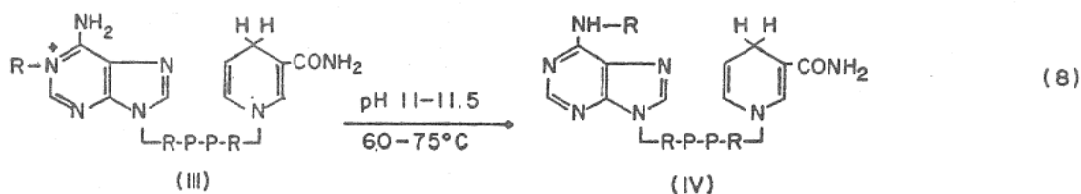
3) アデニン環の N⁶ 位または8位を Cl, Br または SH 置換体を合成し適当な修飾基で再置換する方法である。

1)の方法が最も例が多く、この方法では i) NAD⁺ (I) にモノヨード酢酸³⁾⁴⁾、プロピオラクトン⁵⁾ やエポキシサイド⁶⁾ のようなアルキル化剤と反応させると反応式(7)にしたがって N¹-アルキル化 NAD⁺ (II) が生成する。(II)の化合物は補酵素活性をもっており酵素的に(例えばアルコール脱水素酵素とエタノール存在下で)還元して N¹-アルキル化-NADH (III) にすることも可能である³⁾が Na₂S₂O₄ で還元して III にすることもできる⁴⁻⁶⁾。iii) III をアルカリ性 (pH 11~11.5) で 60~70°C に加温すると反応式(8)にしたがって N¹ のアルキル基が N⁶ に転移する。iv) 得られた N⁶-アルキル化 NADH (IV) を酵素反応により再酸化して NAD⁺ 型に変換する。

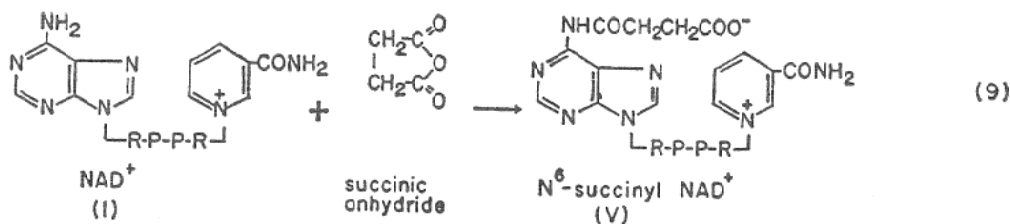
2)の方法は NAD⁺³⁾ または ATP⁷⁾ に適用さ



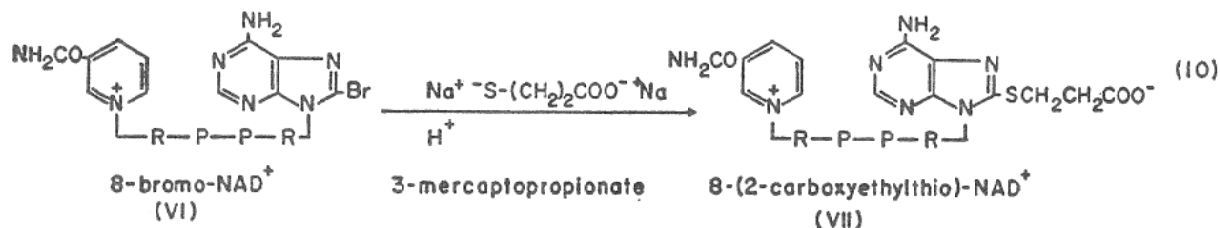
反応式 (7)



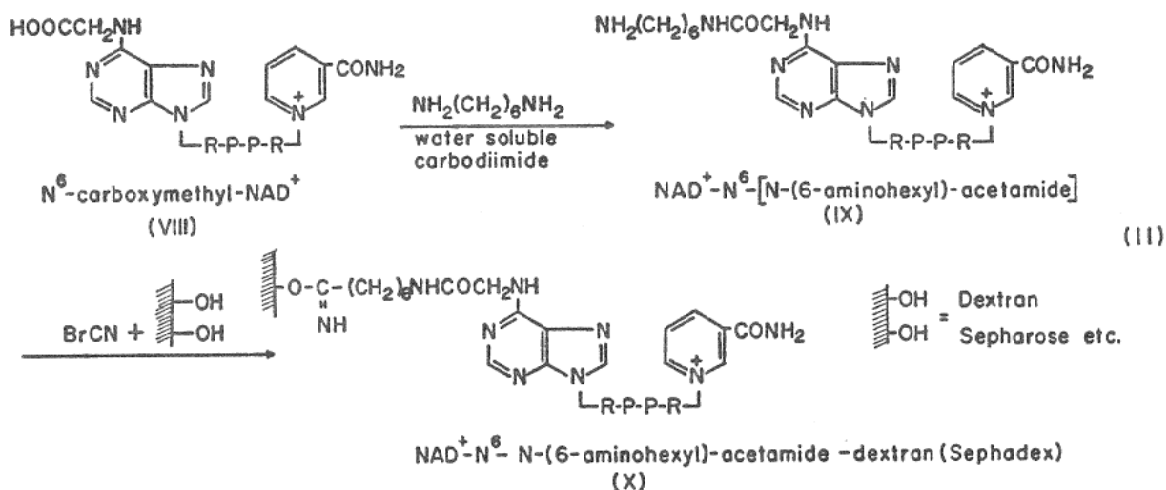
反応式 (8)



反応式 (9)



反応式 (10)



反応式 (11)

れた例がある。NAD⁺ を dimethylsulfoxide 中で無水とはく酸と室温で反応させる。反応式 (9) に示すように NAD⁺ の アデニン環の N⁶ 位が直接アシル化されて N⁶-アシル化 NAD⁺ (V) が生成する。生成した N⁶-アシル化 NAD⁺ がアルカリ側において不安定という説と安定という説がある。もし安定ならば合成法として最上であろう。

3) NAD⁺ のアデニン環の 8 位のハロゲンまたは SH 置換体から出発した合成例はそれ程多くはない。8-ブロム NAD⁺ (VI) を dimethylsulfoxide 中で 3-mercaptopropionate と窒素気流中で16時間反応させて 8-(2-carboxyethylthio)-NAD⁺ (VII) が生成する⁸⁾。(反応式 (10)). VII の NAD⁺ 誘導体は天然の NAD⁺ に

対して50%の補酵素活性をもつが、水溶性デキストランに結合させると乳酸脱水素酵素に対する補酵素活性は極端に低下するが、アルコール脱水素酵素に対しては十分に活性をもっている。

以上のようにして N⁶ または 8 位を修飾した NAD⁺ は スペースを介して水溶性高分子と結合させればよい。担体と NAD⁺ との間隔はメチレンで 6~8 が最適とされているが、修飾に用いた残基が充分大きいときはスペーサーを特に導入しない例もある。また修飾基の末端にあらかじめビニール基を導入しておき、ビニールモノマーと共重合させて水溶性高分子化する例もある。以下いくつかの例について述べるが如何ようにも変化させられる。

(11)式に示したのは Mosbach らが行った例である。N⁶-carboxymethyl-NAD⁺ (VIII) にヘキサメチレンジアミンをスパーサーとして用い水溶性の carbodiimide を触媒として結合させ NAD⁺-N⁶-[N-(aminohexyl)-acetamide] (IX) を作り、このものを水溶性デキストランまたは Sephadex と BrCN 法で結合させて NAD⁺-N⁶-[N-(aminohexyl)-acetamide]-dextran (または sephadex) (X) を得ている。

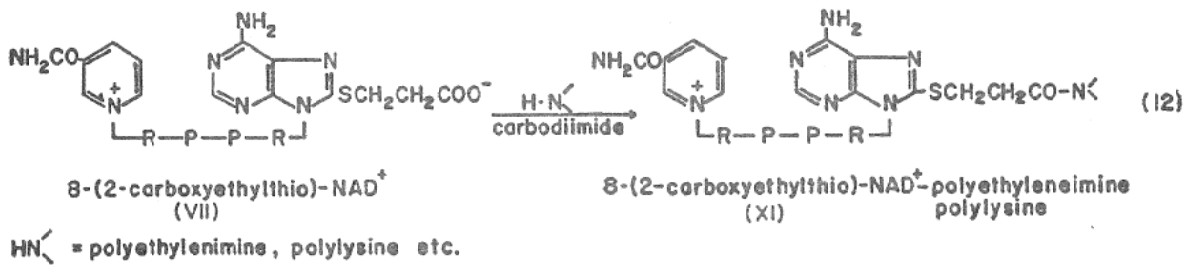
スパーサーを省略した例⁹⁾を反応式(12)に示している。8位の置換体 8-(2-carboxy-ethylthio)-NAD⁺ をそのまま carbodiimide 法によって polyethyleneimine または polylysine とペプチド結合させて NAD⁺ 高分子化程 (XI) を調製している。この反応は反応式(12)に示している。

著者ら⁵⁾⁹⁾は N⁶-(2-carboxyethyl)-NAD⁺ (XII) にビニール基をもっているスパーサー、ε-acryloyl-L-lysine methylester を carbodiimide 法によって結合させ NAD⁺-N⁶-[N-

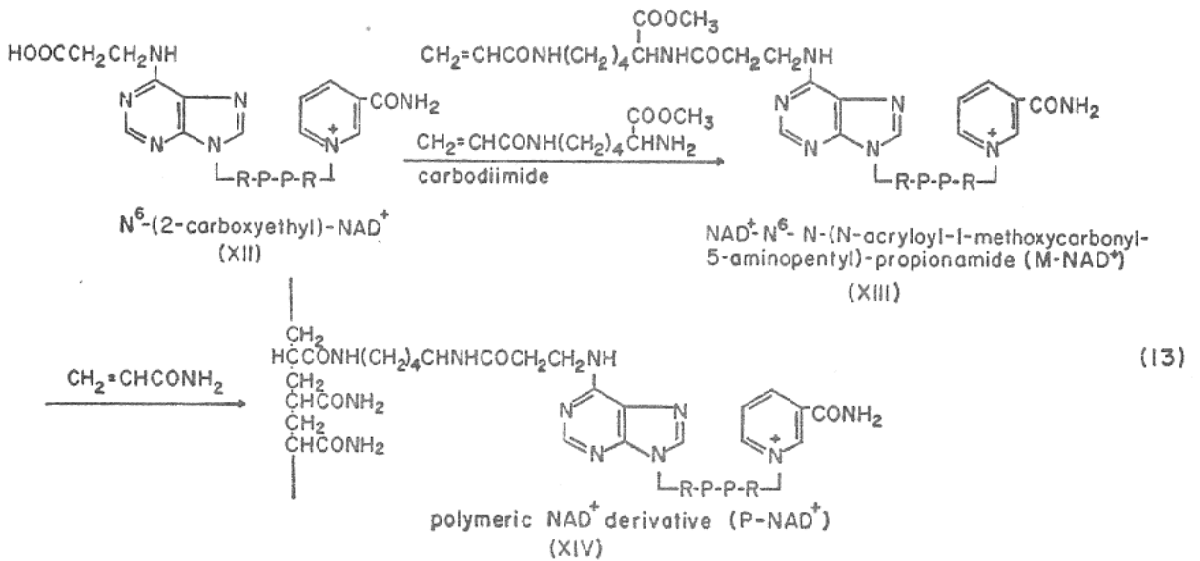
acryloyl-methoxycarbonyl-5-aminopentyl)-propionamide] (M-NAD⁺) (XIII) を合成しこれをアクリルアミドなどのビニールモノマーと共重合させて高分子化水溶性 NAD⁺ (P-NAD⁺) (XIV) を合成した。この誘導体の特長はビニールモノマーを変化させて色々な P-NAD⁺ を作りうること、および重合条件を変化させて種々の分子量のものが得られることである。換言すると高分子化 NAD⁺ の最適化ができることである。(反応式(13))。

修飾 NAD⁺ の補酵素活性

現在までに合成され補酵素活性があると認められたものをまとめたのが表1である。N⁶ または 8位を低分子残基で修飾したものは 50~100% の補酵素活性をもっている。しかし高分子化するときに活性は低下する。Sephadex や polylysine のような不溶性担体に固定化した NAD⁺ では活性が殆んどない。表1の結果は同一区劃を超えて比較はできない。測定条件



反応式 (12)



反応式 (13)

表1 種々の NAD⁺ 誘導体の補酵素活性

補 酵 素	酵 素						
		酵母アルコール脱水素酵素	馬肝臓アルコール脱水素酵素	家畜筋肉および牛心筋乳酸脱水素酵素	B. subtilis アラニン脱水素酵素	豚心筋りんご酸脱水素酵素	家兎筋肉グリセロールアセトアルデヒド-3-りんご酸脱水素酵素
M-NAD ⁺ (XII)		86	71	81		76	32
P-NAD ⁺ (XIV)		19	18	0		33	6
M-NADH		75	66	88		82	
P-NADH		31	28	2		60	
N ⁶ -2-Aminoethyl-NAD ⁺			55	65		75	
N ⁶ -(6-Aminoethyl)-Carbamoyl-NAD ⁺ (K)		61	100	50	75		
" -dextran (X)		16					
" -Sephadex (X)		0.7					
8-(α-Carboxylethylthio)-NAD ⁺ (VII)		41		58			
" -polyethyleneimine (XI)		47		3			
" -polylyrine (XI)		5		6			
Succinyl-NAD ⁺ (V)		78					
" -polyethyleneimine		97					
" -formylpolyethyleneimine		110					
N ⁶ -[4-(3-hydroxybutyl)]-NAD ⁺		65		83	32		
" -polyethyleneimine		6		60	2		
" -polylyrine		7		25	2		

が異っており V_m 値 K_m 値で比較しないと結論は下せない。しかし polyethyleneimine を担体にしたものは割合に活性が高いと云えようである。この例において polyethyleneimine は分子量3万~5万のものを用いている。

以上の例に見られるように NAD⁺ は高い補酵素活性をもつたまま高分子化できバイオレクターへの応用が可能である。

高分子化 NAD⁺ を用いた連続反応

前述のように高分子化 NAD⁺ を用いれば(3)

式に従って連続反応が可能である。これがいわゆるバイオレクターの例であるが、脱水素酵素の反応は可逆的であり平衡点をできるだけ生産物側にずらせる必要がある。バイオレクターが実験されたいくつかの例を図2に示してある。(1)と(2)は Davis¹⁰⁾らの系でアラニンの生成を試みたもので(1)の反応ではピルビン酸からアラニン生成の反応をガラクトース脱水素酵素の反応と共役させた例であり、(2)の反応では乳酸脱水素酵素 (LDH) の反応が NADH の酸化反応とピルビン酸の供給反応とを兼ねてい

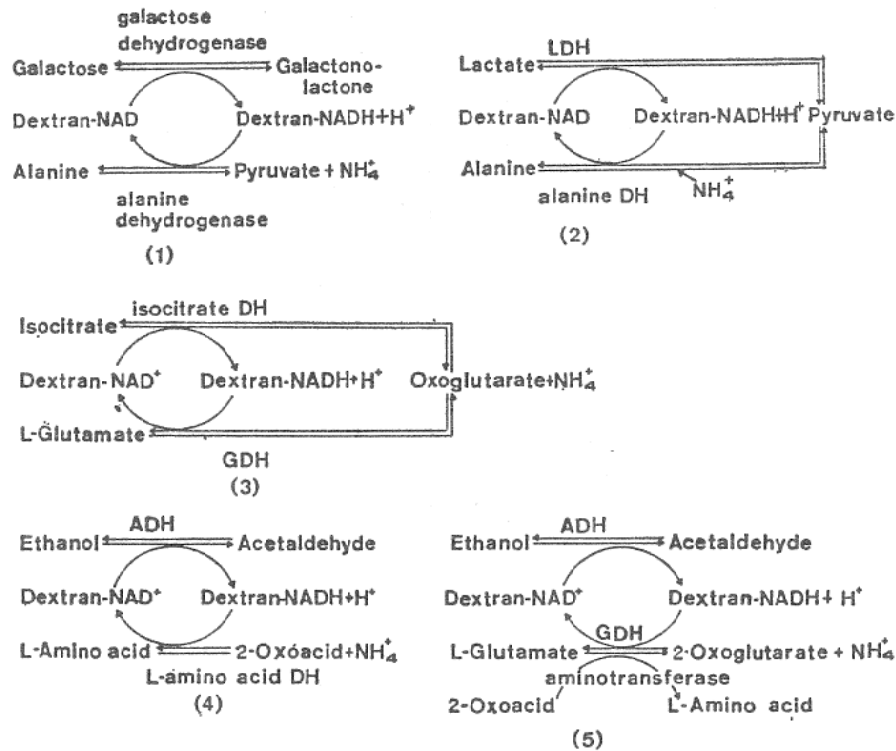


図2 高分子化 NAD⁺ を用いた連続反応バイオリアクターの基本設計

DH：脱水素酵素，LDH：乳酸脱水素酵素
ADH：アルコール脱水素酵素，GDH：グルタミン酸脱水素酵素

表2 高分子化 NAD⁺ を用いたアミノ酸生産連続反応の結果，バイオリアクターの設計
図2に示している。

アミノ酸	反応系	α-ケト酸 に対する 収率	補酵素の サイクル 数(毎時)
L-グルタミン酸	3	28%	12
L-グルタミン酸	4	65	54
L-アラニン	2	12	44
L-アラニン	4	60	110
L-アラニン	5	11	6
L-セリン	4	55	64
L-パリン	4	2	—
L-アスパラギン酸	5	60	60

る。反応の平衡を生産物側に傾けるのは NH₄⁺ 濃度で調節できる。反応槽は実験室規模でアミコン 8MC の超ろ過器に PM 10 の限外ろ過膜を装着している。(1)の反応は 1.5 mM のピルビン酸を供給しその30%をアラニンとして回収し反応は 6.5時間以上定速で進行している。(2)の反応では連続反応開始時に60~70%の対乳酸収率でアラニンが生産されたが 5.5時間後には収率20%まで低下している。このデータから計算すると NAD⁺ ⇌ NADH の turnover

数は(1)の場合が毎時14回，(2)の場合で毎時33回という数字が得られる。

図2の(2)~(5)の系を使って連続反応した結果を表2に示している。いずれの系も可能であり，収率も65%までの成績を得ている。

まとめ

以上の結果からも判るように高分子化NAD⁺ を用いてバイオリアクターを作動させることは全く可能である。しかしこれを生産手段として今直ちに実用化するのは無理である。現在では上の例でもわかるように，非常に低い基質濃度を用いて収率が65%以下である。生産ならば90%以上の収率でかつ高濃度で仕込む必要がある。バイオリアクターが生産手段となるためにはリアクターの活性の半減期が3ヶ月以上と云うのが現在の固定化酵素の常識となっている。しかし現在のバイオリアクターの寿命は数時間である。したがってバイオリアクターを実用化するまでには数多くの試行錯誤と年月が必要であろうが，この系には公害を伴わない事，エネルギー不要であること，装置が動きだせばただ

原料を供給するだけで生産物が取出せるなどの利点もある。また単位リアクターを組合せて生体を行う反応すべてを装置化するのも夢ではない。

引用文献

- 1) Adams, M. J., Buehner, M., Chandraker, K., Ford, G. C., Hockert, M. L., Liljas, A., Rorsmann, M. G., Smiley, I. E., Allisou, W. S., Everse, J., Kaplan, N. O., Taylor, S. S. : Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A. 70, 1968 (1973).
- 2) Larsson, P. O., Mosbach, K. : Biotechnol. Bioeng., 13, 393 (1971).
- 3) Lowe, C. R., Mosbach, K. : Eur. J. Biochem., 49, 511 (1974).
- 4) Lindberg, M., Mosbach, K. : Eur. J. Biochem., 53, 481 (1975).
- 5) Muramatsu, M., Urabe, I., Yamada, Y., Okada, H. : Eur. J. Biochem., 80, 111 (1977).
- 6) Zappelli, P., Rossodivita, A., Re, L. : Eur. J. Biochem., 54, 475 (1975).
- 7) Yamazaki, Y., Maeda, H., Suzuki, H. : Eur. J. Biochem., 77, 511 (1977).
- 8) Zappelli, P., Possodivita, A., Prosperi, G., Rappa, R., Re, L. : Eur. J. Biochem., 62, 211 (1976).
- 9) 岡田：醸酵工学, 56, 441 (1978).
- 10) Davis, P., Mosbach, K. : Biochim. Biophys. Acta, 370, 329 (1974).



限りある資源を大切に……
の姿勢を守るDNT

現在は、“鉄の文明”と評され、今日の世界から鉄を無くしたら、恐らく一切の文化は終息するだろうといわれています。
DNTは、創立の礎となった重防食塗料「ズポイド」を通じて既に半世紀近く私たちの大切な鉄を守りつづけてきました。
そして、これからもDNTはズポイドを生みだした重防食技術をベースに、独自の技術開発を進め、さらに、海外の優れた技術と協力しあって、より優秀な重防食システムとして結合させ、限りある資源を守りつづけていきます。

●創造と調和をめざす●

DNT
大日本塗料

●大阪市此花区西九条5-1-124
〒354 ☎(06)461-5371(大代)

●東京都千代田区丸の内3-3-1
〒100 ☎(03)216-1861(大代)