

## 固定化NAD(P)H酸化酵素を用いるFIAシステム

山梨大学工学部 木羽 信敏

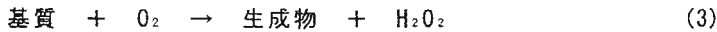
NAD(P)<sup>+</sup>を受容体とする脱水素酵素は、(1)式のように、対応する基質を生成物に酸化するとともにNAD(P)<sup>+</sup>をNAD(P)Hに還元する反応を触媒する。



生成したNAD(P)H量を測定することで、基質を定量できる。NAD(P)Hは吸光度法、蛍光光度法で直接検出されている。Murachi等は固定化NADH酸化酵素を用い、NADHから過酸化水素を生成させ、これを化学発光法で検出する高感度FIA法を提案した<sup>1)</sup>。NAD(P)H酸化酵素は、下式のように、NAD(P)Hと溶存酸素とからNAD(P)<sup>+</sup>と過酸化水素を生成する反応を触媒する。



脱水素酵素とNAD(P)H酸化酵素とを共存させると、脱水素酵素の基質が溶存酸素と反応し、対応する生成物と過酸化水素を生成する反応となる(3)式)。



これにより、脱水素酵素の基質の定量に、酵素反応で消費した酸素量を酸素電極で測定するか、生成した過酸化水素を検出するかいずれかの方法が用いられるようになった。

Ukeda等は、脱水素酵素とNADH酸化酵素とを同時固定化したリアクターと酸素電極を組み込んだ簡単な一流路FIAシステムを用いて、エタノールとグリセリンを定量した<sup>2, 3)</sup>。

生体試料中の基質を、ルミノール/Fe<sup>3+</sup>化学発光法で高感度検出する方法が提案された。血清中の3-ヒドロキシ酪酸は、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素/NADH酸化酵素リアクターと化学発光検出器を用いるFIAシステムを用いて、血清1μlを直接注入することにより定量された<sup>4)</sup>。定量下限は1μMであった。血漿中の3-ヒドロキシ酪酸とグルコースは、3-ヒドロキシ酪酸脱水素酵素/NADH酸化酵素リアクターとグルコース脱水素酵素/NADH酸化酵素リアクターを並列に配置した二流路分割-再合流流路FIAシステムで、同時定量された<sup>5)</sup>。ロイシン脱水素酵素/NADH酸化酵素リアクターが血清中の分岐鎖アミノ酸の定量に適用された<sup>6)</sup>。Yao等は、固定化グルコース-6-リン酸脱水素酵素/NADPH酸化酵素(ジアホラーゼ)リアクター中での基質リサイクリング反応を利用して、6fmolのNADP<sup>+</sup>/NADPHを定量した<sup>7)</sup>。これらの方法では、酸化酵素の場合と同様に、生体試料中に存在する還元性物質(アスコルビン酸、尿酸、グルタチオンなど)の妨害を受ける。今後、固定化NAD(P)H酸化酵素を用いる高感度FIAシステムは、HPLCのポストカラムリアクターとして、胆汁酸分析、アミノ酸分析、糖アルコール分析などへの応用が期待される。

### 文献

- 1) T. Murachi, M. Totani, M. Ikemoto, M. Tabata, *J. Biotechnol.*, 14, 33(1990).
- 2) H. Ukeda, Y. Fujita, M. Sawamura, H. Kusunose, Y. Tazuke, *Anal. Sci.*, 9, 779(1993).
- 3) H. Ukeda, Y. Fujita, M. Sawamura, H. Kusunose, *Anal. Sci.*, 10, 445(1994).
- 4) M. Tabata, M. Totani, *Anal. Biochem.*, 229, 133(1995).
- 5) N. Kiba, H. Koemado, M. Furusawa, *Anal. Sci.*, 11, 605(1995).
- 6) N. Kiba, A. Kato, M. Furusawa, *Anal. Chim. Acta*, 311, 71(1995).
- 7) T. Yao, H. Ogawa, T. Nakahara, *Talanta*, 42, 1297(1995).