

電子伝達蛋白質単分子層をインターフェースとする高速電子移動過程の研究

Study on electron-transfer protein monolayer on an electrode surface as an electron-transfer interface

代表研究者 横浜国立大学工学部物質工学科助手 相樂 隆正
Res. Assoc., Dept. of Phys. Chem. Yokohama National Univ.
Takamasa SAGARA

The factors governing the electron-transfer process of monolayer-adsorbed electron-transfer proteins on the electrode surface were studied at a molecular level using potential-modulated UV-vis reflectance spectroscopy (ER). It was found that cytochrome *c* molecules are oriented on 4-pyridyldisulfide-modified gold electrode so that the heme planes are perpendicular to the electrode surface. Cytochrome *c* monolayer on the electrode surface did not accelerate the electrode reaction of the redox species in the solution phase, probably due to the restriction of the rotation of cytochrome *c* molecule immobilized on the electrode surface. Thiol molecules possessing a carboxyl terminal group showed a function to regulate the redox potentials of cytochrome *c*₃, a tetra-heme protein. That is, such a thiol molecule acts as not only an "electron-transfer promoter" but also a "redox potential controller". These findings would open the next door for the design of functional bioelectronic devices.

研究目的

生体内のエネルギー変換系において可溶性チトクロムは高効率な電子シャトルとして機能している。チトクロムは生体分子を用いたバイオ素子においても電極端子と生体分子との間の電子伝達インターフェースとしての機能を担うことができるものと期待される。電極表面上にチトクロムの単分子層を構築し、電極電位によって電子移動の方向と速度とを制御しながら、電子移動の相手（電子ドナーまたはアクセプタ）に特異的で、かつ高速（高効率）な電子移動を行わせることが本研究のめざす目標である。しかし、実際に裸の電極（金属）上で、天然の酸化還元電位でかつ可逆に電子授受反応するチトクロム（例えばチトクロム *c*₃）は希であり、電極表面とチトクロム分子との間の電子移動コミュニケーションを円滑にするためには化学修飾を施した電極上への単分子層構築が必要なことがわかっている。そこで、チトクロムと電極表面修飾剤との相互作用を明らかにし、

どのような因子（チトクロムの分子配向、電極表面修飾剤との相互作用によるチトクロムの構造変化など）がチトクロム単分子層の電子授受反応の特性を支配するのかを知ることが本研究の重要な基礎となる。

本助成金に基づく研究では、C型チトクロム（馬心筋チトクロム *c* と硫酸還元菌チトクロム *c*₃）の単分子層を種々な方法で電極上に構築し、主に電位変調-紫外・可視反射分光法を用いて電子移動過程を解析した。

研究経過

まず、本助成金により、当研究室で数年前に自作し従来より用いていた電位変調-紫外・可視反射分光法（ER法）のための測定装置を一部改良し、感度を向上させるとともに偏光ER測定を可能にした。以降、主に、以下の(1)~(5)に関して詳細に測定・検討した。(1) 4-ピリジル誘導体で修飾した金電極上でのチトクロム (cyt. *c*) の構造と電子授受反応。(2) 修飾剤吸着層の上に固定化

した cyt. c 分子配向 (偏光 ER 測定)。(3) cyt. c の ER 応答をヘム単体 (ヘミン) のそれと比較。(4) 溶液中の酸化還元種と電極間の cyt. c 単分子層を介した電子移動。(5) チオール化合物で修飾した電極上でのチトクロム c_3 (cyt. c_3) の電極反応。

研究成果

(1) 種々の 4-ピリジル誘導体で被覆した金電極上に単分子層吸着した cyt. c は native な酸化還元電位で電子授受反応する。しかし、これまでの電気化学的測定・結合定数測定などから、表面修飾物質にはそれぞれ個性があり、固定化された cyt. c の安定性や単分子層の構造が修飾剤によって異なることが示唆されていた。本研究で ER 法によって検討した結果、種々の 4-ピリジル誘導体

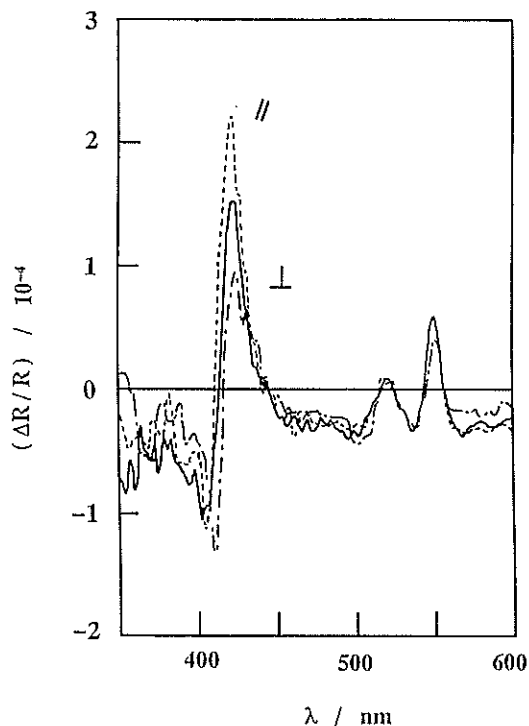


図 1. 4-PyS で修飾した金電極上に固定化したチトクロム c の偏光 ER スペクトル。測定電位: 0.04V (Ag/AgCl sat'd KCl), 電位変調振幅: 50 mV, 電位変調周波数: 14.2 Hz, 溶液: 30 mM リン酸緩衝溶液 (pH 7.0), 入射角: 45°, 実線: 偏光を解消した光を入射, 破線: 入射面に対して平行偏光を入射, 一点鎖線: 入射面に対して垂直偏光を入射。

で修飾された電極上での cyt. c の分子構造と電子移動反応速度はそれぞれに異なっていることが分光学的にも初めて明らかになった。例えば, cyt. c 単分子層を極めて安定に固定化できる 4-ピリジルジスルフィド (4-PyS) 修飾電極上では cyt. c 分子の ER 法で観た構造は native な cyt. c と酷似しているのに対し, 4-メルカプトピリジン修飾電極上ではわずかながら構造変化を起こしている。なお, この両者の差は, 従来の界面モデルに疑問を提示するものである。

(2) 4-PyS で修飾した金電極上に固定化した cyt. c の分子配向に関し, ① cyt. c 分子内で, 活性中心であるヘムは位置的に片寄って存在する, ② 溶液中での cyt. c 一分子当たりの 4-PyS の結合サイト数はわずかに一つである, ③ 4-PyS 修飾層上に単分子層をなして固定化された cyt. c のほとんどが反応に関与する, などのことから, cyt. c はヘムのあるサイトを電極に向けて配向している, というモデルを考えた。すると, ヘムは電極に垂直な配置をとることになる。このことを確かめるため, 偏光 ER 測定を行なった。

図 1 に 4-PyS 修飾層上に固定化した cyt. c の偏光 ER スペクトルを示す。平行偏光の ER 応答強度は垂直偏光の約 2 倍になった。また, 入射角

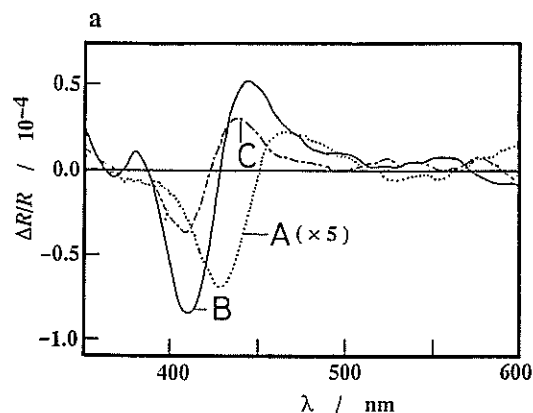


図 2. ヘミンの ER スペクトル (パイロリティックグラファイト上に吸着させ, 偏光を用いず測定した。) 電位変調振幅: 50 mV, 電位変調周波数: 14.2 Hz, A: ヘミンの酸化還元電位 (-0.30V) における ER スペクトル, B: 0.50V (二重層領域) における ER スペクトル, C: 0.20V (二重層領域) における ER スペクトル。

を大きくするほど平行偏光/垂直偏光の ER 応答強度の比は大きくなった。cyt. c のヘムの遷移双極子モーメントはヘム面内に分極している。したがって、これらの結果は、cyt. c 分子が電極表面に対してヘムを垂直にするように高度に配向していることを示している。4-PyS 修飾層は、単に cyt. c の構造変化を抑えて native な構造を保持させるだけでなく、cyt. c を配向させる作用を持つことが分光電気化学的に初めて確かめられた。

(3) 図 1 が例示するように、一般に C 型チトクロムの ER スペクトルは、還元体と酸化体との差吸収スペクトルに対応する。一方、色素などの低分子の ER スペクトルは差吸収スペクトルとは大きく異なる。そこで、cyt. c の ER スペクトルと、ヘム単体であるヘミンの ER スペクトルとを比較した (図 2)。ヘミンの酸化還元電位での ER スペクトルは差吸収スペクトルを大きく長波長方向にシフトさせた形である。ヘミンは、チトクロムとは異なり、電気二重層電位領域でシュタルク効果による ER 応答を示した。すなわち、ヘミンの酸化体のソーレ帯の吸収スペクトルを微分した形状の ER スペクトルが得られた (図 2: B, C)。以上のことから、ヘミンは電極表面電場の影響を強く受けて電子構造が変化しうのに対し、ペプチド鎖に fold されている cyt. c 分子中のヘムは、たとえヘムが電極に近接するように配向していてもヘムの電子状態そのものに対する電極表面電場の影響はごく小さいことが確認できた。

(4) 4-PyS を用いて固定化した cyt. c 単分子層を介した溶液中の酸化還元種 (フェリシアン、ヘキサアンミンルテニウムなど) の電極反応をサイクリックボルタンメトリーにより測定した結果、ピーク電流は cyt. c 単分子層がないときよりも小さく、また、アノードピークとカソードピークとの電位差は 100 mV を大きく超えた。この結果は、cyt. c 単分子層には溶液中の酸化還元種の反応を加速する作用はなく、逆に阻害することを示している。これは、(2) で述べたようにヘムが溶液側に背を向けるように配向していること、また、cyt. c 分子の回転運動が抑制されていることによると考えた。

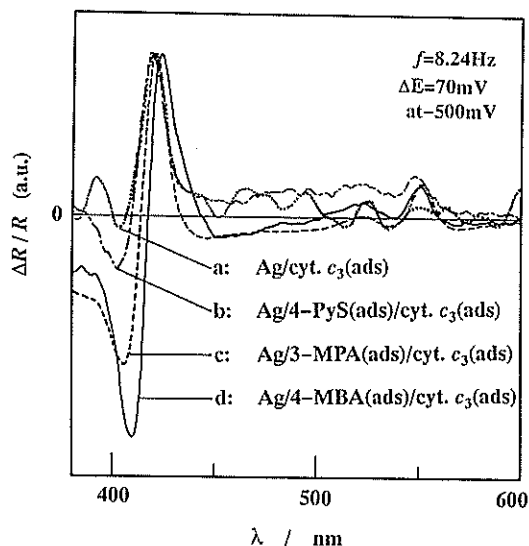
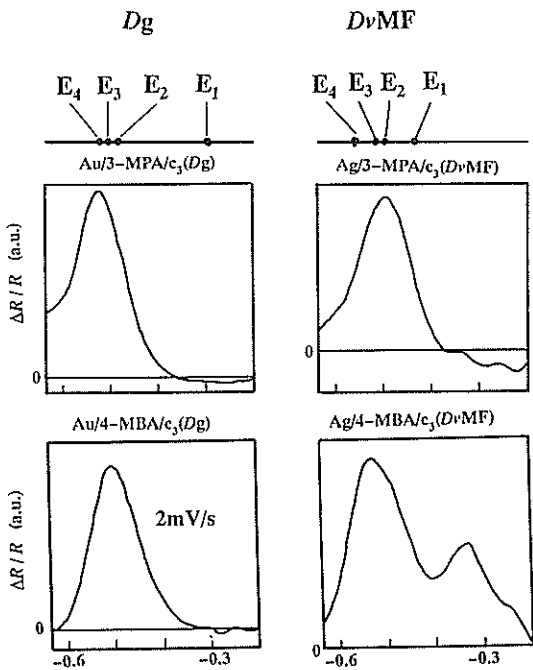


図 3. 裸の銀電極および種々の修飾銀電極上のギガス株チトクロム c_3 の ER スペクトル。いずれのスペクトルもポジティブピークで規格化してある。3-MPA: 3-mercaptopropionic acid, 4-MBA: 4-mercaptopbenzoic acid.

(5) cyt. c_3 は裸の金属電極上に直接吸着した状態で、native な電位で可逆的に反応する。したがって、「構造変化を抑えて native な構造を保持させる」目的で表面修飾剤を用いる意味はない。しかし、末端にカルボキシル基をもつチオール分子で修飾した電極上に固定化した cyt. c_3 の構造と酸化還元電位とが特異的に変化する現象が初めて見出された。

図 3 に、種々の状態で銀電極上に固定化した cyt. c_3 の ER スペクトルを示す。裸の銀電極上に直接吸着した cyt. c_3 の ER スペクトル (A) は native な cyt. c_3 の差吸収スペクトルに酷似している。一方、(B)~(D) の ER スペクトルから、表面修飾層上に固定化した cyt. c_3 のヘムまたはヘム近傍の構造は、表面修飾剤との相互作用により特異的に変化していることがわかる。

図 4 に、ER ボルタモグラムを示す。上段に示した溶液中での cyt. c_3 の巨視的酸化還元電位と比較すると、ギガス株 cyt. c_3 の場合、 E_1 に対応する電位で酸化還元が起こっておらず、 -0.53 V にのみピークが見られる。一方、宮崎株 cyt. c_3 の場合、3-メルカプトプロピオン酸修飾銀電極上で



E vs $E_{Ag/AgCl} / V$

図4. 4-メルカプトベンゾイック酸(4-MBA)または3-メルカプトプロピオン酸(3-MPA)で修飾した電極上でのチトクロム c_3 のER ボルタモグラム波形と水溶液中のチトクロム c_3 の巨視的酸化還元電位(上の数直線上に示した)との対比. Dg: ギガス株, DvMF: 宮崎株. 波長: 420 nm.

は溶液中での巨視的酸化還元電位に対応するERボルタモグラムが得られたのに対し, 4-メルカプトベンジル酸修飾銀電極上では, 一つの巨視的酸化還元電位が大きく貴にシフトしたような波形となっている。このように, 官能基がカルボキシル基であるこの二つの表面修飾剤には, cyt. c_3 の酸化還元電位を特異的に変化させる作用があることがわかった。この結果は, 表面修飾剤を選ぶことによって多核ヘム蛋白の個々のヘムの酸化還元電位を制御できる可能性を示しており, バイオ素子の開発に向けて興味深い。

(1)~(5)の他に, チトクロムをカルボジイミドを用いて炭素電極上に固定化すると蛋白がunfoldしてヘムが遊離する可能性があること, 種々の末端基をもつチオール分子が cyt. c に対し

てプロモーターとして働き得ることが明らかになった他, 色素共存下で吸着 cyt. c_3 の選択的ER測定に成功した。

今後の課題と発展

電子伝達蛋白質を用いた電子移動インターフェース設計の目的は, 「電子伝達蛋白質でなければ発現し得ないような機能(選択性, 反応効率, 特異性, 適合性, 協同的挙動など)をもった界面のデザイン」に他ならず, 「どのような状態(構造)にある電子伝達蛋白質がどのように挙動するか」を物理化学的観点から追究することが基礎として要請される。本助成金による研究では, これまで漠然としていた「電子移動を制御するファクタ」に関して幾つか新しい知見が得られただけでなく, 電極表面修飾剤として最近注目されているチオールで修飾した電極で, バイオ素子の新しい機能創生に発展する可能性のある興味ある現象も見いだされた。

今後, この新しい現象を更に検討することなどによる「電極と電子伝達蛋白質の相互作用」の本質的な理解, 「単分子層インターフェース」を構築する方法の理想化と並んで, さらに踏み込んで「生体分子間, 活性中心間の非平衡協同的コミュニケーション」に由来する特異的な機能の理解と応用を目標に据え, さらに研究を続けて行きたい。

発表論文リスト(本助成金によるもの)

[解説]

- 1) 相樂隆正: 電極表面の紫外・可視反射分光法, 表面技術 43(5), pp. 440-445 (1992).

[論文]

- 1) T. Sagara, S. Takagi and K. Niki: "Electroreflectance study of hemin adsorbed on a pyrolytic graphite electrode surface and its coadsorption with methylene blue", *J. Electroanal. Chem.* in press.
- 2) T. Sagara, H.-X. Wang, T. Kikuma and K. Niki: "Phaseshifting technique in use of electroreflectance spectroscopy - Separative observation of simultaneously-occurring two different electrode reactions", manuscript in preparation.
- 3) T. Sagara, H. Murakami and K. Niki: Orientation of cytochrome c on 4-pyridyl disulfide-

- modified gold electrode - Electroreflectance Study", manuscript in preparation.
- 4) T. Sagara, T. Kikuma and K. Niki: "The roles played by thiol molecules with carboxyl ter-

minal groups as surface modifiers in the electrode reaction of cytochrome c_3 ", manuscript in preparation.