

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02664

研究課題名(和文) 生体模倣電極触媒への展開を指向した金属酵素修飾電極におけるオペランド振動分光計測

研究課題名(英文) Operando vibrational spectroscopic measurements at metalloenzyme-modified electrodes toward developments of bio-inspired electrocatalysts

研究代表者

八木 一三 (Yagi, Ichizo)

北海道大学・地球環境科学研究所・教授

研究者番号：40292776

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：生体模倣電極触媒の構造設計のため、金属酵素を電極表面に構築した人工生体膜系に埋込み、その反応時の変化をオペランド表面増強赤外吸収(SEIRA)分光と組み合わせて追跡した。ターゲットとしては、脱窒系の一酸化窒素還元酵素(cNOR)と呼吸鎖において酸素分子を水に還元するチトクロムc酸化酵素(CcO)とし、各系で電気化学振動分光実験を実施した。

cNORでは、電極上の自己組織化膜(SAM)の末端官能基の比率や鎖長を制御することで、配向をそろえて固定することに成功し、さらに安定な脂質二重膜(BLM)を形成することで、反応時の一酸化窒素分子を観測できた。CcOでは、チトクロムcの吸着の影響等評価できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

金属酵素などの活性中心を模倣する生体模倣電極触媒は、従来、白金等の遷移金属ベースで発展してきた燃料電池電極触媒や硝酸還元触媒の限界を打ち破る触媒設計指針として研究されてきた。しかしながら、反応時の金属酵素の活性中心の反応中間体吸着構造やその周辺の配位構造の影響については未だ未解明であり、今回SEIRA活性基板上に構築した人工生体膜モデルで反応を駆動しながら、酵素の内部構造や反応中間体を捉える手法が確立できた。特にcNORは、地球温暖化ガスとして注目されている亜酸化窒素(N₂O)を生成する反応であり、その生成機構を解明し、抑制することにつながるため、社会的にも意義のある研究につながった。

研究成果の概要(英文)：To design bio-inspired electrocatalysts, metalloenzymes were buried in the artificial bilayer lipid membrane (BLM) systems constructed on electrode surfaces combined with surface enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy. The targets are the cytochrome c-dependent nitric oxide reductase (cNOR) in the denitrification system and cytochrome c oxidase (CcO) in the respiration chain. Enzyme reactions at the both systems were monitored by electrochemical vibrational spectroscopic measurements.

At the cNOR system, the orientation of the fixed enzymes were controlled by changing the ratio of end groups and chain lengths of the self-assembled monolayer on the electrode surfaces. Furthermore, the more stable BLMs were constructed, enabling us to observe the intermediate NO vibrational bands during the reaction. At the CcO system, the effect of the adsorption of cytochrome c on CcO was evaluated.

研究分野：界面物理化学、電極触媒

キーワード：金属酵素 脂質二重膜 一酸化窒素還元酵素 チトクロムc酸化酵素 電極触媒反応 表面増強赤外吸収分光法 人工生体膜モデル

1. 研究開始当初の背景

金属酵素は、人工的に合成した電極触媒や高活性な白金合金系電極触媒などよりも低い過電圧（低エネルギー損失）で逐次的な多電子移動反応を高効率に進行させることが可能である。例えば、ミトコンドリア細胞膜に埋め込まれている膜結合酵素、シトクロム c 酸化酵素 (CcO) は酸素分子 (O_2) を 4 電子・4 プロトン移動により水に還元する酸素還元反応 (ORR) を過電圧（エネルギー損失）ゼロで駆動できる。また、硝酸還元反応 (NRR) を駆動する脱窒菌内の膜結合酵素である一酸化窒素還元酵素 (cNOR) は、一酸化窒素 (NO) 2 分子を 2 電子移動により亜酸化窒素 (N_2O) に還元する。シンクロトロン軌道放射 (SOR) 光を用いた X 線結晶構造解析や X 線吸収分光法の進展により、これらの金属酵素の活性中心 (コア) の原子配置やその周辺構造については詳細な情報が得られている (図 1) が、実際の多電子多プロトン移動反応がどのような中間体を経由して、どのような経路で進行するかについては未だブラックボックスの部分がある。また、申請者らは最近、CcO のコア構造に類似した反応活性サイトを人工的に構築する、bio-inspired 触媒の開発を実施しているが、その ORR 活性は CcO のそれには及ばず、さらに CcO の ORR では観測されない過酸化水素 (H_2O_2) など活性酸素の生成が避けられない。つまり酵素のコア構造を模倣するだけでは、bio-inspired 触媒の反応活性と反応機構は、金属酵素とは異なるものになっているものと考えられる。金属酵素と bio-inspired 触媒との最も大きな違いは、コアを取り巻くアミノ酸鎖 (シェル) の存在とコア周辺の水和環境によるものである可能性が高い。特に、コア周辺のシェル内部は疎水的であるにもかかわらず、少量の水が保持されており、特殊な水和状態が形成されている可能性がある。実際、最近の ORR 電極触媒の研究では、白金系合金 (PGM) 触媒といえども、触媒活性サイト周辺に疎水性官能基やアルキルアミンを配置することで、ORR 過電圧 (エネルギー損失) の低減や H_2O_2 発生率の低下が報告されている。そこで、金属酵素が実際に反応を駆動している状態 (operando) で活性サイト周辺の原子配置やシェルの構造、水和状態を直接観察して、bio-inspired 電極触媒の活性サイト周辺にどのような微視的構造や環境を構築すれば、ORR 活性・NRR 活性の向上や望ましくない中間体の生成が避けられるか、本研究を通じて明らかにできると考えた。

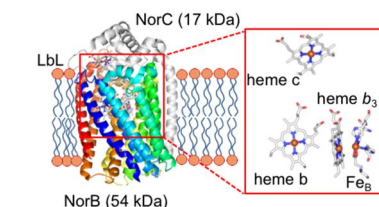


図 1 脂質二分子膜 (LbL) に埋め込まれた膜結合酵素 cNOR の模式図とその内部にある 4 つの Fe サイトを拡大した図。近接する heme b_3 と Fe_B の活性中心 (コア) と言われている。

2. 研究の目的

本研究では、金属酵素を電極表面に固定した試料電極を構築し、基質ガス (一酸化窒素: NO、酸素: O_2) 存在下、電位印加により反応を駆動し、反応が起こっている状況 (operando) でのコアとシェルの構造およびシェル内部の水和状態などを複数の振動分光法を駆使して評価し、反応における最適なコア構造とシェルの役割を解明する。この研究で得られるモデル生体膜電極における酵素反応に関する知見は、金属酵素研究自体に大きな影響を与えるとともに、我々が取り組んでいる bio-inspired 人工電極触媒の活性を飛躍的に向上させるための設計指針につなげる。

3. 研究の方法

振動分光法として利用可能な、3 つの振動分光法: 表面増強赤外吸収分光 (SEIRAS) 法、テラヘルツ表面増強共鳴ラマン散乱 (THz-SERRS) 分光法、界面振動和周波発生 (VSFG) 分光法、を利用する。カバーする振動数領域は、 $10 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$ であり、コア自体の構造 (コアの配位状態や吸着した基質・反応中間体・生成物: $150 \sim 1000 \text{ cm}^{-1}$) 以外に、シェルの水素結合状態 ($10 \sim 200 \text{ cm}^{-1}$) やシェル内の水和構造 (1600 cm^{-1} 近辺・ $3000 \sim 4000 \text{ cm}^{-1}$) など様々な分子振動に関する情報を、反応活性 / 不活性状態間の差スペクトルとして抽出する。また、最近では固定した酵素周辺に生体内環境と同じような脂質二分子膜 (BLM) を高密度に形成することで、SEIRAS での計測に寄与する空間内のバルク水を減らし、酵素内部の水の変化のみを抽出することも可能になってきた。本研究では、酵素が有する本来の活性を観測するべく、酵素を埋め込んだ BLM を電極表面に構築し、モデル生体膜電極反応場として電気化学分光計測をおこなった。

4. 研究成果

表面増強赤外吸収 (SEIRA) 分光法を用いて、電極表面に膜蛋白質である一酸化窒素還元酵素 (cNOR) の有無により、電極 / 溶液界面における脂質二重膜 (BLM) の形成過程の違いが生じることを明らかにすることができた。具体的には、SEIRA 活性な Au 薄膜を Si プリズム表面に構築し、さらにその表面にカルボン酸基末端およびヒドロキシ基末端を有する炭素鎖数 3 のアルキルチオールを混合して親水性表面を有する自己組織化単分子膜 (SAM) を構築した。まずは親水性 SAM 膜表面への BLM 構築過程を観測するため、赤外分光で測定しながら、界面活性剤

と混合した脂質分子 DMPC を添加し、一定時間が経過した後、界面活性剤を優先的に吸着するバイオビーズを添加した。バイオビーズを添加すると水の OH 伸縮領域の吸収が急激に減少し、一方で直鎖アルキル基の CH 伸縮領域のバンドが増大しながら低波数シフトすることを見出した。この OH 伸縮バンドの減衰面積強度と CH 伸縮のピーク波数を時間に対してプロットすると、2 つの変化が同期しており、界面活性剤が除去されると、界面の脂質分子が配列して BLM を形成し、それにより界面の水が失われ、緻密な BLM が形成されることが示唆された。CH バンドの波数は固体のアルキル鎖のそれと近い値にまで低下していた。ただし、膜蛋白質がない状態では、この変化には 2 時間以上の時間が必要だった。一方、カルボン酸基末端へのアミド結合形成に基づき、cNOR を固定した状態で同様の方法で BLM の構築を試みると、バイオビーズ添加以前に既に比較的密な BLM が形成されており、添加後、10 分以内に結晶状態に近い密な BLM が形成された。このことは膜蛋白質の存在が、BLM の形成を促進しているということであり、膜蛋白質と脂質分子との親和性を示す結果となった。

また、電極表面に NOR を固定する際、SAM のアルキル鎖長と末端官能基の比率を変化させ、cNOR の配向制御が可能であることを見出し、さらに cNOR 周辺に形成する脂質二重膜 (BLM) の密度も変化することを明らかにした。そして cNOR の吸着量が多く、その配向性が制御されている一方、BLM が疎にパックされた界面において、一酸化窒素 (NO) 還元反応の中間状態と考えられるヘム b_3 サイトに吸着した NO バンドを観測することができた。一方で、非ヘム Fe_B サイトに対する配位構造が異なる変異体をもちいた実験では、ヘム b_3 サイトに吸着した NO が観測されなかったことから、ヘム b_3 サイトへの NO 吸着には、非ヘム Fe_B サイトの関与が必要であることもわかった。つまり、現状中間体である吸着 NO は、ヘム b_3 サイトに強く吸着する一方、非ヘム Fe_B サイトにも緩く吸着した橋かけ構造をとる可能性が高いと考えられる。現在、 ^{15}NO を用いた実験により反応機構の確定を目指している。

一方、酸素還元酵素であるチトクロム c 酸化酵素 (CcO) の電極表面への固定と各種振動分光法による界面構造計測について継続して研究を進めた。CcO は分子サイズが大きいので、SEIRA 分光法による評価が可能かどうかどうか、懸念があったが、Au 膜上に形成した-COOH 及び-OH 末端 SAM 上への CcO 固定化過程におけるアミド I・アミド II バンドの増大を確認することができた。アミド I とアミド II バンドの比から α ヘリックスの配向が評価できるが、SAM 末端官能基の比率が COOH リッチ (COOH-SAM) でも OH リッチ (OH-SAM) でも、アミド I バンドが大きく成長し、CcO は α ヘリックスを表面法線方向と平行に配向していることがわかった。CcO は膜タンパク質であるため、周辺に脂質二重膜 (BLM) を形成した後、生体内での ORR を駆動するための電子源であるチトクロム c (Cyt c) を吸着させる過程を追跡したところ、COOH-SAM 上の CcO に対しては Cyt c 吸着に伴うアミド I・II バンドの増大が不可逆に観測された一方、OH-SAM 上の CcO ではアミド I・II バンドの微小な増大と洗浄による消失が観測された。以上の結果から Cyt c 結合サイトが、COOH-SAM 上に固定した CcO では溶液側に、OH-SAM 上に固定した CcO では電極側に配向していることが推定され、SAM 末端の電荷密度により CcO の配向が制御できることを見出した。CcO 固定後の各段階で CcO の ORR 活性を評価したところ、CcO 周辺に BLM を形成後にはいずれの SAM でも ORR 電流が増大したが、Cyt c 吸着後には COOH-SAM 電極でのみ ORR 活性がさらに向上した。BLM 形成と Cyt c の結合サイトへの吸着がいずれも ORR には有利であることがわかった。

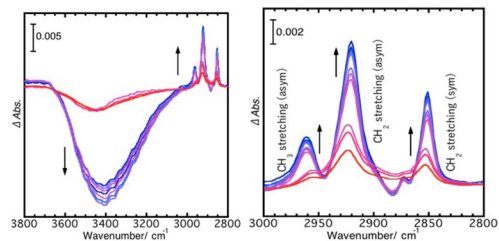


図 2. cNOR 固定電極における BLM 構築時の (右)OH 伸縮振動バンドおよび(右)CH 伸縮バンド領域の SEIRA スペクトル変化

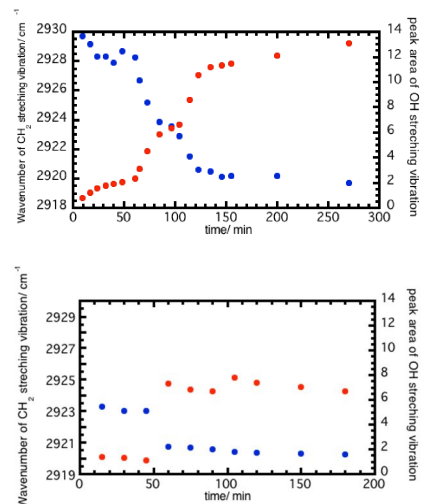


図 3. SAM 表面に(上)酵素がない時と(下)cNOR が固定されているときの()OH 伸縮バンドの減少積分値と()CH₂ 伸縮バンドのピーク波数変化

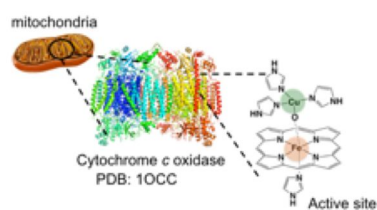


図 3 ミトコンドリアの細胞膜に結合している CcO とその活性中心の分子構造。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Masaru Kato*, Yukatsu Shichibu, Kazuya Ogura, Mitsuhiro Iwasaki, Mizuho Sugiuchi, Katsuaki Konishi, and Ichizo Yagi*	4. 巻 11
2. 論文標題 Terahertz Raman Spectroscopy of Ligand-Protected Au ₈ Clusters	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 7996-8001
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcclett.0c02227	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kato Masaru, Fujibayashi Natsuki, Abe Daiki, Matsubara Naohiro, Yasuda Satoshi, Yagi Ichizo	4. 巻 11
2. 論文標題 Impact of Heterometallic Cooperativity of Iron and Copper Active Sites on Electrocatalytic Oxygen Reduction Kinetics	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Catalysis	6. 最初と最後の頁 2356 ~ 2365
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscatal.0c04753	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaru Kato*, Yuya Masuda, Narumi Yoshida, Takehiko Tosh, Yoshitsugu Shiro, Ichizo Yagi*	4. 巻 373
2. 論文標題 Impact of membrane protein-lipid interactions on formation of bilayer lipid membranes on SAM-modified gold electrode	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 137888
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.electacta.2021.137888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Masaru Kato and Ichizo Yagi	4. 巻 18
2. 論文標題 Electrocatalytic Oxygen Reduction at Multinuclear Metal Active Sites Inspired by Metalloenzymes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 e-Journal of Surface Science and Nanotechnology	6. 最初と最後の頁 81-93
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1380/ejssnt.2020.81	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kato Masaru, Unuma Yuki, Okui Manabu, Qu Yunteng, Zheng Jinhang, Taguchi Satoshi, Kiguchi Fumiya, Torihata Mashu, Gao Yunzhi, Hoshi Nagahiro, Yagi Ichizo	4. 巻 398
2. 論文標題 Electrocatalytic activity and volatile product selectivity for nitrate reduction at tin-modified Pt(100), Pd(100) and Pd?Pt(100) single crystal electrodes in acidic media	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electrochimica Acta	6. 最初と最後の頁 139281 ~ 139281
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.electacta.2021.139281	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 加藤優、八木一三	4. 巻 90
2. 論文標題 白金系および非白金電極触媒におけるその場X線吸収分光計測	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Denki Kagaku	6. 最初と最後の頁 16 ~ 20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5796/denkikagaku.22-FE0005	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Ichizo YAGI, Yuya MASUDA, Narumi YOSHIDA, Shogo NAKAGAWA, Takehiko TOSHA, Masaru KATO
2. 発表標題 Electrochemical Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase Immobilized on Gold Electrodes
3. 学会等名 71st Annual Meeting of International Society of Electrochemistry (ISE) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 吉田生未, 鳴海旭, 増田侑也, 當舎武彦, 加藤優, 八木一三
2. 発表標題 SAM-Au 電極における金属酵素吸着過程と脂質膜構築のその場観察
3. 学会等名 2020年度日本表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部大輝, 藤林那月, 加藤優, 保田諭, 八木一三
2. 発表標題 金属微粒子を含まない(Cu,Fe)-Nドーブカーボン触媒の酸素還元活性
3. 学会等名 第61回電池討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kato Masaru, Masuda Yuya, Nakagawa Shogo, Tosha Takehiko, Yagi Ichizo
2. 発表標題 Mechanistic Insights into Enzymatic Nitric Oxide Reduction Revealed By Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy Absorption Spectroscopy
3. 学会等名 235th ECS Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato Masaru, Masuda Yuya, Nakagawa Shogo, Tosha Takehiko, Yagi Ichizo
2. 発表標題 Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase Immobilized on Gold Electrodes
3. 学会等名 ISABC15 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yagi Ichizo, Masuda Yuya, Nakagawa Shogo, Tosha Takehiko, Kato Masaru
2. 発表標題 Operando Monitoring of Nitric Oxide Reduction at Enzyme- Modified Electrode by ATR-SEIRA Spectroscopy
3. 学会等名 ICAVS 10 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 八木一三
2. 発表標題 種々の計測で解き明かす電極触媒活性の向上
3. 学会等名 電気化学会関西支部・東海支部合同シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kato Masaru, Fujibayashi Natsuki, Matsubara Naohiro, Muto Marika, Murotani Takeshi, Yagi Ichizo
2. 発表標題 NonPGM Electrocatalysts for Oxygen Reduction Reaction Inspired By Metalloenzyme Active Sites
3. 学会等名 236th ECS Meeting（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤林那月、松原直啓、加藤優、保田諭、八木一三
2. 発表標題 酸素還元活性に対するカーボンナノチューブへの銅-鉄共ドーピング効果
3. 学会等名 電気化学会第87回大会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 八木一三
2. 発表標題 金属酵素活性中心に倣った非白金系電極触媒の酸素還元能
3. 学会等名 2021年電気化学会秋季大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤優、藤林那月、阿部大輝、保田諭、八木一三
2. 発表標題 酸素還元反応に対する鉄と銅サイトの異種金属協働効果
3. 学会等名 第128回触媒討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐野綾哉、吉田生未、加藤優、八木一三
2. 発表標題 シトクロムc酸化酵素修飾電極における擬似生体膜の構築およびシトクロムc会合のその場観察
3. 学会等名 2021年表面真空学会学術講演会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 加藤優、八木一三 (監修) 城 宜嗣、青野 重利、齋藤 正男	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 472
3. 書名 ヘムタンパク質の科学	

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>生体分子固定電極におけるその場計測 https://iyagilab.jp/home-jp/portfolio/project-title-3 酵素模倣多電子移動電極触媒 https://iyagilab.jp/home-jp/portfolio/project-title 生体分子固定電極におけるその場計測 https://iyagilab.jp/home-jp/portfolio/project-title-3</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	加藤 優 (Kato Masaru)	北海道大学・大学院地球環境科学研究所・准教授 (10101)	
研究協力者	當舎 武彦 (Tosha Takehiko)	国立研究開発法人理化学研究所・放射光科学研究センター・専任研究員 (82401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関