

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20310065

研究課題名(和文) スラブ光導波路分光法を用いたタンパク質の電子移動反応のその場測定

研究課題名(英文) In situ observation of electron transfer reaction between proteins and electrodes from UV-visible slab optical waveguide absorption spectroscopy.

研究代表者

松田 直樹 (MATSUDA NAOKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生産計測技術研究センター・研究チーム長

研究者番号：10344219

研究成果の概要(和文)：時間分解 ITO-SOWG 分光法を開発し、ITO 電極上にチトクローム *c* を吸着させ、ITO 電極にパルスポテンシャルステップを印加し、酸化体と還元体を交互に生成させながら 2 ミリ秒ごとに吸収スペクトルの連続測定を行った。得られた吸収スペクトルでの時間依存吸収強度変化から時定数を求めたところ、チトクローム *c* と ITO 電極間の電子移動反応は 10 ミリ秒程度で終了しており、速度定数は $k=100[\text{s}^{-1}]$ と概算された。

研究成果の概要(英文)：Time-resolved electrochemical slab optical waveguide spectroscopy utilizing ITO electrode with 1 msec time resolution was developed. The absorption spectral change from cytochrome *c* adsorbed on ITO electrode due to pulse potential step between oxidized and reduced form was observed every 2 msec. The time constant of electron transfer (ET) reaction between cytochrome *c* and ITO electrode was estimated to be about 10 msec from the fitting of the time-resolved intensity change in SOWG absorption spectra. Finally as a result of this study, ET rate constant (k) was evaluated to be $100 [\text{s}^{-1}]$.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	8,600,000	2,580,000	11,180,000
2009 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
2010 年度	3,200,000	960,000	4,160,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：工業化学

キーワード：スラブ光導波路分光法、タンパク質、電子移動反応、固液界面、紫外可視吸収スペクトル、吸着過程、ITO 電極、速度論

1. 研究開始当初の背景

界面では対象となる物質が極微量であるため「そこで何が生じているか」をその場で測定することは非常に困難である。

「タンパク質の電気化学」は 30 年間以上にわたり世界中で盛んに研究されてきたがいまだに不明な点が多く、電極に固定化したチトクローム *c* (cytochrome *c*：以下

Cyt. *c* と略す) 等のタンパク質が電子移動反応を行わない理由として、①タンパク質の機能は高次構造と密接に関連しており、吸着に伴う構造変化で活性が失われた、②ヘムポケットに存在する反応中心が電子移動反応を行うため、Cyt. *c* がヘムポケットの開口部を電極に向くような配向が必要である、等の説明がなされていた。そ

のため電極表面を修飾し配向制御を行う、あるいは電解質溶液内にプロモーター等の触媒分子を共存させ電子移動反応を活性化する等の工夫が行われてきた。

一方、我々は世界に先駆けて紫外～可視領域 (230~900nm) の光を同時に透過することが可能なスラブ光導波路 (slab optical waveguide : 以下SOWGと略す) 分光法を開発し、固液界面に極微量だけ吸着している物質の吸収スペクトルをその場測定し、吸着種の同定やその吸着状態を明らかにしてきた。[文献 : K. Kato et al., *Chemistry Letters*, 1995, 437-438 (1995).]、更にSOWG上に数十 nm の厚さのインジウムスズ酸化物 (Indium-tin-oxide : 以下ITOと略す) の薄層電極を形成させ、電気化学的に制御可能 SOWG (ITO-SOWG) 分光法を開発し、電極上におけるタンパク質の電子移動反応を観察してきた。[文献 : N. Matsuda, et al., *Chemistry Letters*, 1998, 125-126 (1998).] その結果、電極上に吸着した Cyt. *c* は電気化学的に活性である事が明らかになり、Cyt. *c* の吸着力が通常の分子量が数百程度の物質に比べて強過ぎるため、電極上に吸着した Cyt. *c* がバルク溶液中に存在する Cyt. *c* の電子移動反応を疎害するため CV 測定で電流値が非常に小さく観察されているのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、固液界面に固定化したタンパク質の電気化学的活性を簡便に計測する手法を開発するとともに、界面に固定化したタンパク質を利用した新規なセンサー等のデバイス開発の指針を得ることである。このために、本研究において具体的には以下の目標を設定する。

- (1) ITO-SOWG 分光法の高感度化を達成し、単分子層の 1/10 の表面被覆率でも 350~800 nm の波長範囲で 1 ミリ秒程度の時間分解能の吸収スペクトル測定を行う。
- (2) ITO-SOWG 分光法を用いた時間分解吸収スペクトルの連続測定から、タンパク質の ITO 電極上での吸着過程における ΔG_0 を測定する。更に ITO 電極の電位を変化させて同様の測定を行いタンパク質の吸着反応のパラメータの電位依存性を検討する。特にゼロ電荷電位を挟んで ITO 電極表面の電位と電化密度の変化に対する吸着過程の変化を観察する。
- (3) 表面修飾法を用いた固液界面へのタンパク質の固定化を開発し、24 時間以上に渡り 90% 以上のタンパク質が活性な状態を達成する。
- (4) 固液界面に単分子層程度の量で吸着したタンパク質の吸着構造を原子間力顕微鏡等のプローブ顕微鏡で観察し、平均的に単分子

層吸着しているのか、あるいは局在しているのか検討する。

3. 研究の方法

本研究においては我々が開発した ITO-SOWG 分光法等の複数の手法を中心に用いて、タンパク質の吸着過程、及び吸着した後のタンパク質の電子移動反応をマクロスコピックとナノスケールの両方の視点からその場観察し、その構造と機能の関連性に関して詳細な検討を加え、そのデバイスとしての可能性を議論することを目的とする。

- (1) 時間分解吸収スペクトル測定からタンパク質の電極表面に関する吸着過程を観察し、コンフォメーション変化の有無や吸着量と電子移動反応の関連性を判断する。
- (2) 電極に印加した電位に対する吸収スペクトル変化からタンパク質の酸化状態と還元状態を区別し電子移動反応を観察する。
- (3) 電極電位をパルス状に変化させ、同時に 1 ミリ秒程度の時間分解能で吸収スペクトルを連続測定し電子移動反応の速度を観察する。

また、ITO-SOWG 分光法を補完する目的で高感度全反射赤外分光法・近接場赤外分光法、原子間力顕微鏡等を用いる。

4. 研究成果

平成 20 年度の主な研究成果は以下の通りである。ITO-SOWG 分光法の高感度化や最適化を達成し、単分子層の 1/10 の表面被覆率でも 350~800 nm の波長範囲で 1 ミリ秒以下程度の時間分解能の吸収スペクトル測定を行うことが可能な ITO-SOWG 分光装置を開発した。現在確認した限り、本装置では 0.6 ミリ秒の時間分解能で最大 1,000 枚の吸収スペクトルを測定することが可能であり、1 秒以内の吸着過程や電子移動反応の速度論的考察が可能となった。1 ミリ秒以下毎に SOWG セルに対する試料溶液の導入方法を検討し直すとともに、今後、ITO 電極の電位を変化させて同様の測定を行いタンパク質の吸着反応のパラメータの電位依存性を検討する予定である。また、タンパク質やアミノ酸の吸着特性を、基板の表面電荷により制御するために、電気化学セルを形成し、表面増強ラマン・近接場ラマン分光により検討した。その結果、ローダミン色素や有機単分子膜のほか各種アミノ酸を、ITO 系基板に強く吸着させ、その電位依存性を超高感度・超解像ラマン分光測定により明らかにした。

平成 21 年度は実際に ITO-SOWG 上にチトクローム *c* を吸着させ ITO 電極にパルスポテンシャルステップを印加し、酸化体と還元体を交互に生成させながら時

間分解 ITO-SOWG 分光装置で吸収スペクトルの連続測定を行った。1 ミリ秒以下の時間分解ではノイズに対する信号強度が小さくスペクトル変化が明瞭ではないため、2 ミリ秒ごとに吸収スペクトル測定を行った。その結果、チトクローム *c* と ITO 電極間の電子移動反応は 10 ミリ秒程度で終了しており、速度定数は $k=100[\text{s}^{-1}]$ と概算で得られた。これは従来から言われている、他の測定法で得られた結果と非常によく一致した。

平成 22 年度は ITO 電極上に吸着固定化したチトクローム *c* を用い、ITO 電極に対してチトクローム *c* の酸化体と還元対を生成する電位間でパルスポテンシャルステップを印加し、同時に SOWG 分光法でチトクローム *c* の吸収スペクトルの変化を 20 msec の時間分解能でその場観察した。その際、共存するリン酸緩衝液の濃度を減少させていくと、初めは殆ど変化がないが、500 倍程度に希釈しリン酸が $20 \mu\text{M}$ 程度の濃度にまで減少すると電子移動に要する時間が 500 msec 程度まで急に増加した。溶液の電気伝導度はイオン濃度に比例すると考えられるので、溶液物性は電極上に吸着したタンパク質の電子移動活性にはあまり影響しない可能性が示唆された。

また、共存する溶媒を純水に変えても ITO 電極とその上に吸着しているチトクローム *c* の間で電子移動反応が観察された。電子移動反応の自邸数は 4~5 秒程度であった。サイクリックボルタモグラム (CV) 等の電気化学的手法では溶液の電気伝導度が一定以上ないと測定出来ないため、検討が不可能である。SOWG 時間分解吸収分光法を用いたため、このような検討に成功した。

チトクローム *c* の吸収バンドのピーク位置変化を観察した。510~550 nm 付近に観察される Q バンドの酸化還元反応に伴う変化は掃引する電位範囲にほとんど影響を受けなかった。一方、410 nm 付近に観察されるソーレ帯は掃引する電位範囲によってピーク波長の変化する範囲が異なった。CV の結果からは電気化学的に完全に還元されていると考えられる電位に ITO 電極を設定しても、還元体のピーク波長である 416 nm までシフトしなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 14 件)

① Naoki Matsuda, Hiroataka Okabe, Masaki Fujii, Masayoshi Matsui, Yusuke Ayato, Akiko Takatsu, Kenji Kato, "In situ observation of reduction behavior of cytochrome *c* adsorbed on glass surface by slab optical waveguide

spectroscopy", *IEICE Trans. Electron.*, **E94-C**, 170-175 (2011).

② Masayuki Futamata, Yingying Yu, and Toru Yajima. "Elucidation of Electrostatic Interaction between Cationic Dyes and Ag Nanoparticles Generating Enormous SERS Enhancement in Solution", *J. Phys. Chem. C*, **115**, 5271-5279 (2011).

③ 松田直樹, "スラブ光導波路分光法を用いた固液界面におけるタンパク質の吸着過程及び機能のその場観察", *色材協会誌*, **84**, 18-23 (2011).

④ Yusuke Ayato, Naoki Matsuda, "A Novel Biofuel Cell Based on Direct Electron Transfer Utilizing Enzymatic Activity of Hemoglobin at Indium-Tin-Oxide Electrodes in Cathodic Process", *Chem. Lett.*, **38**, 504-505 (2009).

⑤ Masayuki Futamata, Yoshihiro Maruyama, "LSP spectral changes correlating with SERS activation and quenching for R6G on immobilized Ag nanoparticles", *Appl. Phys.*, **B93**, 117-130 (2008).

⑥ Yusuke Ayato, Akiko Takatsu, Kenji Kato, Naoki Matsuda, "In Situ Observation of Electrochemical Activity and Time Dependent Characteristics of Cytochrome *c* at Bare Indium-Tin-Oxide Electrodes by Voltammetry and Slab Optical Waveguide Spectroscopy", *IEICE Trans. Electron.*, **E91-C**, 1899-1904 (2008).

[学会発表] (計 38 件)

① Naoki Matsuda, Hiroataka Okabe, Akiko Takatsu, Kenji Kato, "Oxidation-reduction reaction of cytochrome *c* on solid/liquid interfaces : in situ observation by slab optical waveguide spectroscopy", 2010 環太平洋国際化学会議(ハワイコンベンションセンター、ホノルル、アメリカ合衆国), 2011 年 12 月 19 日 (招待講演).

② Naoki Matsuda, "In situ observation of protein functionality on solid/liquid interfaces by slab optical waveguide spectroscopy", The International Symposium on Biomimetic Materials Processing (野依記念館、名古屋大学), 2010 年 2 月 28 日 (招待講演).

③ 松田直樹, "スラブ光導波路分光法を用いた固液界面における吸収スペクトルの高感度その場測定", フォトニクス・フォーラム (豊田中研), 2008 年 5 月 16 日 (招待講演)

④ Naoki Matsuda, “In Situ Observation、Adsorption Process、Functions、Proteins、ITO Electrodes、Electrode/electrolyte Interfaces、Slab Optical Waveguide Spectroscopy”, 第5回国際及び第7回日中合同熱測定シンポジウム:CATS2008, (中国科学院大連化学物理研究所、大連、中華人民共和国), 2008年5月20日 (招待講演) .

⑤ Naoki Matsuda, “In situ observation of absorption spectra of proteins adsorbed on solid/liquid interfaces by slab optical waveguide spectroscopy”, The 8th International Discussion & Conference on Nano Interface Controlled Electronic Devices : IDC-NICE 2008, POSTECH、慶州、大韓民国) 2008年10月15日.

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/msrc/ci/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松田 直樹 (MATSUDA NAOKI)

独立行政法人産業技術総合研究所・生産計測
技術研究センター・研究チーム長

研究者番号 : 10344219