

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20882

研究課題名(和文)表面分光酵素電気化学による金属酵素-電極界面の理解

研究課題名(英文)Surface-sensitive spectro-electrochemistry on metalloenzyme electrodes

研究代表者

加藤 優 (KATO, MASARU)

北海道大学・大学院地球環境科学研究院・准教授

研究者番号：70709633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：膜貫通型金属酵素の多くが高い触媒活性を示すことが知られているが、一般的に容易に失活することからそれらの電気化学活性評価および表面増強赤外吸収(SEIRA)分光計測の研究例は限られていた。本研究を通して、膜結合型金属酵素の一つである一酸化窒素還元酵素(NOR)を失活することなく電極表面に固定化する方法を確立することができ、更には、NOR電極の電位制御下でのSEIRA分光計測を実施することで、酵素反応機構に関する知見を得ることができた。本研究で用いた表面分光酵素電気化学は他の金属酵素へも適用可能であり、金属酵素の動作原理の解明や高活性な人工電極触媒開発における設計指針を与えてくれると期待している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膜結合型の金属酵素の多くが高い触媒活性を示すことが知られているが、一般的に不安定で容易に失活するためにそれらの電気化学活性評価および表面増強赤外吸収(SEIRA)分光計測の研究例は限られていた。本研究を通して、膜結合型金属酵素の一つである一酸化窒素還元酵素(NOR)を用い、失活することなく電極表面に固定化する方法を確立し、更には、NOR電極の電位制御下でのSEIRA分光計測を実施することで、酵素反応機構の解明が大幅に前進した。本研究で確立した研究手法は他の金属酵素へも適用可能であり、金属酵素が高活性を示す動作原理の解明や高活性な人工電極触媒開発における設計指針を与えてくれるものと考えている。

研究成果の概要(英文)：In this work, we prepared gold electrodes that are active to surface-enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy and immobilized a nitric oxide reductase (NOR), which is a trans-membrane metalloenzyme and selectively catalyzes the reduction of nitric oxide (NO) to nitrous oxide (N<sub>2</sub>O). The NOR electrode showed the electro-catalytic NO reduction activity, indicating that the enzyme was active even on the gold electrode. We also performed SEIRA spectroscopy of the NOR electrode under potential control using carbon monoxide as a vibrational probe. Potential-dependent SEIRA spectra allowed us to determine the redox potentials of the heme and non-heme iron cofactors, which serve as the active site, and then gained the mechanistic insights into the enzymatic NO reduction.

研究分野：電気化学

キーワード：タンパク質フィルム電気化学 表面増強赤外吸収分光計測 金属酵素 一酸化窒素還元酵素 一酸化窒素

## 1. 研究開始当初の背景

金属酵素はタンパク質内部に金属錯体部位を有する酵素であり、その多くが触媒活性コアとして金属錯体部位を用いて生体内反応を触媒する。金属酵素の触媒活性評価と触媒反応機構の解明は、人工触媒の触媒活性におけるベンチマークや新たな人工触媒開発の設計指針になる。一般的な触媒活性の研究手法としては、酵素、反応基質、酸化剤/還元剤をストップフローによる高速混合および反応追跡があるが、酵素必要量が比較的多い( $\mu\text{mol} \sim \text{nmol}$ /測定)点や、触媒活性が酸化剤/還元剤の酸化還元電位に影響を受けるといった問題点がある。これに対して「酵素電気化学」では、実験に必要な金属酵素量はごく少量でよく(>数十 pmol/測定)、金属酵素を固定化した電極に印加する電位やタイミングをデジタル制御することで比較的容易に触媒活性評価が可能になる。また、酵素電気化学には酵素内部の金属部位の酸化還元電位、過電圧(エネルギーロス)などを詳細に調べることができるといった強みもあり、金属酵素を研究する上で強力な分析手法となりつつある。

このように酵素電気化学は金属酵素の触媒活性評価をするさいに威力を発揮するが、未だ発展途上の技術であり、技術的な課題として、金属酵素の電極表面固定化法の確立、別の言い方をすれば、生体分子のような“柔らかい”金属酵素を、金などの“硬い”電極表面にいかにか失活させることなく固定化する方法の確立、が挙げられる。また、金属酵素電極を用いた電気化学測定だけでは、酵素反応機構の理解を深めるには不十分であり、酵素電気化学と表面分光法を融合させることによるその場観察法の確立が不可欠である。

## 2. 研究の目的

本研究では、一酸化窒素(NO)の温室効果ガスかつオゾン層破壊物質の一つである亜酸化窒素( $\text{N}_2\text{O}$ )への還元反応を触媒する膜貫通型金属酵素である一酸化窒素還元酵素(NOR)に着目し、表面増強赤外吸収(SEIRA)活性を示す電極表面へのNORの固定化法の確立、得られたNOR電極の電極触媒活性評価、そして、電位制御下でのSEIRA分光計測による酵素反応機構に関する知見を得ることを目的として研究を実施した。

## 3. 研究の方法

### 1) 金属酵素固定化電極の作製。

半円筒型プリズム表面に無電解メッキ法によりSEIRA活性を示すAu薄膜を作製し、その表面に3-mercaptopropionic acidからなる自己組織化単分子層(SAM)を形成させ、その後、NORをその表面にアミド結合を介して固定化させた。なおNORは共同研究者である當舎武彦博士(理化学研究所)により単離精製をして頂いた。

### 2) NOR修飾電極を用いた電気化学測定による電極触媒活性評価

調製したNOR電極をSEIRA分光計測用の3電極式ガラスセルにセットし、電解質水溶液中でポテンシオスタットにより電極電位を制御することで、不活性ガス雰囲気下(Ar)および基質ガス雰囲気下(NO)での電流応答計測を実施した。

### 3) 一酸化窒素を用いたNOR修飾電極の電位依存SEIRA分光計測

特徴的な赤外吸収バンドを持つ一酸化炭素(CO)をプローブとし、NOR修飾電極の電位依存SEIRA分光計測を実施することで、NORの触媒活性部位を形成するヘム鉄(heme  $b_3$ )と非ヘム鉄( $\text{Fe}_B$ )の還元電位を決定した。そして、得られた結果をもとにNORによるNO酵素還元反応機構に関して考察した。

## 4. 研究成果

調製した NOR 修飾電極における電気化学測定を Ar 雰囲気下および NO 雰囲気下で実施したところ、還元電流応答を  $-0.4$  V vs. SHE 付近に観測することができた(図 1)。このような還元電流は NOR を固定していない Au 電極からは観測できず、また、Ar 雰囲気下でも観測することができなかった(図 1)ことから、観測された還元電流応答は電極表面に固定化された NOR により NO 還元由来であると結論づけることができた。この結果から、膜貫通型金属酵素の 1 つである NOR を電極表面に失活させることなく固定化できたことを示唆している。

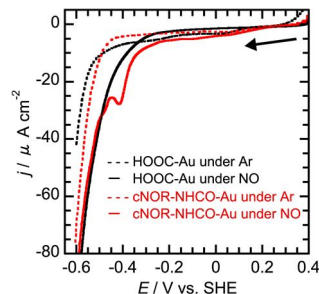


図 1. NOR 修飾電極の電気化学特性

次に、NOR による酵素反応機構に関する知見を得るために、CO を用いた NOR 電極の電位依存 SEIRA 分光計測を実施した。CO は赤外吸収スペクトルにおいて  $2000$   $\text{cm}^{-1}$  付近に特徴的な赤外吸収バンドを示し、更には、heme タンパク質の heme 錯体の  $\text{Fe}^{\text{II}}$  イオンに配位する性質があるため、本研究では、CO を NOR の触媒活性部位を形成するヘム鉄である heme  $b_3$  における赤外振動プローブとして使用した。NOR 電極の電位依存 SEIRA 分光測定を実施したところ、 $-0.4$  V vs. SHE の電位を印加した際に  $1972$   $\text{cm}^{-1}$  に特徴的な CO バンドを観測することができた(図 2)。過去の NOR モデルタンパク質の赤外吸収スペクトル測定の報告において、heme  $b_3$  に配位した CO は  $1972$   $\text{cm}^{-1}$  に、 $\text{Fe}_B$  に配位した CO は  $2066$   $\text{cm}^{-1}$  に CO バンドを示すことが明らかとなっていることから、heme  $b_3$  の鉄イオンが  $-0.4$  V vs. SHE で  $\text{Fe}^{\text{III}}$  から  $\text{Fe}^{\text{II}}$  へ還元され、その後、CO が heme  $b_3$  に配位したと結論づけた。この結果と図 1 の NOR 電極による NO 還元電位を考慮することで、heme  $b_3$  が  $\text{Fe}^{\text{II}}$  へ還元されることにより NO 還元が開始される、すなわち heme  $b_3$  は NOR 還元反応に確実に関与していることを突き止めることができた。

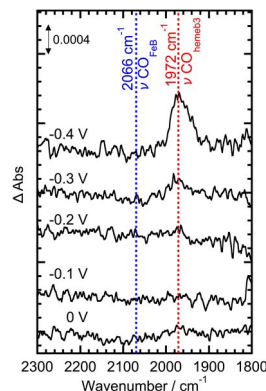


図 2. CO を用いた NOR 修飾電極の電位依存 SEIRA スペクトル

NOR におけるタンパク質フィルム電気化学と SEIRA 分光計測を用いた研究は本研究が初めてであり、上述の通り本研究で得られた結果をもとに NOR の触媒活性部位を形成する heme  $b_3$  と  $\text{Fe}_B$  の還元電位を帰属することに成功することができた。この帰属をもとに過去に提案されていた 3 つの反応機構について考察したところ、*cis*- $\text{Fe}_B$  と言われる heme  $b_3$  が反応に関与しない触媒反応機構を否定することができ、NOR による酵素反応機構を *cis*-heme  $b_3$  機構と *trans* 機構の 2 つに絞り込むことができた(図 3)。NOR の酵素反応機構に関しては、決定的な実験データが得られないがために長年にわたって議論が続いているが、本研究により反応機構に関する理解が大きく前進させることができた。

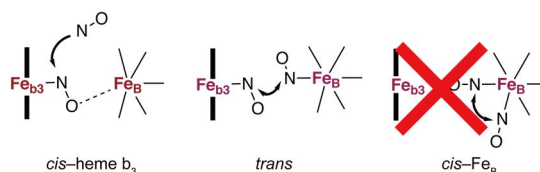


図 3. 過去に提案されていた 3 つの NOR による酵素反応機構。本研究で *cis*- $\text{Fe}_B$  機構を否定することができた。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 5 件)

- 1) **M. Kato**,<sup>\*</sup> S. Nakagawa, T. Tosha, Y. Shiro, Y. Masuda, K. Nakata, I. Yagi,<sup>\*</sup> "Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Bacterial Nitric Oxide Reductase under Electrochemical Control Using Vibrational Probe of Carbon Monoxide", *J. Phys. Chem. Lett.*, **9**, 5196-5200 (2018). 査読あり
- 2) **M. Kato**,<sup>\*</sup> K. Ogura, S. Nakagawa, S. Tokuda, K. Takahashi, T. Nakamura, I. Yagi,<sup>\*</sup> "Enhancement of Electrocatalytic Oxygen Reduction Activity and Durability of Pt-Ni Rhombic Dodecahedral Nanoframes by Anchoring to Nitrogen-doped Carbon Support", *ACS Omega*, **3**, 9052-9059 (2018). 査読あり
- 3) **M. Kato**,<sup>\*</sup> M. Muto, N. Matsubara, Y. Uemura, Y. Wakisaka, T. Yoneuchi, D. Matsumura,

- T. Ishihara, T. Tokushima, S. Noro, S. Takakusagi, K. Asakura, I. Yagi,\* "Incorporation of Multinuclear Copper Active Sites into Nitrogen-doped Graphene for Electrochemical Oxygen Reduction", *ACS Appl. Energy Mater.*, **1**, 2358-2364 (2018). 査読あり
- 4) M. Kato,\* H. Sato, I. Yagi, M. Sugiura,\* "Bio-inorganic hybrid photoanodes of Photosystem II and ferricyanide-intercalated layered double hydroxide for visible-light-driven water oxidation", *Electrochim. Acta*, **264**, 386-392 (2018). 査読あり
- 5) 八木一三, 加藤優, 中田耕, 中川省吾, "表面増強赤外吸収分光法による電極/溶液界面における反応計測", *分光研究*, **67**, 41-56 (2018). 査読あり

[学会発表](計 19 件)

## ポスター発表

- 1) 鳴海旭、増田侑也、中川省吾、加藤優、當舎武彦、八木一三, 自己組織化膜/Au 表面に固定した一酸化窒素還元酵素の分光電気化学的評価, 化学系学協会北海道支部 2019 年冬季研究発表会, 2019
- 2) Masuda Yuya, Kato Masaru, Toshi Takehiko, Nakagawa Shogo, Yagi Ichizo, Tracking Lipid Bilayer Membrane Formation on Gold Surface by Surface-Enhanced Infrared Adsorption Spectroscopy, Bangladesh Chemical Congress 2018, 2018 (ポスター賞受賞)
- 3) 増田侑也、加藤優、當舎武彦、八木一三, 表面増強赤外分光を用いた脂質二分子膜の形成挙動の追跡, 第 34 回ライラックセミナー・第 24 回若手研究者交流会, 2018
- 4) Nakagawa Shogo, Kato Masaru, Toshi Takehiko, Yagi Ichizo, Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Nitric Oxide Reductase Immobilized on Au Electrodes, 68th Annual ISE Meeting, 2017
- 5) 中川省吾、加藤優、當舎武彦、八木一三, 表面増強赤外分光を用いた脂質二分子膜の形成挙動の追跡, 第 33 回ライラックセミナー・第 23 回若手研究者交流会, 2017
- 6) 中川省吾、加藤優、當舎武彦、八木一三, 金電極上に固定化した一酸化窒素還元酵素の電気化学的還元活性, 第 54 回日本生物物理学会年会, 2016

## 口頭発表

- 7) 増田侑也、加藤優、當舎武彦、中川省吾、八木一三, 脂質膜修飾電極における金属酵素反応の追跡, 電気化学会第 86 回大会, 2019
- 8) 鳴海旭、増田侑也、中川省吾、當舎武彦、加藤優、八木一三, 自己組織化単分子層を介して電極上に固定した一酸化窒素還元酵素の分光電気化学, 日本化学会第 99 春季年会, 2019
- 9) 増田侑也、加藤優、當舎武彦、中川省吾、八木一三, 金属酵素-電極界面を指向した人工脂質二分子膜の構築, 2018 年日本表面真空学会学術講演会, 2018
- 10) 中川省吾、加藤優、當舎武彦、八木一三, 電気化学的に制御された一酸化窒素還元酵素の表面増強赤外吸収分光計測, 電気化学会第 85 回大会, 2018
- 11) 中川省吾、加藤優、當舎武彦、八木一三, 分子プローブを用いた一酸化窒素還元酵素修飾電極の表面増強赤外吸収分光計測, 化学系学協会北海道支部 2018 年冬季研究発表会, 2018
- 12) 加藤優、中川省吾、増田侑也、當舎武彦、中田耕、八木一三, 一酸化窒素還元酵素の電気化学制御表面増強赤外吸収分光計測, 第 12 回分子科学討論会, 2018
- 13) Kato Masaru, Nakagawa Shogo, Toshi Takehiko, Yagi Ichizo, Surface-Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy of Bacterial Nitric Oxide Reductase under electrochemical control, 23rd Topical Meeting of ISE, 2018
- 14) Yagi Ichizo, Nakagawa Shogo, Toshi Takehiko, Nakata Kou, Kato Masaru, In Situ Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy for Nitric Oxide Reduction Catalyzed By Bacterial Nitric Oxide Reductase, 232nd ECS Meeting, 2017
- 15) 中川省吾、加藤優、當舎武彦、八木一三, 表面増強赤外吸収分光による一酸化窒素還元酵素の電気化学反応追跡, 錯体化学会第 67 回討論会, 2017
- 16) 八木一三、中川省吾、當舎武彦、加藤優, 表面増強赤外分光法による一酸化窒素還元酵素修飾電極の反応計測, 第 11 回分子科学討論会 2017 仙台, 2017
- 17) 加藤優、中川省吾、當舎武彦、八木一三, 表面増強赤外吸収分光法による電極表面上一酸化窒素還元酵素の反応追跡, 2017 年電気化学会秋季大会, 2017
- 18) Kato Masaru, Nakagawa Shogo, Toshi Takehiko, Nakata Kou, Yagi Ichizo, Mechanistic Insights into Nitric Oxide Reduction Catalyzed by Bacterial Nitric Oxide Reductase, 68th Annual ISE Meeting, 2017
- 19) 中川省吾、加藤優、當舎武彦、中田耕、八木一三, 一酸化窒素還元酵素修飾電極における反応のその場分光追跡, 化学系学協会北海道支部 2017 年冬季研究発表会, 2017

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/msrkt/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究協力者

研究協力者氏名：八木 一三

ローマ字氏名：Ichizo Yagi

研究協力者氏名：當舎 武彦

ローマ字氏名：Takehiko Toshi

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。