

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2008

課題番号：19550192

研究課題名（和文） 酵素電極反応系への展開を指向したナノ多孔体電極系の構築と電気化学応答

研究課題名（英文） Development of nano

研究代表者

今林 慎一郎（IMABAYASHI SHIN-ICHIRO）

芝浦工業大学・工学部・准教授

研究者番号：50251757

研究成果の概要（和文）： ナノ多孔体電極として“逆オパール構造を持つ金電極”と“金ナノ粒子が三次元に集積した構造を持つ電極”を対象に、電極作製方法を確立すると共に、得られた電極表面でのレドックス反応および酵素電極反応を観察した。前者の電極については、層数を±2～3層で制御して15層までの電極を作製した。全細孔が電極として機能したが、細孔内部への物質輸送が不十分なために両電極反応の電流は実効表面積から期待されるほど増幅されなかった。

研究成果の概要（英文）： The fabrication methods of nanometer-scale porous gold electrodes, that are electrodes with inverse opal structure and those consisting of three dimensionally self-assembled nanoparticles, are developed. Redox reactions and enzymatic catalytic reactions at the obtained porous gold electrodes are investigated. The inverse opal electrodes with layers up to 15 are fabricated within an error of several layers. While the whole surface of nanopores works as electrodes, the current for Faraday reactions does not increase as much as expected from the real electrode surface area due to the insufficient transport of active substances to the nanopore surfaces.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：電気化学

科研費の分科・細目：材料化学・無機工業材料

キーワード：ナノ多孔体電極、金ナノ粒子、逆オパール構造、レドックス応答、酵素電極反応、感熱応答性高分子

## 1. 研究開始当初の背景

ナノ多孔体電極（規則的あるいは不規則なnmサイズの空孔を有する電極）は単位体積当たりの電極表面積、すなわち電極|電解質界面の面積を飛躍的に増加させることが可能であるため、電池・キャパシタのようなエネルギー変換デバイスの高性能化や各種センサー

の高感度化に有効であると期待されている。現在まで国内外の研究者から種々のナノ多孔体構造やそれら構造体の作製方法が提案されており、構造体自体が導電性を有するものは電極としての使用も検討されている。ナノ多孔体電極の代表的な作成方法として、シリカやポリマーなどの微粒子結晶を鋳型にして作

製する方法と、自己組織化法を用いて金属微粒子などをボトムアップ的に積み上げて作製する方法が挙げられる。前者で作製した電極は微粒子と同じサイズの球状の空間が小さな孔で互いに連結した逆オパール構造を持つものに対し、後者は金属微粒子が小さな距離を隔てて三次元に集積した構造を持つ。これらナノ多孔体電極がマクロサイズの平板電極とは異なる特異的なボルタモグラムを示す例が報告されているが、その理論的な理解はまだ十分なレベルに達していない。また、エネルギー変換デバイスへの応用においては電極間の空隙への活物質の充填が必要であるが、この充填や期待する構造体が形成できたかの確認も容易ではないこともわかった。このため、ナノ多孔体電極を用いることでデバイスは相対的に高性能化されるものの、潜在能力を100%活用するには至っていない。

一方、申請者らが見出したポリエチレンオキシド(PEO)に類似した構造をもつ新規な感熱応答性高分子(*Chem. Lett.*, **2002**, 1128-29)を介して、溶液中あるいは基板表面上に金ナノ粒子の三次元空間を形成する手法について、現在研究をおこなっている。感熱応答性セグメントを有するブロックコポリマーは、感熱応答性セグメントの会合によって、ある温度(転移温度)以上で自己組織的に会合して様々な構造体を形成するため、これを金ナノ粒子の三次元集積化に利用するものである。現在のところ、コポリマーの構造や金ナノ粒子への修飾状態を適切に選択すれば、金ナノ粒子の三次元集積構造体が形成可能であることがわかった。

界面反応である電極反応を高効率で生起させるためには、拡散などの物質輸送によって反応活性物質が迅速に電極表面に供給される必要がある。一般的にナノ多孔体は複雑な構造を有しているために、活性物質供給が必ずしも有効に行なわれていないと申請者らは考えている。また、ナノ多孔体電極をバイオセンサーや生物燃料電池などの酵素電極反応系に活用するためには電極表面に官能基や分子を固定化する操作が必要であるが、そのための手法は開発途上である。そこで、上記の逆オパール構造や微粒子の三次元集積構造を持つナノ多孔体電極の電気化学応答について、特に物質輸送過程に焦点を当てて、理解を深めることを第一の目的に、ナノ多孔体電極をバイオセンサーや生物燃料電池の電極として活用するための基礎として重要である電極表面へのメディエーターや酵素分子の固定化手法およびそれら固定化分子の電極反応について検討することを第二の目的とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、ナノ多孔体電極として、“シリカ

やポリマーなどの微粒子結晶を鋳型にして作製した逆オパール構造を持つ電極”および“自己組織化法を用いて作製した金属微粒子が小さな距離を隔てて三次元に集積した構造を持つ電極”を対象として、下記3点を目的とした。

- (1) 逆オパール構造および微粒子の三次元集積構造を持つナノ多孔体電極について、再現性の良い作成方法を探索する。
- (2) ナノ多孔体電極において、バルク溶液中に溶解したレドックス種や電極表面に吸着したレドックス種が示す電気化学応答、特に物質輸送過程についてマクロサイズの電極や平板電極が示す応答との共通点や相違点を明らかにする。
- (3) ナノ多孔体電極をバイオセンサーや生物燃料電池の電極として活用するための基礎検討として、溶液中に溶解したあるいは電極表面に固定化した酵素分子あるいはメディエーター分子がどのような電気化学応答を示すかについて検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) ナノ多孔体電極の再現性良い作製手法の確立

逆オパール構造および微粒子の三次元集積構造を持つナノ多孔体電極について、再現性の良い作成方法を探索する。逆オパール構造については内部空孔のサイズ、積層数を制御して、電気化学解析に適した欠陥の少ない構造体や炭素以外の素材を使った電極の作製方法を中心に検討する。

金属微粒子の三次元集積構造については三次元集積構造体が形成可能なコポリマー構造や金ナノ粒子への修飾状態を明らかにすると同時に微粒子径、微粒子密度をコントロールして作製できる手法を検討する。

- (2) ナノ多孔体電極の電気化学応答に関する実験的および理論的検討

作製したナノ多孔体電極において、バルク溶液中に溶解したレドックス種や電極表面に吸着したレドックス種が示す電気化学応答について各種電気化学測定法によって検討する。マクロサイズの電極や平板電極が示す応答との共通点や相違点を明らかにすると同時に、ナノ多孔体電極の電気化学応答に関して可能な限り、応答の定量的・理論的な考察を行なう。

- (3) ナノ多孔体電極を用いた酵素触媒電極系の構築

逆オパール多孔体電極を用いて、(1) 溶液中に溶解した酵素分子あるいはメディエーター分子がどのような電気化学応答を示すかについて調べると共に、(2) 酵素分子あるいはメディエーター分子が溶解した溶液を空孔内部へ減圧含浸させて分子の固定化状態を予備的に検討することで、課題の明確化を試みる。最表面と内部空孔表面の

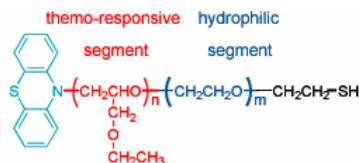
2種類の電極表面に固定化された分子を切り分けることが重要と考えている。

一方、微粒子の三次元集積構造を持つナノ多孔体電極については、架橋・集積化前の個々の微粒子へ酵素分子あるいはメディエータ分子を固定化した後、三次元集積化によってナノ多孔体電極にする方法を中心に検討する。得られた酵素触媒電極系の応答について測定・解析を行う。

#### 4. 研究成果

##### (1) 金属微粒子の三次元集積によるナノ多孔体電極

- ① **Fig.1** に構造を示す申請者が見出したポリエチレンオキシド(PEO)に類似した構造をもつ新規な感熱応答性高分子(poly(ethyl glycidyl ether) PEGE)をひとつのセグメントとし、PT 基を PEGE ブロック側末端に、SH 基を PEO ブロック側末端に持つ感熱応答性ブロック共重合体“poly(ethyl glycidyl ether)-*block*-poly(ethylene oxide) (PT-PEGE-*b*-PEO-SH)”を保護剤として表面に修飾した金ナノ粒子を合成した。感熱応答性ブロック共重合体として、各セグメント長が異なるもの3種 (**Table 1**) を合成し、使用した。今後、共重合体をそれぞれ PT15-159、PT29-136、PT50-68 (数字は各セグメントにおける繰り返し数)と略号で示す。



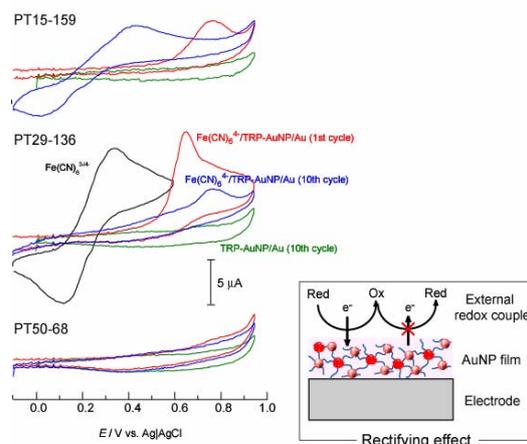
**Table 1** Characteristics of PT-PEGE-*b*-PEO-SH

Abbreviation	MW	n	m	M <sub>w</sub> /M <sub>n</sub>	T <sub>c</sub> (°C)
PT15-159	8500	15	159	1.07	23
PT29-136	9000	29	136	1.08	16
PT50-68	8100	50	68	1.05	12

- ② 得られたAuNPについてMeOH中動的光散乱測定で決定した高分子層の厚さを含むAuNPsの流体力学的半径はPT15-159: 16.6 nm、PT29-136: 15.9 nm、PT50-68: 13.9 nmであった。一方、SEM観測より得られた金ナノ粒子自体の半径はPT15-159: 5.35 nm、PT29-136: 5.25 nm、PT50-68: 5.00 nmであった。両半径の差は修飾したブロック共重合体層の厚さに相当するが、PT15-159: 11.25 nm、PT29-136: 10.65 nm、PT50-68: 8.9 nmであり、セグメント長から計算したフローリー半径と大体一致することがわかった。熱測定から得られた高分子/Au重量比と合わせて見積ったブロック共重合体の金ナノ粒子上への修飾密度は

PT15-159: 3.7 chains nm<sup>-2</sup>、PT29-136: 4.5 chains nm<sup>-2</sup>、PT50-68: 6.2 chains nm<sup>-2</sup>と高密度であり、物理吸着している高分子鎖中の存在を示唆する。15 nm前後であり、電子顕微鏡で決定したAuNPのみの半径は5 nm程度であった。熱測定から得られた高分子/Au重量比と合わせて高分子の修飾密度は6~9 chains nm<sup>-2</sup>と計算された。

- ③ 感熱応答性セグメントを有するブロックコポリマーは、感熱応答性セグメントの会合によって、ある温度(転移温度 T<sub>c</sub>)以上で自己組織的に会合して様々な構造体を形成することがわかっており、これを金ナノ粒子の三次元集積化に利用できるかを水溶液中で検討した。高分子修飾AuNPsは感熱応答性セグメントPEGEの相転移温度以下では分散状態をとり、PTのレドックス応答が観測されるが、転移温度以上では凝集沈殿し、PTの応答も失われた。
- ④ 高分子修飾 AuNPs から形成した高分子膜中に含まれる PT のレドックス応答は、疎水性の PEGE ブロック長、測定温度や電解質中の対アニオンに依存して変化した。例えば、高分子膜中に取り込まれた PT レドックス応答の大きさは PT15-159 > PT29-136 > PT50-68 であり、疎水性の PEGE ブロックが長くなるほど小さかった。正電位シフトも見られたことから、PEGE セグメントが長いと PT が存在するマイクロ環境が疎水性になることを示唆する。多孔体電極として機能した結果得られる電解質中に含まれるレドックス種の反応電流の増大は観られなかった。これは高分子が AuNPs 間のスペーサーとしては長すぎるためと考えられる。
- ⑤ **Fig.2** に示すように、③で記した高分子膜は電解質中に溶解しているレドックス種が膜を介して電極と電子授受する際に整流効果を示すことがわかった。Fe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup>は裸の



**Fig.2** 感熱応答性ブロック共重合体を修飾した金ナノ粒子から形成される高分子膜が電解質中のレドックス種に対して示す整流現象。掃引速度: 50 mV s<sup>-1</sup>, 電極表面積: 0.071 cm<sup>2</sup>.

金電極上では 0.25 V vs.Ag|AgCl で酸化還元されるが、PT29-136 で修飾した金電極上では 0.6 V vs.Ag|AgCl 付近で酸化のみが起こる。この現象は、電極近傍の膜中のPTがPT<sup>+</sup>に酸化されると、膜中のPT基間で電子交換が起こり、膜の溶液側表面に存在するFe(CN)<sub>6</sub><sup>4-</sup>の酸化が可能になるが、再還元はFe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup>とPTの酸化還元電位から考えて不可能であり、起こらないことで説明できる。

- (2) 逆オパール構造を有するナノ多孔体電極
- ① 引き上げ法によって作製したポリスチレン微粒子あるいはシリカ微粒子(いずれも 300 ~ 400 nm φ)から成るコロイド結晶を鋳型として金を電解めっきすることで、20 層まで層数を制御して逆オパール構造を持つ多孔体金めっき電極を作成できることを確認した。場所による層数のバラツキは積層数が多くなるほど増大し、10 層以上では±2~3であった。Fig.3 にポリスチレンコロイド結晶の例を示すが、コロイド溶液の濃度が高いほど積層数も大きくなる傾向があった。特に 1.5 wt%→2.0 wt%で不連続に層数分布が増えたことを考慮して、1.5 wt%のコロイド溶液を用いることで層数分布±2~3 で 15 層程度のコロイド結晶を作製できることがわかった。コロイド溶液濃度 1.5 wt%における検討から、結晶の層数や層数分布に対する引き上げ角度の影響はほとんどないが、コロイド結晶の表面構造は引き上げ角度が小さい場合に低下することがわかった。

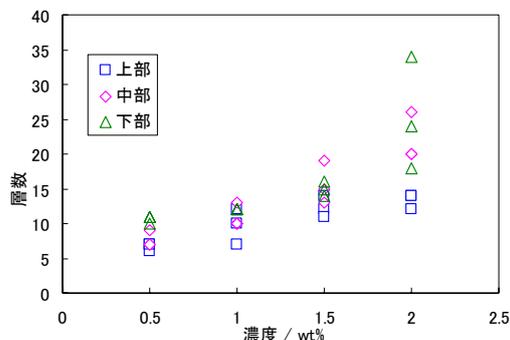


Fig.3 引き上げ法におけるコロイド溶液濃度と積層数の関係

- ② 得られたコロイド結晶を鋳型として、電解金めっきによって逆オパール構造を有する金多孔体電極を作成する条件について検討し、ガラス基板上にスパッタリングや蒸着で下地金を薄く付け、この上にコロイド結晶を形成し、電流パルスモードで電解めっきする方法がめっき皮膜表面の平坦性、析出金属粒径の点から最適であることがわかった。作製したい電極の層数に基づいて計算しためっきで析出させるべき金の量すな

わちめっき電気量によって積層数の制御がある程度可能であることがわかったが、狙った層数よりも実際の層数が小さくなる傾向があり、この誤差は積層数が多いほど顕著であった。また、多孔体電極の基板に対する密着性を上げるために、250℃、5時間のアニールが有効であることを見出した。

Fig.4 に得られた多孔体電極の表面 SEM 写真を示す。最上層の細孔の底に、最上層と第2層の細孔をつなぐ3個の貫通孔が見える。

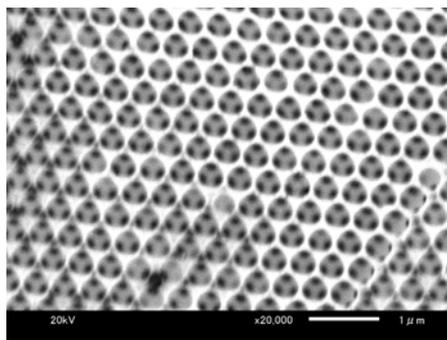


Fig.4 金多孔体電極の表面 SEM 像

- ③ 3、6、13層の多孔体金電極を作製し、電気化学測定を行った。SEM 観察から得られた層数を基に計算した表面積と充電電流あるいは金酸化物の還元電気量から見積もられる表面積はよく一致し、全細孔内表面が電極として機能していることを確認した。
- ④ 一方、溶液中に溶解したレドックス種の反応電気量は、実表面積から期待される電気量の1/5程度であり、全細孔表面で反応が起きていないことがわかった。この結果は、細孔内へのレドックス種の供給が迅速に起きていないことを示唆する。
- ⑤ 時間に依存したレドックス種の反応量を考察するためにクロノクーロメトリーで測定した電気量-(時間)<sup>1/2</sup>プロットは、リファレンスの金平板電極では直線になるが、多孔体電極では直線にならずに測定初期(~200 ms)に大きな増加を示したあと、直線となった。多孔体電極に対するプロットの 200 ms 以降の傾きは金平板電極の傾きと大差なく、この結果は細孔内への物質供給が有効に行われないために電位ステップ後、ある時間が経過すると電極反応が表層でしか起こらないことを示唆する。多孔体電極の初期に観られた大きな電気量の増加は“充電電気量+細孔内のFcDMの電気量”になると考え、細孔内のFcDMの電気量を見積もったが、細孔容積から計算した物質量に基づく電気量と一致しなかった。金多孔体電極に関するCC測定結果の解釈をさらに検討する必要がある。

(3) ナノ多孔体電極を用いた酵素触媒電極系の構築

- ① 多孔体電極を酵素電極系へ展開するための基礎として、酵素として酸素の4電子還元を触媒するLaccaseを選択し、平板の蒸着金電極上に末端官能基として-COOH, -SO<sub>3</sub>H, -NH<sub>2</sub>, -OHを持つ 3-mercaptopropionic acid (MPA), 3-mercaptopropane sulfonic acid (MPS), 2-amonoethane thiol (AET), p-amino thiophenol (ATP), 2-mercaptoethanol (ME) の自己組織化単分子膜を形成し、その上に酵素が活性を保って固定化されるかを検討した。水晶振動子マイクロバランス法によって評価した酵素吸着量は  $2.7\sim 6.4\times 10^{-12}$  mol cm<sup>-2</sup> であり、酵素分子の大きさを基に計算した単分子飽和吸着量  $4.6\sim 6.7\times 10^{-12}$  mol cm<sup>-2</sup> からモノレイヤーからサブモノレイヤーで吸着していると考えられる。
- ② 固定化された Laccase は電極と直接電子移動する能力は持っていない。Fig.5 に示すように ferrocene dimethanol (FcDM) をメディエーターとして用いることで、MPA, MPS, ME SAM 上に固定化した酵素は酸素還元触媒能を有することがわかった。しかし、AET SAM 上では触媒能がほとんど

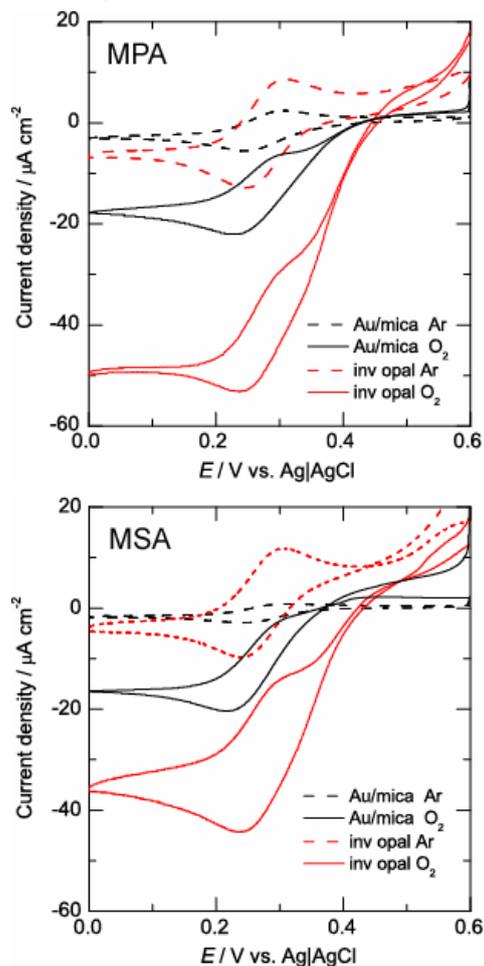


Fig.5

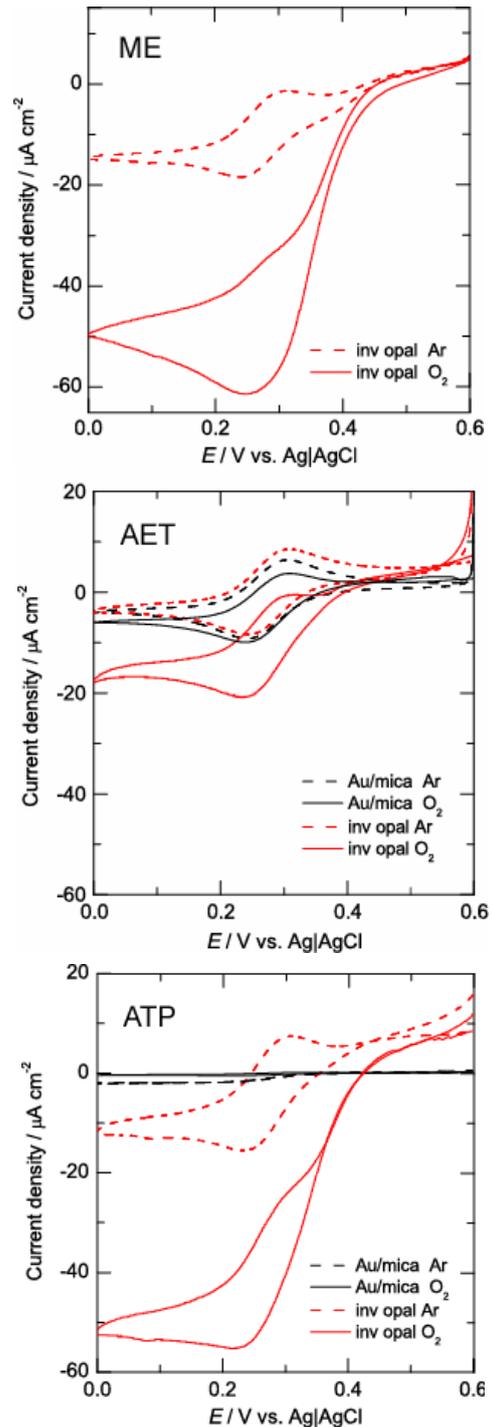


Fig.5 酸素およびアルゴン雰囲気下で測定したLaccase / SAM / Au / mica (黒線)、Laccase / SAM / 金多孔体電極 (赤線) のCV。掃引速度: 1 mV s<sup>-1</sup>

もなく、ATP SAM 上では触媒能が観られたものの再現性に問題があった。

- ③ ②で酸素還元の触媒電流が観られたチオール SAM について、同様の方法で金多孔体電極(積層数: 3~5)にチオール SAM を介して Laccase を固定化し、触媒電流を測定した。MPA, MPS, ME SAM 系において触媒電流の増幅が観測された

が、実表面積に見合う増加 (10.7 倍) はなかった。

- ④ Laccase / MPS SAM / Au / micaにおいて、緩衝液の濃度を 15 mmol dm<sup>-3</sup>から 150 mmol dm<sup>-3</sup>に増やしても触媒電流はほとんど変化しないことがわかった。表面電荷を持たないME SAM上へもLaccaseが固定化されることと合わせて、少なくとも静電的な相互作用が上記SAM表面への酵素固定化の主たる相互作用ではないことを示す。
- ⑤ 酸素還元触媒電流に対する金多孔体電極の層数 (3~5層 vs. 5~7層)、緩衝液の濃度の影響を観測した。この結果、層数に比例して触媒電流が増えること、SAM 表面への酵素固定化において静電相互作用の寄与が小さいこと、多孔体電極が固定化酵素の活性を安定に保つ働きがあることがわかった。

#### (4) 総括および今後の課題

バイオセンサーや生物電池などのデバイスに使用される酵素電極は、①高表面積化、②酵素との迅速かつ電位ロスの少ない電子移動反応の実現、③高安定性などが望まれており、本研究は①および②を目標に計画・実施されたものである。得られた結果は実用に十分なレベルではないが、ナノ多孔体電極を実用レベルに引き上げるための今後の課題を明確にすることは出来たと考えている。

逆オパール構造を有する多孔体電極については今後検討すべき研究課題が明確になったと考えている。当初懸念したように細孔深部への物質輸送が充分ではなく、活性物質の消費を伴う電極反応を継続的に行わせるためには、反応系あるいは電極形状の検討が必要と思われる。今後は、細孔表面で起こっている電極反応のより詳細な解析を行なうと同時に、新規な多孔体電極のデザインを考える予定である。

一方、金ナノ粒子を3次元に集積した電極については、期待していた電流の増幅は得られなかったが、整流効果を持つ電極修飾膜が形成できた。今後は整流メカニズムを解析すると同時に、ナノ粒子間のリンカーを変えることで電流値増幅の可能性を模索する予定である。

#### 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 3 件)

- ① 今林 慎一郎, 渡邊 正義, “レドックス活性ポリエチレンオキシドを用いたバイオインターフェースの構築”, *マテリアルズインテグレーション*, 査読無, 21 巻, 2008 年, 288-293.

- ② Sayaka Inoue, Hiroshi Kakikawa, Naotaka Nakadan, Shin-ichiro Imabayashi, and Masayoshi Watanabe, “Thermal response of poly(ethoxyethyl glycidyl ether) grafted on gold surfaces Probed on the basis of temperature-dependent water wettability”, *Lamgmuir*, 査読有, 25 巻, 2009 年, 2837-41.
- ③ Naotaka Nakadan, Shin-ichiro Imabayashi, and Masayoshi Watanabe, “Role of the thermosensitive segment in determining the redox properties of phenothiazine-labeled poly(ethoxyethyl glycidyl ether)-block-poly(ethylene oxide),” *J. Electroanal. Chem.*, 査読有, 632 巻, 2009 年, 59-63.

[学会発表] (計 4 件)

- ① Shin-ichiro Imabayashi and Hitoshi Abe, “Aggregation Behavior and Redox Properties of Redox Active Thermoresponsive Polymers Modified on Gold Nanoparticles,” ISCCS07, Dec.2007, Awaji.
- ② 阿部 均, 今林 慎一郎, 「レドックス活性ブロックコポリマーで保護した金ナノ粒子から形成される高分子膜の電気化学応答」, 電気化学会第 75 回大会, 2008 年 3 月, 山梨大学.
- ③ 角田 義典, 寺沼 洋輔, 檜崎 和紀, 大坂 高志, 今林 慎一郎, 「逆オパール構造を有する金多孔質電極における酵素電極反応」, 第 55 回 ポーラログラフィーおよび電気化学分析討論会, 2009 年 11 月, 徳島大学.
- ④ 角田 義典, 寺沼 洋輔, 檜崎 和紀, 大坂 高志, 今林 慎一郎, 「逆オパール形金多孔質電極における酵素電極反応に対する電極構造の影響」, 電気化学第 75 回大会, 2010 年 3 月, 富山大学.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

今林 慎一郎 (IMABAYASHI SHIN-ICHIRO)  
研究者番号 : 50251757