

1P050

金電極表面への一酸化窒素還元酵素 (NOR) 固定と その電気化学活性

(北海道大学¹、理化学研究所²) 山木 邦亮¹、加藤 優¹、當舎武彦²、○八木 一三¹

Modification and Electrochemical Activity of NOR modified on Au electrodes

(Hokkaido Univ.¹, RIKEN²) Kuniaki Yamaki¹, Masaru Kato¹, Takehiko Tosha² and Ichizo
Yagi¹

【緒言】

近年、多くの開発途上国では、急激な人口や家畜数の増加に対処するため大量の窒素肥料を使用した食料や牧草の生産が行われ、硝酸イオン(NO_3^-)や亜硝酸イオン(NO_2^-)による土壌および地下水汚染が顕在化してきている。[1] これは酪農が盛んである北海道にも当てはまる。 NO_3^- や NO_2^- による地下水汚染は、Blue baby syndrome などの健康被害を引き起こす。更に、 NO_3^- や NO_2^- は土壌細菌の代謝によって一部が一酸化窒素(NO)や亜酸化窒素(N_2O :笑気ガス)として大気中に放出されることで、地球環境にも悪影響を与える可能性がある。 NO は大気中で酸化され、大気汚染や酸性雨の原因となる NO_2 になる。 N_2O はオゾン層破壊[1]や地球温暖化[2]にも寄与すると考えられている。

このような土壌汚染や地下水汚染による負の連鎖を食い止めるためには、 NO や N_2O を発生しない地下水浄化システムの開発が急務である。特に、 NO_3^- や NO_2^- を還元して、 N_2 もしくは有効窒素資源である NH_3 や NH_2OH へ高選択的に変換できるシステムの開発が望まれている。貴金属電極触媒(Pd や Sn/Pd など)を用いた硝酸還元が研究されているが、反応条件(酸性溶液でのみ活性)や還元生成物の選択性などに問題があるため[3,4]、実用性に欠ける。

本研究では中性溶液中で高い硝酸還元能を示す電極触媒の開発を最終目標としているが、その端緒として、自然界における窒素サイクルに寄与する硝酸還元酵素群に着目し、それらの反応活性中心を人工的に模倣することを目論んでいる。NORは、 NO から N_2O への還元反応を触媒する膜タンパク質であり、その反応中心は heme b_3 と Fe_B から成る(Fig. 1)が、その触媒反応機構は長年議論されて続けているものの、未だ決着はついていない[5]。本発表では、NORの触媒活性発現機構を解明するため、酵素自体を電極表面に固定し、 NO 還元を電極表面で駆動しながら、*in situ*分光法等により計測するための試みについて報告する。

【実験方法】

電極基板は、スライドガラス上に Ti 密着層を介して Au を蒸着した基板をベースに、その表面に直径 13 nm~14 nm の Au ナノ粒子を修飾し、

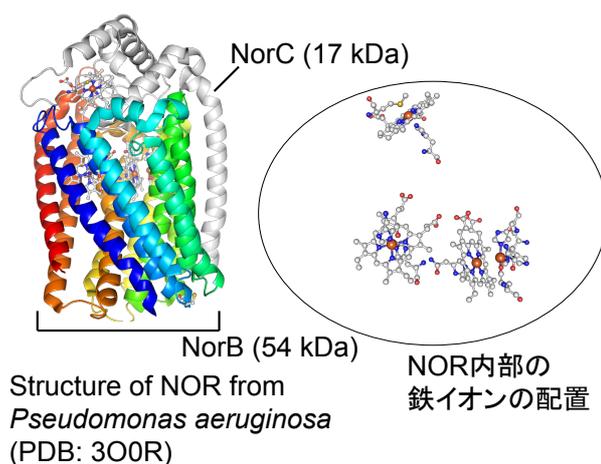


Fig. 1 一酸化炭素還元酵素 (NOR) の構造 (左) と、その内部に存在する反応活性中心における鉄イオンの配置 (右)

ラフネスファクターを10程度まで増大させることで調製した。この表面にカルボキシ基やアミン基を末端に有するフェニルジアゾニウム分子を電気化学グラフティングにより固定した。末端にチオールを有する分子も検討したが、NO還元反応が起こる電位において、チオール基の還元脱離反応が起こってしまったため、上記の手法を採用した。カルボキシ末端もしくはアミン末端を有する単分子膜修飾Au表面にNORをアミド結合により固定することを試みた。また、ベアのAu表面に直接金属酵素を固定すると、多くの場合、変性してしまうことが知られているが、NORでは不明であったため、直接固定する方法も試みた。このようにして調製した3種類の電極について、NOをバブリングした中性電解質水溶液中でNO還元活性を電気化学的に評価した。

【結果および考察】

調製した3つのNOR修飾電極におけるNO還元活性を評価したところ、いずれもNOが存在しないブランク溶液中のサイクリックボルタモグラム(CV)と比較して、NO存在下では明確な還元電流の増大が観測された。その立ち上がり電位は、NHEに対して約-0.2Vであり、NOR修飾法に対する依存性は認められなかった。特に、ベアのAu電極表面にNOR水溶液をキャストしただけのNOR固定Au電極でも

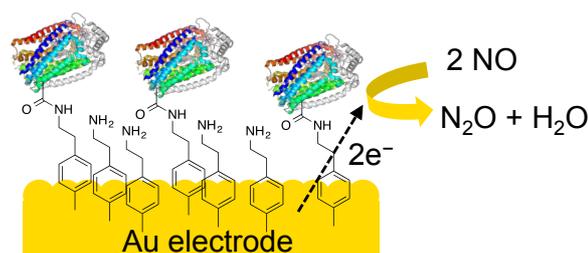


Fig. 2 アミノ末端を有する単分子層修飾 Au 電極にアミド結合を介して NOR を固定化した模式図と考えられる反応

NO還元活性が確認できたことは、NORの構造が比較的安定で、金属表面でも変性しにくいことを示唆している。一方、還元電流の値を比較すると、アミン末端を有する単分子膜を構築した後、アミド結合によりNORを固定化した電極で、他の電極と比較してわずかに大きな還元電流を観測できた(Fig.2)。この原因としてCOOH残基を有するグルタミン酸およびアスパラギン酸がNORの電子受容部位周辺に存在し、電極表面に近接して固定化される可能性が考えられる。ただし、現状では差異が小さいため、よりラフネスを増大させた基板を調製することが喫緊の課題となっている。

今後、表面増強赤外分光(SEIRAS)法や表面増強ラマン散乱(SERS)分光法、振動和周波発生(VSFG)分光法などの振動分光法を駆使したNOR配向状態の特定や水晶振動子マイクロバランス(QCM)法を用いたNOR固定量の決定などについて逐次検討を行ってゆく。

【参考文献】

- [1] H. Suzuki, 窒素酸化物の事典, 丸善出版, 2008
- [2] A. R. Ravishankara, J. S. Daniel, R. W. Portmann, *Science* **326**, 123-125 (2009).
- [3] K. Shimazu, et al., *J. Electroanal. Chem.* **601**, 161-168 (2009)
- [4] Y. Y. Birdja, et al., *Electrochim. Acta* **140**, 518-524 (2014).
- [5] T. Hino et al., *Science* **330**, 1666-1670 (2010)