

## 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

<sup>1</sup>北大院地球環境, <sup>2</sup>北大院環境科学, <sup>3</sup>理研  
○八木一三<sup>1,2</sup>, 中川省吾<sup>2</sup>, 當舎武彦<sup>3</sup>, 加藤 優<sup>1,2</sup>

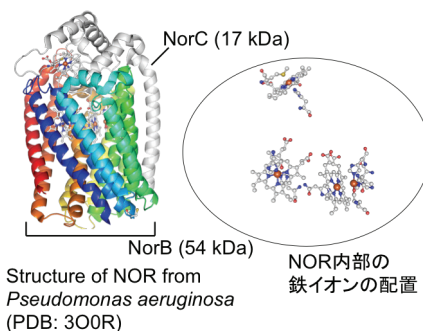
### Monitoring Reactions of Nitric Oxide Reductase-modified Electrodes by Surface Enhanced Infrared Absorption Spectroscopy

○Ichizo Yagi<sup>1,2</sup>, Shogo Nakagawa<sup>2</sup>, Takehiko Tosha<sup>3</sup> and Masaru Kato<sup>1,2</sup>  
<sup>1</sup>Faculty of Environmental Earth Science, Hokkaido University, Japan  
<sup>2</sup>Graduate School of Environmental Science, Hokkaido University, Japan  
<sup>3</sup>RIKEN SPring-8 Center, Japan

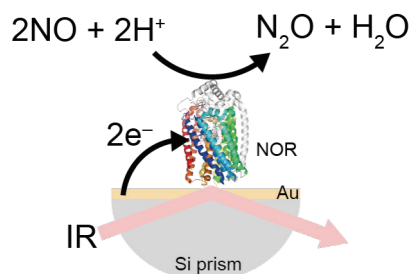
**【Abstract】** Nitric oxide reductase (NOR) catalyzes the reduction of nitric oxide (NO) to nitrous oxide (N<sub>2</sub>O). N<sub>2</sub>O is not only a greenhouse gas 310 times as powerful as carbon dioxide but also a main contributor to the depletion of the ozone layer. About 70 % of N<sub>2</sub>O emission on earth is derived from NOR. However, NO reduction mechanism on NOR is still unclear. In this study, we have investigated cyclic voltammetry and surface-enhanced infrared absorption (SEIRA) spectroscopy of NOR immobilized on Au electrodes to elucidate the NO reduction mechanism. SEIRA spectroscopy can be performed with electrochemical measurements and can provide structural information of molecules/proteins on the electrode surface selectively.

**【緒言】** 一酸化窒素還元酵素(nitric oxide reductase, NOR)は、一酸化窒素(NO)から亜酸化窒素(N<sub>2</sub>O)への還元反応を触媒する金属酵素である。N<sub>2</sub>OはCO<sub>2</sub>の約300倍もの地球温暖化係数を有し、また、オゾン層破壊物質の一つである。大気中のN<sub>2</sub>Oの約7割がNORによって生成されていると言われており[1]、環境変動の抑制やNORに特異的な阻害剤の開発などの観点で、NORによるN<sub>2</sub>O生成機構の解明が望まれている。NORの反応中心はheme b<sub>3</sub>とFe<sub>B</sub>から成る(Fig. 1)が、そのN<sub>2</sub>O生成機構は電子常磁性共鳴[2]、モデル化合物の合成[3]、NORの電気化学測定[4]や量子化学計算[5]などの様々な手法を用いて検討されているものの、未だに結論は得られていない。

そこで我々は、酵素電気化学と表面増強赤外吸収分光法(Surface enhanced infrared absorption spectroscopy: SEIRAS)の融合による、電気化学的触媒活性条件下でのNORのその場観察に着目した(Fig. 2)。本研究では、Au電極上にNORを固定化し、電気化学的に活性化したNORの反応追跡を実施したので報告する。



**Figure 1.** Structure of NOR (left) and arrangement of Fe ions in the reaction



**Figure 2.** Schematic representation of SEIRAS of NOR that is electrochemically activated catalyzed on a Au/Si prism electrode.

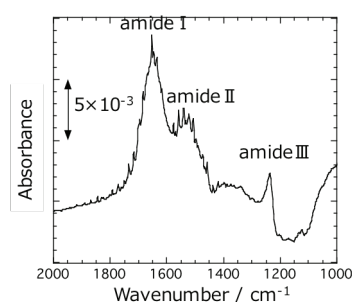
**【実験】** 無電解メッキ法[6]により、半円筒 Si prism 底面に Au メッキすることで NOR 修飾用 Au 基板を調製した。緑膿菌 *Pseudomonas aeruginosa* から単離精製した NOR を用いた。NOR は bare Au 基板上に直接修飾もしくは、予め Au 表面をカルボキシ基またはアミノ基を末端に有する分子により自己組織化膜 (SAMs) を形成した後に、アミド結合形成試薬を用いて修飾を検討した。SAMs についても、末端の異なるアニリン分子をジアゾ化し、電解修飾を実施した場合と、チオール基を有する分子で直接 Au 表面に修飾をおこなった場合の両方を試した。SEIRAS 測定は、Kretschmann 配置、入射角度  $70^\circ$  で測定し、必要に応じて偏光を規定して差スペクトルを得た。電極構成は 3 電極式を採用し、作用極に NOR 修飾 Au 電極、対極に Pt-flag, 参照極に Ag|AgCl (sat'd KCl) を用いた。

**【結果・考察】** 3 種類の電極上にそれぞれ NOR を修飾した後に SEIRAS 測定を行ったところ、タンパク質特有のアミド I, II, III バンドを検出し、NOR の修飾に成功した。また、3 種類の NOR 修飾 Au 電極を用いて 20 mM 2-Morpholinoethanesulfonic acid 水溶液中において NO 還元測定したところ、全ての電極において NO 還元電流が確認された。特に、Bare Au に直接 NOR を固定化した際に、アミド I, II, III バンドが観測 (Fig. 3) され、さらには NO 還元活性が確認された事実は、NOR を貴金属上に直接固定化しても変性することなく、その活性が維持されていることを示唆している。

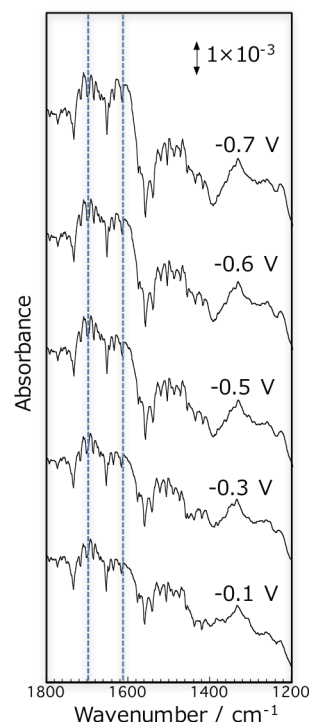
Figure 4 にカルボン酸末端を有する SAM 上に NOR を修飾した Au 電極を NO 飽和雰囲気下に曝した状態での SEIRA 差スペクトルの電位依存性を示す。電位が負電位側になるにしたがって、 $1620\text{ cm}^{-1}$  付近および  $1720\text{ cm}^{-1}$  付近の吸収バンドが明確に観測され、この 2 つのバンドは NOR 反応中心にトランス配置で吸着した 2 分子の NO それぞれの伸縮振動に帰属できる[7]。このことは SEIRAS が NOR の  $\text{N}_2\text{O}$  生成反応機構の解明に資する優れた手法であることを示唆している。

### 【参考文献】

- [1] A.R. Ravishankara, J.S. Daniel, R.W. Portmann, *Science* **326**, 123 (2009); D.J. Wuebbles, *Science* **326**, 56 (2009).
- [2] H. Kumita *et al.*, *J. Biol. Chem.* **279**, 55247 (2004).
- [3] J.P. Collman *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 16498 (2008).
- [4] C.M. Cordas *et al.*, *ChemBioChem* **7**, 1878 (2006); C.M. Cordas, A.G. Duarte, J.J.G. Moura, I. Moura, *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 233 (2013).
- [5] M.R. Blombert, P.E. Siegbahn, *Biochemistry* **51**, 5173 (2012).
- [6] M. Yaguchi *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.* **7**, 3097 (2016).
- [7] H. Matsumura *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **136**, 2420 (2014).



**Figure 3.** SEIRA spectrum of NOR-modified Au surface. (Reference spectrum was bare Au surface.)



**Figure 4.** Potential dependent SEIRA spectra at NOR-APPA-Au electrode. Reference spectrum was taken at APPA-Au surface.