光導波路分光法による電極表面におけるウランおよび タンパク質の酸化還元挙動のその場観察

In situ Observation of Redox Behavior of Uranium and a Protein by Optical Waveguide Spectroscopy

南川 卓也^{*}・鈴木 義規 Takuya Nankawa, Yoshinori Suzuki

lotes

重元素生物地球化学研究グループ *現所属:バックエンド技術部 Research Group for Heavy Elements Biogeochemistry

- ・インジウムスズ酸化物-スラブ型光導波路(ITO-SOWG)電極を用いて、ウランの電極表面での還元に よる化学状態変化をその場観察することに成功しま した。
- ・酸化還元機能を持つタンパク質であるチトクロム*c* をITO-SOWG電極表面に固定化し、チトクロム*c*の 酸化還元挙動をその場観察することに成功しました。

· Using an indium-tin oxide slab optical



- waveguide (ITO-SOWG) electrode, we observed the redox reaction of uranium on the electrode surface *in situ*.
- We immobilized a redox protein, cytochrome *c*, on the electrode and observed redox behavior of the protein *in situ*.

概要

我々のグループでは、6価ウラン(U(VI))の微生物 による還元機構の解明手法として、光透過性電極で あるインジウムスズ酸化物(ITO)を用いた電解法と スラブ型光導波路(SOWG)分光法を組み合わせた分 析手法の適用を考えています。今回、ITO-SOWG電 極を用いて、U(VI)の電解析出時における電極近傍の 可視吸光スペクトルのその場観測に成功し、電極に UO2の膜が成長していくようすを初めてとらえるこ とができました。また、自身の酸化還元により電子 伝達を行うタンパク質であるチトクロムc(用語1)を、 カチオン性ポリマーとアニオン性ポリマーから成る 層を吸着材として用いてITO-SOWG電極表面に固定 し、その酸化還元挙動とスペクトル変化をその場観察 することに成功しました。今後、脂質二分子膜、糖鎖、 タンパク質などの生体分子を修飾した電極を用いて、 酸化還元反応をコントロールしながらU(VI)の生体物 質による還元をその場観察することで、微生物によ るウラン還元機構の解明が期待されます。

本研究の一部は、Chemistry Letters 誌 [1] に掲 載されました。

1. 研究の背景

環境中には、嫌気呼吸により U(VI) を還元する鉄 還元菌や硫酸還元菌などの微生物がいます。このよ うな微生物の還元によるウランの固定は、本来環境 中では還元されにくいウランを固定化できるため、 ウランの環境移行挙動への影響や汚染サイトのバイ オレメディエーション(用語2)への応用の観点か ら注目されています。微生物により還元されたウラ ンの状態は、電子顕微鏡などで観察されており、特 有のナノ粒子を形成していることなどが報告されて きました。しかし、還元されたあとの状態を分析す るだけでは、生成したナノ粒子の結晶、化学組成な どは分かっても、微生物によるウラン還元機構を解 明することは困難です。私たちは、微生物の効率的 なウラン還元機構を解明すれば、生物を育成できな い環境においても、微生物のもつウラン固定化能力 を人工的に応用できるのではないかと考えました。 そのため細胞表面でおこる "微生物内→細胞表面の 生体物質→U(VI)"への電子伝達を"電極+細胞表 面の生体物質→U(VI)"への電子伝達に置き換え、電 極を流れる電流や電極表面を直接観察することによ

り、生体分子を介したウラン還元機構を調べる方法 を思いつきました。電極を用いる方法では、微生物 のような複雑な構造をとらず電位などの化学的な条 件を測定できるため、ウランを効果的に還元しナノ 粒子を生成する条件を明らかにできると考えました。

しかし、電極を用いて電位や電流を測定するだけ では、電極上の化学反応を解析することは困難です。 ウランは水溶液中で、4、5、および6の価数をと り得ます。また、5価のウランは比較的不安定であ り、6価と4価の酸化状態へ不均化する可能性があ ります。このようにウランの酸化還元挙動は複雑な ため、電気化学測定だけから還元されたウランの価 数や化学状態を決定することは出来ません。また、 生体物質の電気化学測定では、電極上での還元脱離 や分解などの反応により電流が流れる可能性がある ため、生体物質が酸化還元していることを電流以外 の方法で確かめる必要があります。

ウランの価数や化学状態及び生体物質の酸化状態 は吸収スペクトルから決定できます。そこで、電気 化学的な測定と同時に電極界面の吸収スペクトル をその場測定し、ウランや生体分子の電極上での状 態を解析しようと考えました。しかし、電極表面に 形成される生体物質の層が非常に薄く吸収が弱い上 に、溶液中の化学種の吸収による妨害を受けるため、 従来の方法で電極上の吸収スペクトルを測定するこ とは不可能でした。そのため、電極表面にあるウラ



図1 インジウムスズ酸化物 - スラブ型光導波路(ITO-SOWG)分光電気化学測定の原理図。ITO-SOWG 電極表面 で光が全反射するときに生じるエバネッセント波を利用し て、電気化学測定を行いながら、電極 - 溶液界面近傍の吸 収スペクトルを測定することができる。

Fig.1 Schematic diagram of the indium-tin oxide slab optical waveguide (ITO-SOWG) spectroelectrochemical system. We can analyze the absorption spectrum of electrode/electrolyte interface during electrochemical measurements with evanescent wave emerged from ITO-SOWG electrode.

インジウムスズ酸化物-スラブ型光導波路 (ITO-SOWG)電極



図2 インジウムスズ酸化物 - スラブ型光導波路(ITO-SOWG)分光電気 化学測定装置の写真。 Fig.2 Photograph of the indium-tin oxide slab optical waveguide (ITO-SOWG) spectroelectrochemical system.

ンや、生体物質だけの吸収スペクトルを検出する測 定法が必要になります。

2. 研究の経緯

そこで私たちは、エバネッセント波(用語3) を利用する SOWG 分光法 [2] によりその場観 察する手法を適用しました。SOWG 分光法では、 SOWG 中に紫外可視光を導入し、透過した光を測 定することにより、電極表面の近傍に存在する物質 の吸収スペクトルを取得できます(図1)。そのため、 バルク中のウランではなく、電極表面に薄膜のよう に吸着したウランや生体物質だけの化学状態変化 を解析することが可能になります。我々は、ITO-SOWG 電極に載せる電解セルを改良し、不活性ガ ス雰囲気でのウランおよびチトクロム c の測定を行 えるようにしました。実際の測定系の写真を図2に 示します。電極表面における U(VI) と生体分子の相 互作用を調べるための準備段階として、U(VI) およ びチトクロム c の還元に伴う化学状態変化を ITO-SOWG 電極を用いて調べました。

3. 研究の内容

ITO-SOWG 電極による U(VI) の電解析出挙 動のその場観察

初めに ITO-SOWG 作用電極、Ag 参照電極およ び Pt 対極から成る電気化学セルを作製し、UO₂²⁺ および電解質として NaCl を含んだ溶液を入れ、N₂ ガスで十分脱気したのち、サイクリックボルタモ グラム (CV) を測定しました (図 3)。0V 付近か ら -0.3V の範囲で電位をスキャンさせると、0 V よ り負電位側で $UO_2^{2^*}$ の還元電流が観測されました。 -0.3 V で正電位側のスキャンに切り替えると、酸 化電流が観測されましたが、電流量は還元電流に比 べてわずかでした。U(VI) は電子を受け取ることに より U(VI) → U(V) → U(IV) に還元されます。U(V) は電極電位を上げると U(VI) に酸化されますが、 U(IV) の酸化は非常に速度が遅いので電位を上げて も少ししか酸化されません。さらに、-0.2 V の電位 を 2 時間維持させた後,電極表面に析出した固相の X 線吸収スペクトルを測定した結果、析出物の大部 分は UO₂ であることを確認できました。これらの 結果から、-0.2 V では U(VI) の還元反応が起こり、 U(IV) が生じていることがわかりました。

次に、電極電位を -0.2 V に固定して U(VI) の電 解還元を行い、その間 10 分おきに U の可視吸収ス ペクトルを SOWG 分光法により取得しました。(図 4) 電解開始直後のスペクトルでは顕著な吸収ピー クは見られませんでした。U(VI) の吸収スペクトル では 420nm 付近における吸収と 400nm 以下の紫外 域での吸収が起こります。このことは、溶液中の U(VI) が観測されていないことを示します。

電解を開始すると、可視領域全体にブロードな吸 収が現れました。その後電解が進むに従い、670 nm 付近にピークを持つ弱い吸収と、550 nm 以下の吸 収帯が顕著に現れました。4 価ウランの吸収のうち、 660-670 nm 付近の吸収は、ウランの形状に関わら ない4 価特有のピークで、X 線吸収分光法で確認で きたように、電極上に U(IV) が生成していることを 示しています。550 nm 以下の吸収帯は U(IV) 原子 間の電子的な相互作用が増えることで、強くブロー ドに現れる吸収帯です。通常焙焼還元によって作成 された UO₂の粉末では、500nm 付近でも 670 nm 付 近の吸収に比べてずっと強い吸収が得られます。こ の吸収は、U(IV) 原子間の電子的相互作用が少なく なると弱くなることが報告されており、電極による 還元で初期段階に生成した UO₂ が微粒子に近い電 子状態を持つ可能性が示されました。このように, これらの実験手法を用いることにより、電解初期の 段階から、電極上に微小な UO₂ 固相が形成される までの U の吸収スペクトル変化をはじめてその場 観察することに成功しました。

(2) ITO-SOWG 電極表面へのチトクロム c の固 定化と酸化還元挙動のその場観察

ITO-SOWG 電極表面において、生体分子と U(VI)との酸化還元反応を観察するには、まず、生 体分子の活性を維持したまま電極に固定化させ、そ の酸化状態を電極によりコントロールしなければな りません。我々は、チトクロムcのITO-SOWG 電 極への固定化と、CV 測定および SOWG スペクト ルによるその場観察に取り組みました。

チトクロム c 1mM を溶解した水溶液に電極を入 れて CV を測定しても、明確な電流ピークは検出で きません。これは生体物質が特殊な電子伝達系をも つため、適切な方法で電極に固定させなければ、チ トクロム c が酸化還元されないからです。そこでま ず、チトクロム c を ITO 表面に固定して測定する ことにしました。ITO 表面を NaOH 溶液などのア ルカリ性溶液で親水化し、タンパク質を固定化する 従来の手法を試みたところ、吸光スペクトルを得る のに十分な量のチトクロム c を固定化することがで きず、CV 測定でチトクロム c 由来の電流を検出す ることができませんでした。そこで次に、チトクロ





Fig.3 Cyclic voltammograms of U(VI) in pH 4.0 solution.



図4 -0.2 V で U(VI) を電解しながら 10 分間おきに測定した SOWG スペクトル。

Fig.4 Time course of SOWG spectra observed during the reduction of U(VI) at a potential of -0.2 V vs. Ag/Ag⁺. The spectrum was measured every 10 min.

ム c と電極表面との静電的相互 作用を増加できれば、チトクロ ム c の吸着量を増加できると考 え、ITO 表面にカチオン性ポ リマー/アニオン性ポリマーの 順に修飾させることを試みまし た。その結果、チトクロム c の 吸着量がポリマーを修飾させる 前の6倍以上に増加することを 見出しました。この状態で CV を測定し(図5左)、その間、 点 a-e で SOWG スペクトルを 測定しました(図5右)。CV 測定では、0.4 V から-0.4 V へ



図5 ITO-SOWG 電極表面に固定化したチトクロムcのサイクリックボルタモグラム(左) およびサイクリックボルタモグラム測定中に点 a - i で測定した SOWG スペクトル(右)。 Fig.5 Cyclic voltammogram of cytochrome c immobilized on the ITO-SOWG surface (left) and SOWG spectra measured at a-i (right).

(点 $a \rightarrow c$) 電位をスキャンさせると、-0.1 V 付近 にチトクロム c の還元ピークが観測されました。そ の後の正電位側への逆スキャン (点 $c \rightarrow e$) では、0.05 V 付近に、還元されたチトクロム c の酸化ピークが 観測されました。SOWG スペクトル測定では、CV 上の点 b から点 c の間で、吸収ピークが 410 nm か ら 415 nm 付近にシフトし、点 d から点 e の間でも とに戻りました。これは従来報告されているチトク ロム c の酸化還元に伴うスペクトル変化 [3] と同 じであり、チトクロム c が電極上で還元・酸化され ていることが確認されました。このように本研究で は、ITO-SOWG 電極表面にチトクロム c を固定し、 その酸化還元反応を電気化学的にコントロールする こと及び、それに伴うスペクトル変化のその場観察 に成功しました。

4. 成果の意義と波及効果

ITO-SOWG 電極表面における U(VI) の電解析出 過程のその場観察と生体分子の固定化および酸化還 元反応のその場観察に成功しました。細胞表面の一 部を模擬するために生体分子を修飾した電極を用い て U(VI) の電解を行い、生体分子と U(VI) の化学状 態変化を同時に SOWG スペクトルでその場観察す ることにより、細胞表面でのウランの化学状態変化 機構解明に迫ることができると考えられます。現在、 U(VI)の微生物還元に関与していることが示唆され ているチトクロム c₃を ITO-SOWG 電極に固定化 し、U(VI)を電解還元する実験に取り組んでいます。 U(VI)との相互作用に限らず、微生物表面では多く の反応が起こりますが、その機構がわかっていない ものも数多くあります。そのような反応の解明に も、本手法を適用することが可能になると考えてい ます。

5. 今後の予定

タンパク質以外にも、脂質二分子膜や糖鎖を修飾 した電極の作製に取り組み、生体分子の反応を電極 上で再現し、その機構を解明する研究を行いたいと 思います。

参考文献

- T. Nankawa, Y. Suzuki, T. Ohnuki, Chem. Lett. 38, 1090-1091 (2009).
- [2] 加藤健次, ぶんせき, スラブ光導波路を利用した界面・ 薄膜計測, No.2 (1995).
- [3] M. Kurihara, S. Sano, J. Biol. Chem. 245, 4804-4806, (1970).

用語の説明

1. チトクロム*c*

ヘム鉄を含むタンパク質群の一種。生物のエネルギー代 謝経路(電子伝達系)において、ヘム鉄の酸化還元反応によ り電子伝達を行う。

2. バイオレメディエーション

微生物、菌類、植物、あるいはそれらの酵素を用いて、有 害物質で汚染された環境を汚染前の状態に戻す処理。

3. エバネッセント波

屈折率の異なる界面で光が全反射される際に浸み出す 光。エバネッセント波の強度は、界面から離れるに従って 指数関数的に減衰するため、界面近傍の分析に適している。