

## ノ ー ト

## カーボン電極上でのペルオキシダーゼの電子移動反応

富永 昌人\*, 谷口 功\*\*

(1991年6月21日受理)

## 1 緒 言

近年, タンパク質の電極反応に関する研究が活発に行われ, 分子量1万程度の電子伝達タンパク質については電極上での可逆な電子移動反応が報告されている<sup>1)~4)</sup>. 一方, 分子量の大きい酵素の電極反応についての知見は極めて少ない<sup>5)6)</sup>. 酵素の電極反応は新しい型の酵素センサー開発にも関連して分析化学的にも重要な課題である.

本研究では分子量約4万の西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼ (HRP) に注目して, その電極反応を検討した. HRP は, フェロセン誘導体, Ru 錯体などを電子移動メディエーターとして用いた電極反応については若干の研究例があるが<sup>7)8)</sup>, ここではメディエーターを用いない HRP の直接的な電極反応を検討した.

## 2 実 験

HRP はシグマ製 (Type II) をそのまま用いた. HRP 濃度は分子吸光係数<sup>9)</sup> ( $\epsilon_{403}=1.02 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) から決定した. 試薬はすべて市販の特級品を使用した. 電気化学測定には, 東方技研製ポテンショスタット 2020 型及び関数発生器 2230 型を用い, ボルタモグラムは脱気した pH 2~10 の Britton & Robinson (B & R) 緩衝溶液中, 10°C で測定した. 作用極にはアルミナスラリー (0.05  $\mu\text{m}$ ) で研磨した直径 0.5 cm のパイロリティックグラファイト {エッジ面 (PGE) とベア表面 (PGB); ユニオンカーバイト社製}, 対極及び基準電極にはそれぞれ白金及び銀塩化銀 (Ag/AgCl; 飽和 KCl) 電極を用いた.

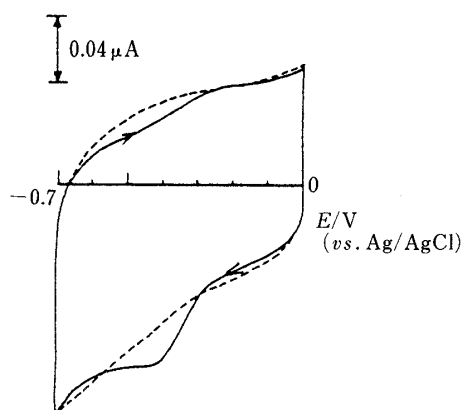
## 3 結果と考察

PGB 電極を用いて, HRP のサイクリックボルタモグ

ラムを測定すると一対の酸化還元波が認められた (Fig. 1). PGE を用いた場合もピーク電流は小さいがほぼ同様の酸化還元波が得られた. しかし, いずれの場合もボルタモグラムの還元波 (還元ピーク電位,  $E_{pc}$ =約  $-0.4 \text{ V vs. Ag/AgCl}$ ) が対応する再酸化波 ( $E_{pa}$ =約  $-0.2 \text{ V}$ ) より大きく, 又, ピーク分離幅も約 0.2 V 程度あり, 完全な可逆過程ではない. ここで HRP の電流応答を与えるものには, 主にヘム鉄部位と HRP 分子内に四つ存在する S-S 基<sup>10)</sup>が考えられる. 実験結果から, (a)  $E_{pa}$  と  $E_{pc}$  の中点として評価した酸化還元電位 ( $E^{\circ}$ ) は pH 8 の場合約  $-0.3 \text{ V}$  で, この値は HRP のヘム鉄の  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  系酸化還元電位<sup>11)</sup>に近い. (b)  $E^{\circ}$  に pH 依存性が見られるが, pH 5~7 では  $-45 \text{ mV/pH}$  程度, 中性から pH 10 までは  $-30 \text{ mV/pH}$  程度で  $-(\text{S-S})-+2\text{H}^++2\text{e}^- \rightarrow 2(-\text{SH})$  の反応から期待される  $-56 \text{ mV/pH}$  (at 10°C) より小さい. (c) ヘム鉄に配位可能な  $\text{N}_3^-$  や  $\text{CN}^-$  存在下での HRP のボルタモグラムは, 期待されるほどの大きなピーク電位変化はないが, 50~100 mV 程度の陰電位シフトが認められた. (d) 一般に  $-(\text{S-S})-$  基の還元反応は pH 8 では  $-0.6 \text{ V}$  程度であり<sup>11)</sup>, 更に, ヘム部位を離脱させて得たアポ酵素を用いて検討した  $-(\text{S-S})-$  基の還元電流は同条件で測定した Fig. 1 の還元電流に比べ, はるかに小さいことが示された. これらのことから, Fig. 1 の酸化還元波は HRP 分子内のヘム鉄の  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  に基づく酸化還元波と考えるのが妥当である. ここで  $E^{\circ}$  の pH 依存性はタンパク質の構造変化によるものと考えられる. 又, ピーク電流は HRP 濃度が 20  $\mu\text{M}$  以上ではほぼ一定となり, HRP の電極上への吸着を示唆している. しかし, 電極上への HRP の吸着は比較的弱く, HRP 濃度が 20  $\mu\text{M}$  より希薄になるほど, 電極反応は HRP の拡散過程が支配的になり, ピーク電流は掃引速度 ( $v$ ) よりもむしろ  $\sqrt{v}$  に比例した. Fig. 1 の還元ピーク面積から算出した吸着 HRP 量は単分子層かそれ以下と評価された (1 分子当たりの占有面積をほぼ 1000  $\text{\AA}^2$  とし

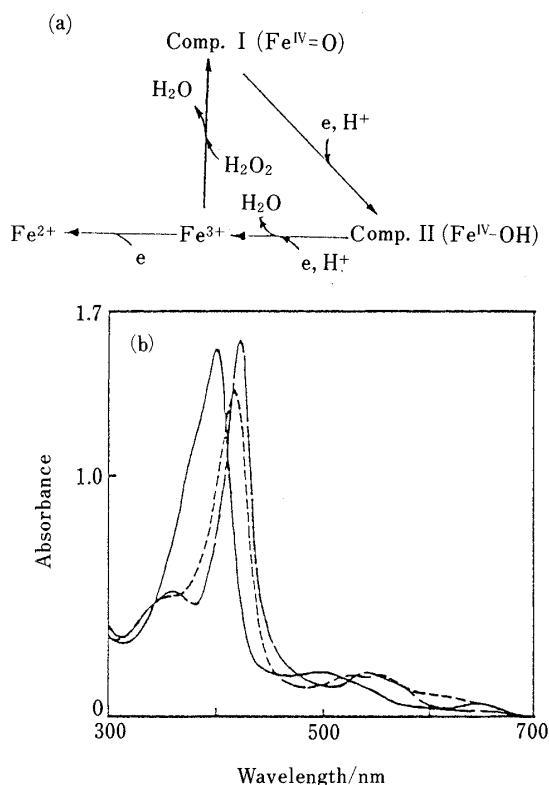
\* 熊本大学大学院自然科学研究科: 860 熊本県熊本市黒髪 2-39-1

\*\* 熊本大学工学部応用化学科: 同上



**Fig. 1** Cyclic voltammograms of HRP (ca. 20  $\mu\text{M}$ ) in a B & R (Britton & Robinson) buffer solution (pH 8) at a pyrolytic graphite electrode with the basal plane (PGB) at 10°C

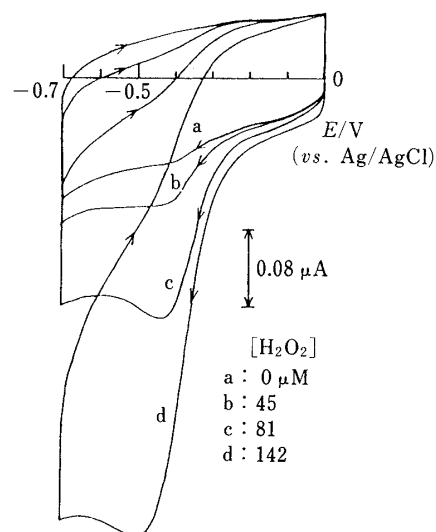
Scan rate: 10 mV/s; - - -: background



**Fig. 2** a) A part of the established reaction pathways of HRP; b) UV-Vis spectra of HRP (ca. 15  $\mu\text{M}$ ) in (—)  $\text{Fe}^{3+}$ , (---)  $\text{CN}^-$  coordinated forms, and (- - -) Comp. II

た).

一方, HRP については Fig. 2a のような酸化還元状



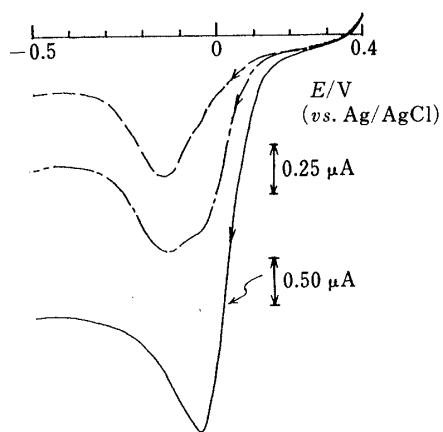
**Fig. 3** Catalytic reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  in the presence of HRP (ca. 20  $\mu\text{M}$ ) in a B & R buffer solution (pH 8) at a PGB electrode

Scan rate: 10 mV/s

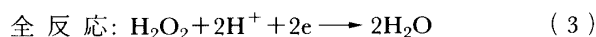
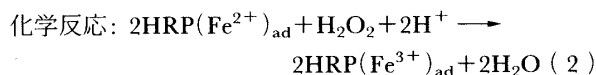
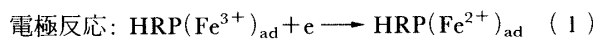
態が知られている<sup>12)</sup>. 酸化型の HRP ( $\text{Fe}^{3+}$ ) に過酸化水素を適量加えると不安定中間体である Compound I (Comp. I) を経て容易に Compound II (Comp. II) と呼ばれる状態の紫外可視吸収スペクトルが観測される (Fig. 2b). ここで Comp. I 及び II から HRP ( $\text{Fe}^{3+}$ ) への還元電位は +0.7 V 程度と報告されている<sup>13)</sup>. HRP 存在下では, pH 8 で -0.4 V 付近に  $\text{H}_2\text{O}_2$  の触媒還元電流が認められるが (Fig. 3), この触媒電流はその電位から判断して電極上で Comp. II が直接還元されることによって生じる電流ではなく, 電極上に弱く吸着した HRP 分子中のヘム鉄の還元反応,  $\text{HRP}(\text{Fe}^{3+})_{\text{ad}} + e \rightleftharpoons \text{HRP}(\text{Fe}^{2+})_{\text{ad}}$  を介した  $\text{H}_2\text{O}_2$  の触媒還元電流と考えられる.

pH 2 程度の酸性溶液中では HRP に基づく小さな還元ピークに加えて HRP が変性して生じた遊離のヘム部位<sup>10)</sup>に基づく還元波 (陰電位側の大きく明確な吸着性の強いピーク, Fig. 4) を有する HRP 吸着電極が得られる. この HRP 吸着電極を用いて測定した  $\text{H}_2\text{O}_2$  の触媒還元電流は遊離のヘム部位の還元電位より陽電位側で生じ (Fig. 4), 触媒作用が, 電極上の変性程度の低い HRP によることを示している. しかもこの場合, pH 8 の場合 (Fig. 3) に比べてはるかに感度よく  $\mu\text{M}$  レベルの  $\text{H}_2\text{O}_2$  が検出できる.

以上より, 触媒反応は次のように表される.



**Fig. 4** Catalytic reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  (----:  $0 \mu\text{M}$ , ---:  $45 \mu\text{M}$ , —:  $270 \mu\text{M}$ ) for the HRP adsorbed PGB electrode in a B & R buffer solution (pH 2). Scan rate:  $10 \text{ mV/s}$ .



すなわち、カーボン電極上に吸着した HRP 層は  $\text{Fe}^{3+} + e \rightleftharpoons \text{Fe}^{2+}$  間の酸化還元反応を示し、この電極反応は  $\text{H}_2\text{O}_2$  を触媒的に還元するメディエーターとなる。この反応は Comp. I 及び II を経る酵素の  $\text{H}_2\text{O}_2$  に対する通常の反応とは異なったものではあるが、 $\text{H}_2\text{O}_2$  の選択的触媒還元及び  $\mu\text{M}$  レベルの  $\text{H}_2\text{O}_2$  の高感度分析の観点から興味深い。

☆

**Electron-transfer reactions of peroxidase at carbon electrodes.** Masato TOMINAGA and Isao TANIGUCHI (Department of Applied Chemistry, Kumamoto University, 2-39-1, Kurokami, Kumamoto-shi, Kumamoto 860)

Electrode reactions of horseradish peroxidase (HRP) at pyrolytic graphite (PG) electrodes were examined by cyclic voltammetry. HRP gave a redox wave around  $-0.3 \text{ V}$  (*vs.* Ag/AgCl) at pH 8, which was due to heme of the HRP adsorbed on the electrode:  $\text{HRP}(\text{Fe}^{3+})_{\text{ad}} + e \longrightarrow \text{HRP}(\text{Fe}^{2+})_{\text{ad}}$ . The addition of  $\text{H}_2\text{O}_2$  to the HRP solution induced a catalytic reduction current at the electrode around  $-0.4 \text{ V}$  at pH 8; larger catalytic currents were obtained in acidic solutions. This catalytic reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$  can be given as  $2\text{HRP}(\text{Fe}^{2+})_{\text{ad}} + \text{H}_2\text{O}_2 + 2\text{H}^+ \longrightarrow 2\text{HRP}(\text{Fe}^{3+})_{\text{ad}} + 2\text{H}_2\text{O}$ , where the catalytic reduction took place favorably through the reduction of heme in HRP, but not through the free heme moiety dissociated from HRP.

(Received June 21, 1991)

#### Keyword phrases

horseradish peroxidase (HRP); electrode reaction; pyrolytic graphite; cyclic voltammetry; catalytic reduction of  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

本研究経費の一部は、文部省科研費 (02045033/03241223) によった。記して謝意を表す。

#### 文 献

- 1) 谷口 功: 電気化学, **56**, 158 (1988); I. Taniguchi: "Charge and Field Effects in Biosystems II", Edited by M. J. Allen, S. F. Cleary, F. M. Hawkridge, p. 91 (1989), (Plenum Pub., New York).
- 2) T. Ikeda, F. Fushimi, K. Miki, M. Senda: *Agric. Biol. Chem.* (Tokyo), **52**, 2655 (1988).
- 3) F. A. Armstrong, H. A. O. Hill, N. J. Walton: *Acc. Chem. Res.*, **21**, 407 (1988).
- 4) M. Tominaga, I. Taniguchi: *Rev. Polarog.* (Kyoto), **36**, 40 (1990).
- 5) A. Heller: *Acc. Chem. Res.*, **23**, 128 (1990).
- 6) I. Taniguchi, H. Eguchi, S. Tomimura: *Chem. Sensor Technol.*, **3**, 233 (1991).
- 7) J. E. Frew, M. A. Harmer, H. A. O. Hill, S. I. Libor, *J. Electroanal. Chem. Interfacial Electrochem.*, **201**, 1 (1986).
- 8) T. Tatsuma, T. Watanabe: *Anal. Chim. Acta*, **242**, 85 (1991).
- 9) G. R. Schonbaum, S. Lo: *J. Biol. Chem.*, **247**, 3353 (1972).
- 10) A. I. Yaropolov, M. R. Tarasevich, S. D. Varfolomeev: *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **5**, 18 (1978).
- 11) G. Dryhurst, K. M. Kadish, F. Scheller, R. Renneberg: "Biological Electrochemistry", Vol. 1, Chap. 7 (1982), (Academic Press, New York).
- 12) 田村 守: "化学増刊 76 ヘムタンパク質の化学", p. 53 (1978), (化学同人).
- 13) Y. Hayashi, I. Yamazaki: *J. Biol. Chem.*, **254**, 9101 (1979).