

# 電極上でのカーボンナノチューブと酵素との直接電子移動反応

熊本大学大学院自然科学研究科

富永 昌人

カーボンナノチューブは、1991年の発見以来、電界放出電子線源、トランジスタや水素貯蔵などへの応用が期待されている[1]。工業的な大量合成も可能となりつつあり、次世代のナノマテリアルとしての期待が大きい。さらに、カーボン素材は生体との適合性が高いことから、カーボンナノチューブのバイオ分野への応用も期待されている。ところで、なぜ「カーボンナノチューブ」を用いて「酵素との電子移動反応」を検討するのであろうか？その主な理由は、カーボンナノチューブが「1次元的導電体」であるためである（厳密には、直径やカイラリティにより半導体や金属になる）。

過去にはタンパク質は電気化学的に不活性であることが常識であったが、電子伝達タンパク質であるチトクロムcと電極基板との直接的な電子移動反応が1977年に報告されてから、種々の電子伝達タンパク質や酸化還元酵素と電極との直接電子移動反応が検討されてきた[2]。電極基板には、カーボンや透明電極のITOや金電極が用いられた。一つのブレークスルーは、電極表面の機能化であった[3]。日常的な取り扱いでは、電極基板表面は大気中の有機物などの汚染物質によって簡単に汚染されてしまう。電極表面の汚染は、電気化学測定結果の再現性に大きく影響を及ぼすばかりでなく、酵素との直接電子移動反応をブロックしてしまう。そのため、汚染が起こる前に目的の修飾剤で電極表面を修飾・機能化する手法がとられた。現在では、この手法は「自己組織化膜」と呼ばれる[4]。様々な有機小分子からなる自己組織化膜で修飾された機能化電極を用いた酵素との直接電子移動反応が検討され、さらに原子レベルで平滑な電極基板の作成法やプローブ顕微鏡による自己組織化膜の理解が深まったのと相まって、酵素の直接電子移動反応に対する電気化学的理解は飛躍的に高まった。しかしながら、直接電子移動反応を達成できた酵素は生体内の酵素のごく一部に過ぎない。酵素の活性中心の周りには厚いタンパク質の壁に覆われているためである。電極と酵素の活性中心との距離が2 nm程度になると電子移動反応は極めて困難になってくる。電子移動反応速度は反応距離が長くなるにつれて指数関数的に遅くなるためである[5]。カーボンナノチューブは、直径が数ナノメートルで長さが数マイクロメートルにもおよぶ「一次元的導電体」である。カーボンナノチューブを用いると、ナノチューブが酵素の活性中心近傍まで接近可能となり、酵素との直接的な電子移動反応が可能になると考えられる。すなわち、ナノチューブを酵素との電子移動反応のための「分子ナノワイヤー」として利用する。

カーボンナノチューブは、種々の直径や純度のものが市販されている。カーボンナノチューブを電極修飾剤として用いた研究報告が多々あるが、それらのほとんどは市販品を用いた研究である。しかしながら、著者はハンドメイドのカーボンナノチューブにこだわる。理由は下記の通りである。市販品のカーボンナノチューブは、その合成の触媒として用いられた金属ナノ粒子（鉄、コバルト、モリブデン、ニッケルなど）を含む（図1）。電気化学測定は電極表面の活性物質に

極めて高感度であるため、市販品をそのまま電気化学測定に用いた場合には、金属ナノ粒子に基づく電極反応が観測され、測定結果に影響を及ぼす。金属触媒ナノ粒子による影響の問題を解決するために、前処理としてこれらのカーボンナノチューブは強力な酸処理と超音波処理が施され、金属ナノ粒子が溶解除去される。一方で、カーボンナノチューブもダメージを受けて、ナノチューブの切断や表面欠陥が生じる。これは、カーボンナノチューブと酵素との相互作用の詳細を検討する上では好ましくない問題である。著者らは、カーボンナノチューブの欠陥によって、電子伝達タンパク質であるチトクロム c の電子移動反応が大きく異なることを見いだしている。電極上に直接ナノチューブを合成する場合にも金属ナノ粒子を触媒として用いる。しかしながら、これらの金属ナノ粒子はナノチューブに包括されており、ナノ粒子が直接測定

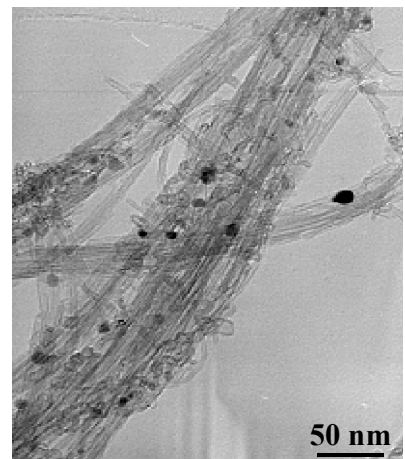


図1 市販品カーボンナノチューブとそれに含まれる触媒金属ナノ粒子のTEM写真.

溶液に曝されることがないために電気化学的には何ら影響を及ぼさない[6]。したがって、酸処理などによる金属粒子の除去を行う必要もなく、合成された状態でのカーボンナノチューブを電気化学測定に用いることができる。また、前述したように酵素反応に限らず、表面修飾を含めた電極表面の制御が電気化学測定では極めて重要である。著者らは、カーボンナノチューブは大気中でコンタミネーションを受けやすいという結果を得た。例えば、電極上に合成直後のカーボンナノチューブを用いるとフェロシアン化物イオンの可逆な電極反応が観測される。一方、大気下に曝したものは時間経過と共に電極反応が抑制された。大気下でナノチューブがコンタミを受けたためである。市販品のナノチューブもコンタミが既に起こっていると考えるのが妥当である。

著者らは、上記の問題を明らかにした上で、電極基板上に合成した直後のカーボンナノチューブ（直径：5~10 nm、複層構造、図2）を酵素溶液に浸漬して、酵素とカーボンナノチューブの直接電子移動反応について検討した。酵素には、グルコースオキシダーゼ（GOD, EC 1.1.3.4, from *Aspergillus niger*, 東洋紡）とフルクトースデヒドロゲナーゼ（FDH, EC 1.1.99.11, from *Gluconobacter* sp., 東洋紡）を用いた。酵素がカーボンナノチューブ上に固定化されたことは、XPS測定から酵素由来のN（1s）ピークの観測から確認した。中性のリン酸緩衝溶液中、GOD 固定化カーボンナノチューブ修飾電極では、下記の反応に示されるような GOD によるグルコースの酸化に基づくと考えられる触媒酸化電流が -0.45 V (vs. Ag/AgCl (飽和 KCl)) 付近から観測された。

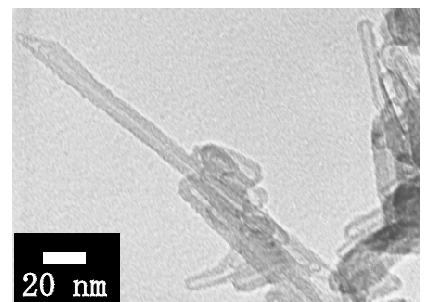


図2 電極基板上に合成したカーボンナノチューブのTEM写真.



観測された触媒電流は、1) 電極基板による反応ではないこと、2) カーボンナノチューブによる反応ではないこと、3) 酸素が測定セルにリークしたと考えられる際に、GODが酸素と反応して生成した過酸化水素による反応でないこと、4) 基質特異性も観測され、グルコース以外の基質では電流応答が観測されないこと、以上のことから、GODの直接電子移動反応に基づく触媒電流であることが確認できた。GODの活性中心はフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)であり、その酸化還元電位は中性溶液中で $-0.4\text{ V}$ 付近である。本研究のように、活性中心の酸化還元電位付近からGODに基づく触媒電流が観測されたのは初めてであり、酵素との直接電子移動反応にカーボンナノチューブが有用であることを示す[6]。FDHを固定化したカーボンナノチューブ修飾電極でも、FDHのフルクトースの還元に基づく触媒還元電流が $-0.15\text{ V}$ 付近から観測された。FDHは3つのサブユニットから構成される。その2つのサブユニットには、それぞれフラビンアデニンジヌクレオチド(FAD)およびヘムcが活性中心として含まれる。中性溶液中のFADおよびヘムcの酸化還元電位は、それぞれ $-0.4\text{ V}$ および $-0.1\text{ V}$ 付近であることから、基質であるフルクトースからカーボンナノチューブまでへの電子伝達経路は、図4に示すように、FADとヘムcとの分子内電子移動を経てカーボンナノチューブに電子伝達されたと考えられる[7]。

カーボンナノチューブは、1次元導電体のため酵素との直接電子移動反応に有用であることが示されつつある。しかしながら、酵素の固定化状態やナノチューブのカイラリティー、さらには欠陥の影響などの説明が不十分な点も多く残されており今後の発展が期待される。

#### 参考文献

- [1] S. Iijima, *Nature* **363** (1991) 56.
- [2] M. J. Eddowers, H. A. O. Hill, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1977) 771; P. Yeh, T. Kuwana, *Chem. Lett.* (1977) 1145.
- [3] I. Taniguchi, K. Toyosawa, H. Yamaguchi, K. Yasukouchi, *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* (1982) 1032.
- [4] R. G. Nuzzo, D. L. Allara, *J. Am. Chem. Soc.* **105** (1983) 4481.

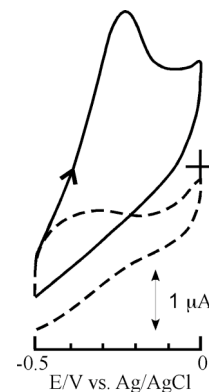


図3 カーボンナノチューブ修飾電極上に固定化されたGODによるグルコースの酸化に基づく触媒酸化電流. 5 mM (実線) および 0 mM (点線) のグルコースを含むリン酸緩衝溶液 (pH 7). 電位掃引速度: 5 mV/s. 見かけの電極面積: 0.25 cm<sup>2</sup>.

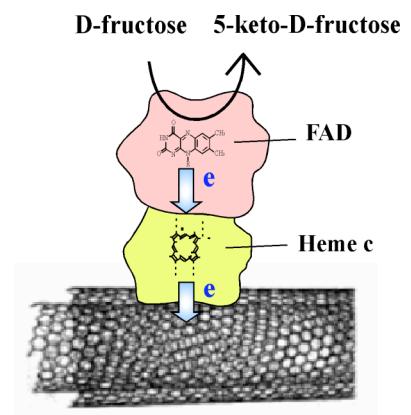


図4 基質からカーボンナノチューブまでのFDHの電子伝達の模式図。

- [5] R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta* **811** (1985) 265.
- [6] M. Tominaga, S. Nomura, I. Taniguchi, *Electrochem. Commun.* **10** (2008) 888.
- [7] M. Tominaga, S. Nomura, I. Taniguchi, *Biosens. Bioelectron.* in press.