

博士論文

Co 錯体修飾電極による金属蛋白質との
電子移動反応時における表面間相互作用の評価

2007 年

高橋 勇雄

目次

第 1 章 緒言	1
1.1. 電子移動蛋白質の分子認識	1
1.2. 均一溶液中における電子移動反応	2
1.3. 電極表面での不均一系電子移動反応	3
1.4. 単分子膜上への蛋白質の固定化	5
1.5. 研究目的	6
参考論文	14
第 2 章 電極表面に固定化した Co^{III} 錯体と cyt <i>c</i> との会合過程を経由した電子移動反応	19
2.1. 序論	19
2.2. 実験	21
2.2.1. 錯体合成	21
2.2.2. 測定機器	22
2.2.3. 錯体修飾電極の作製	23
2.2.4. 電気化学測定	24
2.3. 結果・考察	26
2.3.1. Co ^{III} 錯体(1, 2)の構造と性質	26
2.3.2. 錯体修飾電極の評価	26
2.3.3. プロモーター能に対する表面被覆率依存性	28
2.3.4. Cyt <i>c</i> との電子移動メカニズム	29
2.4. 総括	35
参考論文	36
第 3 章 Cyt <i>c</i> との電子移動反応における光学活性 Co^{III} 錯体修飾電極の不斉の影響	37
3.1. 序論	37
3.2. 実験	39

3.2.1. 錯体修飾電極の作製	39
3.2.2. 電気化学測定	39
3.3. 結果・考察	40
3.3.1. 2-Au の不斉に依存した <i>cyt c</i> の電子移動挙動	40
3.3.2. 2/C₆-Au の不斉に依存した <i>cyt c</i> の電子移動挙動	41
3.3.3. 酸化反応時・還元反応時の認識挙動	41
3.4. 総括	48
参考論文	49

第4章 **Co^{III}** 錯体と末端ヒドロキシアルカンチオール¹の混合分子膜と *cyt c* との電子移動

51

4.1. 序論	51
4.2. 実験	53
4.2.1. 各種修飾電極の作製	53
4.2.2. 電気化学測定	53
4.3. 結果・考察	54
4.3.1. 2R/HOC_n-Au と [Fe(CN) ₆] ³⁻ , [Ru(NH ₃) ₆] ³⁺ の電子移動挙動	54
4.3.2. 2R/HOC₂-Au と <i>cyt c</i> の電子移動挙動	54
4.3.3. 2R/HOC₆-Au と <i>cyt c</i> の電子移動挙動	55
4.4. 総括	61
参考論文	62

第5章 光学活性 **Co^{III}** 錯体修飾電極を利用した *azurin-1*, *azurin-2* の局所構造の評価

63

5.1. 序論	63
5.2. 実験	65
5.2.1. 菌体培養および <i>azurin</i> の精製	65
5.2.2. UV-vis スペクトル測定	66
5.2.3. 錯体修飾電極の作製	66
5.2.4. 電気化学測定	66

5.3. 結果・考察	69
5.3.1. 2-Au の評価	69
5.3.2. 2-Au の不斉に依存した az-1 の電子移動挙動	69
5.3.3. 2-Au の不斉に依存した az-2 の電子移動挙動	70
5.3.4. Azurin 間の立体構造の違いと電子移動挙動との関係	71
5.4. 総括	76
参考論文	77

第 6 章 Co^{III} 錯体修飾電極の側鎖置換基が与える azurin との電子移動反応への影響	79
6.1. 序論	79
6.2. 実験	81
6.2.1. 錯体合成	81
6.2.2. 測定機器	82
6.2.3. 各種修飾電極の作製	83
6.2.4. 電気化学測定	83
6.3. 結果	84
6.3.1. Co ^{III} 錯体(3 , 4)の構造	84
6.3.2. 4-Au の評価	84
6.3.3. 4-Au を用いた az-1 の電子移動挙動	84
6.3.4. 4-Au を用いた az-2 の電子移動挙動	85
6.4. 考察	91
6.4.1. ピーク電流値(I_p)の比較	91
6.4.2. ピーク電位差(ΔE_p)の比較	91
6.4.3. ピーク電位(E_p)の比較	92
6.4.4. 半波電位($E_{1/2}$)の比較	93
6.5. 総括	98
参考論文	99

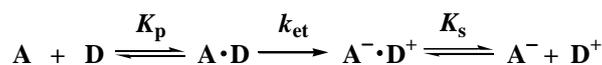
第7章	Co^{III}錯体修飾電極を用いた3種のcyt cの酸化還元挙動とその構造評価	101
7.1.	序論	101
7.2.	実験	103
7.2.1.	菌体培養および各蛋白質の精製	103
7.2.2.	UV-vis スペクトル	104
7.2.3.	電気化学測定	104
7.3.	結果・考察	105
7.3.1.	Cyt c, cyt c ₂ 間の電流応答の比較	105
7.3.2.	Cyt c ₂ の2種類の酸化還元応答	105
7.3.3.	溶液中におけるcyt c ₅₅₃ の構造情報	106
7.4.	総括	109
	参考論文	110
第8章	結言	111
	著者発表の論文	113
	謝辞	115

第1章 緒言

1.1. 電子移動蛋白質の分子認識

好氣的・嫌氣的呼吸^[1] および光合成^[2,3] などの生物学的プロセスにおいて、電子移動反応ならびにそれを司る電子移動蛋白質は非常に重要な役割を果たしている。生体内での反応過程は、全体として”発エルゴンの”に進行する。例えば、呼吸鎖において NADH の還元が始まる段階的な発エルゴンの電子移動反応により得られたエネルギーは、内膜を通したプロトン勾配を作り出し、これらの反応により生じたプロトン勾配を *driving force* として ATP 合成(吸エネルギー反応)が行われる(Figure 1-1)。^[1]

このような生物学的役割を担う電子移動蛋白質の機能は、電子を授受すべき相手(*redox partner*)を識別する「分子認識」、電子を授受する「電子移動」の2点であり、その反応過程はしばしば下式の様を示される。^[4]



ここで、 K_p , K_s はそれぞれ前駆会合体(*precursor complex*)、後駆会合体(*successor complex*)の生成定数、 k_{et} は会合体内の電子移動速度定数である。上式で表される様に、蛋白質は *redox partner* との会合体を形成することにより、電子移動を達成する。この会合体形成時には複数の非共有結合性相互作用が重要な役割を果たしており、複数の弱い相互作用を利用することにより *redox partner* を識別しているものと考えられている。例えば、呼吸鎖内に存在する *cytochrome c* (*cyt c*)の場合、活性中心近傍に存在する Lys 残基が会合体形成に非常に重要な役割を果たしていると言われている。^[5-13] *Cyt c* は、*cytochrome c reductase* (*complex III*)から *cytochrome c peroxidase*, *cytochrome c oxidase* (*complex IV*)へと電子を授受する役割を有した分子量 12,000 程度の球状蛋白質である(Figure 1-1)。^[1,5] *Cyt c-cytochrome c peroxidase*, *cyt c-cytochrome c reductase* に関しては会合体の結晶構造が報告されている(*cf. cyt c-cytochrome c peroxidase from yeast*; Figure 1-2)。^[14-16] これらの結晶構造より、蛋白質表面間における立体的相互作用(*van der Waals* 相互作用)、正電荷・負電荷による静電的な相互作用、水素結合相互作用という複数の非共有結合的な相互作用の存在が明確に示された。これらの相互作用は会合体形成過程においては有利に働くものの、電子移動後の脱離過程

においてどの様に寄与しているのかは未だ不明である。Brayerらは、酸化型、還元型 cyt *c* の結晶構造の比較により、73-80 番目のポリペプチド鎖のコンフォメーション変化が脱離過程の driving force となる”push-button switching”メカニズムを提唱した。^[5,17] Weber らは、cyt *c* と cytochrome *c* oxidase の混合溶液の CD スペクトル測定を行ったところ、その差スペクトルは native cyt *c* のそれとは異なり、ヘムの軸配位子が Met80 から近隣の Lys 残基に交換した”alkaline form”^[5] のスペクトルに類似であることを示した。^[18] この様に会合体形成前後および電子移動反応前後における構造変化を示唆するものの、詳細な検討が出来ないのが現状である。

1.2. 均一溶液中における電子移動反応

蛋白質表面間における分子間相互作用において、ある部分のみを直接的に測定することは難しく、電子移動反応の結果から間接的に評価することが主流となっている。Cyt *c* の場合、特定のアミノ酸残基を修飾した cyt *c*, cytochrome *c* reductase, cytochrome *c* oxidase を用いた蛋白質間電子移動反応から、蛋白質表面間における静電的な相互作用が分子間電子移動反応を加速することが報告されている。^[5-13] 様々な分子間電子移動反応の結果から、蛋白質間の会合体形成過程において静電的相互作用が重要な役割を果たしていることは最早周知の事実となっている。また、Kostićらは蛋白質間電子移動反応における粘度依存性から、蛋白質間の会合体を形成した後に構造変化を引き起こし、電子移動が進行するという”gated electron transfer”の概念を報告している。^[19]

遷移金属錯体は中心金属の種類、酸化数、配位子の選択などにより様々な性質を容易に変換可能であるため、蛋白質に対する redox partner のモデルとしてこれまでに多くの研究が報告されてきた。^[12,13,20-30] Sykes らは蛋白質表面に露出している Lys 残基を修飾した cyt *c* と負電荷を有した遷移金属錯体との分子間電子移動反応により Lys 残基との静電的相互作用を評価している。^[12] また、Gray らは、遷移金属錯体を電子移動蛋白質の特定残基に配位結合させ、溶液中における単一分子内電子移動反応について報告している。^[24] Bernauer らは、アミノ酸誘導体を導入した光学活性遷移金属錯体を用いた場合、その不斉の変化に伴って電子移動速度が変化することを示した(Figure 1-3)。^[25] この様なエナンチオ選択的電子移動反応は、[Co^{III}(acac)₃] (acac: acetylacetonato), [Co^{III}(ox)₃] (ox: oxalate)の光学異性体(Δ-体、Λ-体)を用いた場合などでも観測されている。^[26,27]

遷移金属錯体は容易に性質を変化させることが出来る反面、その性質は用いる金属、配位

子によって大きく変化してしまう側面も存在する。Kumita, Kato らは、アミノ酸誘導体を導入した Ru 錯体を用い、錯体外圏の環境を変化させることなくアミノ酸残基の構造・不斉のみを変化させることで電子移動蛋白質に対する系統的な検討を行った(Figure 1-3)。^[30] 還元型蛋白質と Ru^{III} 錯体、酸化型蛋白質と Ru^{II} 錯体との両方向における電子移動反応を行ったところ、無電荷(電気的中性)の Ru^{III} 錯体を用いた場合には立体選択的、エナンチオ選択的な電子移動挙動を示したものの、負電荷(-1)を帯びた Ru^{II} 錯体を用いた場合には静電的な相互作用が強く働くことにより選択性が小さくなるという結果であった。この様に、還元型蛋白質の酸化反応時における蛋白質-Ru^{III} 錯体間の立体的な相互作用についての議論を可能としたものの、酸化還元物質間における酸化還元電位差を driving force とした分子間電子移動反応の場合ではプローブとする遷移金属錯体側の酸化状態の違いを完全に無視することは出来ない。

1.3. 電極表面での不均一系電子移動反応

Cyt *c* は活性中心であるヘムが蛋白質内部に埋没しているため、^[17] その酸化還元反応を貴金属電極(Au, Ag など)を用いた通常の電気化学的手法により直接的に観測することは出来なかった。しかし、Hill らは、金電極を使用し、cyt *c* 溶液中に 4, 4'-bipyridine を混在させることによって cyt *c* の可逆的な酸化還元応答を得ることに成功した(Figure 1-4)。^[31a] ここで、4,4'-bipyridine 自身は cyt *c* の酸化還元電位(+55 mV vs. Ag/AgCl)^[5] 近傍に酸化還元応答を示さないため、4,4'-bipyridine の酸化(還元)を経由して cyt *c* を酸化(還元)しているわけではない。また、4,4'-bipyridine の片方の N 原子が金表面への接合部位として、もう片方の N 原子が cyt *c* 表面の Lys 残基との水素結合部位として作用しており、金表面上に 4,4'-bipyridine が自己集積化した単分子膜を形成していることが示された。すなわち、4,4'-bipyridine は電子の仲介者(メディエーター)として機能しているわけではなく、電極-cyt *c* 間の電子移動を促進(プロモート)するいわば導線として作用している。Hill らの最初の発見以降、金表面への結合部位と cyt *c* との相互作用部位を有した二機能性分子を修飾素子とした様々な cyt *c* の電気化学系が報告され、^[31-39] 電極-蛋白質間の電子移動反応を促進することが出来る分子に対して”プロモーター(promoter)”という名前が付けられた(Figure 1-4)。

Taniguchi らは、*n*-mercaptopyridine (*n*-pyS), benzenethiol を修飾した金電極を用いた場合、3-, 4-pyS では cyt *c* の酸化還元応答が観測されたものの、2-pyS, benzenethiol では観測されなかったことから、cyt *c* 表面の Lys 残基と pyridine N 原子との水素結合が電子移動に関与していることを示した。^[32] Waldeck らもまた *p*-置換 benzene を末端に有したジスルフィド分子を用い

た系統的な検討から水素結合の重要性を示している。^[33] Miller らは、末端ヒドロキシアルカンチオールを用いて *cyt c* との不均一系電子移動反応における速度論的パラメータについて報告している。^[34] また近年 Khoshtariya らは、末端ヒドロキシアルカンチオールのメチレン鎖長を変化させた場合、鎖長の増加に伴って *cyt c* との電子移動速度が大きく減少することを示した。^[35] Moreira らは、負電荷を有した $[\text{Ru}(\text{CN})_5(4\text{-pyS})]^{3-}$ 錯体を修飾した場合においても *cyt c* の可逆的な酸化還元応答が得られることを示した。^[36] この様に、蛋白質表面と非共有結合的に相互作用可能な膜表面を形成することが、プロモーター活性に対して重要であるとされている。中でも 4-pyS は様々な金属蛋白質に対してプロモーター活性を示し、^[40-45] 蛋白質の酸化還元電位測定に広く用いられている。

上記の様なプロモーター電子移動系は基本的に *cyt c* の拡散が、全体の電子移動速度の律速段階となっている電子移動系である。また、*cyt c* との電子移動速度にのみ焦点が当てられており、Lys 残基との非共有結合的な相互作用後の電子移動メカニズムおよびその蛋白質-電極表面間の相互作用については不明な点が未だ多く残されている。末端官能基のわずかな変化が膜表面の性質および単分子膜の配向などに重大な影響を及ぼすこともあり、系統的な検討が難しいことがその理由の 1 つとして挙げられる。また、Kohzuma らは、apopseudoazurin を nitrite reductase の溶液に混在させ、4-pyS 修飾電極を用いることにより nitrite reductase の酸化還元応答を得ることに成功した。^[45] Ataka らは、cytochrome *c* oxidase を His-tag 法により固定化した修飾電極を用いた場合、*cyt c* 溶液中において *cyt c* の酸化還元応答が得られることを示した。^[46] いずれも蛋白質が固定化されることによって溶液中の酸化還元種と電極間の距離は非常に長くなっているにも関わらずプロモーター活性を示し、プロモーター電子移動系は電子移動距離だけでは解釈が難しいという側面も見せている。

Willner らは、光学活性なフェロセン誘導体を glucose oxidase に対するメディエーターとして機能させた場合、溶液中に混在させた系、^[47] 金表面に固定化した系^[48] のそれぞれにおいてフェロセンの不斉に伴って電子移動速度が変化することを示した(Figure 1-5)。この様に、酵素に一方的に電子を渡す、もしくは酵素から電子を受け取る場合にはメディエーター系は非常に有用である。それは、酸化還元物質-酵素間の酸化還元電位差を利用した電子移動反応であるため、逆電子移動が起こりにくい酸化還元電位を有した酸化還元物質を選択することによって、電子移動の方向性を制御することが出来るためである。逆に言えば、蛋白質の酸化・還元両方向の電子移動反応を検討することにはあまり適していない。

1.4. 単分子膜上への蛋白質の固定化

近年、蛋白質を固定化した修飾電極を用いた実験が多数報告されてきた(Figure 1-6)。^[46,49-64] Tarlovらは、末端にカルボン酸を導入した修飾電極上に *cyt c* を吸着させ、電子移動反応を検討した。^[49] その後、Nikiらは末端にカルボン酸を導入したアルカンチオールの鎖長を変化させ、電極-ヘム間の電子移動速度と鎖長(距離)との関係についてプロットしたところ、鎖長に依存せず一定の電子移動速度を示す部分(plateau region)と鎖長に依存して電子移動速度が指数関数的に減少する部分が存在することを示した。^[50] 前者は *cyt c* が吸着状態から電子移動状態へと移行する速度、後者は電子がメチレン鎖をトンネルする速度が律速段階と考えられている。^[49-52] Waldeckらは、*cyt c* のヘム Fe が pyridine と配位可能であることを利用し、末端に pyridine を導入したアルカンチオールを用いて電極-ヘム間を直接的に結合することに成功した。^[53] また、この場合も前述のカルボン酸系と類似の鎖長依存性が得られ、電極-ヘム間の電子移動距離に換算すると pyridine 系、カルボン酸系ともに電子移動速度が電子移動距離に依存し、約 17 Å を境にして前述の様な律速段階が切り替わることを報告した。^[53d] この様に電極表面に固定化した場合の電子移動反応においても”gated”な電子移動挙動を示すことが明らかとされ、近年より詳細な議論が行われている。^[49-58] *Cyt c* の吸着配向と電子移動挙動の関係について、Whitesidesらは末端に種々の置換基を導入したアルカンチオールを用いることで議論し、^[54] Atakaらは表面増強 IR スペクトルを利用することでより詳細な議論を展開した。^[55]

上述の様に、蛋白質が表面に吸着した状態と電子移動状態が大きく異なっているという可能性は、プロモーター電子移動系においても考えられる現象である。また、電子移動反応とは関係はないが、Whitesidesらは修飾電極表面と蛋白質との会合・脱離過程について SPR 法により検討している(Figure 1-7)。^[65] 結合形成部位は carbonic anhydrase の Zn 中心と、金表面に固定化した arylsulfonamide (ASA)であり、ASA の表面モル分率が低い場合には可逆的に吸脱着可能であるが、モル分率が上昇すると carbonic anhydrase の結合速度は劇的に減少する。これは結合部位である Zn 中心が蛋白質内部約 15 Å ほどに位置するため、蛋白質内部に ASA が入り込むには ASA 分子周りにおける程度立体的な空間が必要であることから生じていると考えられる。この様に立体的に込み合った環境で相互作用するためには、均一にオーダーした単分子膜表面では限界があり、鎖長の異なる分子を用いた混合分子膜を利用するなど意図的に膜表面に凹凸を与えることも必要となる。

1.5. 研究目的

本研究では、金属蛋白質と修飾電極間の電子移動反応時における表面間相互作用を検討するため、修飾素子(プロモーター分子)としてアミノ酸誘導体を導入した光学活性遷移金属錯体を設計した。表面間での相互作用を検討するためには、出来る限り修飾分子の性質(親水性・疎水性、正電荷・負電荷など)を変化させずに系統的に検討することが必要である。そこで我々は遷移金属錯体を用いることで分子の性質を制御し、一部の不斉・構造のみを変化させることで金属蛋白質との不均一系電子移動反応を検討した。少なくとも不斉のみを変化させた場合には、分子の化学的性質は全く同じものとみなせる。また、アミノ酸側鎖の方が錯体部分よりも小さいため、たとえ密にオーダーした場合においてもアミノ酸側鎖周りには立体空間的に余裕を持たせることも出来る。ここで、遷移金属錯体に必要とされるものは、

- (1) 蛋白質溶液中での電位掃引範囲において安定であること(自発的に電子移動しない)
- (2) 蛋白質との非共有結合的な相互作用が可能であること
- (3) 金表面への結合部位を有すること
- (4) アミノ酸側鎖が溶液側に配向すること

の4点であり、この様な条件を満たす錯体分子として Figure 1-8 に示した Co^{III} 錯体を設計した。Cyt *c*, azurin とのプロモーター能を促進するために各 Co^{III} 錯体にはそれぞれ負電荷(-1)を導入し、金表面への結合部位としてジスルフィド結合を分子内に導入した。この Co^{III} 錯体は、6配位構造では d^6 low spin の閉殻状態となり、結晶場安定化エネルギーが最大となるため Co^{III} 状態を非常に安定化する。また、過去の報告により $\text{Co}^{\text{II/III}}$ の還元電位は-300から-700 mV vs. Ag/AgCl に位置するため、^[66] cyt *c*, azurin との自発的な電子移動は起こさないと考えられる。これにより、酸化還元電位差を driving force とした均一溶液中における電子移動反応^[12,13,20-30] や金表面におけるメディエーター系電子移動反応^[47,48] とは異なり、蛋白質の酸化・還元反応時における Co^{III} 錯体側の構造および性質の変化は無視出来る。

本論文ではアミノ酸側鎖部分の不斉および構造のみが異なる一連の Co^{III} 錯体修飾電極を用いた cyt *c*, azurin との電子移動反応を検討した。以下の各章にその詳細を記した。

第2章では、Phe 誘導体配位子を有した Co^{III} 錯体(**2**; **2S/2R**)を合成し、**2** の修飾金電極(**2-Au**; **2S-Au/2R-Au**)を作製した。そして、**2R-Au** の表面被覆率変化と cyt *c* との電子移動挙動との関係について検討した。

第3章では、第2章で作製した低密度に集積化した **2-Au** の不斉部分を変化させ、cyt *c* と

の電子移動反応を行うことにより、cyt *c* との電子移動過程において不斉の変化がどの様に影響を与えるかについての検討を行った。

第4章では、低密度に集積化した **2R-Au** の Co^{III} ユニット間に cyt *c* のプロモーター分子として機能する末端ヒドロキシルアルカンチオール(**HOC_n**; *n* = 2, 6)を挿入した混合分子膜 (**2R/HOC_n-Au**)の作製を試みた。

第5章では、高密度に集積化した **2-Au** を用いて、脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 から産出される非常に構造の類似した2種類の azurin (azurin-1, azurin-2)^[41a] との電子移動反応について検討を行った。

第6章では、**2-Au** の不斉部分(Bzl 基)を除去した Co^{III} 錯体(**4**)を用いた修飾電極(**4-Au**)を作製し、第5章で用いた2種の azurin に対して電気化学測定を試みた。**4-Au** の測定結果との比較により、**2-Au** の不斉・構造が電子移動に与える影響について調査した。

第7章では、高密度に集積化した **2S-Au** を用いて horse heart 由来の cyt *c*, *Rhodospirillum rubrum* 由来の cyt *c*₂, *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 由来の cyt *c*₅₅₃ の酸化還元挙動を検討し、cyt *c*, cyt *c*₂ との比較により cyt *c*₅₅₃ の構造評価を試みた。

第8章では、本論文を総括し、蛋白質に対するプロモーター電子移動系においても蛋白質-プロモーター間における会合相互作用が重要な役割を果たしており、その会合相互作用によって全体の電子移動速度が大きく影響を受けることを示し、結言とした。

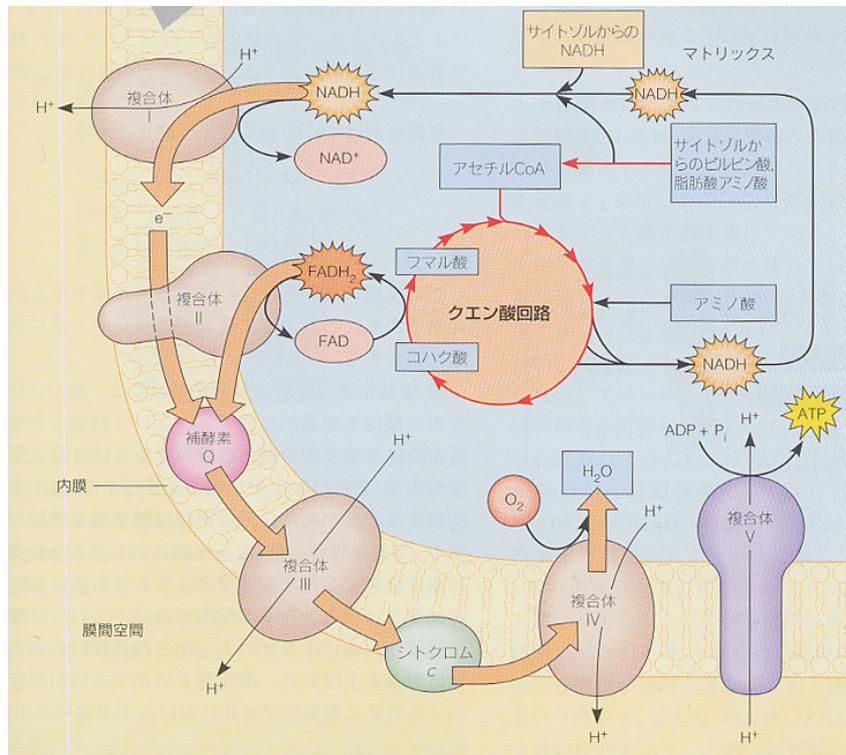


Figure 1-1. Schematic view of mitochondrial respiration mechanism.^[1]

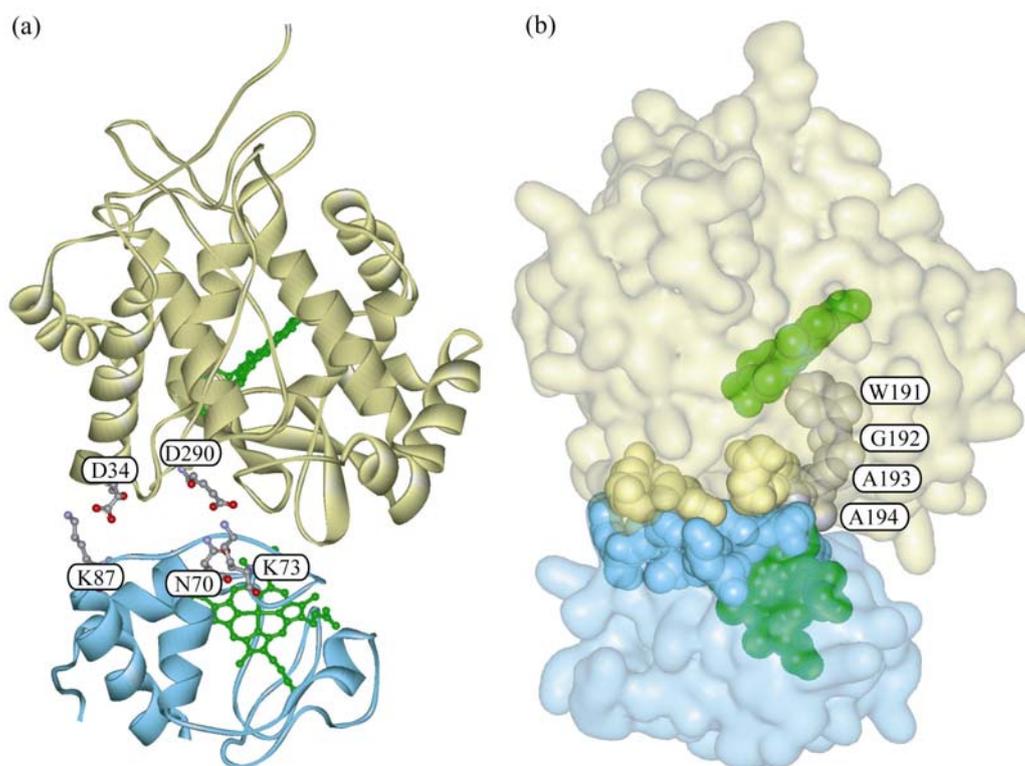
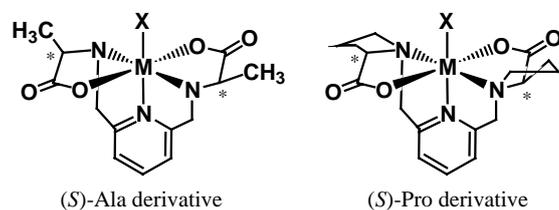


Figure 1-2. Crystal structures of the associated complex between iso-1-cytochrome *c* (blue) and cytochrome *c* peroxidase (yellow) from yeast (PDB code: 2PCC) denoted by ribbon (a) and surface model (b). Heme Fe is denoted by green. The non-covalently interacting residues between proteins are represented by ball and stick models (electrostatic and hydrogen bonding interactions), blue and yellow CPK models (van der Waals interaction), respectively. Gray CPK models indicate the proposed electron transfer pathway.

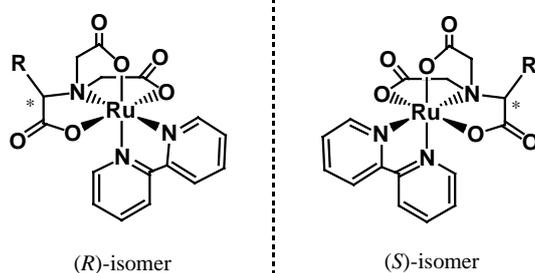


(S)-Ala derivative

(S)-Pro derivative

M = Fe, Co; X = H₂O, pyridine

Bernauer *et al.*



(R)-isomer

(S)-isomer

R = -CH₃, -CH₂C₆H₅ etc.

Kumita, Kato *et al.*

Figure 1-3. Schematic views of optically active metal complexes.

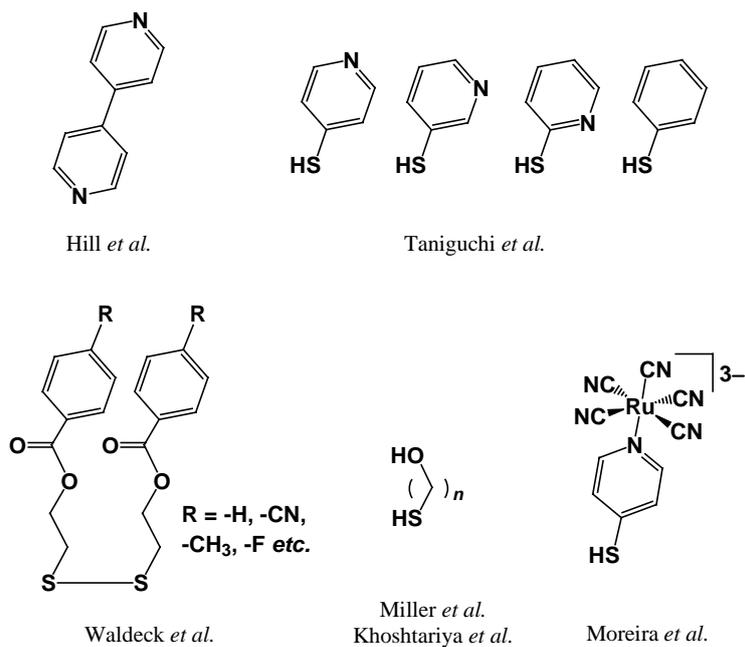


Figure 1-4. Schematic views of various modified molecules as a promoter.

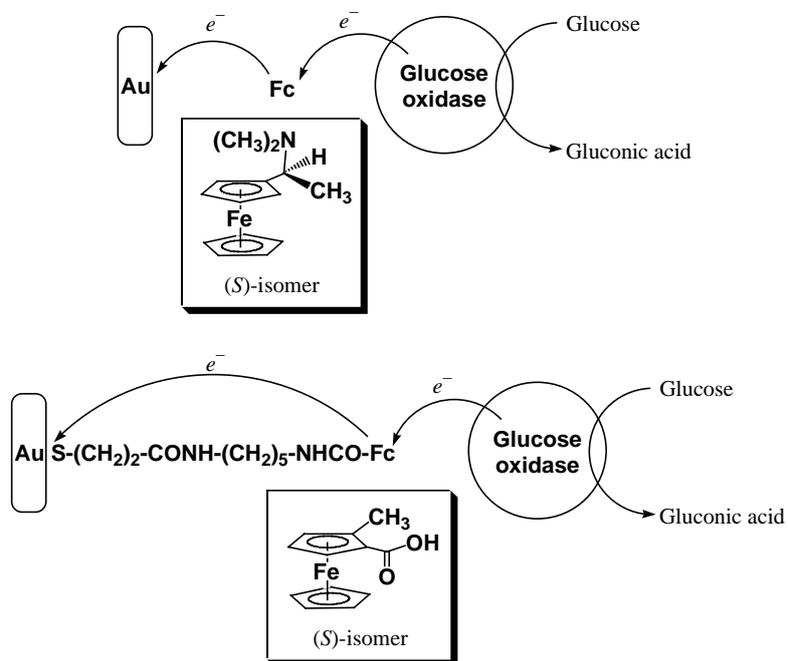


Figure 1-5. Schematic views of electrochemical oxidation of glucose by glucose oxidase.

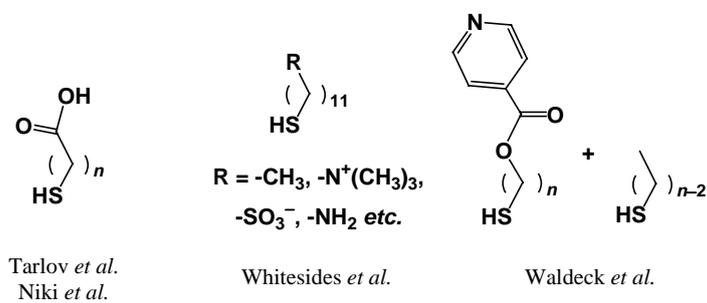


Figure 1-6. Schematic views of various modified molecules to interact with proteins.

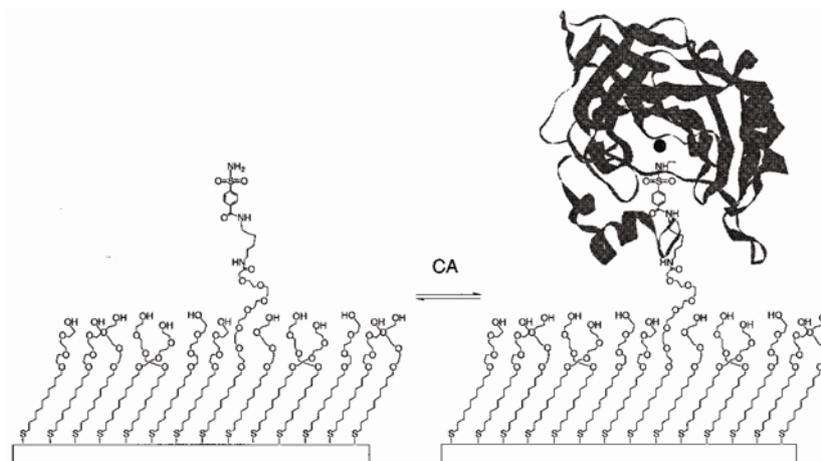


Figure 1-7. Schematic view of association and dissociation states of carbonic anhydrase (CA) to benzenesulfonamide group on Au.^[65]

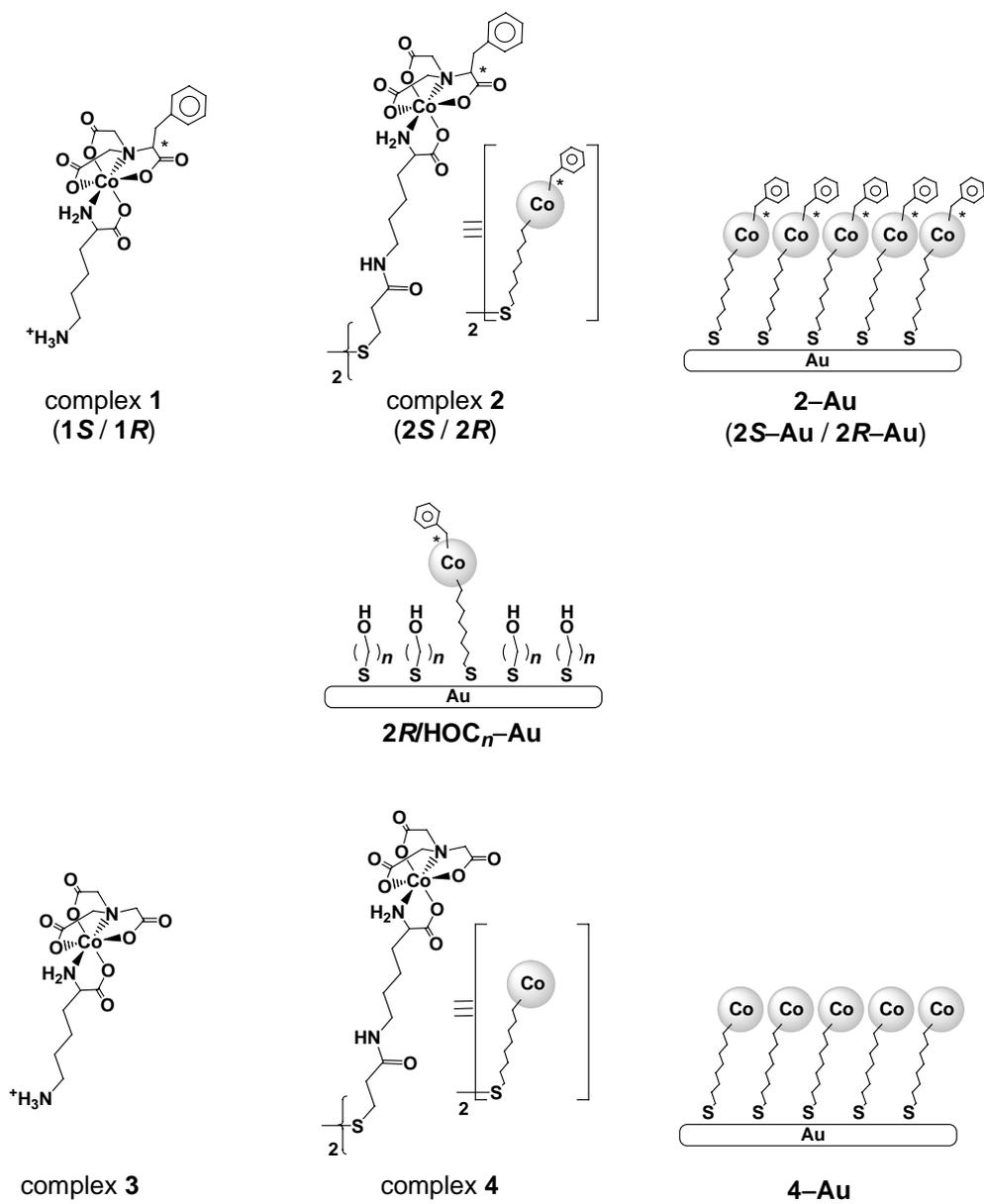


Figure 1-8. Schematic views of a series of Co^{III} complexes and their modified Au electrodes prepared in this study.

参考論文

- [1] 清水孝雄, 高木正道, 中谷一泰, 三浦謹一郎, 「マシューズ ホルダ アハーン カラー生化学」, 西村書店, 2003.
- [2] Anderson, J. M.; Anderson, B. *Trend Biochem. Sci.* **1988**, *13*, 351-355.
- [3] Huber, R. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1989**, *28*, 848-869.
- [4] 木村優, 「溶液内の錯体化学入門」, 共立出版, 1991.
- [5] Scott, R. A.; Mauk, A. G. *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach*; University Science Books: California, 1996.
- [6] (a) 奥貫一男教授退官記念会, 「チトクロムの研究 —実験を中心に—」, 東京大学出版会, 1973. (b) Takemori, S.; Wada, K.; Ando, K.; Hosokawa, M.; Sekuzu, I.; Okunuki, K. *J. Biochem.* **1962**, *52*, 28-37. (c) Takemori, S.; Wada, K.; Sekuzu, I.; Okunuki, K. *Nature* **1962**, *195*, 456-457. (d) Wada, K.; Okunuki, K. *J. Biochem.* **1968**, *64*, 667-681. (e) Wada, K.; Okunuki, K. *J. Biochem.* **1969**, *66*, 249-262. (f) Wada, K.; Okunuki, K. *J. Biochem.* **1969**, *66*, 263-272.
- [7] Erecińska, M.; Davis, J. S.; Wilson, D. F. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 9653-9658.
- [8] (a) Margoliash, E.; Ferguson-Miller, S.; Tulloss, J.; Kang, C. H.; Feinberg, B. A.; Brautigan, D. L.; Morrison, M. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **1973**, *70*, 3245-3249. (b) Ferguson-Miller, S.; Brautigan, D. L.; Margoliash, E. *J. Biol. Chem.* **1976**, *251*, 1104-1115.
- [9] Rieder, R.; Bosshard, H. R. *J. Biol. Chem.* **1980**, *255*, 4732-4739.
- [10] (a) Smith, H. T.; Ahmed, A. J.; Millet, F. *J. Biol. Chem.* **1981**, *256*, 4984-4990. (b) Millet, F.; de Jong, C.; Paulson, L.; Capaldi, R. A. *Biochemistry* **1983**, *22*, 546-552.
- [11] König, B. W.; Wilms, J.; van Gelder, B. F. *Biochim. Biophys. Acta* **1981**, *636*, 9-16.
- [12] (a) Butler, J.; Davis, D. M.; Sykes, A. G.; Koppenol, W. H.; Osheroff, N.; Margoliash, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 469-471. (b) Butler, J.; Davies, D. M.; Sykes, A. G. *J. Inorg. Biochem.* **1981**, *15*, 41-53. (c) Butler, J.; Chapman, S. K.; Davis, D. M.; Sykes, A. G.; Speck, S. H.; Osheroff, N.; Margoliash, E. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 6400-6404. (d) Armstrong, G. D.; Chambers, J. A.; Sykes, A. G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1986**, 755-758.
- [13] Cheddar, G.; Meyer, T. E.; Cusanovich, M. A.; Stout, C. D.; Tollin, G. *Biochemistry* **1989**, *28*, 6318-6322.
- [14] Pelletier, H.; Kraut, J. *Science* **1992**, *258*, 1748-1755.
- [15] Poulos, T. L.; Sheriff, S.; Howard, A. J. *J. Biol. Chem.* **1987**, *262*, 13881-13884.
- [16] Lange, C.; Hunte, C. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **2002**, *99*, 2800-2805.
- [17] (a) Bushnell, G. W.; Louie, G. V.; Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 585-595. (b) Berghuis, A. M.; Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 959-976.
- [18] Weber, C.; Michel, B.; Bosshard, H. R. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **1987**, *84*, 6687-6691.
- [19] Pletneva, E. V.; Fulton, D. B.; Kohzuma, T.; Kostić, N. M. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 1034-1046.
- [20] (a) Hodges, H. L.; Holwerda, R. A.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 3132-3137. (b) McArdle, J. V.; Gray, H. B.; Creutz, C.; Sutin, N. *J. Am. Chem. Soc.* **1974**, *96*, 5737-5741. (c) Wherland, S.; Gray, H. B. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **1976**, *73*, 2950-2954. (d) McArdle, J. V.; Coyle, C. L.; Gray, H. B.; Yoneda, G. S.; Holwerda, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 2483-2489. (e) McArdle, J. V.; Yocom, K.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 4141-4145. (f) Cummins, D.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1977**, *99*, 5158-5167. (g) Mauk, A. G.; Coyle, C. L.; Bordignon, E.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 5054-5056.
- [21] Eley, C. G. S.; Ragg, E.; Moore, G. R. *J. Inorg. Biochem.* **1984**, *21*, 295-310.
- [22] (a) Wishart, J. F.; van Eldik, R.; Sun, J.; Su, C.; Isied, S. S. *Inorg. Chem.* **1992**, *31*,

- 3986-3989. (b) Meier, M.; van Eldik, R. *Inorg. Chim. Acta* **1994**, 225, 95-101. (c) Meier, M.; Sun, J.; Wishart, J. F.; van Eldik, R. *Inorg. Chem.* **1996**, 35, 1564-1570. (d) Meier, M.; van Eldik, R. *Chem. Eur. J.* **1997**, 3, 39-46. (e) Macyk, J.; van Eldik, R. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **2001**, 2288-2292. (f) Chatterjee, D.; Hamza, M. S. A.; Shoukry, M. M.; Mitra, A.; Deshmukh, S.; van Eldik, R. *Dalton Trans.* **2003**, 203-209. (g) Macyk, J.; van Eldik, R. *Dalton Trans.* **2003**, 2704-2709. (h) Körner, M.; Tregloan, P. A.; van Eldik, R. *Dalton Trans.* **2003**, 2710-2717.
- [23] (a) Segal, M. G.; Sykes, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1978**, 100, 4585-4592. (b) Lappin, A. G.; Segal, M. G.; Weatherburn, D. C.; Sykes, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 2297-2301. (c) Lappin, A. G.; Segal, M. G.; Weatherburn, D. C.; Henderson, R. A.; Sykes, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 2302-2306. (d) Armstrong, F. A.; Henderson, R. A.; Sykes, A. G. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 6912-6917. (e) Beoku-Betts, D.; Sykes, A. G. *Inorg. Chem.* **1985**, 24, 1142-1147.
- [24] (a) Meade, T. J.; Gray, H. B.; Winkler, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, 111, 4353-4356. (b) Winkler, J. R.; Gray, H. B. *Chem. Rev.* **1992**, 92, 369-379. (c) Casimiro, D. R.; Richards, J. H.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Phys. Chem.* **1993**, 97, 13073-13077. (d) Mines, G. A.; Bjerrum, M. J.; Hill, M. G.; Casimiro, D. R.; Chang, I. -J.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, 118, 1961-1965.
- [25] (a) Bernauer, K.; Sauvain, J. -J. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1988**, 353-354. (b) Bernauer, K.; Monziona, M.; Schürmann, P.; Viette, V. *Helv. Chim. Acta* **1990**, 73, 346-352. (c) Bernauer, K.; Jauslin, P. *Chimia* **1993**, 47, 218-220. (d) Bernauer, K.; Verardo, L. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1996**, 35, 1716-1717. (e) Bernauer, K.; Ghizdavu, S.; Verardo, L. *Coord. Chem. Rev.* **1999**, 190-192, 357-369. (f) Scholten, U.; Merchán, A. C.; Bernauer, K. *J. R. Soc. Interface* **2005**, 2, 109-112.
- [26] (a) Sakaki, S.; Nishijima, Y.; Koga, H.; Ohkubo, K. *Inorg. Chem.* **1989**, 28, 4061-4063. (b) Sakaki, S.; Nishijima, Y.; Ohkubo, K. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1991**, 1143-1148.
- [27] (a) Ficke, J. T.; Pladziewicz, J. R.; Sheu, E. C.; Lappin, A. G. *Inorg. Chem.* **1991**, 30, 4282-4285. (b) Pladziewicz, J. R.; Gullerud, S. O.; Accola, M. A. *Inorg. Chim. Acta* **1994**, 225, 151-156.
- [28] Conrad, D. W.; Zhang, H.; Stewart, D. E.; Scott, R. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1992**, 114, 9909-9915.
- [29] (a) Tsukahara, K.; Kimura, C. *J. Electroanal. Chem.* **1997**, 438, 67-70. (b) Tsukahara, K.; Kiguchi, K.; Matsui, M.; Kubota, N.; Arakawa, R.; Sakurai, T. *J. Biol. Inorg. Chem.* **2000**, 5, 765-773. (c) Tsukahara, K.; Iida, N.; Kaida, Y.; Takashima, H.; Mizobe, M.; Arakawa, R. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2003**, 76, 1323-1328.
- [30] (a) Kumita, H.; Asai, N.; Sakurai, T.; Jitsukawa, K.; Ozawa, T.; Masuda, H.; Einaga, H. *Inorg. Chem. Commun.* **2000**, 3, 185-187. (b) Kato, T.; Takahashi, I.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Masuda, H. *Adv. Mater. Res.* **2006**, 11-12, 343-346. (c) Kato, T.; Kumita, H.; Takahashi, I.; Murakami, A.; Yoshimoto, K.; Ikeue, Y.; Kataoka, K.; Suzuki, S.; Sakurai, T.; Ozawa, T.; Jitsukawa, K.; Masuda, H. *Inorg. Chim. Acta*, in press (2007). (d) Kato, T.; Takahashi, I.; Kumita, H.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Jitsukawa, K.; Masuda, H. *Inorg. Chem. Commun.*, submitted.
- [31] (a) Eddows, M. J.; Hill, H. A. O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 771-772. (b) Eddows, M. J.; Hill, H. A. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, 101, 4461-4464. (c) Allen, P. M.; Hill, H. A. O.; Walton, N. J. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, 178, 69-86. (d) Gleria, K. D.; Hill, H. A. O.; Lowe, V. J.; Page, D. J. *J. Electroanal. Chem.* **1986**, 213, 333-338. (e) Hill, H. A. O.; Whitford, D. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, 235, 153-167. (f) Kazlauskaitė, H.; Hill, H. A. O.; Wilkins, P. C.; Dalton, H. *Eur. J. Biochem.* **1996**, 241, 552-556. (g) Hill, H. A. O.; Bond, A. M. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, 209, 263-331. (h) Astier, Y.; Canters, G. W.; Davis, J. J.; Hill, H. A. O.; Verbeet, M. P.; Wijma, H. J. *Chem. Phys. Chem.* **2005**, 6, 1114-1120.
- [32] (a) Taniguchi, I.; Toyosawa, K.; Yamaguchi, H.; Yasukouchi, K. *J. Electroanal. Chem.* **1982**, 140, 187-193. (b) Taniguchi, I.; Murakami, T.; Toyosawa, K.; Yamaguchi, H.;

- Yasukouchi, K. *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *131*, 397-401. (c) Taniguchi, I.; Iseki, M.; Toyosawa, K.; Yamaguchi, H.; Yasukouchi, K. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *164*, 385-391. (d) Taniguchi, I.; Iseki, M.; Yamaguchi, H.; Yasukouchi, K. *J. Electroanal. Chem.* **1985**, *186*, 299-307. (e) 谷口功; 安河内一夫 *表面* **1985**, *23*, 597-614. (f) 谷口功 *電気化学* **1988**, *56*, 158-162. (g) Taniguchi, I.; Kajiwara, M.; Kai, T.; Muraguchi, R.; Tonemura, K.; Nishiyama, K. *Chemical Sensors* **1993**, *9 Suppl. B*, 239-242. (h) Taniguchi, I.; Yoshimoto, S.; Nishiyama, K. *Chem. Lett.* **1997**, 353-354. (i) Sawaguchi, T.; Mizutani, F.; Yoshimoto, S.; Taniguchi, I. *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2861-2867.
- [33] Liu, H.; Yamamoto, H.; Wei, J.; Waldeck, D. H. *Langmuir* **2003**, *19*, 2378-2387.
- [34] Terrettaz, S.; Cheng, J.; Miller, C. J.; Guiles, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7857-7858.
- [35] (a) Dolidze, T. D.; Khoshtariya, D. E.; Waldeck, D. H.; Macyk, J.; van Eldik, R. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 7172-7179. (b) Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Sarauli, D.; van Eldik, R. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2006**, *45*, 277-281. (c) Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Seifert, S.; Sarauli, D.; Lee, G.; van Eldik, R. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7041-7056.
- [36] (a) Diógenes, I. C. N.; Nart, F. C.; Temperini, M. L. A.; Moreira, I. S. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 4884-4889. (b) Corio, P.; Andrade, G. F. S.; Diógenes, I. C. N.; Moreira, I. S.; Nart, F. C.; Temperini, M. L. A. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *520*, 40-46. (c) Diógenes, I. C. N.; de Sousa, J. R.; de Carvalho, I. M. M.; Temperini, M. L. A.; Tanaka, A. A.; Moreira, I. S. *Dalton Trans.* **2003**, 2231-2236. (d) de Sousa, J. R.; Batista, A. A.; Diógenes, I. C. N.; Andrade, G. F. S.; Temperini, M. L. A.; Lopes, L. G. F.; Moreira, I. S. *J. Electroanal. Chem.* **2003**, *543*, 93-99. (e) de Sousa, J. R.; Parente, M. M. V.; Diógenes, I. C. N.; Lopes, L. G. F.; Neto, P. L.; Temperini, M. L. A.; Batista, A. A.; Moreira, I. S. *J. Electroanal. Chem.* **2004**, *566*, 443-449.
- [37] Haladjian, J.; Bianco, P.; Pilard, R. *Electrochim. Acta* **1983**, *28*, 1823-1828.
- [38] Lamp, B. D.; Hobara, D.; Porter, M. D.; Niki, K.; Cotton, T. M. *Langmuir* **1997**, *13*, 736-741.
- [39] Fedurco, M. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209*, 263-331.
- [40] Battistuzzi, G.; Borsari, M.; Sola, M.; Francia, F. *Biochemistry* **1997**, *36*, 16247-16258.
- [41] (a) Yamaguchi, K.; Deligeer; Nakamura, N.; Shidara, S.; Iwasaki, H.; Suzuki, S. *Chem. Lett.* **1995**, 353-354. (b) Suzuki, S.; Nakamura, N.; Yamaguchi, K.; Kataoka, K.; Inoue, T.; Nishio, N.; Kai, Y.; Tobar, J. *J. Biol. Inorg. Chem.* **1999**, *4*, 749-758.
- [42] Pinho, D.; Besson, S.; Brondino, C. D.; de Castro, B.; Moura, I. *Eur. J. Biochem.* **2004**, *271*, 2361-2369.
- [43] (a) Sakurai, T.; Nose, F. *Chem. Lett.* **1995**, 1075-1076. (b) Sakurai, T.; Nose, F.; Fujiki, T.; Suzuki, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 2855-2862.
- [44] Erabi, T.; Yuasa, H.; Hirata, K.; Wada, M. *Chem. Express* **1989**, *4*, 809-812.
- [45] (a) Kohzuma, T.; Takase, S.; Shidara, S.; Suzuki, S. *Chem. Lett.* **1993**, 149-152. (b) Kohzuma, T.; Shidara, S.; Suzuki, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 138-143.
- [46] (a) Friedrich, M. G.; Gieß, F.; Naumann, R.; Knoll, W.; Ataka, K.; Heberle, J.; Hrabakova, J.; Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. *Chem. Commun.* **2004**, 2376-2377. (b) Ataka, K.; Giess, F.; Knoll, W.; Naumann, R.; Haber-Pohlmeier, S.; Richter, B.; Heberle, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 16199-16206.
- [47] Marx-Tibbon, S.; Katz, E.; Willner, I. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 9925-9926.
- [48] Tao, G.; Katz, E.; Willner, I. *Chem. Commun.* **1997**, 2073-2074.
- [49] (a) Tarlov, M. J.; Bowden, E. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1991**, *113*, 1847-1849. (b) Song, S. S.; Clark, R. A.; Bowden, E. F.; Tarlov, M. J. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 6564-6572.
- [50] (a) Feng, Z. Q.; Imabayashi, S.; Kakiuchi, T.; Niki, K. *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* **1997**, *93*, 1367-1370. (b) Niki, K.; Sprinkle, J. R.; Margoliash, E. *Bioelectrochem.* **2002**, *55*, 37-40. (c) Niki, K. *Electrochemistry* **2002**, *70*, 82-90. (d) Niki, K.; Hardy, W. R.; Hill, M. G.; Li, H.; Sprinkle, J. R.; Margoliash, E.; Fujita, K.; Tanimura, R.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Richards, J. H.; Gray, H. B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9947-9949.

- [51] Dai, Z.; Ju, H. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **2001**, *3*, 3769-3773.
- [52] (a) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P. *J. Am. Chem. Soc.* **2001**, *123*, 4062-4068. (b) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P.; Wei, J.; He, Y. -F.; Liu, H.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2261-2269. (c) Yue, H.; Khoshtariya, D. E.; Waldeck, D. H.; Grochol, J.; Hildebrandt, P.; Murgida, D. H. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 19906-19913.
- [53] (a) Yamamoto, H.; Liu, H.; Waldeck, D. H. *Chem. Commun.* **2001**, 1032-1033. (b) Wei, J.; Liu, H.; Dick, A. R.; Yamamoto, H.; He, Y.; Waldeck, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9591-9599. (c) Wei, J.; Liu, H.; Khoshtariya, D. E.; Yamamoto, H.; Dick, A.; Waldeck, D. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4700-4703. (d) Khoshtariya, D. E.; Wei, J.; Liu, H.; Yue, H.; Waldeck, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7704-7714. (e) Wei, J. J.; Liu, H.; Niki, K.; Margoliash, E.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16912-16917. (f) Petrović, J.; Clark, R. A.; Yue, H.; Waldeck, D. H.; Bowden, E. F. *Langmuir* **2005**, *21*, 6308-6316. (g) Yue, H.; Waldeck, D. H.; Petrović, J.; Clark, R. A. *J. Phys. Chem. B* **2006**, *110*, 5062-5072.
- [54] Chen, X.; Ferrigno, R.; Yang, J.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 7009-7015.
- [55] (a) Ataka, K.; Heberle, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 4986-4987. (b) Ataka, K.; Heberle, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 9445-9457.
- [56] (a) Imabayashi, S.; Mita, T.; Kakiuchi, T. *Langmuir* **2005**, *21*, 1470-1474. (b) Imabayashi, S.; Mita, T.; Kakiuchi, T. *Langmuir* **2005**, *21*, 2474-2479.
- [57] Wu, Y.; Hu, S. *Bioelectrochem.* **2006**, *68*, 105-112.
- [58] DiCarlo, C. M.; Compton, D. L. *Chem. Commun.* **2005**, 218-220.
- [59] Bianco, P. *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *82*, 393-409.
- [60] Scheller, F. W.; Wollenberger, U.; Lei, C.; Jin, W.; Ge, B.; Lehmann, C.; Lisdat, F.; Fridman, V. *Rev. Mol. Biotech.* **2002**, *82*, 411-424.
- [61] Armstrong, F. A.; Barlow, N. L.; Burn, P. L.; Hoke, K. R.; Jeuken, L. J. C.; Shenton, C.; Webster, G. R. *Chem. Commun.* **2004**, 316-317.
- [62] Fujita, K.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Leigh, B. S.; Niki, K.; Gray, H. B.; Richards, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13954-13961.
- [63] Gaigalas, A. K.; Niaura, G. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *193*, 60-70.
- [64] (a) Chi, Q.; Zhang, J.; Nielsen, J. U.; Friis, E. P.; Chorkendorff, I.; Canters, G. W.; Andersen, J. E. T.; Ulstrup, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4047-4055. (b) Chi, Q.; Zhang, J.; Andersen, J. E. T.; Ulstrup, J. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4669-4679. (c) Fristrup, P.; Grubb, M.; Zhang, J.; Christensen, H. E. M.; Hansen, A. M.; Ulstrup, J. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *511*, 128-133. (d) Zhang, J.; Welinder, A. C.; Hansen, A. G.; Christensen, H. E. M.; Ulstrup, J. *J. Phys. Chem.* **2003**, *107*, 12480-12484. (e) Zhang, J.; Christensen, H. E. M.; Ooi, B. L.; Ulstrup, J. *Langmuir* **2004**, *20*, 10200-10207. (f) Wackerbarth, H.; Tofteng, A. P.; Jensen, K. J.; Chorkendorff, I.; Ulstrup, J. *Langmuir* **2006**, *22*, 6661-6667.
- [65] (a) Mrksich, M.; Grunwell, J. R.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12009-12010. (b) Lahiri, J.; Isaacs, L.; Tien, J.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 777-790. (c) Lahiri, J.; Isaacs, L.; Grzybowski, B.; Carbeck, J. D.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1999**, *15*, 7186-7198. (d) Chapman, R. G.; Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2000**, *16*, 6927-6936. (e) Ostuni, E.; Grzybowski, B. A.; Mrksich, M.; Roberts, C. S.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1861-1872. (f) Love, J. C.; Estroff, L. A.; Kriebel, J. K.; Nuzzo, R. G.; Whitesides, G. M. *Chem. Rev.* **2005**, *105*, 1103-1169.
- [66] Kumita, H.; Jitsukawa, K.; Masuda, H.; Einaga, H. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *283*, 160-166.

第 2 章

電極表面に固定化した Co^{III} 錯体と cyt c との会合過程を経由した電子移動反応

2.1. 序論

Cytochrome *c* (cyt *c*)は活性中心にヘム *c* を含有した電子移動蛋白質であり、呼吸鎖内において cytochrome *c* reductase から cytochrome *c* peroxidase, cytochrome *c* oxidase への電子移動を媒介している。^[1] 一般に、生体分子間の電子移動反応時には、蛋白質間における非共有結合性相互作用を用いた電子移動会合体を形成することが知られており、特に cyt *c* の場合には蛋白質表面に多数存在する Lys 残基が会合体形成に重要であることが(Figure 2-1)、種々の Lys 修飾 cyt *c* を用いた検討により明らかとされている。^[1,2]

この様に電子授受が生来の役割である cyt *c* は、活性中心であるヘムが蛋白質内部に大きく埋没していること(Figure 2-1)、貴金属電極表面への吸着変性などの理由により、貴金属電極(Au, Pt など)を用いた電気化学測定の場合には酸化還元応答を示さないことが知られていた。しかし、1977年に Hill らは 4,4'-bipyridine を cyt *c* 溶液内に混在させることにより、cyt *c* -金電極間の可逆的な酸化還元応答を得ることに成功した。^[3a] 後の研究により、4,4'-bipyridine は片方の N 原子により金表面に吸着し、もう片方の N 原子により cyt *c* と非共有結合的に相互作用していることが示された。^[3] 4,4'-bipyridine 自身は cyt *c* の酸化還元電位 (+55 mV vs. Ag/AgCl^[1])近傍においては電気化学的に不活性であるにも関わらず、cyt *c*-Au 間の電子移動反応を促進していることから、この種の分子は”プロモーター”と呼ばれている。Hill の報告以降、50 種類を超えるプロモーター分子が様々な研究者により報告されており、^[3-7] プロモーター分子には cyt *c* の Lys 残基との非共有結合性相互作用が重要であることが示されている。しかし、cyt *c* が認識しているのは静電的、水素結合的に相互作用可能な膜表面であり、修飾分子自身ではない。

本章では、cyt *c* -修飾分子間の相互作用を検討するため、Phe 誘導体配位子の不斉のみが異なる Co^{III} 錯体(2)を合成し、その修飾電極(2-Au)の cyt *c* に対するプロモーター活性について検討を行った(Scheme 2-1)。ここで、cyt *c* との静電的な相互作用を働かせるため各 Co^{III} ユニットには負電荷(-1)を、金表面への修飾を行うためにジスルフィド結合を 2 に導入した。2-Au は 2 の浸漬条件により様々な表面被覆率を示し、その表面被覆率が cyt *c* との電子移動反応に大きな影響を与えることを発見した。それらの結果から、cyt *c*-Co^{III} ユニット間における会合過程を経由した電子移動反応であることを明らかとした。以下にその詳細を述べる。

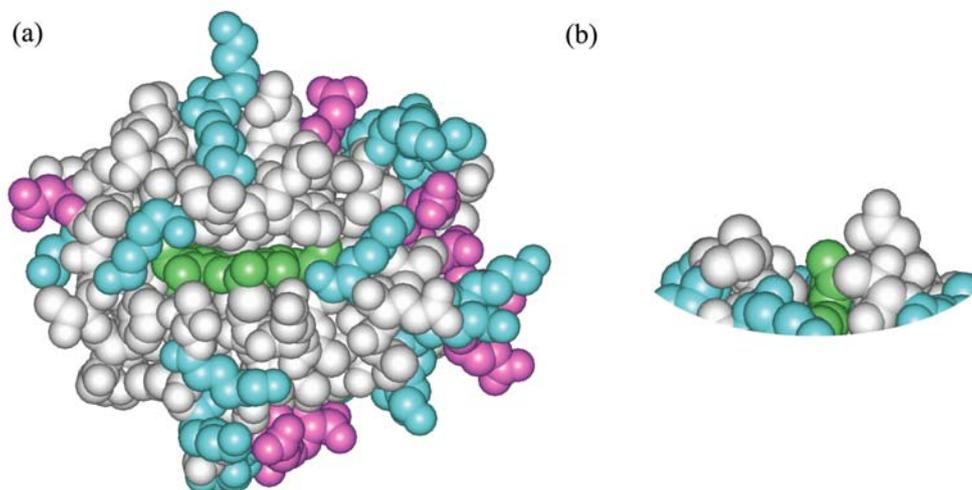
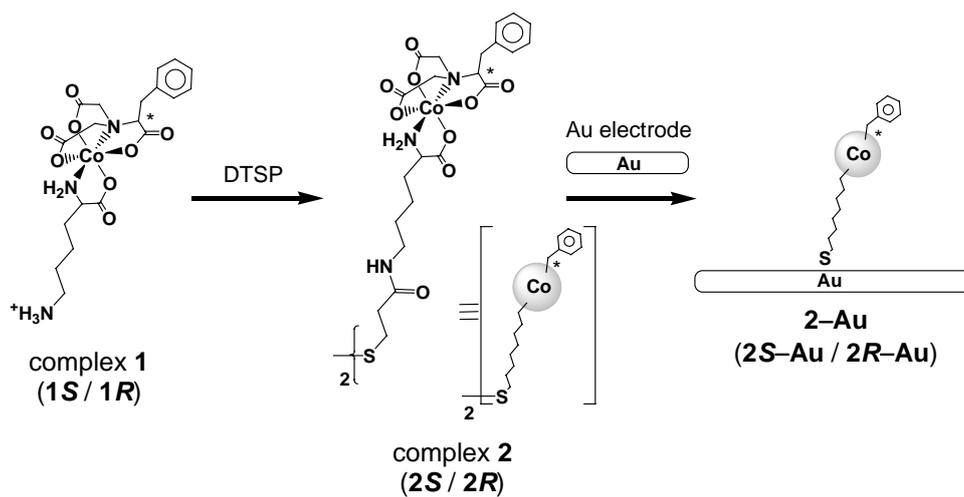


Figure 2-1. Overall structure of horse heart cyt *c* (PDB code: 1HRC) (a) and local structure around heme (b) denoted by CPK model (Green: heme, blue: basic residue, red: acidic residue).



Scheme 2-1. Schematic view of Co^{III} complexes (**1**, **2**) and modified Au electrode with **2** (**2-Au**)

2.2. 実験

全ての試薬・溶媒は、ペプチド研究所、ナカライテスク、和光純薬、東京化成から購入したものをそのまま使用した。ミリQ水は Millipore Milli-Q biocel A により得た。アニオン交換クロマトグラフィーに用いた QAE Sephadex A-25 (Cl⁻ form)は Pharmacia より、ゲル濾過クロマトグラフィーに用いた バイオゲル P-2 (Extra Fine)は BIO-RAD より購入した。金電極用に用いた金線($\phi = 0.30$ mm)および金板($d = 0.1$ mm)はそれぞれ田中貴金属より購入した。(S)-/(R)-BCMPA は (S)-/(R)-phenylalanine から既報の方法に従ってそれぞれ合成した。^[8]

2.2.1. 錯体合成

錯体(**1**, **2**)は、Scheme 2-2 に従って合成を行った。

2.2.1.1. **1S/1R** の合成

CoCl₂·6H₂O 1.2 g (5 mmol)を 3 mL の水に溶解し、30 % H₂O₂ 水溶液(2 mL)を加えた。この溶液を、KHCO₃ 3.5 g (35 mmol)の水溶液(30 mL)に氷浴中でゆっくりと加えた。反応溶液を濾過した後、KOH で中和した(S)-/(R)-BCMPA 1.55 g (5.5 mmol)の水溶液(50 mL)に加え、室温にて一晩攪拌した。この溶液に、(S)-Lys·HCl 0.91 g (5 mmol)を 10 mL の水に溶解し、4 N KOH 水溶液により pH 7 に調整した溶液を加えた後、6 N HCl 水溶液により pH 7 に調整した。活性炭を少量加え、50 °C にて 6 時間攪拌した後、活性炭を濾去した。得られた濾液を減圧濃縮し、MeOH により数回脱塩した。残渣を少量(3 mL)の水に溶解し、アニオン交換クロマトグラフィー(QAE-Sephadex A-25)を行ったところ、水(イオン強度なし)にて赤紫色バンドを溶離した。この溶液を減圧濃縮し、MeOH により脱塩した。残渣を少量(3 mL)の水に溶解し、アニオン交換クロマトグラフィー(QAE-Sephadex A-25)を非常に遅い流速(30 秒/滴)で行ったところ、水にて青紫色(*cis*(N)-体)および赤紫色(*trans*(N)-体)のバンドが溶離した。精製した赤紫色溶液を減圧濃縮し、MeOH 中で再沈澱操作を行うことにより赤紫色粉末を得た。得られた粉末を真空乾燥し、各種測定を行った。

Yield 358 mg (15 %, **1S**) and 188 mg (7.8 %, **1R**). ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): $\delta = 1.69$ (m, 2H, γ -CH₂-(Lys)), 1.74 (m, 2H, δ -CH₂-(Lys)), 1.92 (m, 1H, β -CH₂-(Lys)), 2.03 (m, 1H, β -CH₂-(Lys)), 3.06 (t, 2H, $J = 7.3$ Hz, ϵ -CH₂-(Lys)), 3.24 (d, 1H, $J = 16.6$ Hz, -CH₆₂-(BCMPA)), 3.50 (dd, 1H, $J = 4.6, 15.1$ Hz, β -CH₂-(BCMPA)), 3.62 (dd, 1H, $J = 10.1, 15.1$ Hz, β -CH₂-(BCMPA)), 3.88 (dd, 1H, $J = 4.5, 8.2$ Hz, α -H(Lys)), 3.95 (d, 1H, $J = 18.1$ Hz,

-CH_{R2}-(BCMPA)), 4.18 (d, 1H, *J* = 16.6 Hz, -CH_{G2}-(BCMPA)), 4.61 (d, 1H, *J* = 18.1 Hz, -CH_{R2}-(BCMPA)), 5.03 (dd, 1H, *J* = 5.5, 10.4 Hz, α -H(BCMPA)), 7.44 (t, 1H, *J* = 7.6 Hz, *p*-H(BCMPA)), 7.52 (t, 2H, *J* = 7.9 Hz, *m*-H(BCMPA)), 7.61 (d, 2H, *J* = 7.8 Hz, *o*-H(BCMPA)). MS (ESI-TOF): *m/z*: 569.0 [M - H⁺]. Anal. calcd. for **1S**·2.5H₂O (C₁₉H₃₁N₃CoO_{10.5}): C, 43.19; H, 5.91; N, 7.95. Found: C, 43.04; H, 5.84; N, 8.16. Anal. calcd. for **1R**·2H₂O (C₁₉H₃₀N₃CoO₁₀): C, 43.94; H, 5.82; N, 8.09. Found: C, 44.07; H, 5.55; N, 8.02.

2.2.1.2. **2S/2R** の合成

1S/1R 48.3 mg (0.1 mmol)を少量の 0.1 M KCl 水溶液に溶解し、減圧濃縮した後に DMSO に溶解した。この DMSO 溶液にトリエチルアミン 0.01 g (0.1 mmol)を加え、DMSO 10 mL に溶解した DTSP 20.2 mg (0.05 mmol)を室温にてゆっくりと滴下した。3 時間攪拌した後、減圧濃縮し、水に溶解した。0.1 M KOH 水溶液にて pH 7 に調整した後、減圧濃縮し、MeOH にて数回脱塩した。残渣を少量(3 mL)の水に溶解し、ゲル濾過クロマトグラフィー(バイオゲル P-2)により精製した。得られた精製物を水/EtOH にて再沈澱操作を行うことにより、赤紫色粉末を得た。得られた粉末を真空乾燥し、各種測定を行った。

Yield 24.8 mg (46 %, **2S**) and 18.9 mg (51 %, **2R**). ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 1.62 (m, 8H, δ + γ -CH₂-(Lys)), 1.86 (m, 2H, β -CH₂-(Lys)), 1.97 (m, 2H, β -CH₂-(Lys)), 2.63 (t, 4H, *J* = 6.9 Hz, S-CH₂-CH₂-(DTSP)), 2.92 (t, 4H, *J* = 6.8 Hz, S-CH₂-CH₂-(DTSP)), 3.23 (d, 2H, *J* = 16.7 Hz, -CH_{G2}-(BCMPA)), 3.24 (m, 4H, ϵ -CH₂-(Lys)), 3.49 (dd, 2H, *J* = 4.4, 14.9 Hz, β -CH₂-(BCMPA)), 3.60 (dd, 2H, *J* = 10.0, 14.9 Hz, β -CH₂-(BCMPA)), 3.83 (dd, 2H, *J* = 4.7, 8.6 Hz, α -H(Lys)), 3.94 (d, 2H, *J* = 18.2 Hz, -CH_{R2}-(BCMPA)), 4.15 (d, 2H, *J* = 16.7 Hz, -CH_{G2}-(BCMPA)), 4.59 (d, 2H, *J* = 18.2 Hz, -CH_{R2}-(BCMPA)), 5.01 (dd, 2H, *J* = 5.0, 10.3 Hz, α -H(BCMPA)), 7.43 (t, 2H, *J* = 7.3 Hz, *p*-H(BCMPA)), 7.50 (t, 4H, *J* = 7.4 Hz, *m*-H(BCMPA)), 7.60 (d, 4H, *J* = 7.5 Hz, *o*-H(BCMPA)). MS (ESI-TOF): *m/z*: 569.0 [M - 2K]²⁺. Anal. calcd. for **2S**·4H₂O (C₄₄H₆₄N₆Co₂K₂O₂₂S₂): C, 40.99; H, 5.00; N, 6.52. Found: C, 40.83; H, 5.14; N, 6.40. Anal. calcd. for **2R**·5H₂O (C₄₄H₆₆N₆Co₂K₂O₂₃S₂): C, 40.43; H, 5.09; N, 6.43. Found: C, 40.34; H, 4.81; N, 6.34.

2.2.2. 測定機器

2.2.2.1. UV-vis スペクトル

測定装置は日本分光社製 Ubest V-570 spectrophotometer を使用し、200-900 nm について測定した。セルは光路長 1 cm の石英セルを使用し、サンプルは錯体濃度 1 mM の水溶液を

用いた。

2.2.2.2. CD スペクトル

測定装置は日本分光社製 J-820 spectrophotometer を使用し、300-700 nm について測定した。セルは光路長 1 cm の石英セルを使用し、サンプルは錯体濃度 1 mM の水溶液を用いた。

2.2.2.3. $^1\text{H-NMR}$ スペクトル

測定装置は BRUKER 社製 AVANCE-600 spectrometer を使用し、 $\delta = -0.2-9.8$ ppm について測定した。内径 5 mm のサンプルチューブを使用し、サンプルは錯体濃度 0.1-1 mM の D_2O 溶液を用いた。ケミカルシフトは内部標準の DSS を基準として表記した。

2.2.2.4. ESI-TOF Mass スペクトル

測定装置は Micromass 社製 LCT ESI-TOF spectrometer を使用し、 $m/z = 100-1500$ について negative mode で測定した。サンプルは錯体濃度 10 μM の MeOH 溶液を使用し、マイクロシリンジを用いてシリンジポンプ (300 $\mu\text{L/h}$) により溶液を噴霧した。校正は NaI を用いて行った。

2.2.2.5. 有機微量元素分析

測定装置は Perkin Elmer 社製 2400II CHNS/O を使用した。試料測定前にガスブランク測定を行った後、錫箔に封入したサンプル (約 1.5 mg) を 2 回測定し、それを元素分析用アセトアニリド標準試料による補正を行うことで C, H, N の各元素含有量の比を算出した。

2.2.3. 錯体修飾電極の作製

2.2.3.1. 多結晶性金電極の作製および洗浄

多結晶性金電極は、金板から切り取った金ディスク ($\phi = 6$ mm) と金線をスポットウェルディングしたものを使用した。金電極は混酸 (濃硝酸 : 濃硫酸 = 1 : 1) 溶液中で 30 分間煮沸洗浄した後、ミリ Q 水中にて超音波洗浄を数回行った。洗浄した金電極を水素炎でアニールし、水素飽和のミリ Q 水中で十分にクエンチした後、各種溶液に浸漬した。

2.2.3.2. 多結晶性金電極の表面積算出

金電極の表面積は、アニール・クエンチ処理後の金電極を用いた 0.1 M H_2SO_4 水溶液中での CV 測定を行い (Figure 2-2)、酸化被膜の還元反応時の電気量 (理論値: 444 $\mu\text{C cm}^{-2}$ [9]) か

ら算出した($A = 0.796 \text{ cm}^2$, roughness factor: 1.36)。

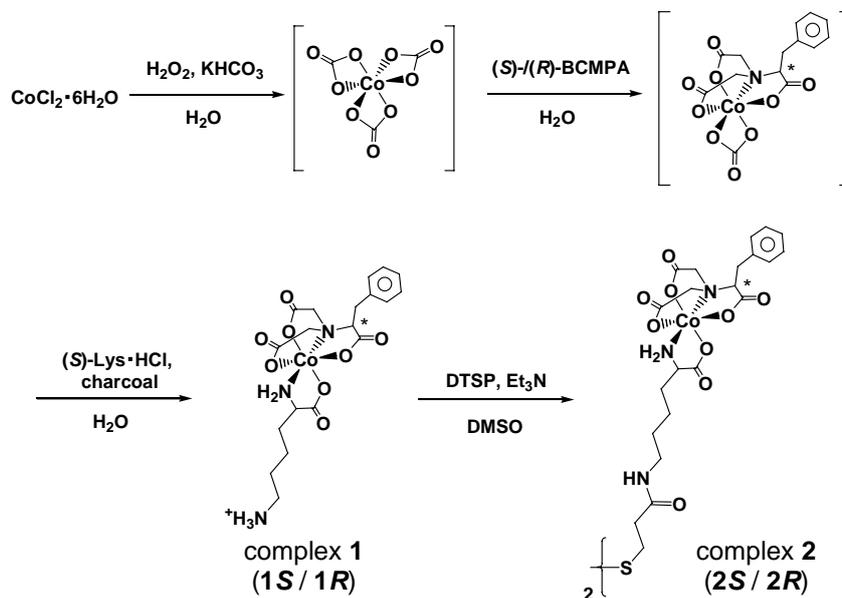
2.2.3.3. 錯体(2)の修飾

2S-Au および **2R-Au** は、2.2.3.1 項にて洗浄した多結晶性金電極を 1 mM の **2S/2R** 水溶液に浸漬することでそれぞれ作製し、水にてリンスした後に各種電気化学測定に使用した。

2.2.4. 電気化学測定

測定装置は BAS 社製 CV-50W および北斗電工社製 HZ-5000 automatic polarization system を使用した。測定は三電極系で行い、作用極にグラッシーカーボン(GC)および種々の修飾電極、対極に Pt 線、参照極に Ag/AgCl (3 M NaCl)を使用した。測定前に約 15 分間 Ar バブリングすることで溶存酸素を除去した。測定には 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, $I = 0.1 \text{ M (NaClO}_4)$)溶液もしくは 0.5 M KOH 水溶液のいずれかを用いて行った。

また cyt *c* 溶液は、ナカライテスクより購入した horse heart cytochrome *c* (cyt *c*)の 100 μM (0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, $I = 0.1 \text{ M (NaClO}_4)$))溶液を調製し、同 buffer 溶液中にて数回透析した後に測定に使用した。



Scheme 2-2. Synthesis process of complex 2

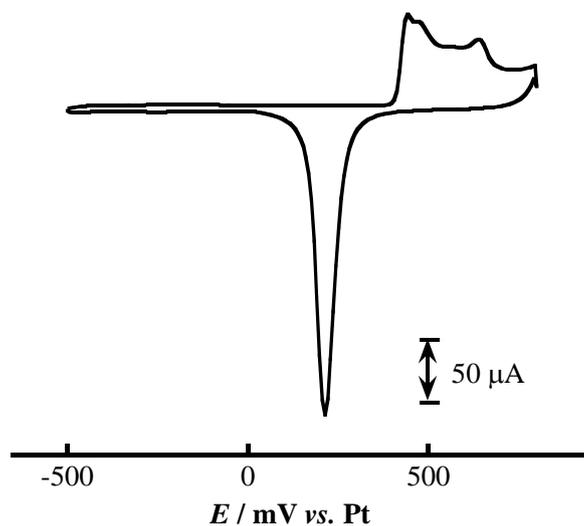


Figure 2-2. Cyclic voltammogram measured with bare polycrystalline Au electrode in 0.1 M H_2SO_4 aqueous solution. Scan rate is 50 mV s^{-1} .

2.3. 結果・考察

2.3.1. Co^{III} 錯体(**1**, **2**)の構造と性質

錯体 **1** は、(*S*)-lysine の配位形式によって 2 つの構造異性体(*trans*(N)-体, *cis*(N)-体)が生成するが、本研究においては主生成物である *trans*(N)-体を使用した。また、側鎖の Bzl 基は N₂O₂ 平面に対してエカトリアル方向に位置することが分光測定および X 線結晶構造から明らかとされている。^[10]

合成した錯体 **1**, **2** の水溶液中において UV-vis スペクトルを測定したところ、いずれも 372, 509 nm に 2 つの *d-d* 遷移を観測した(Figure 2-3, Table 2-1)。同様の配位子骨格を有した *trans*(N)-K[Co^{III}((*S*)-bcmpa)((*S*)-phenylalanine)]錯体のスペクトル(373 (170), 510 nm (170 M⁻¹ cm⁻¹)^[10])と非常によく一致を示したことから、**1**, **2** は同様に *trans*(N)-[Co^{III}(N)₂(O)₄]型の配位形式であると推定される。**1S** の水溶液中における CD スペクトルは *trans*(N)-K[Co^{III}((*S*)-bcmpa)((*S*)-phenylalanine)]錯体のスペクトル(375 (+0.43), 485 (-1.14), 543 (+0.31), 609 nm (+0.18 M⁻¹ cm⁻¹)^[10])と類似であった(Figure 2-4, Table 2-1)。また、**1R** の場合では 610 nm 付近のコットン効果が完全に反転していたため、これが Phe 部位の不斉に誘起されたものと考えられる。また、**2** のモル吸光係数(ϵ)、モル円二色性($\Delta\epsilon$)は **1** に比べていずれも約 2 倍の値を示していたことから、**1** の dimer であると考えられる。

1, **2** の 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)中における CV 測定を行い、**2R** のボルタモグラムを Figure 2-5a に示した。いずれも Co^{III}と帰属される不可逆な還元波のみが観測され、**2** の還元電位は約 -300 mV vs. Ag/AgCl であった(Table 2-1)。このような酸化還元挙動は *trans*(N)-K[Co^{III}((*S*)-bcmpa)((*S*)-phenylalanine)]錯体を用いた場合の還元電位(-330 mV^[10])と類似であった。Cyt *c* の酸化還元電位(+55 mV^[11])付近では Co^{III} ユニットの酸化還元は起きないため、Co の酸化還元を介した cyt *c* との電子移動反応は進行しないものと考えられる。実際に、GC を作用極として **1S** を含む cyt *c* 溶液中にて測定したボルタモグラムは、**1S** の有無に関わらず cyt *c* に由来する酸化還元応答を示さなかった(Figure 2-6)。従って、cyt *c* 溶液中に共存する **1S** は金電極-cyt *c* 間の電子移動反応に影響を与えないことが明らかとなった。

2.3.2. 錯体修飾電極の評価

錯体修飾電極(**2-Au**)は、洗浄処理を行った金電極を **2** の 1 mM 水溶液中に浸漬することで作製した。ここで、**2-Au** の表面被覆率は浸漬時間、浸漬温度により大きく変化した。**2S-Au** および **2R-Au** の被覆率は、同じ浸漬条件の場合には類似の値を示したため、以下 **2R-Au** の

場合についてのみ示した。

5 °C および 25 °C にて 3 日間浸漬した **2R-Au** を用いた 0.1 M phosphate buffer 溶液中における CV 測定を行い、そのボルタモグラムを Figure 2-5b, 2-5c にそれぞれ示した。いずれのボルタモグラムにおいても、**2R** 溶液中(Figure 2-5a)と同様に不可逆な還元波のみが観測された。この還元波は 2 サイクル目では観測されなかったため、Co^{III} ユニットの還元波と帰属した。**2R-Au** の還元電位はいずれも類似の値(-360 mV)を示しており、**2R** 溶液中の還元電位(-310 mV)に比べて負側にシフトしていた。Co^{III} ユニットの還元反応は錯体電荷の変化を伴うため、この負電位シフトは Co^{III} ユニット間の静電反発もしくはカウンターカチオンの出入りによる影響と考えられる。また、この還元電位は cyt *c* の酸化還元電位(+55 mV^[1])と比べて十分に負側に位置するため、cyt *c* 溶液中における電気化学測定時に Co の酸化還元の影響は無視出来る。**2R-Au** の Co^{III} ユニット当たりの表面被覆率(Γ_{Co})を式(1)から算出した。

$$\Gamma_{Co} = Q_{Co} / (nFA) \quad (1)$$

ここで、 Q_{Co} はそれぞれの還元波の電気量、 n は反応電子数、 F はファラデー定数、 A は電極表面積である。得られた表面被覆率(Γ_{Co})は、それぞれ 3.6×10^{-11} (5 °C), 1.9×10^{-10} mol cm⁻² (25 °C)であった。また、別途作製した **2R-Au** の 0.5 M KOH 水溶液中における還元脱離測定から推定された表面被覆率(Γ_{des})は、それぞれ 3.5×10^{-11} (5 °C), 1.7×10^{-10} mol cm⁻² (25 °C)であった。この 2 種の方法により算出した表面被覆率は互いによく一致していたことから、buffer 溶液中における還元波は Co^{III} の還元反応に由来し、KOH 水溶液中における還元波は Co ユニットの脱離反応に由来するものと帰属した。25 °C にて 3 日間浸漬した **2R-Au** の表面被覆率は、5 °C の場合に比べて約 5 倍も大きな値を示すことがわかった。

5 °C, 25 °C にて浸漬した場合の **2R-Au** の表面被覆率(Γ_{des})の時間変化を Figure 2-7 に示した。25 °C では、表面被覆率は時間に伴って増加し、 $(1.7-1.9) \times 10^{-10}$ mol cm⁻² で飽和に達した。Co^{III} ユニットが理想的に表面に配向した場合の理論計算値は、 3.6×10^{-10} mol cm⁻² であり、25 °C における最大値はそれに近い値であった。従って、25 °C にて 3 日間浸漬した **2R-Au** は、金表面上において Co^{III} ユニットが密にオーダーしているものと考えられる。5 °C では、1-3 日で被覆率は一旦飽和する($(3.5-4.3) \times 10^{-11}$ mol cm⁻²)が、7 日後には再び増加した。

既報の有機チオール分子を用いた場合では数分から数時間で集積化が完了することから、^[3-7] **2** の集積化は非常に遅い。これは分子自体が既報の分子よりも大きなジスルフィド錯体であるために吸着速度自体が遅いこと、また負電荷を持った Co^{III} ユニットと金表面との静電的相互作用による安定化が原因と考えられる。一般に、金表面への分子吸着プロセスは、吸着した

分子が金表面に対して横になった状態で集積化した後、van der Waals 力などの非共有結合性相互作用により密にパッキングした状態へと移行する 2 段階のプロセスが提案されている。^[11] 5 °C 時では 25 °C 時よりも 5 倍も低い被覆率で安定化していることから、少なくとも浸漬中においては Co^{III} ユニットの金表面に対して横になった状態で安定化の寄与を受けているものと考えられる。さらに時間が経過することにより Co^{III} ユニットの不可逆的吸着が進行し、徐々に密なパッキング状態へと移行していると考えられる。25 °C において高い被覆率を示すのは、吸着速度の増加および表面上での Co^{III} ユニットの運動しやすさなどによって密な状態へと移行しやすいのが原因と推察される。この様な遅い集積挙動のために、様々な被覆率を有した表面状態を作製可能である点は本錯体系に特徴的なものである。

2.3.3. プロモーター能に対する表面被覆率依存性

25 °C および 5 °C にて 3 日間浸漬した **2R-Au** を用いた buffer 溶液中、cyt *c* 溶液中でのボルタモグラムの Figure 2-8 に示した。Buffer 溶液中(cyt *c* なし)では、測定電位範囲内において酸化還元応答を示さなかった。Cyt *c* 溶液中では、5 °C にて浸漬した **2R-Au** を用いた場合にのみ一対の酸化還元応答を観測した。得られた半波電位($E_{1/2}$)は +65 mV であり、cyt *c* の酸化還元電位(+55 mV^[11])と類似していたことから溶液中に存在する cyt *c*^{II/III} の酸化還元応答であると帰属した。2.3.1 項で記した様に、溶液中に **1** を混在させた場合では cyt *c* との電子移動は観測されなかったため、**2R** を金表面に吸着させることにより金電極-cyt *c* 間の電子移動が促進されたものと考えられる。しかし、25 °C にて浸漬した **2R-Au** を用いた場合では、cyt *c* の酸化還元応答はほとんど得られなかった。これは、本系における電子移動反応は **2R-Au** の表面被覆率に強く依存することを示している。

被覆率依存性をより詳細に検討するため、様々な表面被覆率を有した **2R-Au** を用いて cyt *c* 溶液中での CV 測定を行った。得られた応答のカソードピーク電流値(I_{pc})と表面被覆率(Γ_{des})の関係を Figure 2-9 にプロットした。Cyt *c* のピーク電流値は、**2R-Au** の表面被覆率が約 4.0×10^{-11} mol cm⁻² の時に最大となり、その後は被覆率の増加に伴って電流値は激減した。これは、cyt *c* が Co^{III} ユニットと相互作用するための最適な表面状態が存在することを示しており、上述の 5 °C にて 3 日間浸漬した **2R-Au** が最適な表面被覆率であることがわかった。従って、本系における電子移動反応は表面上における **2R** の表面密度が非常に重要であると考えられる。

上述の様に被覆率が増加することで、電子移動が進行しにくくなるという挙動は他のプロモーター系では観測されていない。^[3-7] Taniguchi らは Bis(4-pyridyl)disulfide の浸漬時間により被覆率をコントロールし、cyt *c* 溶液中での CV 測定を行ったところ cyt *c* のピーク電流値は被覆

率の増加に伴って増加した。^[5c] これは、cyt *c* との電子移動過程が本系と pyridine 系では大きく異なっていることを示している。Pyridine 系のプロモーターは、cyt *c* 表面の Lys 残基と pyridine N 原子との水素結合が重要であると言われている。^[5] 従って、相互作用可能な pyridine N 原子の数が增多ることにより、ピーク電流値が増加していくものと考えられる。すなわち、cyt *c* は pyridine 1 分子を認識して電子移動を行っているわけではない。しかし、本系の場合では修飾分子数の増加はピーク電流値の減少をもたらす。Cyt *c* が表面上に密に配向した場合の被覆率は $1.5 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ であり、^[12] 5 °C および 25 °C にて 3 日間浸漬した **2R-Au** の被覆率と比較すると、cyt *c* 1 分子に対して Co^{III} ユニットが 5 °C の場合では約 2 分子、25 °C の場合では約 10 分子存在していることになる。後者ではほとんど電子移動せず、前者では良好な応答が得られたことから、cyt *c* は Co^{III} ユニット 1 分子を認識して電子移動を行っているのではないかと考えられる。

2.3.4. Cyt *c* との電子移動メカニズム

Whitesides らは、arylsulfonamide (ASA) と tri(ethyleneglycol) 誘導体の混合分子膜を用いた carbonic anhydrase (CA) の ASA 部位への結合速度が、ASA の表面モル分率に強く依存することを報告している。^[13] この様な依存性は、CA の活性中心である Zn イオンが蛋白質表面から約 15 Å 離れた位置に存在すること、CA 分子自体が非常に巨大な分子であることにより発現されていると考えられる。ASA の表面密度が低い場合には、CA の結合・脱離過程は可逆的に進行する。しかし、ASA の表面密度が増加すると CA の結合速度は激減する。これは、CA 分子間の立体反発の影響と考えられている。この実験結果は、本系における **2R-Au** の被覆率に依存した電子移動挙動とよく一致している。すなわち、本系においては Co^{III} ユニットの Bzl 基がヘムクレバスに貫入 (penetrate) することで電子移動が進行しているのではないかと考えられる (Figure 2-10)。25 °C にて 3 日間浸漬した **2R-Au** の様に Co^{III} ユニットの表面被覆率が増加し、ユニット間の距離が狭くなると貫入が立体反発により妨げられ、電子移動反応が進行しない (応答が得られない) ものと考えられる (Figure 2-10)。従って、被覆率の増加により cyt *c*-Co^{III} ユニット間の会合体が形成しにくくなり、ピーク電流値が減少したと推察される。

この様に、本系における電子移動反応は cyt *c* が Co^{III} ユニット 1 分子を認識 (会合) する過程を経由していると考えられる。従って、本系における全体の電子移動過程は、1) 溶液中の cyt *c* が拡散により電極近傍に近づいてくる過程 (拡散速度 (k_D)), 2) 電極表面に存在する cyt *c* が Co^{III} ユニットとの会合体を形成する過程 (会合速度 (k_A)), 3) 電子が移動する過程 (電子移動速度 (k_{ET})) の 3 つの過程により進行していると考えられる。

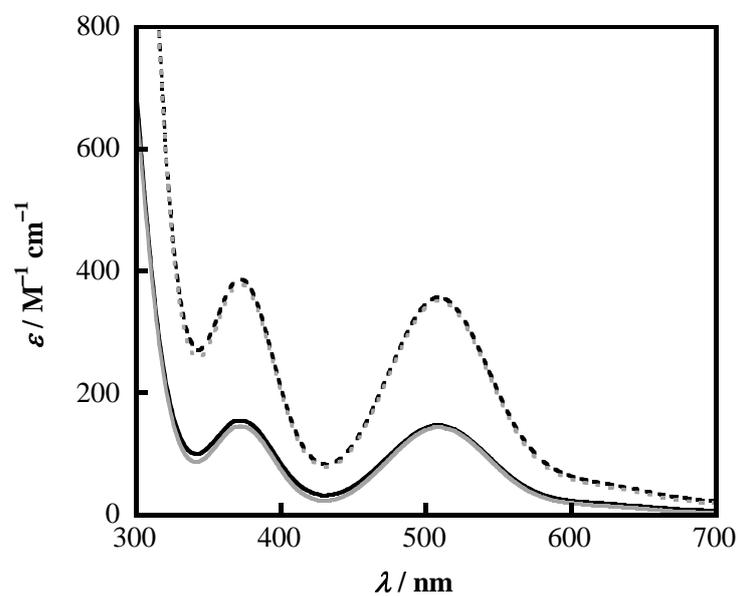


Figure 2-3. UV-vis spectra of complexes **1** (solid line) and **2** (dashed line) in an aqueous solution (Black: (*S*)-isomer, gray: (*R*)-isomer).

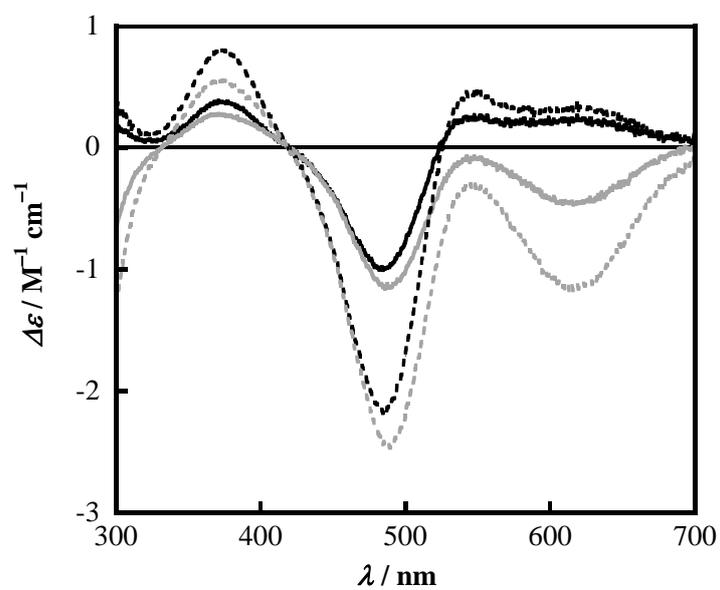


Figure 2-4. Circular dichroism spectra of complexes **1** (solid line) and **2** (dashed line) in an aqueous solution (Black: (*S*)-isomer, gray: (*R*)-isomer).

Table 2-1. UV-vis, CD spectral and electrochemical data for **1** and **2**

	UV-vis ^a		CD ^a				CV ^b
	$\lambda / \text{nm} (\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$		$\lambda / \text{nm} (\Delta\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$				$E_{\text{red}} / \text{mV}$
1S	372 (160)	509 (150)	371 (+0.39)	484 (-1.0)	543 (+0.26)	610 (+0.25)	-450
1R	372 (150)	509 (140)	371 (+0.28)	485 (-1.1)	-	613 (-0.34)	-448
2S	372 (390)	509 (360)	371 (+0.81)	485 (-2.2)	542 (+0.46)	611 (+0.35)	-291
2R	372 (380)	509 (350)	374 (+0.55)	489 (-2.5)	-	614 (-1.2)	-310

^a 1 mM (in H₂O), $l = 1 \text{ cm}$; ^b 1 mM (in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, $I = 0.1 \text{ M}$ (NaClO₄))).

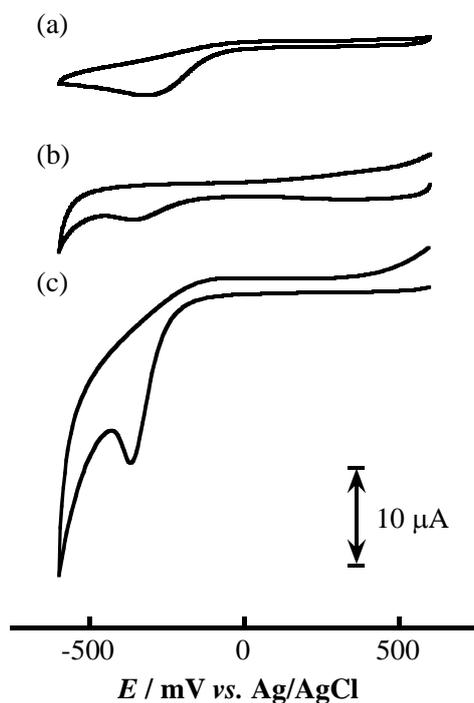


Figure 2-5. Cyclic voltammograms of (a) **2R**, **2R-Au** prepared (b) at 5 °C, and (c) at 25 °C in a phosphate buffer solution. **2R-Au** was immersed for 3 days. Scan rate is 50 mV s^{-1} .

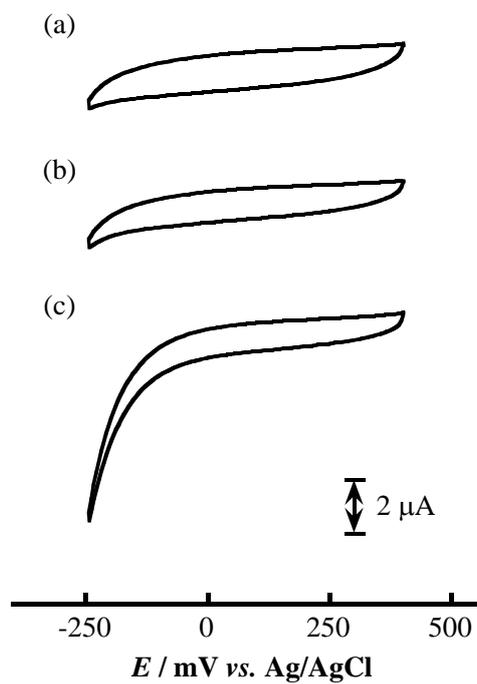


Figure 2-6. Cyclic voltammograms of cyt *c* in the absence (a) and the presence of **1S** (10 eq. (b) and over 30 eq. (c)) as measured with a GC electrode. Scan rate is 50 mV s^{-1} .

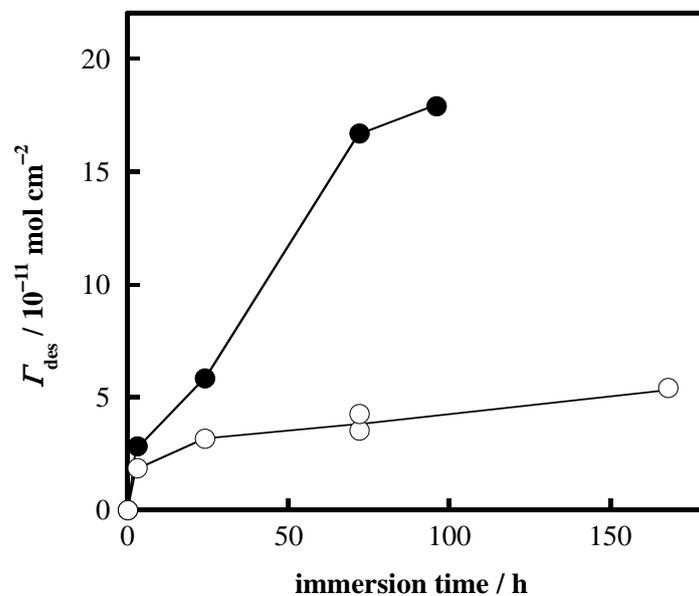


Figure 2-7. Plots of the surface coverages of **2R-Au** against the immersion time at $5 \text{ }^\circ\text{C}$ (open circle) and $25 \text{ }^\circ\text{C}$ (filled circle).

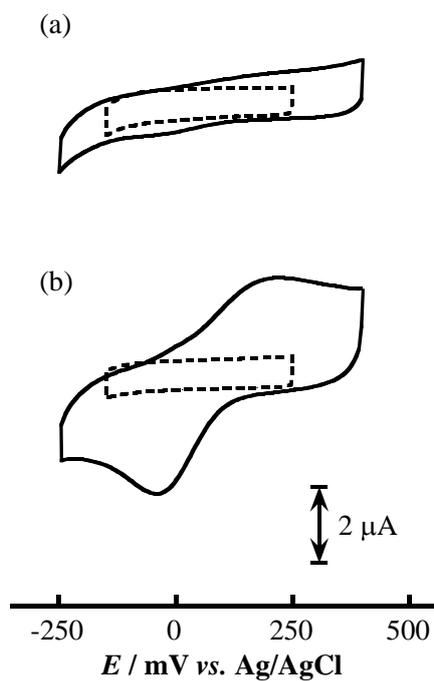


Figure 2-8. Cyclic voltammograms in a phosphate buffer solution (dashed line) and cyt *c* solution (solid line) using with **2R-Au** prepared (a) at 25 °C and (b) 5 °C immersing for 3 days. Scan rate is 50 mV s^{-1} .

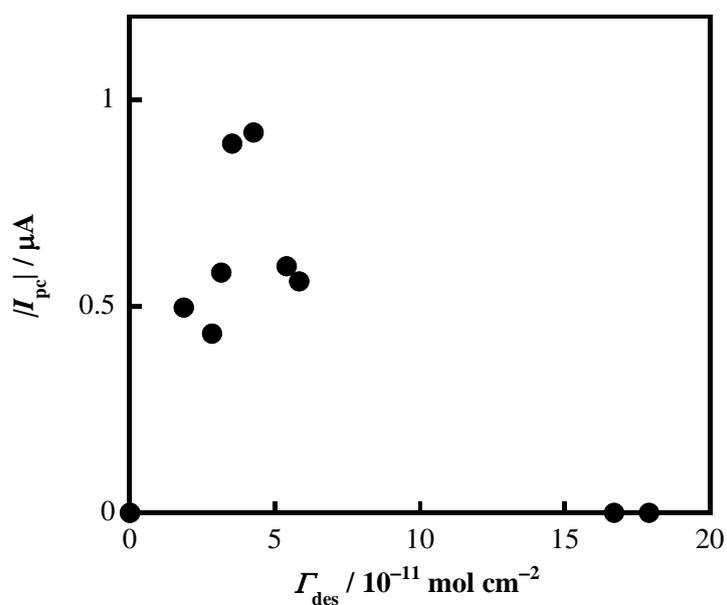


Figure 2-9. Plots of the cathodic peak currents of cyt *c* ($v = 10 \text{ mV s}^{-1}$) against the surface coverages of **2R-Au**.

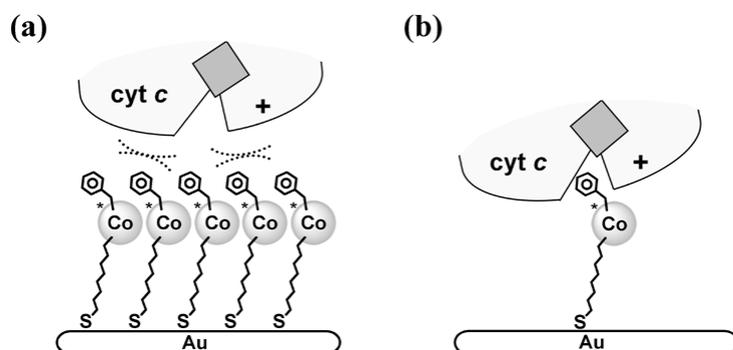


Figure 2-10. Schematic views of associated complexes between *cyt c* and Co^{III} unit using the densely (a; *ca.* $2.0 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) and loosely packed monolayers of **2R** (b; *ca.* $4.0 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$).

2.4. 総括

本章では、cyt *c*-修飾分子間の相互作用を検討するために、Phe 誘導体配位子の不斉のみが異なる Co^{III} 錯体(**1**, **2**)を設計・合成し、**2** の金表面への吸着挙動および錯体修飾電極(**2-Au**)を用いた cyt *c* との電子移動反応の反応性について検討した。

1, **2** は種々の分光学的手法により、その構造を確認した。**2** の金表面への吸着挙動は浸漬時間および浸漬温度により大きく変化し、様々な表面被覆率を有した **2-Au** を作製することが可能であった。また、**2-Au** は溶液中と同様に Co^{III} に帰属される不可逆な還元波を示した。**2-Au** の cyt *c* に対するプロモーター活性は **2-Au** の表面被覆率に大きく依存した。**2-Au** の被覆率が約 $4.0 \times 10^{-11} \text{ mol cm}^{-2}$ の時に最も大きなピーク電流値を示し、それよりも大きな被覆率ではピーク電流値は減少していった。この様な被覆率に依存した電子移動挙動は、cyt *c* が Co^{III} ユニット 1 分子を認識(会合)して電子移動を進行していることを示唆している。従って、本系での全体の電子移動速度(k)は、拡散速度(k_D)、会合速度(k_A)、電子移動速度(k_{ET})の3つにより支配されており、蛋白質-電極間の電子移動反応においても会合過程が重要であることが明らかとなった。

第3章では、本章において最も大きな cyt *c* のピーク電流値を示した **2-Au** の不斉部分を変化させ、不斉の変化が cyt *c* との電子移動に与える影響について述べる。

參考論文

- [1] Scott, R. A.; Mauk, A. G. *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach*; University Science Books: California, 1996.
- [2] (a) Butler, J.; Davis, D. M.; Sykes, A. G.; Koppenol, W. H.; Osheroff, N.; Margoliash, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 469-471. (b) Butler, J.; Chapman, S. K.; Davis, D. M.; Sykes, A. G.; Speck, S. H.; Osheroff, N.; Margoliash, E. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 6400-6404. (c) Armstrong, G. D.; Chambers, J. A.; Sykes, A. G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1986**, 755-758.
- [3] (a) Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1977**, 771-772. (b) Eddowes, M. J.; Hill, H. A. O. *J. Am. Chem. Soc.* **1979**, *101*, 4461-4464. (c) Allen, P. M.; Hill, H. A. O.; Walton, N. J. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *178*, 69-86. (d) Davis, J. J.; Hill, H. A. O.; Bond, A. M. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *200-202*, 411-442.
- [4] Fedurco, M. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209*, 263-331.
- [5] (a) Taniguchi, I.; Toyosawa, K.; Yamaguchi, H.; Yasukouchi, K. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* **1982**, 1032-1033. (b) Taniguchi, I.; Toyosawa, K.; Yamaguchi, H.; Yasukouchi, K. *J. Electroanal. Chem.* **1982**, *140*, 187-193. (c) Taniguchi, I.; Kajiwara, M.; Kai, T.; Muraguchi, R.; Tonemura, K.; Nishiyama, K. *Chemical Sensors 1993*, *9 Suppl. B*, 239-242. (d) Taniguchi, I.; Yoshimoto, S.; Nishiyama, K. *Chem. Lett.* **1997**, 353-354. (e) Sawaguchi, T.; Mizutani, F.; Yoshimoto, S.; Taniguchi, I. *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2861-2867.
- [6] (a) Diógenes, I. C. N.; Nart, F. C.; Temperini, M. L. A.; Moreira, I. S. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 4884-4889. (b) Corio, P.; Andrade, G. F. S.; Diógenes, I. C. N.; Moreira, I. S.; Nart, F. C.; Temperini, M. L. A. *J. Electroanal. Chem.* **2002**, *520*, 40-46. (c) Diógenes, I. C. N.; de Sousa, J. R.; de Carvalho, I. M. M.; Temperini, M. L. A.; Tanaka, A. A.; Moreira, I. S. *Dalton Trans.* **2003**, 2231-2236.
- [7] Liu, H.; Yamamoto, H.; Wei, J.; Waldeck, D. H. *Langmuir* **2003**, *19*, 2378-2387.
- [8] Korman, S.; Clarke, H. T. *J. Biol. Chem.* **1956**, *221*, 113-131.
- [9] Angerstein-Kozłowska, H.; Conway, B. E.; Hamelin, A.; Stoicoviciu, L. *J. Electroanal. Chem.* **1987**, *228*, 429-453.
- [10] (a) Kumita, H.; Jitsukawa, K.; Masuda, H.; Einaga, H. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *283*, 160-166. (b) Kumita, H.; Morioka, T.; Ozawa, T.; Jitsukawa, K.; Einaga, H.; Masuda, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 1035-1042. (c) Kumita, H.; Kato, T.; Jitsukawa, K.; Einaga, H.; Masuda, H. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3936-3942.
- [11] Poirier, G. E. *Chem. Rev.* **1997**, *97*, 1117-1127.
- [12] Chen, X.; Ferrigno, R.; Yang, J.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2002**, *18*, 7009-7015.
- [13] Lahiri, J.; Isaacs, L.; Grzybowski, B.; Carbeck, J. D.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1999**, *15*, 7186-7198.

第3章

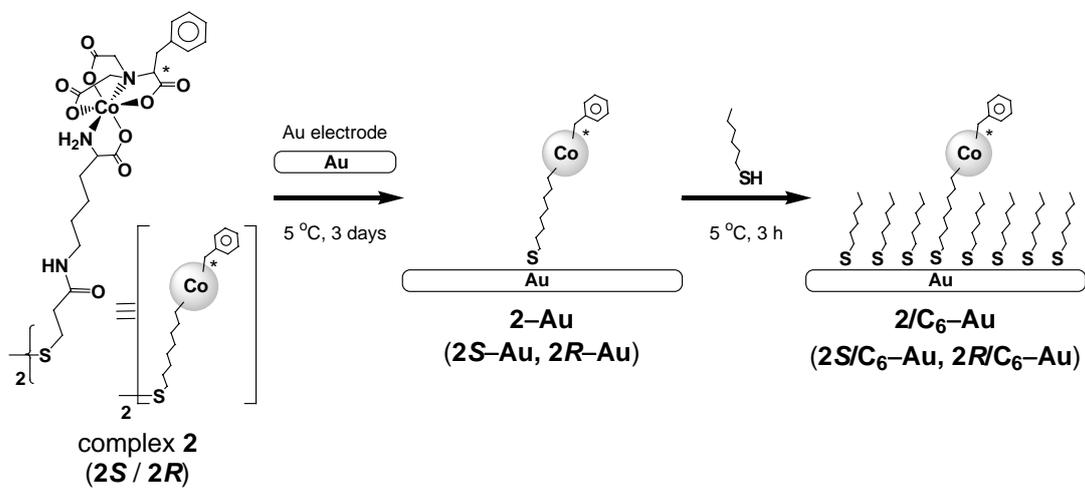
Cyt c との電子移動反応における光学活性 Co^{III} 錯体修飾電極の不斉の影響

3.1. 序論

呼吸鎖内において、cyt *c* は cytochrome *c* reductase から電子を受け取り、cytochrome *c* peroxidase, cytochrome *c* oxidase に電子を渡す。^[1] このうち、cyt *c*-cytochrome *c* reductase,^[2] cyt *c*-cytochrome *c* peroxidase^[3] に関しては会合体の結晶構造が報告されている。いずれの結晶構造においても静電的相互作用、水素結合、van der Waals 相互作用など複数の非共有結合性相互作用が観測されている。Lys 修飾 cyt *c* を用いた均一系電子移動反応^[1,4]、不均一系電子移動反応^[5,6]などにより Lys 残基の重要性が報告されているが、静電的な相互作用のみでは蛋白質間の分子認識メカニズムは理解出来ない。特に、電子移動後の会合体の脱離過程は静電的相互作用だけでは十分に説明出来ない。

Brayer らは酸化型・還元型 cyt *c* の結晶構造の違いから、73-80 番目のポリペプチド鎖が 2 つの酸化状態を安定化するための”trigger”として作用し、電子移動反応を促進しているのではないかという提案を行っている。^[1,7] Qi らは ¹H-NMR スペクトルによる cyt *c* の溶液構造から、Ile81 が”switch”である可能性を示唆している。^[8] しかし、現在の測定手法では蛋白質-蛋白質間における相互作用を詳細に検討するのは難しく、分子間電子移動反応の結果から議論しているのが現状である。しかし、酸化型蛋白質の還元反応、還元型蛋白質の酸化反応を 1 つの分子で行うことは不可能であり、蛋白質-遷移金属錯体に議論を移した場合でも金属錯体の酸化状態によって電子移動反応は大きく影響を受けうる。^[9]

本系における Co^{III} 錯体修飾電極(**2-Au**)と cyt *c* との電子移動反応は、**2-Au** の表面被覆率に強く依存しており、cyt *c* が Co^{III} ユニットの認識(会合)する過程を経由した電子移動反応であることを第 2 章で示した。ここで、Co^{III} ユニットのプロモーターとして機能していたため、cyt *c* の酸化還元に関わらず Co 中心の酸化状態は一定と考えることが出来る。本章では、**2-Au** の不斉部分を変化させた場合に cyt *c* との電子移動に与える影響について検討を行った。また、**2-Au** の Co^{III} ユニットの隙間を hexanethiol (C₆)で補完した混合分子膜(**2/C₆-Au**)による検討も併せて行った(Scheme 3-1)。**2-Au**、**2/C₆-Au** はいずれも不斉の変化に伴って全体の電子移動速度が変化し、それらの結果から cyt *c*-Co^{III} ユニットの会合速度(k_A)に差が生じていること、その違いは酸化時と還元時で大きく異なることを見出したので、以下にその詳細を述べる。



Scheme 3-1. Schematic view of complex 2 and modified Au electrode with 2 (2-Au, 2/C₆-Au)

3.2. 実験

ミリ Q 水は Millipore Milli-Q biocel A により得た。1-Hexanethiol (C_6)は東京化成より購入したものをそのまま使用した。錯体(2)の合成および構造同定は第 2 章で示した方法により行った。

3.2.1. 錯体修飾電極の作製

3.2.1.1. 2-Au の作製

2S-Au および **2R-Au** は、2.2.3.1 項に記した方法により洗浄した多結晶性金電極を 1 mM の **2S/2R** 水溶液に 5 °C にて 3 日間浸漬することでそれぞれ作製し、水にてリンスした後に各種電気化学測定に使用した。

3.2.1.2. 2/C₆-Au の作製

2S/C₆-Au および **2R/C₆-Au** は、3.2.1.1 項にて作製した **2-Au** を水、MeOH の順にリンスした後に、 C_6 の MeOH 溶液(*ca.* 1 mM)に 5 °C にて 3 時間浸漬することでそれぞれ作製し、MeOH、水の順にリンスした後に各種電気化学測定に使用した。

3.2.2. 電気化学測定

測定装置は BAS 社製 CV-50W および北斗電工社製 HZ-5000 automatic polarization system を使用した。測定は三電極系で行い、作用極に種々の修飾電極、対極に Pt 線、参照極に Ag/AgCl (3 M NaCl)を使用した。測定前に約 15 分間 Ar バブリングすることで溶存酸素を除去した。測定には 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, $I = 0.1$ M (NaClO₄))溶液もしくは 0.5 M KOH 水溶液のいずれかを用いて行った。 $[Ru^{III}(NH_3)_6]Cl_3$ 溶液(1 mM)は、Aldrich より購入した $[Ru^{III}(NH_3)_6]Cl_3$ を用いて同 buffer 溶液により調製した。また cyt *c* 溶液は、2.2.4 項と同様に調製した。

3.3. 結果・考察

3.3.1. 2-Au の不斉に依存した cyt c の電子移動挙動

第 2 章で最も大きなピーク電流値を示した浸漬条件(5 °C, 3 日間)により **2S-Au** および **2R-Au** をそれぞれ作製し、cyt c 溶液中で CV 測定を行った(Figure 3-1, Table 3-1)。いずれの場合においても cyt c^{III} に由来する酸化還元波は、掃引速度の増加に伴ってブロード化し、500 mV s⁻¹ ではピークを検出することが出来なかった。このような掃引速度に対する依存性は、cyt c と Co^{III} ユニットの会合過程に影響を受けているものと考えられ、電子移動の律速段階が拡散速度から会合速度へと変化している可能性が示唆される。次に、S-R 間における全体の電子移動速度(k)を比較するため、各掃引速度におけるピーク電位差の差($\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$)を式(1)の様に定義し、掃引速度(ν)に対してプロットした(Figure 3-2)。

$$\Delta(\Delta E_p)_{S-R} = \Delta E_{p,S} - \Delta E_{p,R} \quad (1)$$

ここで、 $\Delta E_{p,S}$ および $\Delta E_{p,R}$ は各掃引速度における **2S/2R-Au** を用いた場合のピーク電位差である。10-50 mV s⁻¹ では、 $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値はほぼ 0 であり、全体の電子移動速度(k)はほぼ等しいと考えられる。しかし、100 mV s⁻¹ を越えると、掃引速度の増加に伴って $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値は徐々に減少していった。これは **2S-Au** を用いた方が **2R-Au** を用いた場合に比べて cyt c と速く電子移動していることを示しており、^[10] S-R 間の速度差は掃引速度に依存して変化していることがわかる。一方、**2-Au** を用いた [Ru(NH₃)₆]³⁺ のボルタモグラムでは、いずれも未修飾の金電極の場合と同様に可逆的な酸化還元応答を示した(Figure 3-3)。さらに、掃引速度に対する $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値をプロットした場合(Figure 3-2)、いずれの掃引速度においてもほぼ 0 に近い値を示した。これらの結果から、**2-Au** のアミノ酸(Phe)側鎖の不斉の違いは cyt c-金電極間の電子移動速度には影響を与えるが、[Ru(NH₃)₆]³⁺-金電極間の電子移動速度にはほとんど影響を与えないことが示された。

2.3.4 項にて述べた様に、 ΔE_p 値から見積もられる全体の電子移動速度(k)は、拡散速度(k_D)、会合速度(k_A)、電子移動速度(k_{ET})の 3 つの過程に支配されていると考えられる。**2S**、**2R** の立体構造はほぼ同一であり、その修飾電極(**2S-Au**、**2R-Au**)は類似の表面被覆率を示しているため、拡散速度(k_D)は不斉の違いによって影響されないと考えられる。電子移動速度(k_{ET})は、Co^{III} ユニットの cyt c との会合体が S-R 間で全く異なる場合には異なる値を示す。しかし、遅い掃引速度範囲において $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値は 0 に近い値を示すことから、 k_{ET} 値に S-R 間の差は無い、すなわち類似の会合体構造により電子移動反応を進行していると考えられる。従って、掃

引速度により影響を受けうるものは会合速度(k_A)のみである。Figure 3-2 の様な $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値の掃引速度依存性は、 Co^{III} ユニットの不斉によって誘起された会合速度の違いによって得られたものと考えられる。これは、金表面上の Co^{III} ユニットの Bzl 基と cyt *c* のヘムクレバスとの立体的なフィッティングの違いによるものと考えられ、cyt *c* は表面の Bzl 基の配向を会合過程により厳密に認識していることが推察される。この推定電子移動メカニズムを Figure 3-4 に示した。

3.3.2. 2/C₆-Au の不斉に依存した cyt *c* の電子移動挙動

3.3.1 項にて使用した 2-Au の Co^{III} ユニット間の隙間に hexanethiol (C₆)を補完し、混合分子膜(2/C₆-Au)を作製した。2/C₆-Au の buffer 溶液中におけるバックグラウンド電流は、2-Au に比べて小さな値を示したことから、2/C₆-Au は 2-Au に比べてより密にパッキングしているものと考えられる。^[11] 2/C₆-Au を用いた cyt *c* 溶液中におけるボルタモグラムを Figure 3-5 に、得られた電気化学的パラメータを Table 3-2 に示した。いずれも 2-Au の場合と同様に cyt *c*^{III} の酸化還元波を観測したことから、2-Au の場合も Co^{III} ユニットが立った状態で電子移動が進行していると考えられる。また、2/C₆-Au では 200 mV s⁻¹ 以上ではピークを検出することが出来なかった。2/C₆-Au の $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値は、2-Au と同様に掃引速度の増加に伴って負に増加していった(Figure 3-2)。しかし、2-Au を用いた場合では S-R 間の速度差が観測されなかった遅い掃引速度においても、大きな速度差を示した。これは C₆ により錯体間の隙間を補完したことによって Co^{III} ユニットの運動が制限されたためであると考えられる。従って、密に配向させることによって、会合速度の差を増幅させることが出来ると考えられる。

3.3.3. 酸化反応時・還元反応時の認識挙動

2R-Au を用いた 10 mV s⁻¹ における cyt *c* のボルタモグラムから算出した $|E_{\text{pa}} - E_{\text{pa}2}|$, $|E_{\text{pc}} - E_{\text{pc}2}|$ 値はそれぞれ 89, 62 mV であった。 $|E_p - E_{p2}|$ の理論値は十分に可逆的な系では 56.5 mV となる。^[10] 従って、この結果は cyt *c*^{II} の酸化速度が cyt *c*^{III} の還元速度よりも遅い可能性を示唆している。10 mV s⁻¹ における E_p 値および ΔE_p 値は、2S-Au, 2R-Au 間および 2S/C₆-Au, 2R/C₆-Au 間において類似の値を示しており、この掃引速度時には Co^{III} ユニットの不斉の違いは電子移動にほとんど影響を与えていないと考えられる。そこで、cyt *c*^{II} の酸化反応時および cyt *c*^{III} の還元反応時を分離して考察するため、10 mV s⁻¹ における E_p 値を基準としたピークシフト($|\text{shift}|_{\text{pa}}$, $|\text{shift}|_{\text{pc}}$)およびその S-R 間の差($\Delta(|\text{shift}|_{\text{pa}})_{S-R}$, $\Delta(|\text{shift}|_{\text{pc}})_{S-R}$)を式(2, 3)により算出した(Table 3-1, 3-2)。

$$|\text{shift}|_{\text{pa}} = |E_{\text{pa}}(n) - E_{\text{pa}}(10)|, |\text{shift}|_{\text{pc}} = |E_{\text{pc}}(n) - E_{\text{pc}}(10)| \quad (2)$$

$$\Delta(|\text{shift}|_{\text{pa}})_{S-R} = |\text{shift}|_{\text{pa},S} - |\text{shift}|_{\text{pa},R}, \Delta(|\text{shift}|_{\text{pc}})_{S-R} = |\text{shift}|_{\text{pc},S} - |\text{shift}|_{\text{pc},R} \quad (3)$$

ここで、 $E_{\text{pa}}(10)$, $E_{\text{pc}}(10)$ および $E_{\text{pa}}(n)$, $E_{\text{pc}}(n)$ はそれぞれ 10 および $n (= 10-400)$ mV s⁻¹ におけるアノード、カソードピーク電位である。掃引速度と $\Delta(|\text{shift}|_{\text{pa}})_{S-R}$, $\Delta(|\text{shift}|_{\text{pc}})_{S-R}$ 値の関係を Figure 3-6 にそれぞれ示した。[Ru(NH₃)₆]³⁺ を用いた場合には、いずれも 0 に近い値であった。アノード反応(cyt c^{II} の酸化反応)時には、 $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値と同様の掃引速度依存性を示した。しかし、カソード反応(cyt c^{III} の還元反応)時には、 $\Delta(|\text{shift}|_{\text{pc}})_{S-R}$ 値は **2-Au-cyt c** 系ではほぼ 0 に近い値を示し、**2/C₆-Au-cyt c** 系ではわずかに負の値を示した。これは、カソード反応時には Co^{III} ユニットの不斉があまり認識されていないことを示している。Co^{III} ユニットの還元電位は本測定電位範囲よりもさらに負側であり、cyt c との電子移動反応時において Co^{III} ユニットの酸化還元に伴う構造変化は無視出来る。従って、このような異なる挙動は cyt c の酸化状態の違いに起因しているものと考えられ、cyt c^{II} は cyt c^{III} よりも強く Bzl 基を認識していることが示唆される。

Cyt c の酸化状態の違いはヘムクレバス周辺の立体環境を大きく変化させている可能性がある。すなわち、cyt c^{III} の還元反応時には cyt c^{III} のヘムクレバスが広がっているため Co^{III} ユニットの認識が弱くなった、一方 cyt c^{II} の酸化反応時には cyt c^{II} のヘムクレバスが狭まっているため Co^{III} ユニットの強く認識したと考えることが出来る。cyt c^{II} の酸化反応時における強い認識挙動は、**1** と類似の配位環境を有した Ru^{III} 錯体と cyt c^{II} との水溶液中における電子移動反応でも観測されている。^[9] [Ru^{III}((S)-bcmpa)(bpy)] (bpy: 2,2'-bipyridine) を用いた場合の二次速度定数は(R)-体の錯体を用いた場合よりも大きく、本系における結果と類似するものであった。Qi らは、¹H-NMR スペクトルにより cyt c の溶液構造を推定しており(Figure 3-7)、それによるとヘムの溶媒に曝されている部分の表面積はヘム全体の 14.6 % (cyt c^{III}), 7.53 % (cyt c^{II})である。^[8] この結果は、酸化状態によりヘムクレバスの大きさが変化しているという考察を支持するものであり、**2-Au**, **2/C₆-Au** を用いることによって間接的にヘムクレバスのサイズを評価することが可能である。生体内において cyt c は redox partner との発エルゴニックな電子移動を行った後に、redox partner から脱離する必要がある。従って、各酸化状態におけるコンフォメーション変化を脱離過程の driving force としている可能性が挙げられ、^[7,8,12,13] 本系では電気化学測定によりそのような立体構造の違いを酸化還元挙動を通して評価出来たものと考えられる。

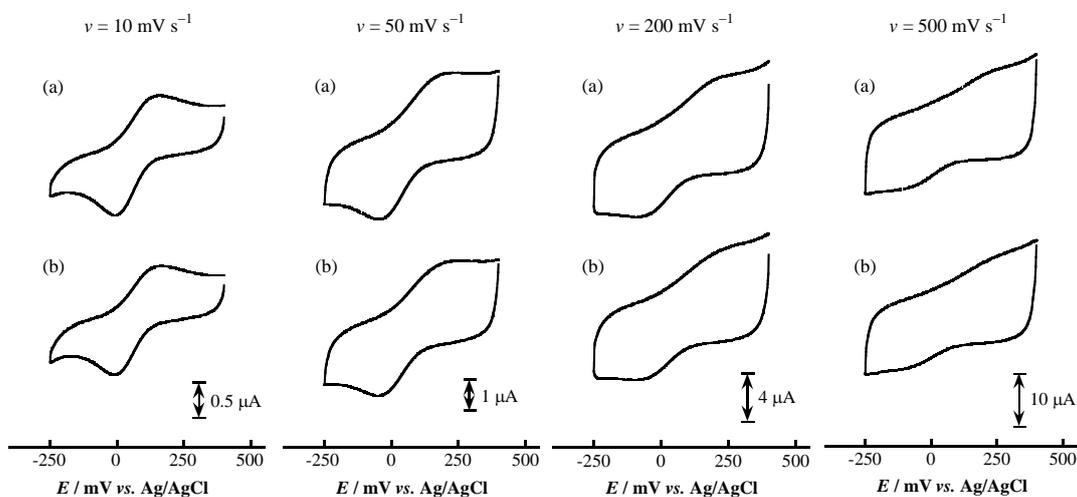


Figure 3-1. Cyclic voltammograms of cyt *c* using **2S–Au** (a) and **2R–Au** (b) at several scan rates.

Table 3-1. Electrochemical parameters calculated from the voltammograms of cyt *c* using **2S–Au** and **2R–Au**^a

ν^b	2S–Au			2R–Au			A_{S–R}		
	E_{pc}^c (shift _{pc}) ^e	E_{pa}^c (shift _{pa}) ^e	ΔE_p^d	E_{pc}^c (shift _{pc}) ^e	E_{pa}^c (shift _{pa}) ^e	ΔE_p^d	$\Delta(\Delta E_p)^f$	$\Delta(\text{shift} _{pc})^g$	$\Delta(\text{shift} _{pa})^g$
10	–8 (0)	+137 (0)	145	–3 (0)	+141 (0)	144	+1	0	0
25	–24 (16)	+164 (27)	188	–20 (17)	+170 (29)	190	–2	–1	–2
50	–40 (32)	+186 (49)	226	–39 (36)	+187 (46)	226	0	–4	+3
100	–49 (41)	+181 (44)	230	–50 (47)	+205 (64)	255	–25	–6	–20
200	–79 (71)	+204 (67)	283	–78 (75)	+230 (89)	308	–25	–4	–22
300	–84 (78)	+209 (72)	293	–85 (82)	+268 (127)	353	–60	–4	–55
400	–126 (118)	+232 (95)	358	–135 (132)	+304 (163)	439	–81	–14	–68

^a [cyt *c*] = 100 μM (in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, $I = 0.1$ M (NaClO₄))); ^b scan rate (mV s^{-1}); ^c cathodic and anodic peak potentials (mV vs. Ag/AgCl); ^d peak separation (mV); ^e |shift|_{pa} = $|E_{pa}(n) - E_{pa}(10)|$, |shift|_{pc} = $|E_{pc}(n) - E_{pc}(10)|$ ($n = 10\text{--}400$) (mV); ^f $\Delta(\Delta E_p)_{S-R} = \Delta E_{p,S} - \Delta E_{p,R}$ (mV); ^g $\Delta(|\text{shift}|_{pa})_{S-R} = |\text{shift}|_{pa,S} - |\text{shift}|_{pa,R}$, $\Delta(|\text{shift}|_{pc})_{S-R} = |\text{shift}|_{pc,S} - |\text{shift}|_{pc,R}$ (mV).

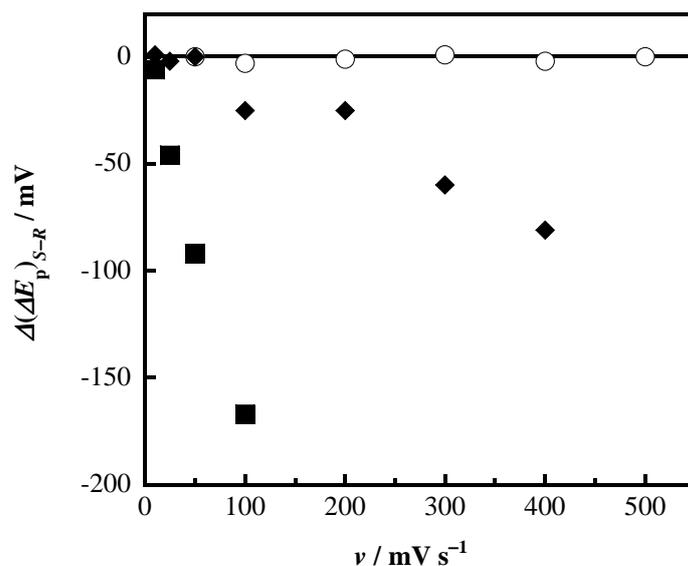


Figure 3-2. Relationship between scan rates and $\Delta(E_p)_{S-R}$ values for **2-Au-cyt c** (filled diamond), **2/C₆-Au-cyt c** (filled square) and **2/C₆-Au-[Ru(NH₃)₆]³⁺** systems (open circle).

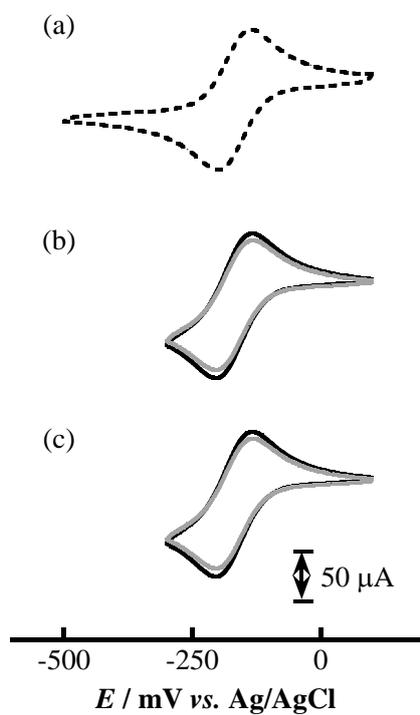


Figure 3-3. Cyclic voltammograms of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ using bare Au (a), **2-Au** (b) and **2/C₆-Au** (c) (black solid line: (S)-isomer, gray one: (R)-isomer). Scan rate is 50 mV s^{-1} .

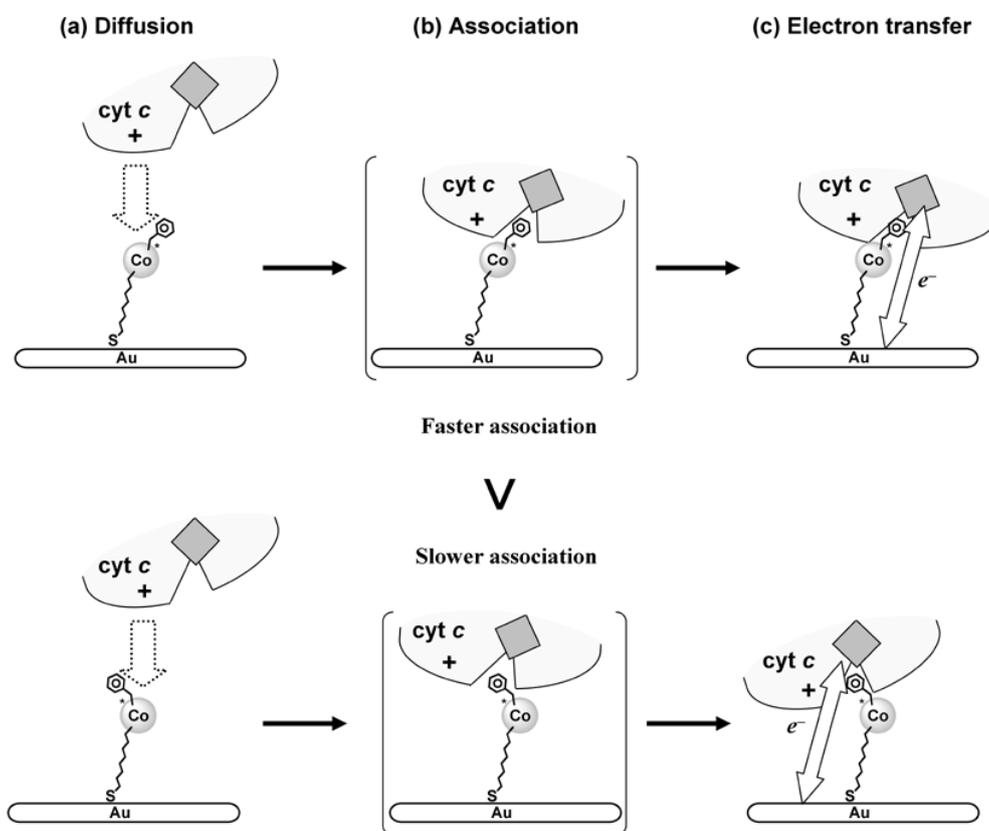


Figure 3-4. Proposed mechanism of the electron transfer reaction of cyt *c* using **2S-Au** (upper) and **2R-Au** (lower). (a) Positively charged cyt *c* approaches to negatively charged electrode surface, and then adsorbs the Co^{III} unit electrostatically. (b) Adsorbed cyt *c* moves and/or rotates on Au surface to form the associated structure with a Co^{III} unit. The association process is probably affected by slight structural difference induced by the chirality of the Co^{III} unit. (c) Cyt *c*^{II/III} donates/accepts electron to/from Au electrode, respectively.

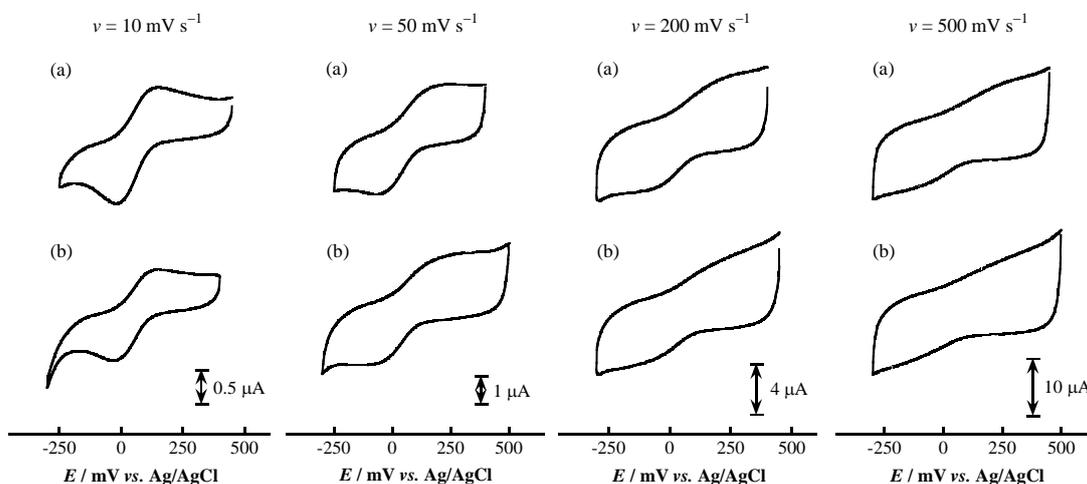


Figure 3-5. Cyclic voltammograms of cyt *c* using **2S/C₆-Au** (a) and **2R/C₆-Au** (b) at several scan rates.

Table 3-2. Electrochemical parameters calculated from the voltammograms of cyt *c* using **2S/C₆-Au** and **2R/C₆-Au** ^a

ν^b	2S/C₆-Au			2R/C₆-Au			A_{S-R}		
	E_{pc}^c (shift _{pc} ^e)	E_{pa}^c (shift _{pa} ^e)	ΔE_p^d	E_{pc}^c (shift _{pc} ^e)	E_{pa}^c (shift _{pa} ^e)	ΔE_p^d	$\Delta(\Delta E_p)^f$	$\Delta(\text{shift} _{pc})^g$	$\Delta(\text{shift} _{pa})^g$
10	-19 (0)	+133 (0)	152	-25 (0)	+133 (0)	158	-6	0	0
25	-33 (14)	+146 (13)	179	-59 (34)	+166 (33)	225	-46	-20	-20
50	-55 (36)	+163 (30)	218	-92 (67)	+218 (85)	310	-92	-31	-55
100	-75 (56)	+175 (42)	250	-148 (123)	+269 (136)	417	-167	-67	-94

^a [cyt *c*] = 100 μM (in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, *I* = 0.1 M (NaClO₄))); ^b scan rate (mV s⁻¹); ^c cathodic and anodic peak potentials (mV vs. Ag/AgCl); ^d peak separation (mV); ^e |shift|_{pa} = |E_{pa}(*n*) - E_{pa}(10)|, |shift|_{pc} = |E_{pc}(*n*) - E_{pc}(10)| (*n* = 10-100) (mV); ^f $\Delta(\Delta E_p)_{S-R} = \Delta E_{p,S} - \Delta E_{p,R}$ (mV); ^g $\Delta(|\text{shift}|_{pa})_{S-R} = |\text{shift}|_{pa,S} - |\text{shift}|_{pa,R}$, $\Delta(|\text{shift}|_{pc})_{S-R} = |\text{shift}|_{pc,S} - |\text{shift}|_{pc,R}$ (mV).

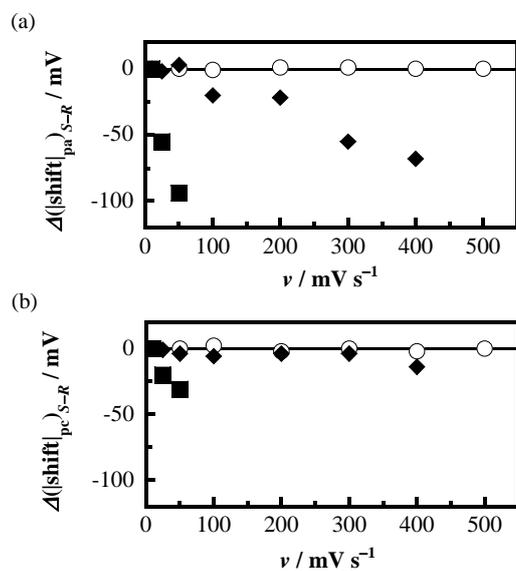


Figure 3-6. Plots of $\Delta(|\text{shift}|_{\text{pa}})_{S-R}$ (a) and $\Delta(|\text{shift}|_{\text{pc}})_{S-R}$ values (b) against scan rates for 2-Au-cyt *c* (filled diamond), 2/C₆-Au-cyt *c* (filled square), and 2/C₆-Au-[Ru(NH₃)₆]³⁺ systems (open circle).

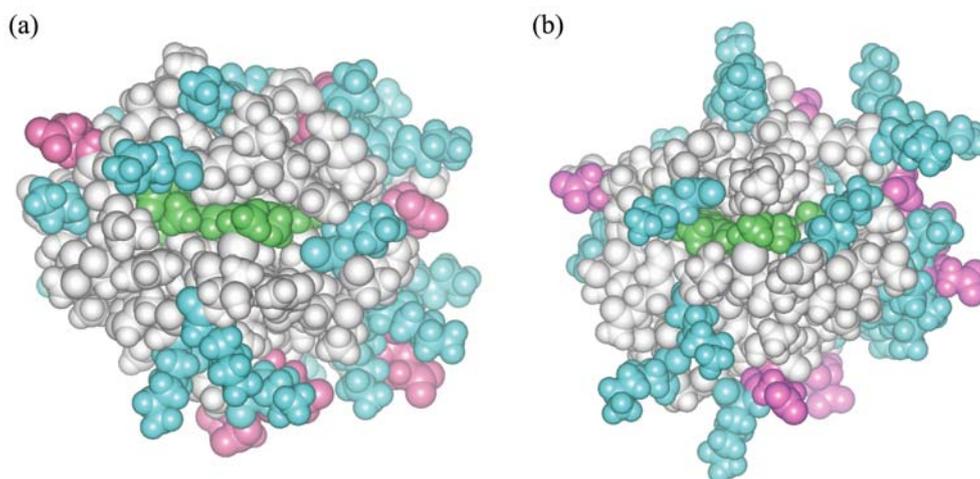


Figure 3-7. Solution structures of oxidized (a) and reduced (b) cytochrome *c* from horse heart (PDB code: 1OCD, 2FRC) denoted by CPK model (Green: heme, blue: basic residue, red: acidic residue).

3.4. 総括

本章では、第 2 章にて最も大きなピーク電流値を示した修飾条件により作製した **2-Au** と、**2-Au** の Co^{III} ユニット間を hexanethiol (C_6)により補完した混合分子膜(**2/C₆-Au**)の不斉部分のみを変化させ、cyt *c* との電子移動反応に与える影響について検討を行った。

2-Au を用いた cyt *c* のボルタモグラムから、 $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値は掃引速度が増加するにつれて負に増加することがわかった。掃引速度により影響を受けるのは会合速度(k_A)のみであることから、この $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値の挙動は cyt *c* のヘムクレバスと Co^{III} ユニットの Bzl 基との会合速度における *S-R* 間の違いを反映したものと考えられる。また、**2/C₆-Au** を用いた場合、**2-Au** では $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値に差が見られなかった掃引速度においても *S-R* 間の差を示した。これは、 Co^{III} ユニット間を C_6 により補完したことで Co^{III} ユニットの運動が制限されたことが原因であると考えられ、より密に配向させることで会合速度の差を増幅することが可能であると考えられる。これらの結果から、 Co^{III} ユニットの不斉部分を変化させただけで、cyt *c* との立体的相互作用には大きな違いをもたらし、全体の電子移動速度(k)に大きな影響を与えることを示した。

アノード(cyt c^{II} の酸化)側、カソード(cyt c^{III} の還元)側のピーク挙動に着目した場合、 $\Delta(\text{shift}|_{\text{pa}})_{S-R}$ 値は $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値と同様の掃引速度依存性を示したものの、 $\Delta(\text{shift}|_{\text{pc}})_{S-R}$ 値は **2-Au** を用いた場合ではほぼ 0、**2/C₆-Au** を用いた場合でもわずかに差を示す程度であった。これは、cyt *c* の酸化状態の違いに由来したヘムクレバス周辺構造の違いを反映した結果と考えられ、cyt c^{III} の方が cyt c^{II} よりも広がったヘムクレバス構造を有しているものと考えられる。この様に、電極電位によって電子移動反応を制御することで金表面における Co^{III} ユニットの構造変化を無視することが出来、同一の分子(表面)を用いて蛋白質の表面構造を評価可能であることが明らかとなった。

第 4 章では、 Co^{III} ユニット間に cyt *c* に対するプロモーターとして機能する分子を補完した混合分子膜を用いた電子移動挙動について述べる。

參考論文

- [1] Scott, R. A.; Mauk, A. G. *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach*; University Science Books: California, 1996.
- [2] Lange, C.; Hunte, C. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **2002**, *99*, 2800-2805.
- [3] Pelletier, H.; Kraut, J. *Science* **1992**, *258*, 1748-1755.
- [4] (a) Butler, J.; Davis, D. M.; Sykes, A. G.; Koppenol, W. H.; Osheroff, N.; Margoliash, E. *J. Am. Chem. Soc.* **1981**, *103*, 469-471. (b) Butler, J.; Chapman, S. K.; Davis, D. M.; Sykes, A. G.; Speck, S. H.; Osheroff, N.; Margoliash, E. *J. Biol. Chem.* **1983**, *258*, 6400-6404. (c) Armstrong, G. D.; Chambers, J. A.; Sykes, A. G. *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* **1986**, 755-758.
- [5] Niki, K.; Hardy, W. R.; Hill, M. G.; Li, H.; Sprinkle, J. R.; Margoliash, E.; Fujita, K.; Tanimura, R.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Richards, J. R.; Gray, H. B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9947-9949.
- [6] Wei, J. J.; Liu, H.; Niki, K.; Margoliash, E.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16912-16917.
- [7] Berghuis, A. M.; Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.* **1992**, *223*, 959-976.
- [8] Qi, P. X.; Beckman, R. A.; Wand, A. J. *Biochemistry* **1996**, *35*, 12275-12286.
- [9] Kato, T.; Takahashi, I.; Kumita, H.; Funahashi, Y.; Ozawa, T.; Jitsukawa, K.; Masuda, H. *Inorg. Chem. Commun.*, submitted.
- [10] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.
- [11] Chidsey, C. E. D.; Bertozzi, C. R.; Putvinski, T. M.; Majsce, A. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1990**, *112*, 4301-4306.
- [12] Weber, C.; Michel, B.; Bosshard, H. R. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **1987**, *84*, 6687-6691.
- [13] Hildebrandt, P.; Stockburger, M. *Biochemistry* **1989**, *28*, 6722-6728.

第 4 章

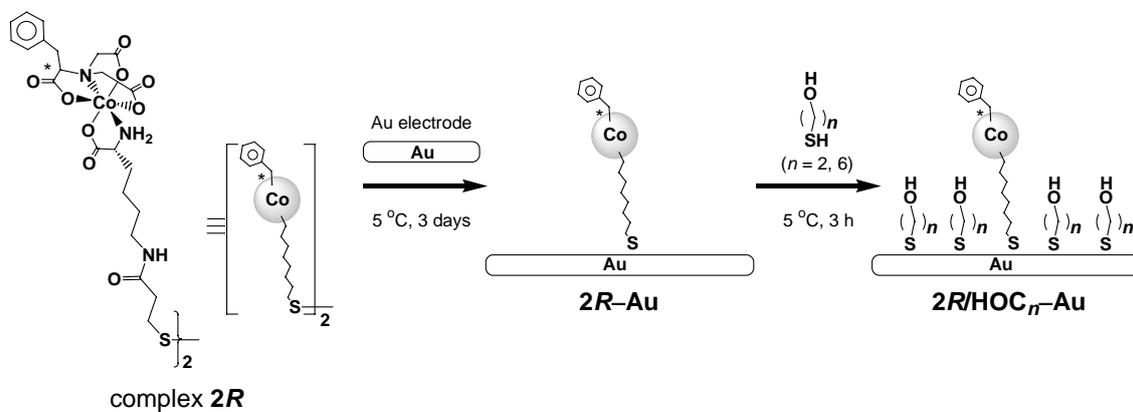
Co^{III} 錯体と末端ヒドロキシルアルカンチオールの混合分子膜と cyt c との電子移動

4.1. 序論

金属蛋白質の電気化学測定は有機チオール分子を修飾した金電極が広く用いられているが、プロモーターとして機能する分子は蛋白質の表面の性質によって大きく異なる。例えば cyt *c* に対しては、4-mercaptopyridine や 2-mercaptoethanol は良好なプロモーターであるが、benzenethiol や alkanethiol はプロモーター活性を示さず、cyt *c* のへム近傍に存在する Lys 残基と非共有結合的に相互作用可能な電極表面が重要であると考えられている。^[1-6] しかし、蛋白質の膜表面は疎水的、親水的など必ずしも一義的に決められるものではなく、2 種以上の分子を修飾した混合分子膜作製法の確立が期待される。

Kakiuchi らは、2 種のチオール分子の混合溶液を用いて作製した混合分子膜の表面組成について検討を行い、混合溶液中のモル分率と表面上のモル分率が大きく異なることを報告している。^[7] Taniguchi らは、非対称ジスルフィドを用いた混合分子膜を作製した場合に、表面上で”phase-separation (相分離)”を引き起こすことを報告している。^[8] この様に、2 種の修飾分子のわずかな違いにより均一に分散した膜表面の生成を妨げてしまうものの、現在混合分子膜の作製は前者の方法がほとんどである。^[9-11] これに対して Kakiuchi らは、電荷補償関係にある 2 種の分子(2-aminoethanethiol, 2-mercaptoethane sulfonic acid)を利用することにより、溶液中のモル分率に依存せず、ほぼ 1 : 1 の表面モル分率を得ることに成功した。^[12]

本系における Co^{III} 錯体(2)は吸着速度が非常に遅く、Co^{III} ユニット間に他のチオール分子(hexanethiol)を導入可能であることを第 3 章で示した。ここで、hexanethiol は cyt *c* の酸化還元応答を示さず、密に配向した Co^{III} ユニットも cyt *c* の酸化還元応答を示さないため、phase separation は起きていないと考えられる。本章では、cyt *c* に対するプロモーター分子として機能する分子(2-mercaptoethanol (HOC₂), 6-mercaptohexanol (HOC₆))^[5,6] を Co^{III} ユニット間に挿入した混合分子膜(2R/HOC₂-Au, 2R/HOC₆-Au)を作製し、cyt *c* の電子移動挙動について検討を行った(Scheme 4-1)。2R/HOC₂-Au を用いた場合では、2R-Au と同様のピーク電位差を示したことから、HOC₂ は cyt *c* との電子移動速度に影響を与えないことがわかった。一方、2R/HOC₆-Au を用いた場合では 2R-Au よりも速い電子移動を示したため、その電子移動メカニズムも含めて以下に詳細を述べる。



Scheme 4-1. Schematic view of complex **2R** and modified Au electrode with **2R** (**2R-Au**, **2R/HOC_n-Au**)

4.2. 実験

ミリ Q 水は Millipore Milli-Q biocel A により得た。2-Mercaptoethanol (HOC_2), 6-mercaptohexanol (HOC_6)は Aldrich より購入したものをそのまま使用した。錯体(2)の合成および構造同定は第 2 章で示した方法により行った。

4.2.1. 各種修飾電極の作製

2R/HOC₂-Au および **2R/HOC₆-Au** は、3.2.1.1 項にて作製した **2-Au** を水、MeOH の順にリンスした後に、 HOC_2 および HOC_6 の MeOH 溶液(0.1 g/50 mL)に 5 °C にて 3 時間浸漬することでそれぞれ作製し、MeOH、水の順にリンスした後に各種電気化学測定に使用した。また、**HOC₂-Au** および **HOC₆-Au** は、上記チオール溶液に 5 °C にて 3 時間浸漬することでそれぞれ作製し、同様の洗浄操作を行った後に測定に使用した。

4.2.2. 電気化学測定

測定装置は北斗電工社製 HZ-5000 automatic polarization system を使用した。測定は三電極系で行い、作用極に種々の修飾電極、対極に Pt 線、参照極に Ag/AgCl (3 M NaCl)を使用した。測定前に約 15 分間 Ar バブリングすることで溶存酸素を除去した。測定には 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0, $I = 0.1 \text{ M (NaClO}_4)$)溶液もしくは 0.5 M KOH 水溶液のいずれかを用いて行った。 $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$, $\text{K}_3[\text{Fe}^{\text{III}}(\text{CN})_6]$ 溶液(1 mM)は、Aldrich、和光純薬より購入したものをを用いて同 buffer 溶液によりそれぞれ調製した。Cyt c 溶液は、2.2.4 項と同様に調製した。

4.3. 結果・考察

4.3.1. $2R/HOC_n-Au$ と $[Fe(CN)_6]^{3-}$, $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ の電子移動挙動

$2R/HOC_2-Au$, $2R/HOC_6-Au$ は、第 2 章で最も大きなピーク電流値を示した修飾条件(5 °C, 3 日間)にて作製した $2R-Au$ を HOC_2 および HOC_6 溶液に浸漬することで作製した。

$2R/HOC_2-Au$ を用いた $[Fe(CN)_6]^{3-}$ 溶液中における CV 測定を行ったところ、非常に不可逆なボルタモグラムが観測された(Figure 4-1a)。得られた応答のピーク電位差(ΔE_p)は 174 mV (50 mV s^{-1})であり、裸の金電極を用いた場合(67 mV (50 mV s^{-1}))に比べて ΔE_p 値はかなり大きかった。この様な ΔE_p 値の増加は、 $2R-Au$, $2R/C_6-Au$, $2R/HOC_6-Au$ を用いた場合にも共通して観測されており(Table 4-1)、 Co^{III} ユニットの負電荷と $[Fe(CN)_6]^{3-}$ の負電荷との静電反発により電子移動速度が遅くなった結果と考えられる。^[13,14] 一方で、正に帯電した $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ 溶液中における CV 測定を行ったところ、いずれの場合においても可逆的なボルタモグラムが観測された(Figure 4-1b, Table 4-1)。従って、 Co^{III} ユニットの負電荷は正に帯電した $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ に対しては静電引力が影響し、速い(可逆的な)電子移動を示すことがわかった。^[14,15] 上記の電子移動挙動は、全ての修飾電極において表面に Co^{III} ユニットが固定化されていることを示唆するものである。

4.3.2. $2R/HOC_2-Au$ と *cyt c* の電子移動挙動

$2R/HOC_2-Au$ を用いた *cyt c* 溶液中における CV 測定を行い、Figure 4-2 に示した。得られたボルタモグラムは *cyt c*^{II/III} に帰属される一対の酸化還元応答のみを示した。掃引速度に関わらず一対の応答のみが観測されたことから、1 種類の電子移動過程により電子移動反応が進行しているものと考えられる。 $2R-Au$ は、第 3 章にて述べた様に不可逆な酸化還元応答($\Delta E_p = 226 \text{ mV}$ (50 mV s^{-1}))を、 HOC_2-Au は準可逆的な応答($\Delta E_p = 80 \text{ mV}$ (50 mV s^{-1}))をそれぞれ示す。一方、 $2R/HOC_2-Au$ を用いた場合の ΔE_p 値は 222 mV (50 mV s^{-1})であり、 $2R-Au$ の場合とほぼ類似の値であった。それぞれの修飾電極を用いた場合の各掃引速度における *cyt c* の ΔE_p 値を Figure 4-3 にプロットした。 $2R/HOC_2-Au$ を用いた場合における ΔE_p 値は、 $2R-Au$ を用いた場合とほぼ一致した ΔE_p 値を示しており、全体の電子移動速度(*k*)は HOC_2 を Co^{III} ユニット間に挿入した場合には変化しないことが示された。^[14]

第 2 章で示した様に、 Co^{III} ユニットが密に集積化すると *cyt c* の酸化還元応答は観測されず、また HOC_2-Au は *cyt c* と速い電子移動を行う。^[15,6] 従って、完全に phase separation が起きている場合、 HOC_2-Au と同様の ΔE_p 値を示す酸化還元応答が観測されるはずである。しかし、

2R/HOC₂-Au の ΔE_p 値は **2R-Au** の場合と類似の値を示したため、phase separation はほとんど起きていないものと考えられる。また、全体の電子移動速度(k)は **2R-Au**, **2R/HOC₂-Au** のいずれを用いた場合でもほぼ同一であることから、HOC₂部分は cyt c との電子移動反応に全く影響を与えていない。すなわち、cyt c との電子移動反応は **2R-Au** の場合と同様に、Co^{III} ユニットの会合体形成過程が律速段階であると考えられる(Scheme 4-2a)。

4.3.3. **2R/HOC₆-Au** と cyt c の電子移動挙動

2R/HOC₆-Au を用いた cyt c 溶液中における CV 測定を行い、Figure 4-4 に示した。得られたボルタモグラムは cyt $c^{II/III}$ に帰属される一対の酸化還元応答を示した。**2R/HOC₂-Au** の場合と同様に、掃引速度に関わらず一対の応答のみを示したことから、1 種類の電子移動過程を経由しているものと考えられる。前項で述べた様に、**2R-Au** は不可逆な、**HOC₆-Au** は準可逆的な酸化還元応答を示す。しかし、**2R/HOC₆-Au** を用いた場合、50 mV s⁻¹ における ΔE_p 値は 130 mV であり、**2R-Au** を用いた場合(226 mV)、**HOC₆-Au** を用いた場合(75 mV)の中間程度の値を示した。それぞれの修飾電極を用いた場合の各掃引速度における cyt c の ΔE_p 値を Figure 4-5 に示した。**2R/HOC₆-Au** の ΔE_p 値はいずれの掃引速度においても **2R-Au**, **HOC₆-Au** の中間程度の値であり、**2R/HOC₆-Au** を用いた場合の全体の電子移動速度(k)は **2R-Au** を用いた場合よりも速く、**HOC₆-Au** を用いた場合よりも遅いと考えられる。^[14] 完全に phase separation が起きている場合 **HOC₆-Au** と同様の ΔE_p 値を示すと考えられるが、**2R/HOC₆-Au** は **HOC₆-Au** よりも大きな ΔE_p 値を示した。従って、Co^{III} ユニット間の距離はある程度保たれており、Co^{III} ユニット、HOC₆ 分子が共に関与した電子移動反応であると推察される。

第 3 章で述べた様に **2R/C₆-Au** を用いた場合は **2R-Au** よりもさらに遅い電子移動速度を示した(Figure 4-5)。C₆, HOC₆ 分子自身はほぼ同じ鎖長であるにも関わらず、このような違いを示すのは **C₆-Au**, **HOC₆-Au** の cyt c との電子移動速度に依存していると考えられる。**HOC₆-Au** は cyt c と速い電子移動を行うことが出来る^[5,6] のに対して、**C₆-Au** を用いた場合では cyt c の酸化還元応答はほとんど観測されない。従って、**2R/C₆-Au** の場合では C₆ 部分は cyt c との電子移動には直接的には関与せず、Co^{III} ユニットの運動を制限してしまうことによって **2R-Au** よりも電子移動が遅くなったものと考えられる。これらの結果から、**2R/C₆-Au**, **2R/HOC₂-Au** の場合とは異なり、**2R/HOC₆-Au** を用いた場合では HOC₆ 部分が cyt c との電子移動に大きく関与していることが示唆される。C₆ 分子を挿入することにより Co^{III} ユニットの運動が制限されるということは、HOC₆ 分子を挿入した場合でも同様の寄与が考えられる。しかし、

ΔE_p 値が **2R-Au** (**2R/C₆-Au**) を用いた場合よりも小さいということは、**2R/HOC₆-Au** を用いた場合の電子移動反応は HOC₆ 部分で進行していると考えられる。また、**HOC₆-Au** を用いた場合よりも遅いことから Co^{III} ユニットとも相互作用していると考えられ、ここでの相互作用はへム近傍に存在する Lys 残基との静電的な相互作用と推察される。従って、**2R/HOC₆-Au** を用いた cyt *c* との電子移動過程は、拡散により電極表面に近づいてきた cyt *c* が一旦 Co^{III} ユニットとの静電的相互作用を働かせ、Co^{III} ユニットとの会合体形成よりも速く HOC₆ 部分との会合体を形成し、電子移動を行っているものと考えられる(Scheme 4-2b)。

HOC_n-Au を用いた場合の cyt *c* との電子移動反応は、電極表面に存在する OH 基と水素結合的に相互作用した水分子に対して cyt *c* 表面の Lys 残基が相互作用することで進行すると考えられている。^[1] 従って、**2R/HOC₆-Au** の場合は HOC₂ よりもメチレン鎖長が長いことため cyt *c* と相互作用しやすく、より速い電子移動速度を示したものと考えられる。また、**2R/C₆-Au** を用いた場合に **2R-Au** よりも遅い電子移動を示すのは、C₆ 部分と Lys 残基との立体反発による寄与も影響を与えている可能性が挙げられる。

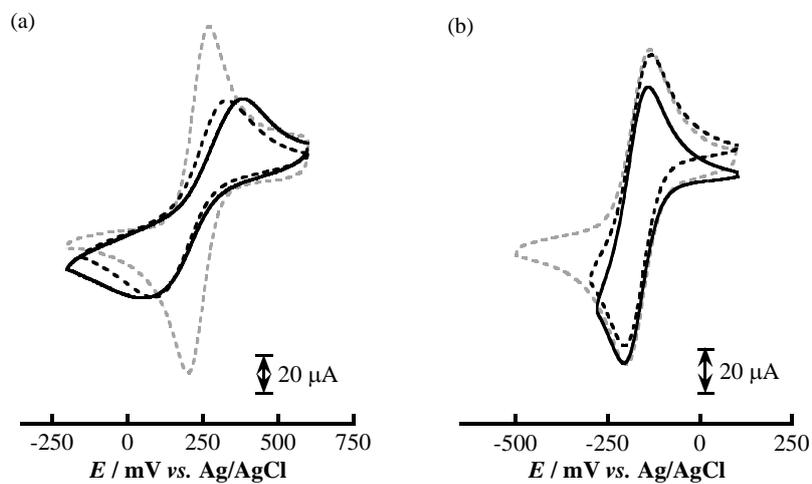


Figure 4-1. Cyclic voltammograms of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ (a) and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (b) using bare Au electrode (gray dashed line), **2R-Au** (black dashed line), and **2R/HOC₂-Au** (black solid line), respectively. Scan rate is 50 mV s^{-1} .

Table 4-1. Peak separations calculated from the voltammograms of $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ using a series of electrodes

	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$	$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$
	$\Delta E_p / \text{mV}$	$\Delta E_p / \text{mV}$
bare Au	67	62
2R-Au	303	58
2R/C₆-Au	236	62
2R/HOC₂-Au	174	59
2R/HOC₆-Au	219	61

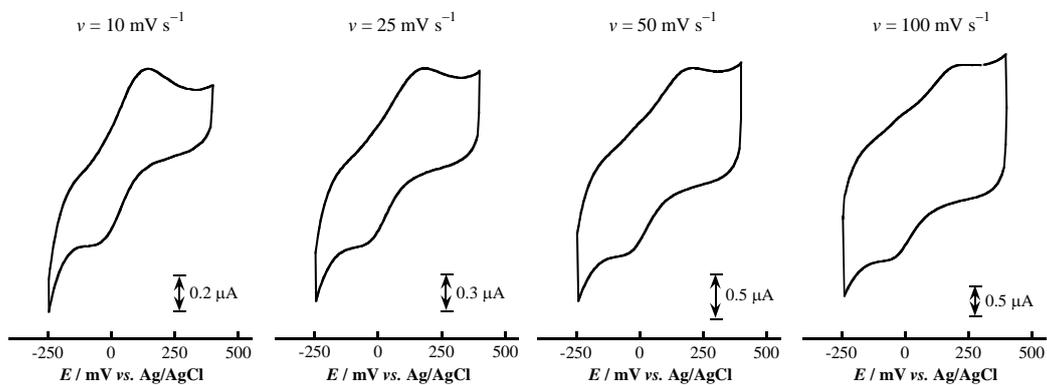


Figure 4-2. Cyclic voltammograms of cyt *c* using **2R/HOC₂-Au** at several scan rates.

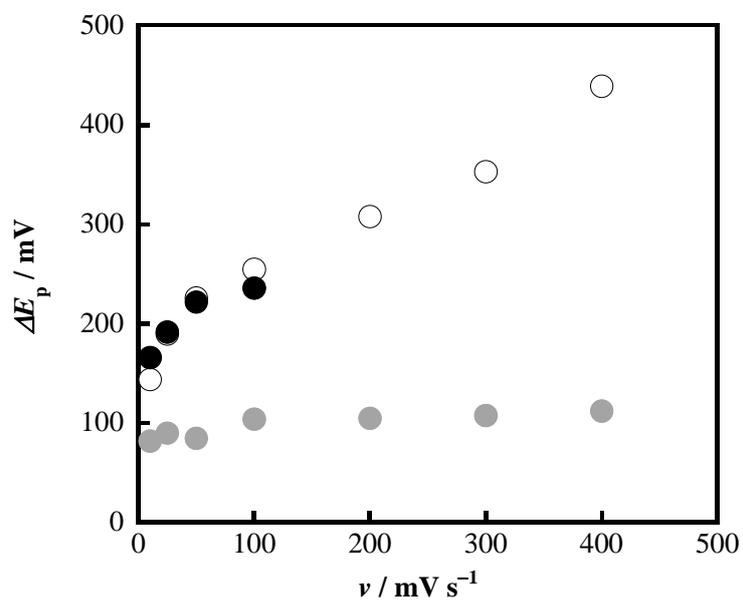
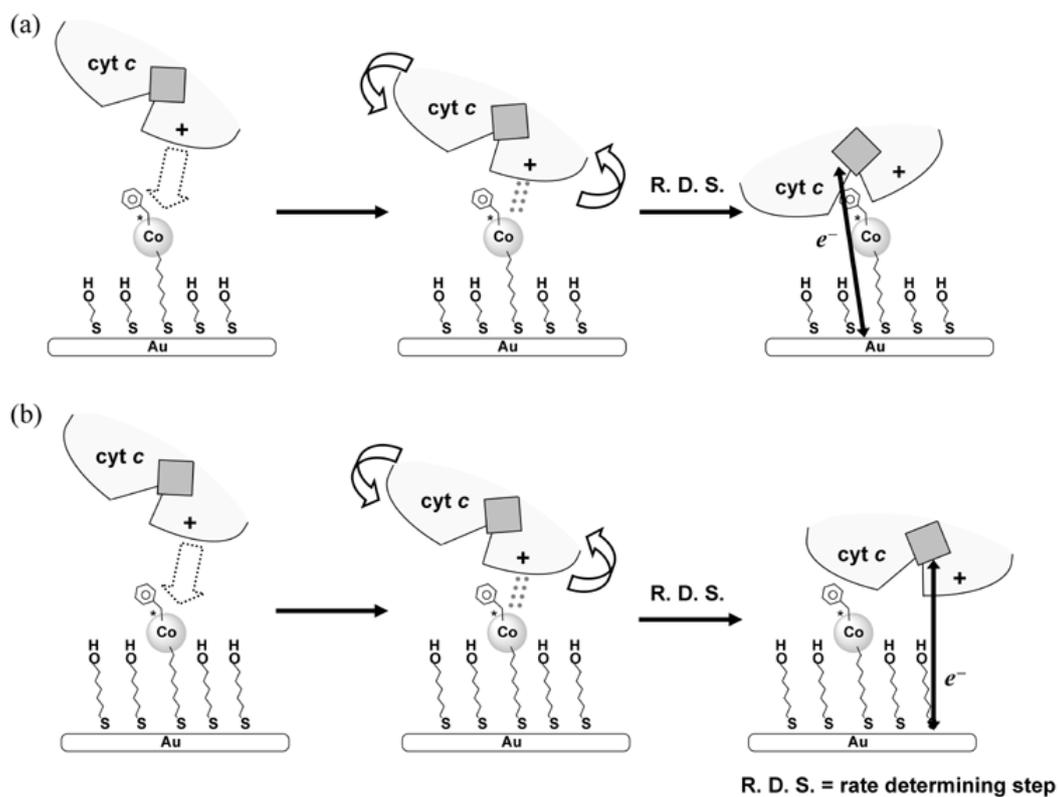


Figure 4-3. Relationship between scan rates and ΔE_p values of cyt *c* as measured with **2R-Au** (open circle), **2R/HOC₂-Au** (black filled circle), and **HOC₂-Au** (gray filled circle).



Scheme 4-2. Proposed mechanisms of the electron transfer reaction of cyt *c* using $2R/HOC_2-Au$ (a) and $2R/HOC_6-Au$ (b)

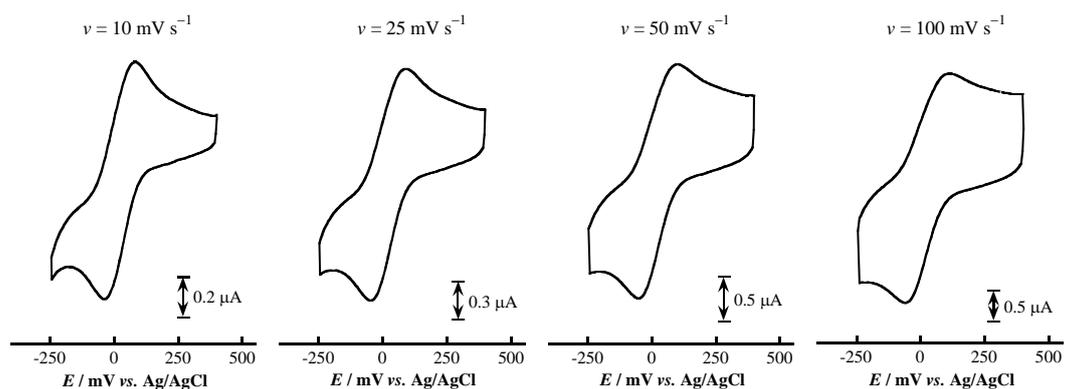


Figure 4-4. Cyclic voltammograms of cyt *c* using $2R/HOC_6-Au$ at several scan rates.

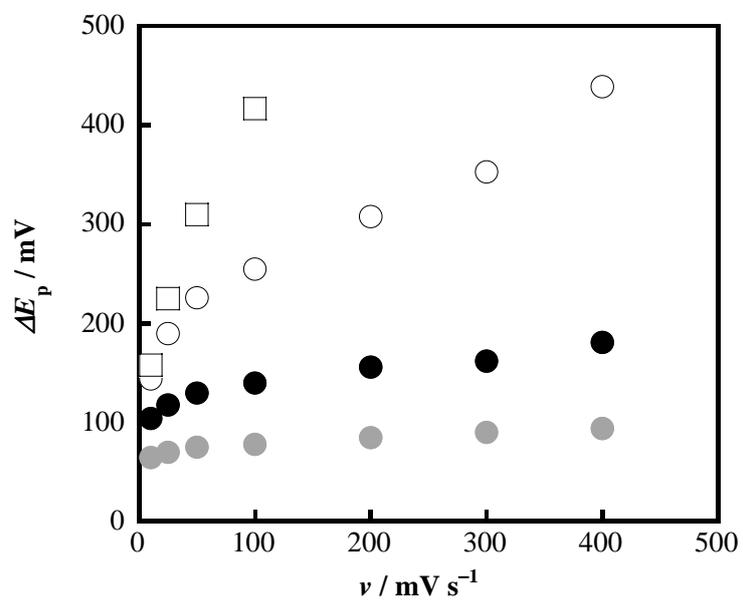


Figure 4-5. Relationship between scan rates and ΔE_p values of cyt *c* as measured with **2R-Au** (open circle), **2R/C₆-Au** (open square), **2R/HOC₆-Au** (black filled circle), and **HOC₆-Au** (gray filled circle).

4.4. 総括

本章では、第 2 章にて最も大きなピーク電流値を示した修飾条件により作製した **2R-Au** の Co^{III} ユニット間に、cyt *c* と速い電子移動が可能である 2-mercaptoethanol (HOC_2), 6-mercaptohexanol (HOC_6)を挿入した混合分子膜(**2R/HOC₂-Au**, **2R/HOC₆-Au**)を作製し、cyt *c* との電子移動反応について検討を行った。

2R/HOC_{*n*}-Au を用いた cyt *c* のボルタモグラムはいずれの掃引速度においても一對の酸化還元応答のみを示したことから、1 種類の電子移動反応のみが観測されていると考えられる。完全に phase separation した場合には HOC_n 部分での速い電子移動のみが観測されることが考えられるが、いずれも **HOC_{*n*}-Au** よりも遅い電子移動反応を示したことから、phase separation は抑えられているものと推察される。

ΔE_p 値に着目すると、**2R/HOC₂-Au** を用いた場合には **2R-Au** とほぼ同じ ΔE_p 値を示しており、 HOC_2 部分が cyt *c* との電子移動反応に寄与していないことがわかった。**2R/HOC₆-Au** を用いた場合の ΔE_p 値は、**2R-Au** を用いた場合よりも小さく、**HOC₆-Au** を用いた場合よりも大きかった。この結果から、**2R/HOC₆-Au** と cyt *c* との電子移動過程は、 Co^{III} ユニットと cyt *c* 表面の Lys 残基との静電的な相互作用を経た後、 Co^{III} ユニットとの会合体形成よりも速く HOC_6 部分で電子移動が進行しているものと考えられる。この様に、**2R-Au** の Co^{III} ユニット間にアルカンチオール分子を挿入するという段階的な修飾方法を用いることによって、2 種の分子が均一に分散した混合分子膜を作製可能であり、鎖長や末端官能基を変化させることにより蛋白質との電子移動過程をより詳細に検討出来る可能性が示された。また、このような手法を用いることによって、様々な蛋白質表面に適した電極表面状態を設計・構築出来るものと考えられる。

第 5 章では、非常に構造の類似した 2 種類の azurin に対し、高密度に集積化した **2-Au** を用いた場合の電子移動挙動について述べる。

参考論文

- [1] Fedurco, M. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209*, 263-331.
- [2] Allen, P. M.; Hill, H. A. O.; Walton, N. J. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *178*, 69-86.
- [3] (a) Taniguchi, I.; Yoshimoto, S.; Nishiyama, K. *Chem. Lett.* **1997**, 353-354. (b) Sawaguchi, T.; Mizutani, F.; Yoshimoto, S.; Taniguchi, I. *Electrochim. Acta* **2000**, *45*, 2861-2867.
- [4] Liu, H.; Yamamoto, H.; Wei, J.; Waldeck, D. H. *Langmuir* **2003**, *19*, 2378-2387.
- [5] Terrettaz, S.; Cheng, J.; Miller, C. J.; Guiles, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7857-7858.
- [6] Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Seifert, S.; Sarauli, D.; Lee, G.; van Eldik, R. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7041-7056.
- [7] Imabayashi, S.; Mita, T.; Kakiuchi, T. *Langmuir* **2005**, *21*, 1470-1474.
- [8] Nishiyama, K.; Kie, T. T.; Taniguchi, I. *Chem. Lett.* **1999**, 753-754.
- [9] (a) Mrksich, M.; Grunwell, J. R.; Whitesides, G. M. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, *117*, 12009-12010. (b) Lahiri, J.; Isaacs, L.; Tien, J.; Whitesides, G. M. *Anal. Chem.* **1999**, *71*, 777-790. (c) Lahiri, J.; Isaacs, L.; Grzybowski, B.; Carbeck, J. D.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **1999**, *15*, 7186-7198. (d) Chapman, R. G.; Ostuni, E.; Yan, L.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2000**, *16*, 6927-6936. (e) Ostuni, E.; Grzybowski, B. A.; Mrksich, M.; Roberts, C. S.; Whitesides, G. M. *Langmuir* **2003**, *19*, 1861-1872.
- [10] (a) Wei, J.; Liu, H.; Dick, A. R.; Yamamoto, H.; He, Y.; Waldeck, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9591-9599. (b) Wei, J.; Liu, H.; Khoshtariya, D. E.; Yamamoto, H.; Dick, A.; Waldeck, D. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4700-4703. (c) Khoshtariya, D. E.; Wei, J.; Liu, H.; Yue, H.; Waldeck, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7704-7714. (d) Wei, J.; Liu, H.; Niki, K.; Margoliash, E.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 16912-16917.
- [11] Fujita, K.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Leigh, B. S.; Niki, K.; Gray, H. B.; Richards, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13954-13961.
- [12] Ooi, Y.; Hobara, D.; Yamamoto, M.; Kakiuchi, T. *Langmuir* **2005**, *21*, 11185-11189.
- [13] Aoki, H.; Hasegawa, K.; Tohda, K.; Umezawa, Y. *Biosens. Bioelectron.* **2003**, *18*, 261-267.
- [14] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.
- [15] Colonna, B.; Echegoyen, L. *Chem. Commun.* **2001**, 1104-1105.

第 5 章

光学活性 Co^{III} 錯体修飾電極を利用した azurin-1, azurin-2 の局所構造の評価

5.1. 序論

Azurin はバクテリア由来のブルー銅蛋白質の 1 つであり、活性中心に type I Cu を有した電子移動蛋白質である。Cu 中心は His117, His46 の N 原子、Cys112 の S 原子、Met121 の S 原子、Gly45 のペプチド O 原子がそれぞれ配位した三方両錐型構造であることが種々の結晶構造により明らかとされている(Figure 5-1)。^[1] Azurin と redox partner との電子移動反応は、“north pole”と呼ばれる Cu 中心近傍の疎水性部位により進行すると考えられており、特に直接 Cu に配位した His117 が電子移動に大きく関与していると報告されている。^[1,2] また、azurin を用いた不均一系電子移動反応においても同様に His117 周辺での電子移動が提案されている。^[3-8]

脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015 および GIFU 1051 株からは、分光学的性質の異なる 2 種類の azurin が単離され、その構造情報が明らかとされた。^[9,10] 単一の菌体から 2 種類の azurin が得られるのは非常に珍しく、この 2 種類の azurin (azurin-1 (az-1), azurin-2 (az-2)) の生体内における役割が検討されている。^[11,12] Kai らは、*Methylomonas* sp. strain J から得られる 2 種類の azurin と methylamine dehydrogenase との電子移動反応を行った場合、その電子移動速度は az-2 を用いた方が 5 倍も速いことを報告している。^[12]

本章では、*Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 株から産出される 2 種類の azurin と、第 2, 3 章にて設計・構築した光学活性 Co^{III} 錯体修飾電極(2-Au)との電子移動挙動について検討を行った(Scheme 5-1)。Az-1, az-2 の His117 周りの構造に着目すると、43 番目のアミノ酸残基 (az-1: Val, az-2: Ala) に違いが見られるのみである(Figure 5-1)。^[10] Az-1, az-2 は、cyt *c* の場合とは異なり、高密度に集積化した 2-Au を用いた場合においても良好な酸化還元応答を示した。また、2-Au の不斉を変化させた場合、ピーク挙動は azurin 間において大きく異なることを見出したので、His117 周辺残基との関連性を含めて以下にその詳細を述べる。

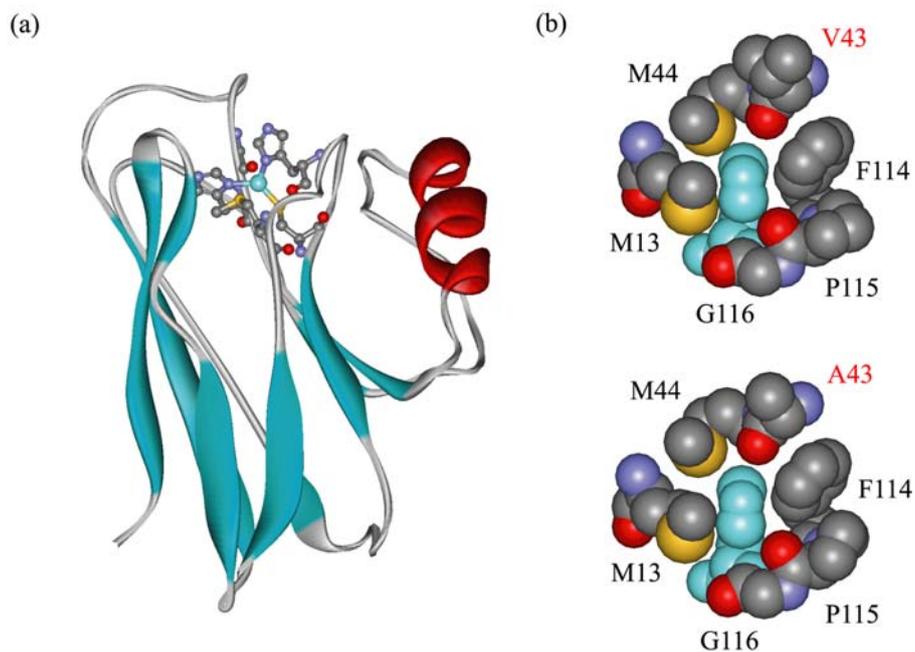
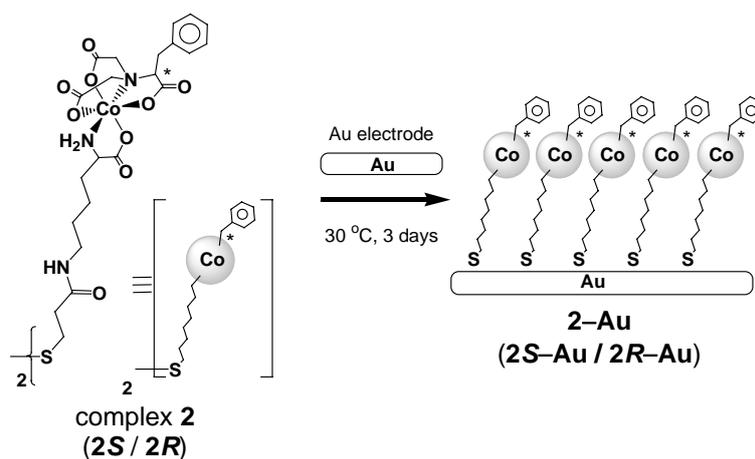


Figure 5-1. (a) Overall structure of az-1 (PDB code: 1RKR) from *Alcaligenes xylosoxidans* NCIMB 11015. (b) Local structures around His117 side chain (light blue) of az-1 (upper) and az-2 (lower; PDB code: 1DYZ) denoted by CPK model.



Scheme 5-1. Schematic view of Co^{III} complexes (**2**) and Au electrode modified with **2** (**2-Au**)

5.2. 実験

全ての試薬・溶媒は、ペプチド研究所、ナカライテスク、和光純薬、東京化成から購入したものをそのまま使用した。ミリ Q 水は Millipore Milli-Q biocel A により得た。錯体(2)の合成および構造同定は第 2 章で示した方法により行った。

5.2.1. 菌体培養および azurin の精製

菌体培養および azurin の精製は既報に従って行った。^[13] また、その過程においてトミー精工社製オートクレーブ BS-235、同社製超音波発生器 UD-201、同社製微量高速冷却遠心機 MX-160、アズワン社製クリーンベンチ卓上型 NS-AST および日立工機社製日立高速冷却遠心機 CR20G を使用した。

5.2.1.1. 菌体培養

金沢大学理学部化学科 櫻井武教授から提供された菌体(*Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051)を用い、以下の様に培養を行った。使用した液体培地の組成は、水 1000 mL に対し牛肉エキス 10 g、ポリペプトン 10 g、乾燥酵母エキス 1 g、塩化ナトリウム 3 g、酢酸ナトリウム 2.5 g、硝酸カリウム 3 g、各重金属溶液 200 μ L を含むものであり、これを 120 $^{\circ}$ C、15 分間加圧滅菌処理した。また用いた重金属溶液は $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 FeCl_3 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ それぞれの 5 wt% 水溶液である。

試験管保存用斜面培地に保存してあった菌体 2 本を 31 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。これを 30 mL 培地 6 本に植菌し、31 $^{\circ}$ C で一晩静置培養した。この手順を 50 mL、500 mL、6666 mL 培地を用いてそれぞれ同様に植菌し、静置培養した。この培養液を遠心分離(8000 rpm, 4 $^{\circ}$ C, 9 min)することで約 150 g の湿潤菌体を得た。

5.2.1.2. 各種蛋白質の分離

得られた湿潤菌体約 150 g を 50 mM phosphate buffer (pH 7.0) 溶液 250 mL に懸濁させ、0.05 M フェニルメチルスルホニルフルオリド(PMSF)の EtOH 溶液 2.5 mL を加えた後、4 $^{\circ}$ C で一晩攪拌した。この懸濁液を超音波破碎(180 W, 30 min)し、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ を 0.1 M となる様に加え、さらにデオキシリボヌクレアーゼ(DNase)、リボヌクレアーゼ(RNase)をそれぞれ 1 mg 加えた後、4 $^{\circ}$ C で一時間攪拌した。この破碎液を遠心分離(15000 rpm, 0 $^{\circ}$ C, 1 h)し、上澄み液を回収した。得られた上澄み液に 30 % 飽和となる様に硫酸アンモニウムを加え 4 $^{\circ}$ C で 30 分間攪拌した後、遠心分離(15000 rpm, 0 $^{\circ}$ C, 1 h)し、上澄み液を回収した。この上澄み液に 80 %

飽和となるように硫酸アンモニウムを加え 4 °C で 30 分間攪拌した後、遠心分離(10000 rpm, 4 °C, 30 min)し、沈殿物を得た。この沈殿物を 10 mM phosphate buffer (pH 6.0)溶液に溶解し、同 buffer にて 2 日間透析した。次に、同 buffer 溶液にて平衡化した CM-Sephadex C-50 (Pharmacia)によりイオン交換クロマトグラフィーを行った。10 mM phosphate buffer (pH 6.0)溶液により cyt *c*₅₅₃ を含む褐色分画、40 mM phosphate buffer (pH 6.0)溶液により azurin-1, azurin-2 を含む青色分画、60 mM phosphate buffer (pH 6.0)溶液により cyt *c*' の茶色分画、100 mM phosphate buffer (pH 6.0)溶液により NiR の青色分画をそれぞれ回収した。

5.2.1.3. azurin-1, azurin-2 の精製

5.2.1.2 項で得られた青色分画を 4 mM phosphate buffer (pH 6.0)溶液にて 2 日間透析した。次に、同 buffer 溶液にて平衡化した CM32-Cellulose (Whatman)によりイオン交換クロマトグラフィーを行った。4 mM, 15 mM phosphate buffer (pH 6.0)溶液により azurin-1, azurin-2 をそれぞれ回収した。Azurin-1, azurin-2 を 4 mM phosphate buffer (pH 6.0)溶液にてそれぞれ 2 日間透析し、再度 CM32-Cellulose (Whatman)によりイオン交換クロマトグラフィーを行い、azurin-1 ($A_{279}/A_{620} = 2.2$), azurin-2 ($A_{279}/A_{620} = 3.1$)をそれぞれ精製した。

5.2.2. UV-vis スペクトル測定

測定装置は日本分光社製 Ubest V-570 spectrophotometer を使用し、200-800 nm について測定した。セルは光路長 1 cm の石英セルを使用し、サンプルは蛋白質濃度 50-200 μ M の 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)溶液を用いた。

5.2.3. 錯体修飾電極の作製

2S-Au および **2R-Au** は、2.2.3.1 項にて洗浄した多結晶性金電極を 1 mM の **2S/2R** 水溶液に 30 °C にて 3 日間浸漬することでそれぞれ作製し、水でリンスした後に各種電気化学測定に使用した。

5.2.4. 電気化学測定

測定装置は北斗電工社製 HZ-5000 automatic polarization system を使用した。測定は三電極系で行い、作用極に種々の修飾電極、対極に Pt 線、参照極に Ag/AgCl (3 M NaCl)を使用した。測定前に約 15 分間 Ar バブリングすることで溶存酸素を除去した。測定には 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)溶液もしくは 0.5 M KOH 水溶液のいずれかを用いて行った。

[Ru^{III}(NH₃)₆]Cl₃ 溶液(1 mM)は、Aldrich より購入したものをういて同 buffer 溶液により調製

した。また azurin 溶液は、5.2.1 項にて精製したそれぞれの azurin を 100 μM となる様に 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0) 溶液により調製した。濃度は既報のモル吸光係数 (az-1: 620 (5000), az-2: 620 nm ($4500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$))^[9] を用いて、UV-vis スペクトルにより決定した (Figure 5-2)。

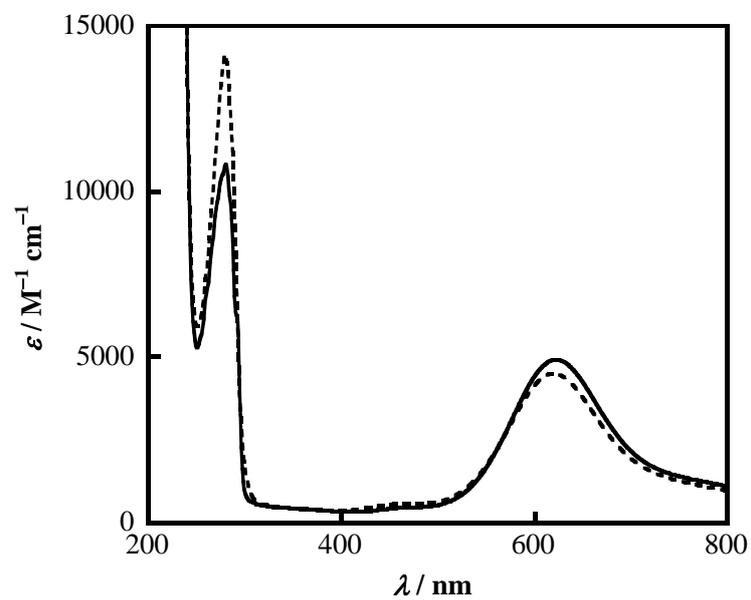


Figure 5-2. UV-vis spectra of az-1 (solid line) and az-2 (dashed line) in a 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.0).

5.3. 結果・考察

5.3.1. 2-Au の評価

2-Au は 2 の水溶液に 30 °C にて 3 日間浸漬することで作製した。得られた 2-Au を用いて 0.5 M KOH 水溶液中における LSV 測定を行い、Figure 5-3 にそれぞれ示した。2S-Au, 2R-Au はいずれも -870 mV 付近に還元波を示した。2 回目以降の掃引時にはピークが減衰し、最終的には消失したことから Au-S 結合の還元脱離波であると考えられる。還元脱離波のピーク電流量から算出した表面被覆率(Γ_{des})は、 $(4.0 \pm 1.6) \times 10^{-10}$ (2S-Au), $(3.2 \pm 1.2) \times 10^{-10}$ mol cm⁻² (2R-Au)であった。Co^{III} ユニットが理想的に表面に配向した場合の計算値は、 3.6×10^{-10} mol cm⁻² であり、得られた表面被覆率と非常に近い値であった。従って、2-Au は Co^{III} ユニットが理想的に近い状態で密にパッキングした単分子膜と考えられる。測定値が計算値よりもわずかに大きいのは、電気二重層の充電電流の寄与によるものと考えられる。

2-Au を用いた [Ru(NH₃)₆]³⁺ 溶液中での CV 測定を行ったところ、いずれも Ru^{II/III} に帰属される準可逆的な酸化還元応答を観測した (Figure 5-4)。2S-Au, 2R-Au を用いた場合の各掃引速度において得られたピーク電位差 (ΔE_p) を Figure 5-5 にプロットした。それぞれの ΔE_p 値はいずれの掃引速度においてもほぼ同一の値を示したことから、2S-Au, 2R-Au と [Ru(NH₃)₆]³⁺ 間の全体の電子移動速度 (k) はほぼ等しいものと考えられる。^[14]

5.3.2. 2-Au の不斉に依存した az-1 の電子移動挙動

2-Au を用いた az-1 溶液中における CV 測定を行い、各掃引速度におけるボルタモグラムを Figure 5-6 に示した。いずれの場合でも az-1Cu^{II/III} に帰属される酸化還元波は掃引速度の増加に伴ってブロード化し、2S-Au では 250 mV s⁻¹、2R-Au では 125 mV s⁻¹ 以上の掃引速度ではピークを検出することが出来なかった。このようなピーク挙動は、3.3.1 項で示した cyt c の場合と類似の挙動であり、Co^{III} ユニットと az-1 との会合過程に影響されたものと考えられる。各掃引速度における ΔE_p 値を Figure 5-7a に、その S-R 間の差 ($\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$) を Figure 5-7b にそれぞれ示した。5.3.1 項で示した様に、[Ru(NH₃)₆]³⁺ の場合では S-R 間の差は観測されなかった。しかし、az-1 を用いた場合、10 mV s⁻¹ では ΔE_p 値は S-R 間でほぼ等しいものの、それ以上の掃引速度では ΔE_p 値は 2S-Au を用いた方が 2R-Au を用いた場合よりも小さな値を示した。すなわち、 ΔE_p 値から見積もられる全体の電子移動速度 (k) は遅い掃引速度時においては S-R 間でほぼ等しく、速い掃引速度時においては 2S-Au を用いた方が速い。^[14] この様に az-1 を用いた場合では $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値は掃引速度に依存する挙動を示した。

Cyt *c* の場合と同様に全体の電子移動速度(k)が、拡散速度(k_D)、会合速度(k_A)、電子移動速度(k_{ET})によって支配されていると考えた場合、拡散速度(k_D)は $S-R$ 間の速度差に影響を与えないと考えられる。また、 10 mV s^{-1} において $S-R$ 間で同様の ΔE_p 値を示したことから、 k_{ET} 値に $S-R$ 間の有意な差は無いものと考えられ、類似の会合体を経由した電子移動反応であることが示唆される。従って、 $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値の掃引速度依存性は、az-1 と Co^{III} ユニットとの会合速度(k_A)の違いを反映したものと推察される。Cyt *c* の場合と同様に、az-1 を用いた場合でも **2S-Au** を用いた方が **2R-Au** を用いた場合よりも会合速度が速いと考えられる。

10 mV s^{-1} におけるピーク電位(E_p)が $S-R$ 間でほぼ等しい値であったため、3.3.3 項と同様に各掃引速度における $\Delta(\text{shift}|_{pa})_{S-R}$ 、 $\Delta(\text{shift}|_{pc})_{S-R}$ 値を算出し、Figure 5-8 にプロットした。いずれも $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ を用いた場合ではほぼ 0 に近い値であった。アノード反応(az-1Cu^{I} の酸化反応)側に着目すると、 $\Delta(\text{shift}|_{pa})_{S-R}$ 値は掃引速度に関わらずほぼ 0 であり、 $S-R$ 間の差は観測されなかった。しかし、カソード反応($\text{az-1Cu}^{\text{II}}$ の還元反応)側では、 $\Delta(\text{shift}|_{pc})_{S-R}$ 値は $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値と類似の掃引速度依存性を示した。Cyt *c* の場合では全く逆の傾向であったことから、いずれの反応時に $S-R$ 間の差を示すのかは蛋白質の酸化状態に伴う立体構造変化に強く依存するものと考えられる。従って、az-1 の場合では酸化型 az-1 が Co^{III} ユニットの不斉を強く認識しており、還元型 az-1 は Co^{III} ユニットの不斉にはほとんど影響されないことが示唆された。

5.3.3. 2-Au の不斉に依存した az-2 の電子移動挙動

2-Au を用いた az-2 溶液中における CV 測定を行い、各掃引速度におけるボルタモグラムを Figure 5-9 に示した。いずれの場合も $\text{az-2Cu}^{\text{II}}$ に帰属される酸化還元波は掃引速度の増加に伴ってブロード化し、**2S-Au** では 250 mV s^{-1} 、**2R-Au** では 125 mV s^{-1} 以上の掃引速度においてピークを検出することが出来なかった。このような挙動は az-1, cyt *c* の場合と同様であり、 Co^{III} ユニットとの会合過程に影響されたものと考えられる。各掃引速度における ΔE_p 値を Figure 5-10a に、その $S-R$ 間の差($\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$)を Figure 5-10b にそれぞれ示した。得られた ΔE_p 値は、az-1 の場合とは異なり、 10 mV s^{-1} においても $S-R$ 間の差を示しており、掃引速度の増加に関わらず $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値はほぼ一定の負の値を示した。 $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値が常に負であるということは、いずれの掃引速度時においても全体の電子移動速度(k)は **2S-Au** を用いた方が **2R-Au** を用いた場合よりも速いということである。^[14] この様に遅い掃引速度(10 mV s^{-1})においても全体の電子移動速度(k)は $S-R$ 間で異なる値を示したため、az-1, cyt *c* の場合とは異なり、電子移動速度(k_{ET})が $S-R$ 間で異なっていると考えられる。また、 $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値が掃引速度に依存せずほぼ一定の値であることから、会合速度(k_A)は $S-R$ 間でほぼ等しいものと考えられる。すな

わち az-2 の場合では、S-R 間で異なる会合体を經由して電子移動が進行しており、その会合速度はほぼ等しいものと考えられる。また、 10 mV s^{-1} におけるピーク電位が S-R 間で大きく異なっていたため $\Delta(\text{shift}|_{\text{pa}})_{\text{S-R}}$, $\Delta(\text{shift}|_{\text{pc}})_{\text{S-R}}$ については検討しなかった。

5.3.4. Azurin 間の立体構造の違いと電子移動挙動との関係

5.3.2, 5.3.3 項で述べた様に、az-1 は会合速度(k_A)に S-R 間の違いを示し、az-2 は会合速度の差を示さなかった。5.1 項で示した様に、His117 周辺構造は az-1, az-2 間においてほぼ類似であり、わずかに異なるのが 43 番目の残基(az-1: Val, az-2: Ala)のみである(Figure 5-1)。^[10] 電子移動反応が His117 周辺との相互作用により進行していると考え、**2-Au** を用いた場合の電子移動挙動の違いは 43 番目の残基の構造の違いに起因したものと考えられる。Isopropyl 基(Val)は、methyl 基(Ala)よりも立体的に嵩高く、**2-Au** と azurin 間の会合挙動の違いはこの嵩高さの違いに由来した立体的な効果もしくはそれに伴うコンフォメーション変化を反映したものと考えられる。従って、本系における会合挙動の違いは、立体的に込み合った活性中心を有した蛋白質に対して会合速度の差を強く示し、一方で比較的平らな表面構造に対しては有意な差を示さなかったと考えられる。蛋白質-蛋白質間の様な巨大分子間の相互作用では、Val, Ala の様なわずかな立体的な違いは電子移動反応に影響を与えないかもしれない。しかし、現在のところほとんど着目されていない蛋白質間電子移動反応後の脱離過程においてはこの様なわずかな違いが大きな影響を与えている可能性はある。本系ではこの様なわずかな立体構造の違いをも、小分子(Co^{III} ユニット)-蛋白質(azurin)間の相互作用、電子移動反応を通して検出可能であることが示された。

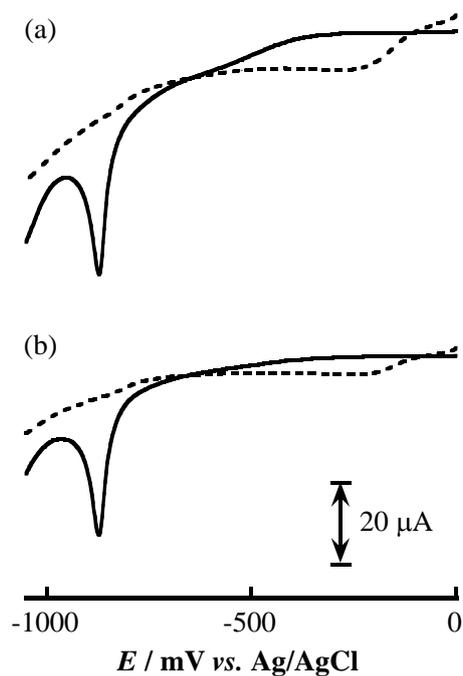


Figure 5-3. Linear sweep voltammograms of **2S-Au** (a) and **2R-Au** (b) in a 0.5 M KOH aqueous solution (solid line: first scan, dashed line: last scan). Scan rate is 50 mV s^{-1} .

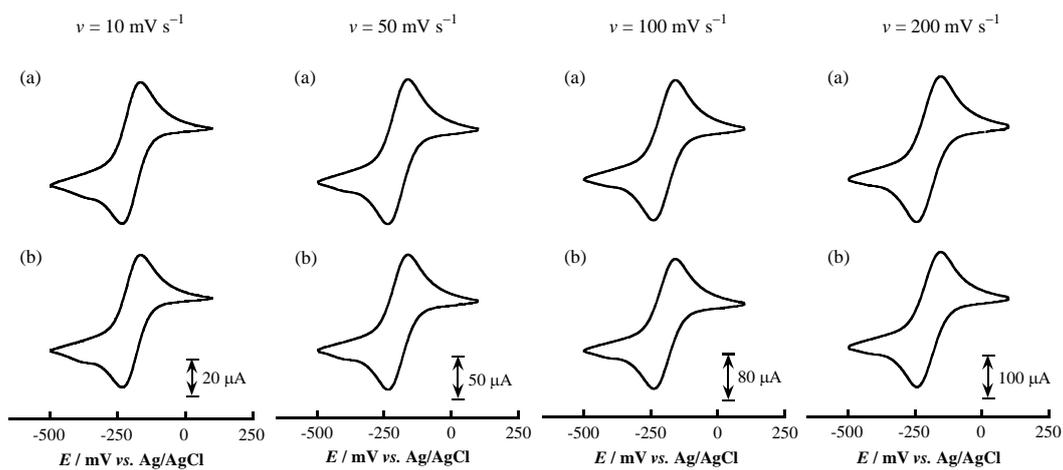


Figure 5-4. Cyclic voltammograms of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ using **2S-Au** (a) and **2R-Au** (b) at several scan rates.

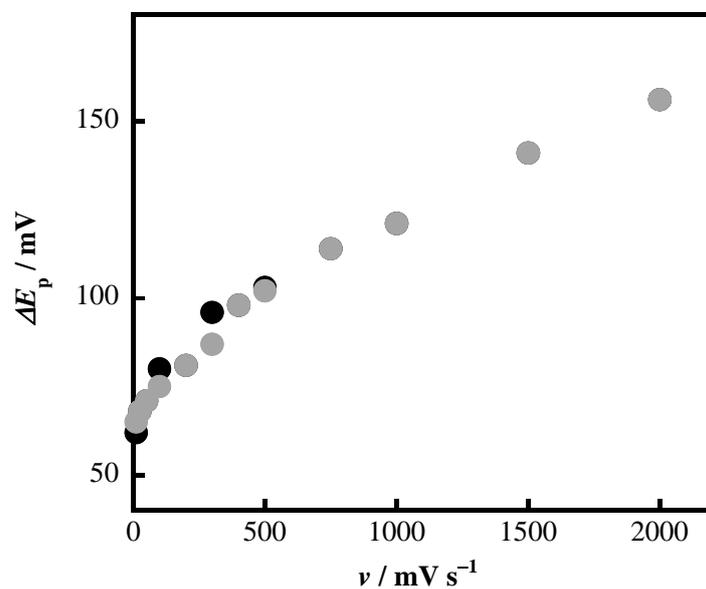


Figure 5-5. Relationship between scan rates and ΔE_p of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ as measured with **2S-Au** (black) and **2R-Au** (gray).

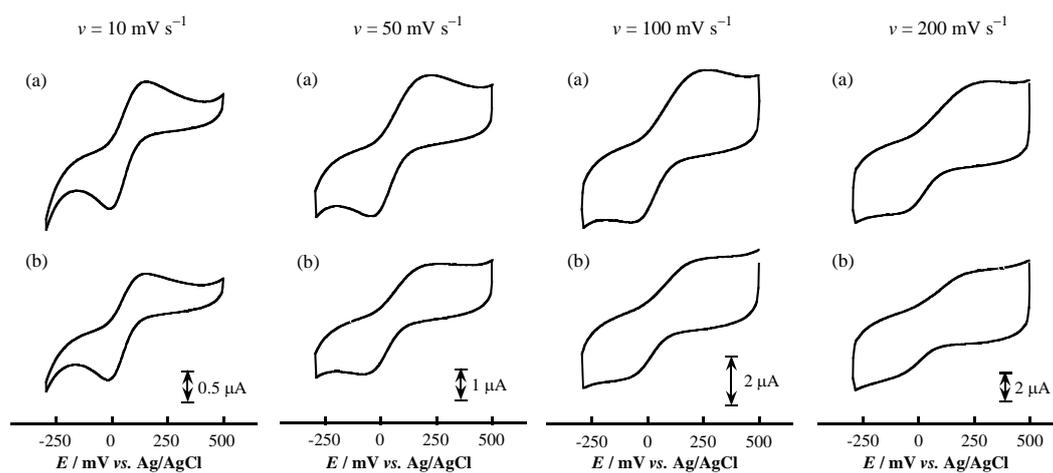


Figure 5-6. Cyclic voltammograms of az-1 using **2S-Au** (a) and **2R-Au** (b) at several scan rates.

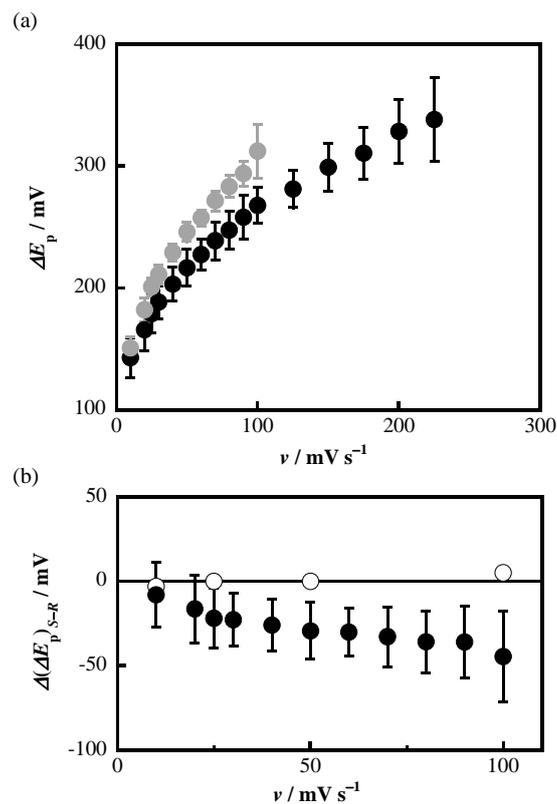


Figure 5-7. (a) Relationship between scan rates and ΔE_p of $az-1$ as measured with $2S\text{-Au}$ (black) and $2R\text{-Au}$ (gray). (b) Plot of $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ against scan rates for $az-1$ (filled circle) and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (open circle) using 2-Au . Error bars are the standard deviation.

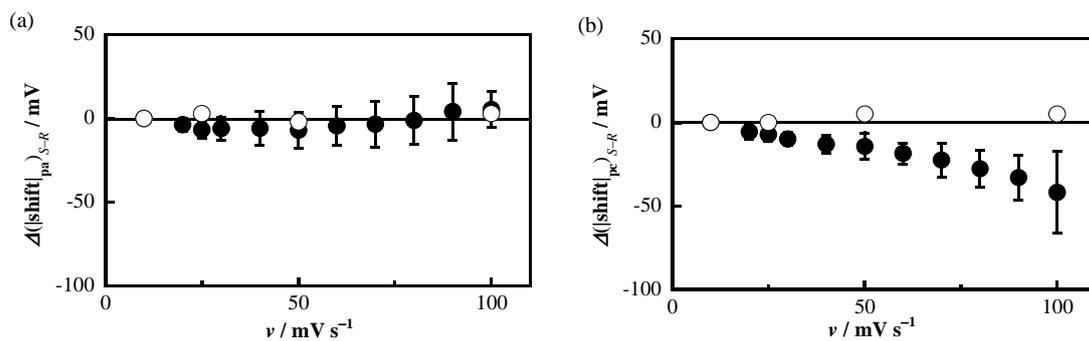


Figure 5-8. Plots of $\Delta(|\text{shift}|_{pa})_{S-R}$ (a) and $\Delta(|\text{shift}|_{pc})_{S-R}$ (b) against scan rates for $az-1$ (filled circle) and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (open circle) using 2-Au , respectively. Error bars are the standard deviation.

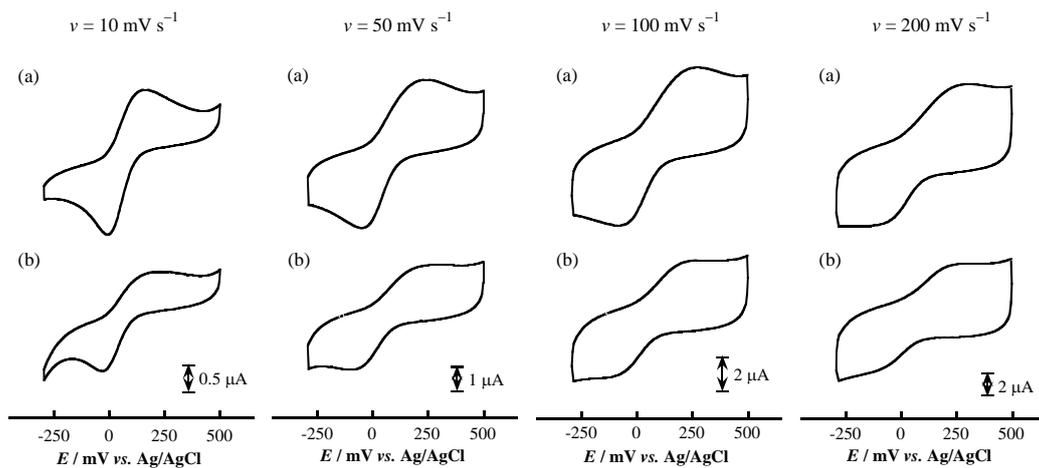


Figure 5-9. Cyclic voltammograms of az-2 using **2S-Au** (a) and **2R-Au** (b) at several scan rates.

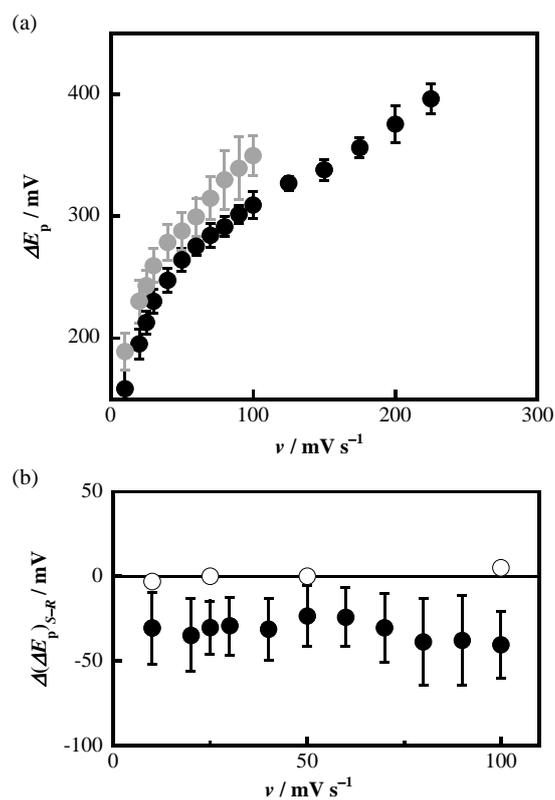


Figure 5-10. (a) Relationship between scan rates and ΔE_p of az-2 as measured with **2S-Au** (black) and **2R-Au** (gray). (b) Plot of $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ against scan rates for az-2 (filled circle) and $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (open circle) using **2-Au**. Error bars are the standard deviation.

5.4. 総括

本章では、第 2, 3 章にて設計・構築した光学活性 Co^{III} 錯体修飾電極(**2-Au**)を用いて、*Alcaligenes xylooxidans* GIFU 1051 株から産出される構造の類似した 2 種類の azurin (azurin-1 (az-1), azurin-2 (az-2))との電子移動反応について検討を行った。

2 種類の azurin は、密にオーダーした **2-Au** を用いた場合でも azCu^{III} に由来する酸化還元応答を示し、その酸化還元波は掃引速度の増加に伴いブロード化していった。それぞれの $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値に着目すると、az-1 を用いた場合では掃引速度に依存して $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値が減少するのに対して、az-2 を用いた場合では掃引速度に依存せずほぼ一定の負の値を示した。この結果から、az-1 を用いた場合は *cyt c* の場合と同様に電子移動速度(k_{ET})に *S-R* 間の差は無く、 $\Delta(\Delta E_p)_{S-R}$ 値は会合速度(k_A)の違いを反映したものと考えられる。一方、az-2 を用いた場合では、遅い掃引速度においても ΔE_p 値に差を示したため電子移動速度(k_{ET})に *S-R* 間の差が存在し、会合速度(k_A)は *S-R* 間に有意な差は無いものと考えられる。2 種の azurin 間の His117 周りの立体構造は非常に類似しており、わずかに 43 番目の残基(az-1: Val, az-2: Ala)に違いが見られるのみである。従って、このような会合挙動の違いは、43 番目の残基の立体的な影響もしくはそれに伴うコンフォメーション変化を反映したものと考えられる。本系における **2-Au** は Co^{III} ユニット-蛋白質間の相互作用を利用することにより、蛋白質の局所構造のわずかな違いをも検出可能であることが示された。

第 6 章では、**2** の Bzl 基を除去した錯体を用いた修飾電極を作製し、az-1, az-2 との電子移動反応における側鎖置換基の影響について述べる。

參考論文

- [1] Messerschmidt, A.; Huber, R.; Paulos, T.; Wieghardt, K. *Handbook of Metalloproteins*; Wiley: Chichester, 2001; Vol. 2.
- [2] van de Kamp, M.; Silvestrini, M. C.; Brunori, M.; van Beeumen, J.; Hali, F. C.; Canters, G. W. *Eur. J. Biochem.* **1990**, *194*, 109-118.
- [3] Armstrong, F. A.; Hill, H. A. O.; Oliver, B. N.; Walton, N. J. *J. Am. Chem. Soc.* **1984**, *106*, 921-923.
- [4] (a) Sakurai, T.; Ikeda, O.; Suzuki, S. *Inorg. Chem.* **1990**, *29*, 4715-4718. (b) Sakurai, T.; Nose, F. *Chem. Lett.* **1995**, 1075-1076. (c) Sakurai, T.; Nose, F.; Fujiki, T.; Suzuki, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1996**, *69*, 2855-2862.
- [5] (a) Chi, Q.; Zhang, J.; Nielsen, J. U.; Friis, E. P.; Chorkendorff, I.; Canters, G. W.; Andersen, J. E. T.; Ulstrup, J. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 4047-4055. (b) Fristrup, P.; Grubb, M.; Zhang, J.; Christensen, H. E. M.; Hansen, A. M.; Ulstrup, J. *J. Electroanal. Chem.* **2001**, *511*, 128-133. (c) Chi, Q.; Zhang, J.; Andersen, J. E. T.; Ulstrup, J. *J. Phys. Chem. B* **2001**, *105*, 4669-4679.
- [6] Gaigalas, A. K.; Niaura, G. *J. Colloid Interface Sci.* **1997**, *193*, 60-70.
- [7] Armstrong, F. A.; Barlow, N. L.; Burn, P. L.; Hoke, K. R.; Jeuken, L. J. C.; Shenton, C.; Webster, G. R. *Chem. Commun.* **2004**, 316-317.
- [8] Fujita, K.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Leigh, B. S.; Niki, K.; Gray, H. B.; Richards, J. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2004**, *126*, 13954-13961.
- [9] Yamaguchi, K.; Deligeer; Nakamura, N.; Shidara, S.; Iwasaki, H.; Suzuki, S. *Chem. Lett.* **1995**, 353-354.
- [10] (a) Li, C.; Inoue, T.; Gotowda, M.; Suzuki, S.; Yamaguchi, K.; Kataoka, K. *Acta Crystallogr.* **1997**, *D53*, 337-338. (b) Li, C.; Inoue, T.; Gotowda, M.; Suzuki, S.; Yamaguchi, K.; Kataoka, K.; Kai, Y. *Acta Crystallogr.* **1998**, *D54*, 347-354. (c) Dodd, F. E.; Abraham, Z. H.; Eady, R. R.; Hasnain, S. S. *Acta Crystallogr.* **2000**, *D56*, 690-696.
- [11] Dodd, F. E.; Hasnain, S. S.; Hunter, W. N.; Abraham, Z. H. L.; Debenham, M.; Kanzler, H.; Eldridge, M.; Eady, R. R.; Amber, R. P.; Smith, B. E. *Biochemistry* **1995**, *34*, 10180-10186.
- [12] Inoue, T.; Suzuki, S.; Nishio, N.; Yamaguchi, K.; Kataoka, K.; Tobari, J.; Yong, X.; Hamanaka, S.; Matsumura, H.; Kai, Y. *J. Mol. Biol.* **2003**, *333*, 117-124.
- [13] Suzuki, H.; Iwasaki, H. *J. Biochem.* **1962**, *52*, 193-199.
- [14] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.

第6章

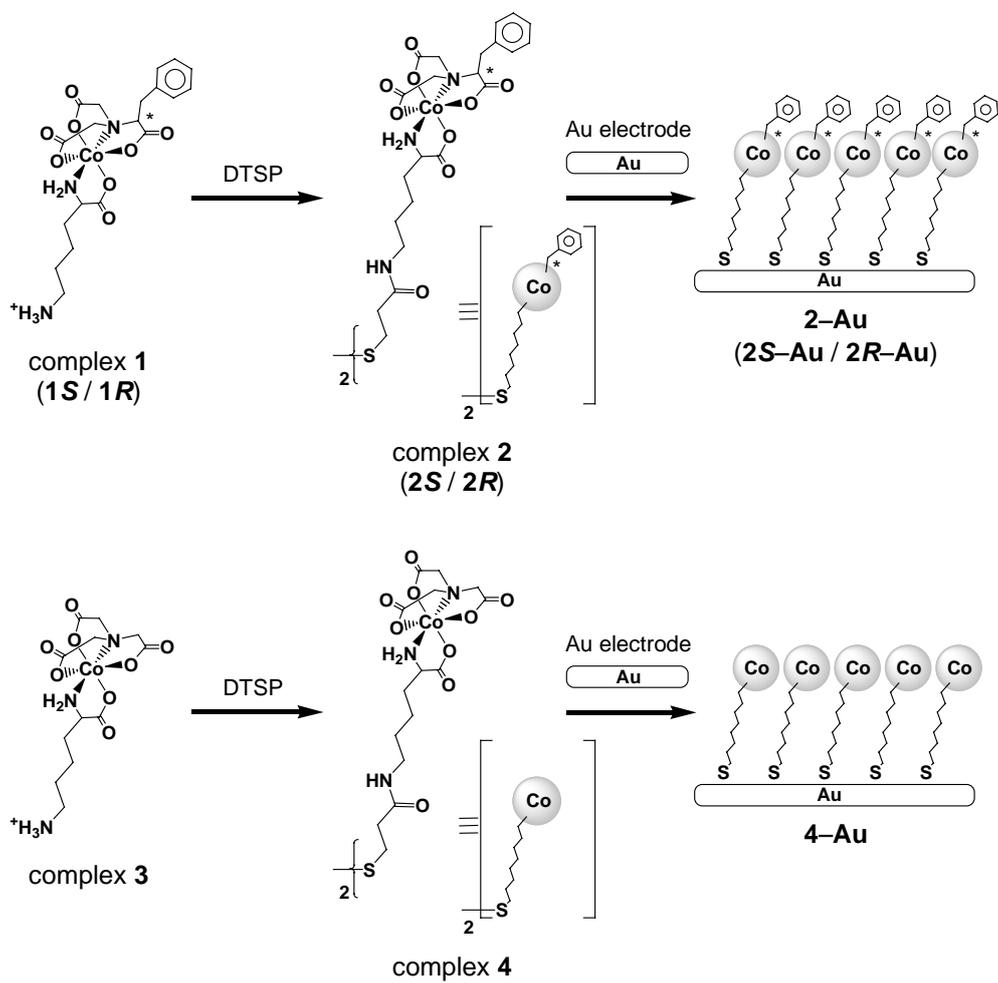
Co^{III} 錯体修飾電極の側鎖置換基が与える azurin との電子移動反応への影響

6.1. 序論

電子移動反応において、酸化還元物質間、酸化還元物質－電極表面間の距離はその速度に対して非常に大きな影響を与える。^[1,2] 均一溶液中では酸化還元物質間の酸化還元電位差が driving force となり電子移動反応が進行するため、酸化還元電位差も電子移動の重要なファクターであるが、不均一系の場合では電極電位が電子移動の driving force となるため酸化還元電位差は無視出来る。^[2] Niki および Waldeck らは、それぞれ末端カルボキシルアルカンチオール、末端ピリジルアルカンチオールを用いた cyt c 固定化電極を用いて、電子移動速度(k_{ET})とアルカンチオールの鎖長との関係について検討している。^[3,4] 異なる2つの系および Gray らによる均一溶液中での分子内電子移動反応の結果から、距離が約 17 Å を越えると k_{ET} 値は指数関数的に減少することを報告している。^[3-5]

溶液中の cyt c とのプロモーター電子移動系においても鎖長の及ぼす影響についての多数の報告がある。^[6-10] Khoshtariya らは、末端ヒドロキシルアルカンチオールを用いた場合においても cyt c との不均一系電子移動速度(k)が鎖長の増加に伴って激減することを報告している。^[6] この様に修飾分子の鎖長(大きさ)は不均一系電子移動反応において無視出来ないファクターである。

本章では、第5章で記した **2-Au** と *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 株由来の2種類の azurin (azurin-1 (az-1), azurin-2 (az-2)) との電子移動挙動をより詳細に検討するため、**2** の Bzl 基を除去した錯体 **4** を固定化した修飾電極(**4-Au**)を作製した(Scheme 6-1)。**4-Au** は、**2-Au** と同様に Co^{III} ユニットが密に配向した単分子膜であり、az-1, az-2 溶液中でのボルタモグラムにおいても酸化還元応答を示した。ボルタモグラムから得られたパラメータ(ピーク電流値、ピーク電位差、ピーク電位、半波電位)について **4-Au**, **2-Au** 間で比較・検討を行ったところ、アノード反応($azCu^I$ の酸化反応)およびカソード反応($azCu^{II}$ の還元反応)ではその反応速度が大きく異なっており、使用した電極によって様々な挙動を示すことを見出したため、azurin-Co^{III} ユニット間の相互作用も含めて以下に詳細を記す。



Scheme 6-1. Schematic view of Co^{III} complexes (1-4) and modified Au electrodes with 2, 4 (2-Au, 4-Au)

6.2. 実験

全ての試薬・溶媒は、ペプチド研究所、ナカライテスク、和光純薬、東京化成から購入したものをそのまま使用した。ミリQ水は Millipore Milli-Q biocel A により得た。アニオン交換クロマトグラフィーに用いた QAE Sephadex A-25 (Cl⁻ form)は Pharmacia より、ゲル濾過クロマトグラフィーに用いた バイオゲル P-2 (Extra Fine)は BIO-RAD より購入した。Azurin の精製は第 5 章に記した方法により行った。

6.2.1. 錯体合成

錯体(3, 4)は、第 2 章で記した方法により合成を行った。

6.2.1.1. 3 の合成

CoCl₂·6H₂O 1.2 g (5 mmol)を 3 mL の水に溶解し、30 % H₂O₂ 水溶液(2 mL) を加えた。この溶液を、KHCO₃ 3.5 g (35 mmol)の水溶液(30 mL)に氷浴中でゆっくりと加えた。反応溶液を濾過した後、KOH で中和した NTA 1.05 g (5.5 mmol)の水溶液(50 mL)に加え、室温にて一晩攪拌した。この溶液に、(S)-Lys-HCl 0.91 g (5 mmol)を 10 mL の水に溶解し、4 N KOH 水溶液により pH 7 に調整した溶液を加えた後、6 N HCl 水溶液により pH 7 に調整した。活性炭を少量加え、50 °C にて 6 時間攪拌した後、活性炭を濾去した。得られた濾液を減圧濃縮し、卓上電気透析装置 マイクロ・アシライザー G1 (旭化成)により徹底脱塩操作を行った。脱塩後の溶液を減圧濃縮し、残渣を少量(3 mL)の水に溶解し、アニオン交換クロマトグラフィー(QAE-Sephadex A-25)を行ったところ、水(イオン強度なし)にて赤紫色バンドを溶離した。この溶液を減圧濃縮し、残渣を再度少量(3 mL)の水に溶解し、アニオン交換クロマトグラフィー(QAE-Sephadex A-25)を非常に遅い流速(30 秒/滴)で行ったところ、水にて青紫色(*cis*(N)-体)および赤紫色(*trans*(N)-体)のバンドが溶離した。精製した赤紫色溶液を減圧濃縮し、水/EtOH 中で再沈澱操作を行うことにより赤紫色粉末を得た。得られた粉末を真空乾燥し、各種測定を行った。

Yield 447 mg (23 %). δ = 1.7-1.8 (m, 4H, δ , γ -CH₂-(Lys)), 1.94 (m, 1H, β -CH₂-(Lys)), 2.05 (m, 1H, β -CH₂-(Lys)), 3.07 (t, 2H, J = 7.1 Hz, ϵ -CH₂-(Lys)), 3.88 (dd, 1H, J = 4.0, 8.5 Hz, α -H(Lys)), 4.31* (d, 1H, J = 16.2 Hz, -CH_{G2}-(NTA)), 4.32* (s, 2H, -CH_{R2}-(NTA)), 4.33* (d, 1H, J = 16.2 Hz, -CH_{G2}-(NTA)), 4.68 (d, 1H, J = 16.4 Hz, -CH_{G2}-(NTA)), 4.69 (d, 1H, J = 16.4 Hz, -CH_{G2}-(NTA)); * overlapped. MS (ESI-TOF): m/z : 392.0 [M - H]⁺. Anal. calcd. for

3·1.75H₂O (C₁₂H_{23.5}N₃CoO_{9.75}): C, 33.93; H, 5.58; N, 9.89. Found: C, 34.13; H, 5.89; N, 9.76.

6.2.1.2. 4 の合成

3 100 mg (0.256 mmol)を少量の 0.1 M KCl 水溶液に溶解し、減圧濃縮した後に DMSO に溶解した。この DMSO 溶液にトリエチルアミン 0.026 g (0.256 mmol)を加え、DMSO 10 mL に溶解した DTSP 51.7 mg (0.128 mmol)を室温にてゆっくりと滴下した。3 時間攪拌した後、減圧濃縮し、水に溶解した。0.1 M KOH 水溶液にて pH 7 に調整した後、減圧濃縮し、MeOH にて数回脱塩した。残渣を少量(3 mL)の水に溶解し、ゲル濾過クロマトグラフィー(バイオゲル P-2)により精製した。得られた精製物を水/EtOH にて再沈澱操作を行うことにより、赤紫色粉末を得た。得られた粉末を真空乾燥し、各種測定を行った。

Yield 47.6 mg (36 %). ¹H-NMR (600 MHz, D₂O): δ = 1.6-1.7 (m, 8H, δ + γ-CH₂-(Lys)), 1.90 (m, 2H, β-CH₂-(Lys)), 2.01 (m, 2H, β-CH₂-(Lys)), 2.67 (t, 4H, J = 6.8 Hz, S-CH₂-CH₂-(DTSP)), 2.96 (t, 4H, J = 6.7 Hz, S-CH₂-CH₂-(DTSP)), 3.27 (m, 4H, ε-CH₂-(Lys)), 3.84 (dd, 2H, J = 4.0, 8.8 Hz, α-H(Lys)), 4.30* (d, 2H, J = 16.3 Hz, -CH_{G2}-(NTA)), 4.31* (s, 4H, -CH_{R2}-(NTA)), 4.32* (d, 2H, J = 14.4 Hz, -CH_{G2}-(NTA)), 4.67 (d, 2H, J = 16.6 Hz, -CH_{G2}-(NTA)), 4.69 (d, 2H, J = 16.6 Hz, -CH_{G2}-(NTA)); * overlapped. MS (ESI-TOF): m/z: 479.0 [M - 2K]²⁻. Anal. calcd. for 4·2H₂O (C₃₀H₄₈N₆Co₂K₂O₂₀S₂): C, 33.58; H, 4.56; N, 7.77. Found: C, 33.48; H, 4.64; N, 7.69.

6.2.2. 測定機器

6.2.2.1. UV-vis スペクトル

測定装置は日本分光社製 Ubest V-570 spectrophotometer を使用し、200-900 nm について測定した。セルは光路長 1 cm の石英セルを使用し、サンプルは錯体濃度 1 mM の水溶液および蛋白質濃度 50-200 μM の 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)溶液を用いた。

6.2.2.2. CD スペクトル

測定装置は日本分光社製 J-820 spectrophotometer を使用し、300-700 nm について測定した。セルは光路長 1 cm の石英セルを使用し、サンプルは錯体濃度 1 mM の水溶液を用いた。

6.2.2.3. ¹H-NMR スペクトル

測定装置は BRUKER 社製 AVANCE-600 spectrometer を使用し、δ = -0.2-9.8 ppm について測定した。内径 5 mm のサンプルチューブを使用し、サンプルは錯体濃度 0.1-1 mM の D₂O

溶液を用いた。ケミカルシフトは内部標準の DSS を基準として表記した。

6.2.2.4. ESI-TOF Mass スペクトル

測定装置は Micromass 社製 LCT ESI-TOF spectrometer を使用し、 $m/z = 100-1500$ について negative mode で測定した。サンプルは錯体濃度 $10 \mu\text{M}$ の MeOH 溶液を使用し、マイクロシリンジを用いてシリンジポンプ ($300 \mu\text{L/h}$) により溶液を噴霧した。校正は NaI を用いて行った。

6.2.2.5. 有機微量元素分析

測定装置は Perkin Elmer 社製 2400II CHNS/O を使用した。試料測定前にガスブランク測定を行った後、錫箔に封入したサンプル (約 1.5 mg) を 2 回測定し、それを元素分析用アセトアニリド標準試料による補正を行うことで C, H, N の各元素含有量の比を算出した。

6.2.3. 各種修飾電極の作製

4-Au は、2.2.3.1 項にて洗浄した多結晶性金電極を 1 mM の **4** 水溶液に 30°C にて 3 日間浸漬することで作製し、水にてリンスした後に各種電気化学測定に使用した。また、**pyS-Au** は同様に洗浄した金電極を 1 mM の 4-mercaptopyridine 水溶液に室温にて 30 分浸漬することで作製し、水にてリンスした後に各種電気化学測定に使用した。

6.2.4. 電気化学測定

測定装置は北斗電工社製 HZ-5000 automatic polarization system を使用した。測定は三電極系で行い、作用極にグラッシーカーボン (GC) および種々の修飾電極、対極に Pt 線、参照極に Ag/AgCl (3 M NaCl) を使用した。測定前に約 15 分間 Ar バブリングすることで溶存酸素を除去した。測定には $0.1 \text{ M phosphate buffer (pH 7.0)}$ 溶液もしくは 0.5 M KOH 水溶液のいずれかを用いて行った。 $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ 溶液 (1 mM) は、Aldrich より購入した $[\text{Ru}^{\text{III}}(\text{NH}_3)_6]\text{Cl}_3$ を用いて同 buffer 溶液により調製した。また azurin 溶液は、5.2.4 項にて記した方法により調製した。

6.3. 結果

6.3.1. Co^{III}錯体(3, 4)の構造

錯体 **3**, **4** の水溶液中における UV-vis スペクトルを測定したところ、372, 509 nm 付近に 2 つの *d-d* 遷移を観測した (Figure 6-1, Table 6-1)。同様の配位原子を有した *trans*(N)-K[Co^{III}((*S*)-bcmpa)((*S*)-phenylalanine)]錯体^[11] および **1**, **2** のスペクトルと類似の極大吸収波長、モル吸光係数(ϵ)を示したことから、**3**, **4** も *trans*(N)-[Co^{III}(N)₂(O)₄]型の配位形式であると推定される。**3**, **4** の水溶液中における CD スペクトルは **1**, **2** と類似のスペクトルパターンを示し、610 nm 付近の吸収はわずかに負の値を示した (Figure 6-2, Table 6-1)。2.3.1 項において、**1**, **2** の 610 nm 付近の吸収のモル円二色性($\Delta\epsilon$)が Phe 部位の不斉に対応して完全な y 軸対称にならなかったのは、**3**, **4** の負のコットン効果が重なっているためである。また、**4** のモル吸光係数およびモル円二色性は **3** に比べて約 2 倍の値を示していたことから、**3** の dimer であることが示唆される。

6.3.2. 4-Au の評価

4-Au は、第 5 章にて使用した **2-Au** と同様の浸漬条件(**4** の水溶液に 30 °C にて 3 日間浸漬)により作製した。得られた **4-Au** を用いて 0.5 M KOH 水溶液中における LSV 測定を行い、Figure 6-3 に示した。**4-Au** は、**2-Au** の場合と同様に -870 mV 付近に還元脱離波を示し、そのピーク電気量から算出した表面被覆率(Γ_{des})は $(4.1 \pm 1.5) \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$ であった。得られた表面被覆率は Co^{III} ユニットが理想的に配向した場合の計算値 ($3.6 \times 10^{-10} \text{ mol cm}^{-2}$) に非常に近い値であったため、**4-Au** も **2-Au** と同様に Co^{III} ユニットが理想的に近い状態で密にパッキングした単分子膜と考えられる。測定値が計算値よりもわずかに大きいのは、電気二重層の充電電流の寄与によるものと考えられる。

4-Au を用いた [Ru(NH₃)₆]³⁺ 溶液中での CV 測定を行ったところ、いずれも Ru^{II/III} に帰属される準可逆的な酸化還元応答を観測した (Figure 6-4a)。得られたピーク電流値は **2-Au** を用いた場合とほぼ同じ値であった (Figure 6-5a)。**4-Au**, **2-Au** を用いた場合の各掃引速度において得られたピーク電位差(ΔE_p)を Figure 6-6a にそれぞれプロットした。 ΔE_p 値は **2S-Au**, **2R-Au** 間ではほぼ一致した値を示したものの、それらに比べて **4-Au** を用いた方がわずかに小さな値を示した。

6.3.3. 4-Au を用いた az-1 の電子移動挙動

4-Au を用いた az-1 溶液中での CV 測定を行い、各掃引速度におけるボルタモグラムを

Figure 6-4b に示した。az-1Cu^{III} に帰属される酸化還元応答が観測されたものの、そのピーク電流値は非常に小さかった。4-Au, 2-Au を用いた 50 mV s⁻¹ におけるピーク電流値を Figure 6-5b に示した。同条件の az-1 溶液を用いているにも関わらず、4-Au を用いた場合のピーク電流値はアノード側、カソード側を問わず 2-Au を用いた場合の半分以下の値であった。また、4-Au, 2-Au を用いた各掃引速度における ΔE_p 値を Figure 6-6b にそれぞれ示した。4-Au を用いた場合の ΔE_p 値は 2S-Au の場合とほぼ類似の値を示し、2R-Au の場合よりも小さかった。

6.3.4. 4-Au を用いた az-2 の電子移動挙動

4-Au を用いた az-2 溶液中での CV 測定を行い、各掃引速度におけるボルタモグラムを Figure 6-4c に示した。az-2Cu^{III} に帰属される酸化還元応答が観測されたものの、そのピーク電流値は az-1 の場合と同様に非常に小さかった。4-Au, 2-Au を用いた 50 mV s⁻¹ におけるピーク電流値を Figure 6-5c に示した。同条件の az-2 溶液を用いているにも関わらず、4-Au を用いた場合のピーク電流値はアノード側、カソード側を問わず 2-Au を用いた場合の 10 分の 1 以下の値であった。4-Au, 2-Au を用いた各掃引速度における ΔE_p 値を Figure 6-6c にそれぞれ示した。4-Au を用いた場合の ΔE_p 値は 2S-Au, 2R-Au の場合よりもさらに小さな値を示した。

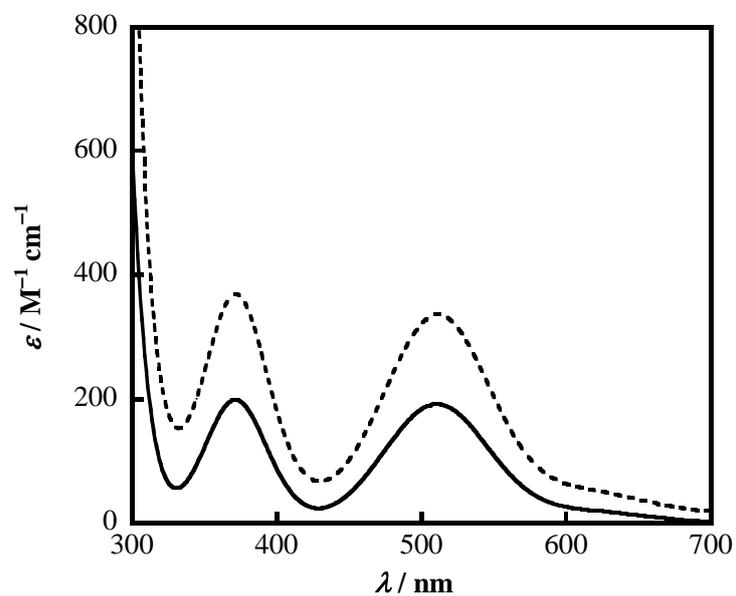


Figure 6-1. UV-vis spectra of complexes **3** (solid line) and **4** (dashed line) in an aqueous solution.

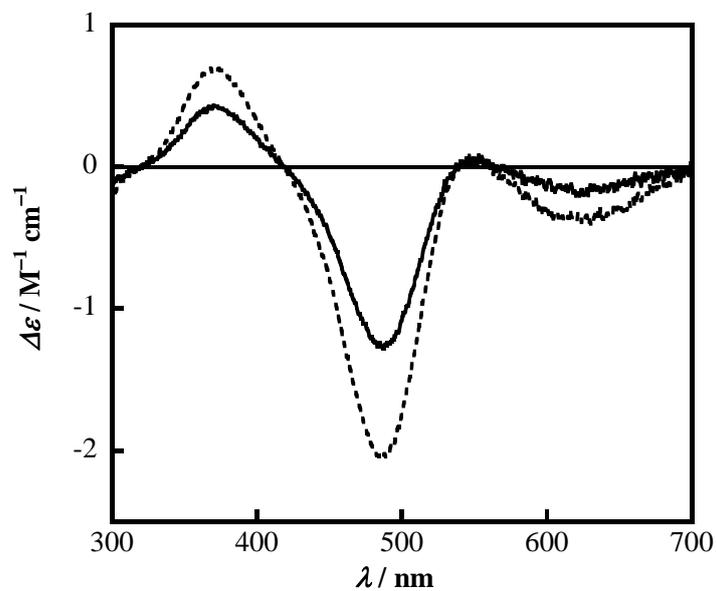


Figure 6-2. Circular dichroism spectra of complexes **3** (solid line) and **4** (dashed line) in an aqueous solution.

Table 6-1. UV-vis, CD spectral and electrochemical data for **3** and **4**

	UV-vis ^a		CD ^a			CV ^b	
	$\lambda / \text{nm} (\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$		$\lambda / \text{nm} (\Delta\epsilon / \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$			$E_{\text{red}} / \text{mV}$	
3	372 (200)	509 (190)	371 (+0.42)	485 (-1.2)	553 (+0.083)	624 (-0.16)	-585
4	372 (370)	511 (340)	374 (+0.69)	488 (-2.0)	547 (+0.038)	625 (-0.38)	-645

^a 1 mM (in H₂O), $l = 1$ cm; ^b 1 mM (in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)).

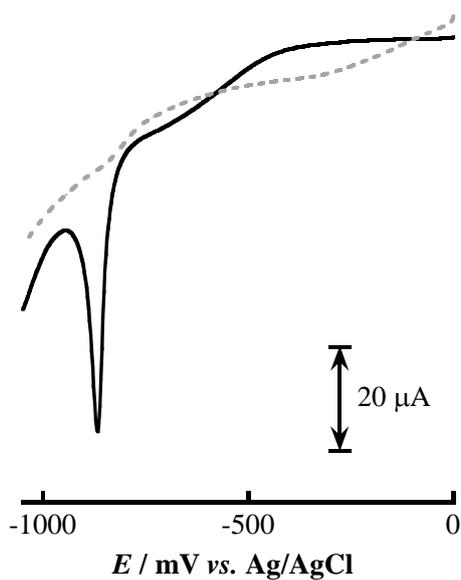


Figure 6-3. Linear sweep voltammograms of **4-Au** in a 0.5 M KOH aqueous solution (solid line: first scan, dashed line: last scan). Scan rate is 50 mV s⁻¹.

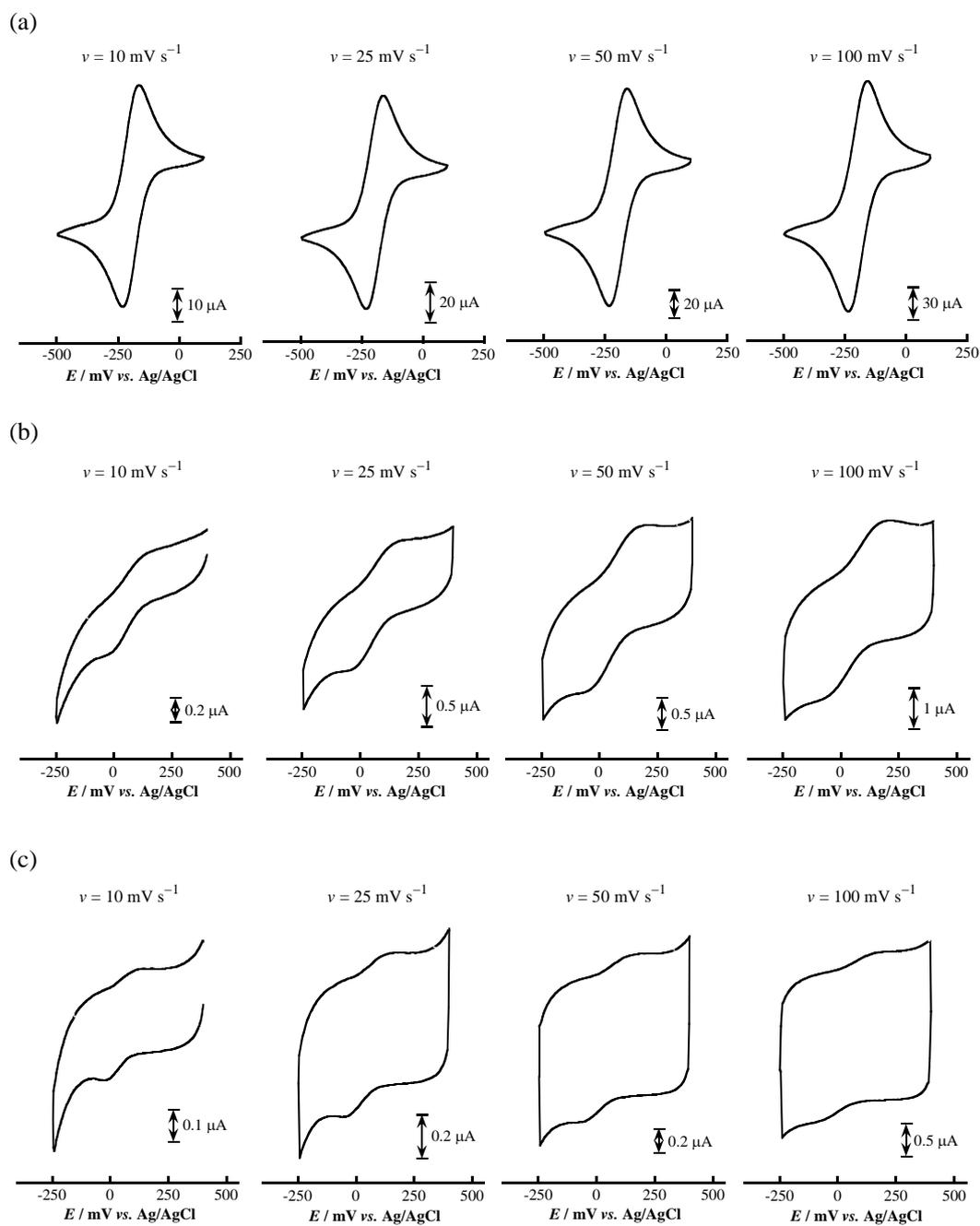


Figure 6-4. Cyclic voltammograms of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (a), az-1 (b), and az-2 (c) using **4-Au** at several scan rates.

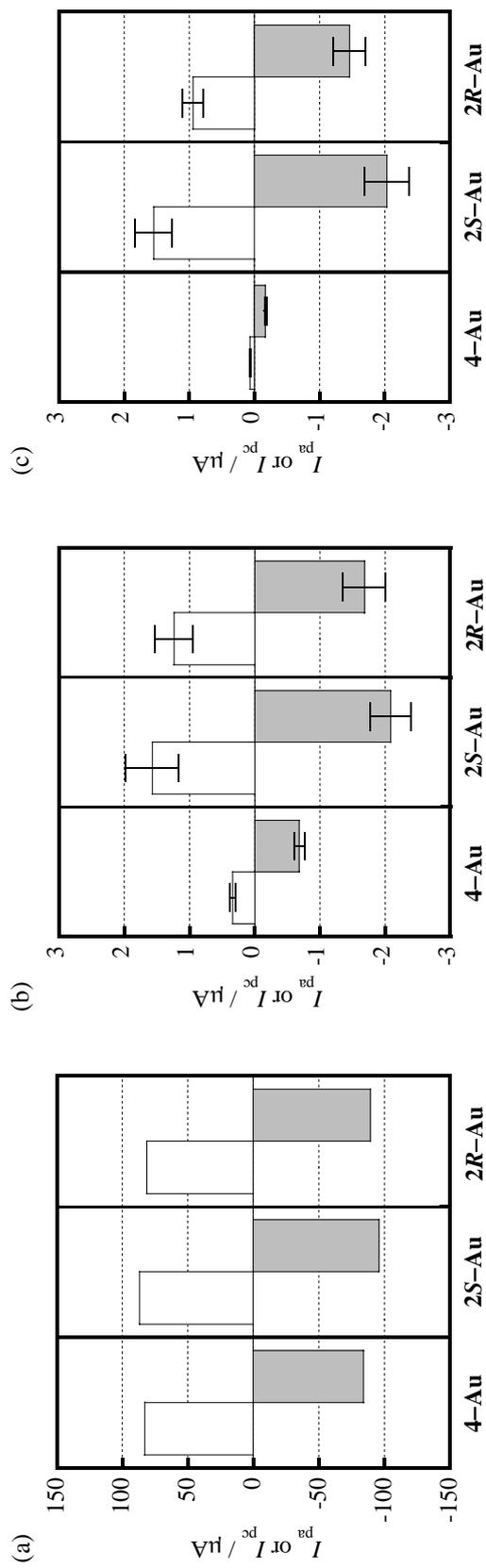


Figure 6-5. Anodic (open bar) and cathodic peak currents (filled bar) of $[Ru(NH_3)_6]^{3+}$ (a), az-1 (b), and az-2 (c) as measured with a series of modified Au electrodes at 50 mV s^{-1} , respectively. Error bars are the standard deviation.

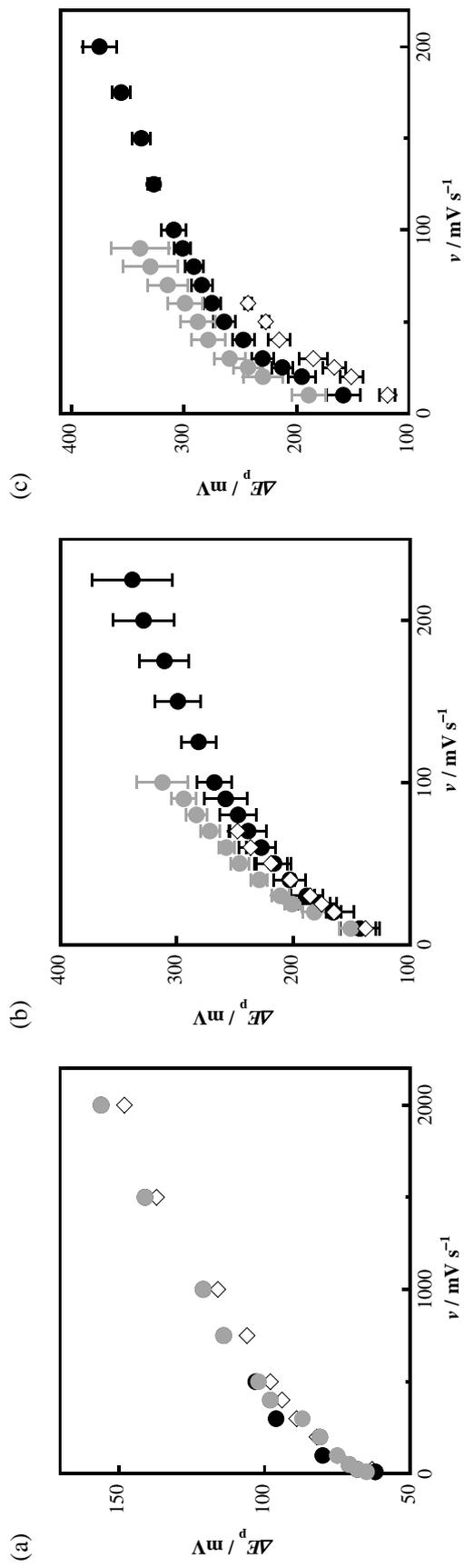


Figure 6-6. Relationship between scan rates and ΔE_p of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (a), az-1 (b), and az-2 (c) as measured with **4-Au** (black open diamond), **2S-Au** (black filled circle), and **2R-Au** (gray filled circle), respectively. Error bars are the standard deviation.

6.4. 考察

6.4.1. ピーク電流値(I_p)の比較

$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ 溶液中のボルタモグラムのピーク電流値(50 mV s^{-1})は、いずれの修飾電極を用いた場合においてもほぼ同じ値を示した(Figure 6-5a)。しかし、az-1 および az-2 の場合では、**4-Au** を用いた場合のピーク電流値は **2-Au** の場合に比べて大きく減少していた(Figure 6-5b, 6-5c)。**4-Au**, **2-Au** ともに Co^{III} ユニットが密に配向した表面状態であるため、**2-Au** の Bzl 基を除去したことによる表面の疎水性の減少が原因と考えられる。疎水性の減少により azurin との電子移動効率が大きく減少したことは、azurin との電子移動過程において His117 周辺の疎水性部位が重要な役割を果たしていることを示唆している。ここで、 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ を用いた場合にほぼ一定のピーク電流値を示したのは、疎水性よりも Co^{III} ユニットとの静電的相互作用が有利に働いたためと考えられる。実際に負電荷を有した $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ 溶液中での CV 測定では、非常に不可逆な酸化還元応答($\Delta E_p > 300 \text{ mV}$)を示した。

6.4.2. ピーク電位差(ΔE_p)の比較

$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, az-1, az-2 を用いた場合のピーク電位差(ΔE_p)から、それぞれの修飾電極を用いた場合の全体の電子移動速度(k)は定性的に以下の様な関係と推定することが出来る(Figure 6-6)。^[2]

$$[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}: \mathbf{4-Au} > \mathbf{2S-Au} \approx \mathbf{2R-Au}$$

$$\text{az-1}: \mathbf{4-Au} \approx \mathbf{2S-Au} \geq \mathbf{2R-Au}$$

$$\text{az-2}: \mathbf{4-Au} > \mathbf{2S-Au} > \mathbf{2R-Au}$$

一般に、均一系電子移動反応、不均一系電子移動反応に関わらず k_{ET} 値は酸化還元中心間の距離の増加に伴って減少する。^[1-5] 従って、**4-Au**, **2-Au** 間では Bzl 基分の距離の違いがあるため、 k_{ET} 値は **4-Au** を用いた方が **2-Au** を用いた場合よりも大きいと考えることが出来る。 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ の場合では **4-Au** を用いた方が **2-Au** を用いた場合よりも k 値は大きく、距離の増加に伴う k_{ET} 値の減少に対応した結果と考えられる。また、**2S-Au**, **2R-Au** の間には ΔE_p 値の差は無く、会合速度(k_A)が無視出来るほど小さいものと考えられる(Figure 6-6a)。Az-2 の場合でも、 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ の場合と同様に **4-Au** を用いた方が **2-Au** よりも k 値が大きく(Figure 6-6c)、**2S-Au**, **2R-Au** 間の違いは第5章にて述べた通りである。また、6.4.1 項にて述べた様にピーク電流値は **4-Au** を用いた場合には激減するにも関わらず k 値は **4-Au** の方が大きいことから、

蛋白質-電極間の電子移動反応において電子移動効率と k 値は必ずしも一致した傾向を与えるわけではないということが示唆される。しかし、**az-1** を用いた場合はこれらとは大きく異なり、**4-Au**, **2S-Au** はほぼ同様の ΔE_p 値を示す、すなわち k 値がほぼ等しい(Figure 6-6b)。^[2] **4-Au**, **2R-Au** 間では距離の増加に伴って k_{ET} 値が減少し、**4-Au** を用いた方が k 値が大きくなったと考えることが出来る。第 5 章で述べた様に **2S-Au**, **2R-Au** 間の k_{ET} 値はほぼ等しいと考えられるため、**2S-Au** を用いた場合では速い会合速度(k_A)により **4-Au** と同等の k 値を示したものと推察される。すなわち、距離が増加したとしても、速い会合相互作用が存在することにより全体の電子移動速度(k)を加速しうることが示唆される。

ここでの会合過程は Co^{III} ユニットの **Bzl** 基と **azurin** の **His117** 周りの疎水性部分とのフィッティングのしやすさであり、**2S-Au** を用いた方が **2R-Au** を用いた場合よりも速く会合体を形成するものと考えられる。**Cyt c** の場合においても **2S-Au** を用いた方が **2R-Au** よりも k_A 値が大きかったことから、(S)-体のアミノ酸のみで構築された蛋白質は(S)-Phe 誘導体を有した錯体(**2S**)と速やかに会合体を形成する、すなわち電子伝達経路を速やかに構築出来るものと考えられる。

6.4.3. ピーク電位(E_p)の比較

4-Au, **2-Au** を用いた $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, **az-1**, **az-2** 溶液中のボルタモグラムにおけるピーク電位 (E_p)を Figure 6-7 にプロットした。 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ の場合では、**4-Au**, **2-Au** ともにほぼ一致した E_p 値を示した(Figure 6-7a)。一方、**az-1**, **az-2** に着目すると、アノード側は **4-Au** の場合よりも **2-Au** の方が正側に E_{pa} 値を示し、**2S-Au**, **2R-Au** 間では E_{pa} 値はほぼ一致していた(Figure 6-7b, 6-7c)。この結果から、**4-Au** を用いた方が **2-Au** を用いた場合よりもアノード反応(azCu^{I} の酸化反応)速度が速く、**2S-Au**, **2R-Au** 間では速度差が無いことがわかる。しかし、カソード側では **4-Au**, **2R-Au** は類似の E_{pc} 値を示し、**2S-Au** はさらに正側にピークが存在していた(Figure 6-7b, 6-7c)。これは、**4-Au**, **2R-Au** 間にはカソード反応(azCu^{II} の還元反応)速度に差が無く、それらよりも **2S-Au** を用いた方が速いことを示唆する。この様にアノード反応とカソード反応がそれぞれ独立したピーク挙動を示した。 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ の場合ではいずれの場合においてもほぼ一致した E_p 値を示すため、錯体修飾電極側はほとんど影響を与えていないものと考えられる。従って、 azCu^{I} の酸化反応と azCu^{II} の還元反応の反応速度が大きく異なっているのは **azurin** の酸化状態に伴うコンフォメーション変化に影響されたものと考えられる。

上記の結果から、溶液中もしくは会合体形成時(電子移動反応時)において azCu^{I} の方が azCu^{II} に比べて活性中心近傍の構造が平坦になっているものと考えられる。 AzCu^{I} が比較的

平坦な表面であるため **4-Au** よりも **2-Au** の方がアノード反応速度が遅い、すなわち距離の違いがそのまま反応速度に反映されたと考えられる。一方で、立体的に嵩高い表面である azCu^{II} の場合には距離の違いとは一致しないカソード反応速度を示す。**2S-Au**, **2R-Au** 間での速度差が存在することからも、**Bzl** 基が嵩高い活性中心と立体的にフィッティングした会合体を形成しているものと考えられ、実際には **4-Au**, **2-Au** 間では **azurin** との距離はほとんど変わらないのかもしれない。各酸化状態における **azurin** と Co^{III} ユニットとの推定会合状態を Figure 6-8 に模式的に示した。この様に **4-Au**, **2-Au** を利用することにより、各酸化状態における蛋白質金属中心近傍の構造情報についての定性的な評価が可能であることが示唆された。

6.4.4. 半波電位($E_{1/2}$)の比較

上記の様にアノード反応とカソード反応の速度が大きく異なる場合($\alpha \neq 0.5$)、それぞれのピーク電位から得られる $E_{1/2}$ 値は標準酸化還元電位(E°)に完全に一致するわけではない。^[2] 各種修飾電極を用いた場合の 10 mV s^{-1} における $E_{1/2}$ 値を Table 6-2 にまとめた。同じ **azurin** 溶液中での測定にも関わらず、使用した電極によって $E_{1/2}$ 値はそれぞれ異なった値を示した。これは、それぞれのアノード、カソード反応速度が異なるため、それに伴って $E_{1/2}$ がシフトしたものと考えられる。一般に、金属蛋白質の標準酸化還元電位を調べる場合、**pyS-Au** などの修飾金電極を使用して非常に遅い掃引速度(*cf.* $5, 10 \text{ mV s}^{-1}$)において CV 測定を行い、得られた $E_{1/2}$ 値がその蛋白質の標準酸化還元電位として取り扱われている。^[12] しかし、上記の様に蛋白質を用いた電気化学測定ではアノード、カソード反応速度が大きく異なることもあり、これは本系の錯体修飾電極に限ったことではない。**pyS-Au** を用いた **az-1**, **az-2** 溶液中における CV 測定を行い、得られた E_p , $E_{1/2}$ 値を Figure 6-9 に示した。いずれの場合においてもアノード側はほぼ一定の E_{pa} 値を示したのに対し、カソード側は掃引速度の増加に伴って E_{pc} 値はより負側にシフトした。 $E_{1/2}$ 値はカソードピークのシフトとともに負側にシフトしており、このような挙動は上記の本錯体系と全く類似の挙動である。Figure 6-8 で示した様な酸化状態の変化に伴う **azurin** のコンフォメーション変化を考えた場合、**pyS-Au** を用いた場合に本錯体系と類似の挙動を示すのは妥当な結果と考えられ、逆に言えば **azurin** のコンフォメーション変化は **2-Au**, **4-Au** の Co^{III} 錯体表面にのみ特異的に誘起されたものではないということが推察される。

pyS-Au を用いた場合の 10 mV s^{-1} における **az-1**, **az-2** の ΔE_p 値はそれぞれ $78, 72 \text{ mV}$ であり、掃引速度の増加に伴って ΔE_p 値が増加するいわゆる準可逆的な電子移動系である。^[2] そして、多くの研究者により報告されている蛋白質の電気化学系はそのほとんどが準可逆的もしくは不可逆な系である。^[12] $E_{1/2}$ 値を完全に標準酸化還元電位として取り扱う際には、①遅い掃

引速度における ΔE_p 値が 56 mV (1 電子反応の理論値)^[2] に近い値であること、② $E_{1/2}$ 値が掃引速度に依存せずほぼ一定であること、のいずれかを満たす必要があると考えられ、それ以外の場合では多少の誤差が含まれることを考慮に入れるべきである。

本錯体系においては、cyt *c*, azurin ともに非常に遅い(不可逆な)電子移動系であるため、蛋白質の標準酸化還元電位を正確に決定することには適していない。逆に、非常に遅い電子移動系を構築したことによって、蛋白質と **2-Au** との会合速度(k_A)が全体の電子移動速度の律速段階となりえたとも考えられる。従って、標準酸化還元電位を決定する場合には速い電子移動系を、蛋白質-金表面での分子間(表面間)相互作用を検討する場合には遅い電子移動系をそれぞれ構築する必要があり、両者をともに満たすことは不可能と考えられる。

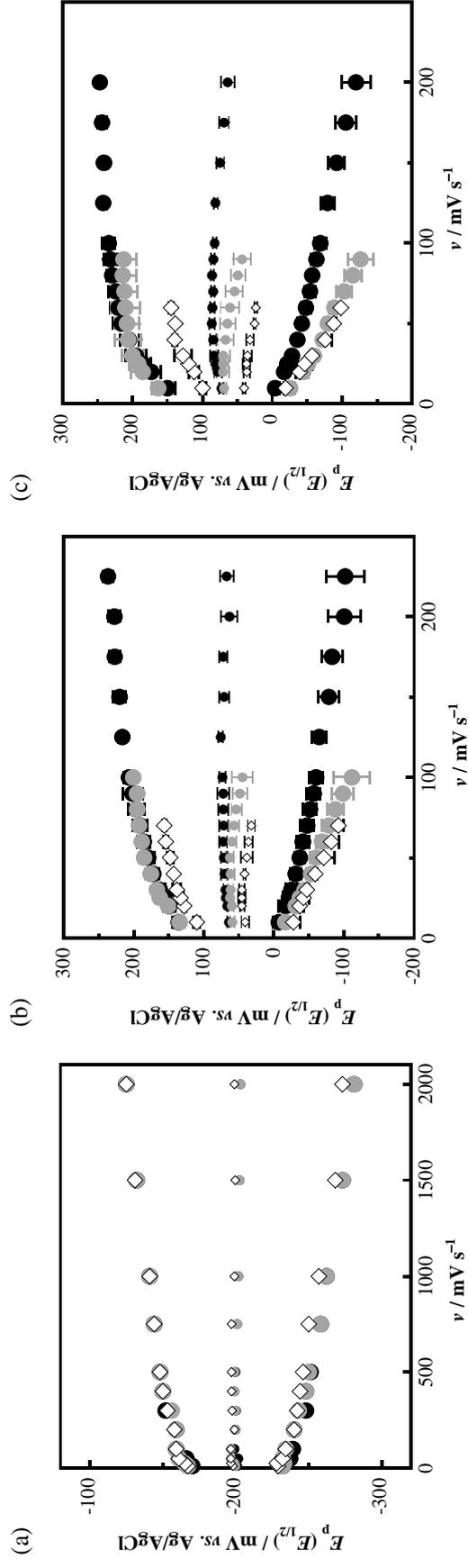


Figure 6-7. Plots of peak potentials and half-wave potentials of $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$ (a), az-1 (b), and az-2 (c) against scan rates using **4-Au** (black open diamond), **2S-Au** (black filled circle), and **2R-Au** (gray filled circle), respectively. Error bars are the standard deviation.

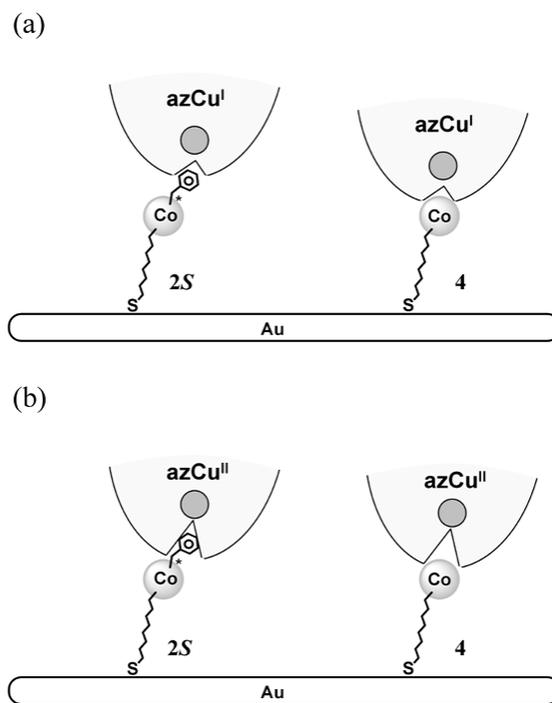


Figure 6-8. Proposed associated complexes between azurin and Co^{III} complexes ($2S$, 4) on Au electrode in the case of anodic (a) and cathodic reaction (b). AzCu^{I} and azCu^{II} represent the reduced and oxidized azurins, respectively.

Table 6-2. Half-wave potentials and peak separations calculated from the voltammograms of azurins using a series of modified Au electrodes at 10 mV s^{-1} ^a

	az-1	az-2
	$E_{1/2}^b (\Delta E_p^c)$	$E_{1/2}^b (\Delta E_p^c)$
4-Au	+41 (138)	+41 (119)
2S-Au	+64 (143)	+73 (158)
2R-Au	+59 (151)	+69 (189)
pyS-Au	+52 (78)	+52 (72)

^a [azurin] = $100 \mu\text{M}$ (in a 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)); ^b half-wave potentials (mV vs. Ag/AgCl); ^c peak separations (mV).

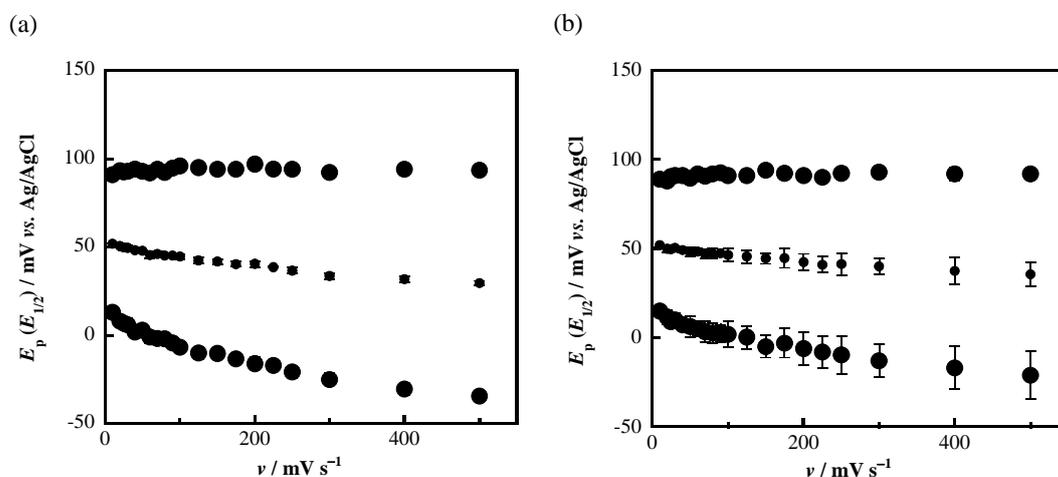


Figure 6-9. Plots of peak potentials and half-wave potentials of az-1 (a) and az-2 (b) against scan rates using **pyS-Au**. Error bars are the standard deviation.

6.5. 総括

本章では、2 の不斉部分(Bzl 基)を除去した錯体 4 を用いた修飾電極(4-Au)を用いて *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 株由来の azurin-1 (az-1), azurin-2 (az-2)との電子移動反応を行い、第 5 章で示した 2-Au の結果と併せて比較・検討した。

4-Au を用いた az-1, az-2 の CV 測定を行ったところ、2-Au を用いた場合に比べてピーク電流値が非常に小さいボルタモグラムを示した。2-Au の Bzl 基を除去したことによる表面疎水性の減少がこのピーク電流値の減少をもたらしたものと考えられ、本系での azurin との電子移動反応には His117 周辺の疎水性部分との相互作用が非常に重要であることが示された。また、az-1 の場合では、4-Au を用いた場合のピーク電位差(ΔE_p)が 2S-Au のそれと類似の値を示した。一般には、4-Au と 2-Au の間には Bzl 基分の距離の違いが存在するため、電子移動速度(k_{ET})は 4-Au の方が速くなるはずである。実際に、 $[\text{Ru}(\text{NH}_3)_6]^{3+}$, az-2 の場合では 4-Au の方が全体の電子移動速度(k)が大きかった。しかし、az-1 の場合では、4-Au, 2S-Au 間で k 値に差が見られなかったため、2S-Au を用いた場合では k_{ET} 値の減少を速い会合速度(k_A)により補償したと考えられる。従って、蛋白質との距離だけではなく、速い会合相互作用によって全体の電子移動を加速出来ることが示された。

また、それぞれのピーク電位に着目すると、アノード側、カソード側で異なった反応挙動を示した。アノード反応(azCu^{I} の酸化反応)では、4-Au の方が 2-Au を用いた場合よりも速い反応を示し、2S-Au, 2R-Au 間においては速度差は無い。一方、カソード反応(azCu^{II} の還元反応)では、2S-Au が最も速く、2R-Au, 4-Au 間において速度差は観測されなかった。これは、azurin の酸化状態の変化に伴うコンフォメーション変化に由来するものと考えられ、 azCu^{I} の方が azCu^{II} に比べて比較的平坦な表面構造であることが示唆される。

この様に本系の修飾電極を用いた一連の電気化学測定を行い、詳細に解析することにより、溶液状態もしくは会合状態(電子移動状態)での各酸化状態における蛋白質表面の構造情報についての定性的な評価が可能であることが明らかとなった。

第 7 章では、由来の異なる 3 種の cyt *c* に対して高密度に集積化した 2S-Au を適用することにより、その酸化還元挙動とヘム周りの構造との関係について述べる。

參考論文

- [1] Marcus, R. A.; Sutin, N. *Biochim. Biophys. Acta* **1985**, *811*, 265-322.
- [2] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.
- [3] (a) Niki, K.; Sprinkle, J. R.; Margoliash, E. *Bioelectrochem.* **2002**, *55*, 37-40. (b) Niki, K. *Electrochemistry* **2002**, *70*, 82-90. (c) Niki, K.; Hardy, W. R.; Hill, M. G.; Li, H.; Sprinkle, J. R.; Margoliash, E.; Fujita, K.; Tanimura, R.; Nakamura, N.; Ohno, H.; Richards, J. H.; Gray, H. B. *J. Phys. Chem. B* **2003**, *107*, 9947-9949.
- [4] (a) Yamamoto, H.; Liu, H.; Waldeck, D. H. *Chem. Commun.* **2001**, 1032-1033. (b) Wei, J.; Liu, H.; Dick, A. R.; Yamamoto, H.; He, Y.; Waldeck, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 9591-9599. (c) Wei, J.; Liu, H.; Khoshtariya, D. E.; Yamamoto, H.; Dick, A.; Waldeck, D. H. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, *41*, 4700-4703. (d) Khoshtariya, D. E.; Wei, J.; Liu, H.; Yue, H.; Waldeck, D. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, *125*, 7704-7714. (e) Murgida, D. H.; Hildebrandt, P.; Wei, J.; He, Y. -F.; Liu, H.; Waldeck, D. H. *J. Phys. Chem. B* **2004**, *108*, 2261-2269.
- [5] (a) Meade, T. J.; Gray, H. B.; Winkler, J. R. *J. Am. Chem. Soc.* **1989**, *111*, 4353-4356. (b) Winkler, J. R.; Gray, H. B. *Chem. Rev.* **1992**, *92*, 369-379. (c) Casimiro, D. R.; Richards, J. H.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Phys. Chem.* **1993**, *97*, 13073-13077. (d) Mines, G. A.; Bjerrum, M. J.; Hill, M. G.; Casimiro, D. R.; Chang, I. -J.; Winkler, J. R.; Gray, H. B. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 1961-1965.
- [6] Khoshtariya, D. E.; Dolidze, T. D.; Seifert, S.; Sarauli, D.; Lee, G.; van Eldik, R. *Chem. Eur. J.* **2006**, *12*, 7041-7056.
- [7] Liu, H.; Yamamoto, H.; Wei, J.; Waldeck, D. H. *Langmuir* **2003**, *19*, 2378-2387.
- [8] Fedurco, M. *Coord. Chem. Rev.* **2000**, *209*, 263-331.
- [9] Allen, P. M.; Hill, H. A. O.; Walton, N. J. *J. Electroanal. Chem.* **1984**, *178*, 69-86.
- [10] Terrettaz, S.; Cheng, J.; Miller, C. J.; Guiles, R. D. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 7857-7858.
- [11] (a) Kumita, H.; Jitsukawa, K.; Masuda, H.; Einaga, H. *Inorg. Chim. Acta* **1998**, *283*, 160-166. (b) Kumita, H.; Morioka, T.; Ozawa, T.; Jitsukawa, K.; Einaga, H.; Masuda, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **2001**, *74*, 1035-1042. (c) Kumita, H.; Kato, T.; Jitsukawa, K.; Einaga, H.; Masuda, H. *Inorg. Chem.* **2001**, *40*, 3936-3942.
- [12] for example: (a) Erabi, T.; Ozawa, S.; Hayase, S.; Wada, M. *Chem. Lett.* **1992**, 2115-2118. (b) Kohzuma, T.; Shidara, S.; Suzuki, S. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1994**, *67*, 138-143.

第 7 章

Co^{III} 錯体修飾電極を用いた 3 種の cyt c の酸化還元挙動とその構造評価

7.1. 序論

Cytochrome c_2 (cyt c_2)はバクテリア由来の電子移動蛋白質の 1 つであり、その活性中心であるヘムは蛋白質表面に位置している(Figure 7-1)。^[1,2] 光合成細菌中において、cyt c_2 は cytochrome bc_1 複合体と reaction center 間の電子移動を仲介しており、^[1] cyt c_2 -reaction center 間の会合体については近年結晶構造も報告されている。^[3] また、cyt c_2 は cyt c とは異なり、中性溶液中において 2 つのコンフォメーション状態が存在することが種々の測定から明らかとされている。^[4-6] Smith らは、¹H-, ¹⁵N-NMR スペクトルからその 2 つのコンフォメーション状態が His42 のプロトン化体/脱プロトン化体であると帰属した(Figure 7-1)。^[6]

Cytochrome c_{553} (cyt c_{553})もまたバクテリア由来の電子移動蛋白質であり、脱窒過程において cytochrome bc_1 複合体と NO reductase 間の電子伝達の役割を担っている。^[7] 脱窒菌由来の cyt c_{553} はその軸配位子が cyt c , cyt c_2 と同様に Met と His であることを除いて、^[7] その立体構造に関する情報は得られていない。

本章では、高密度に集積化した **2S-Au** を用いて(Scheme 7-1)、horse heart 由来の cyt c 、*Rhodospirillum rubrum* 由来の cyt c_2 、*Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 由来の cyt c_{553} との電気化学挙動について検討を行い、構造情報が多く得られている cyt c , cyt c_2 の酸化還元挙動との比較から cyt c_{553} の溶液構造を評価した。**2S-Au** を用いた場合、cyt c は酸化還元応答を示さず、cyt c_2 , cyt c_{553} は明確なピーク応答を示した。これは、蛋白質内におけるヘムの位置に起因するものと考えられ、cyt c_{553} のヘムが蛋白質表面に位置することを示唆している。また、それぞれの酸化還元挙動は大きく異なっていたため、それらから得られる cyt c_{553} の構造情報を含めて以下にその詳細を記す。

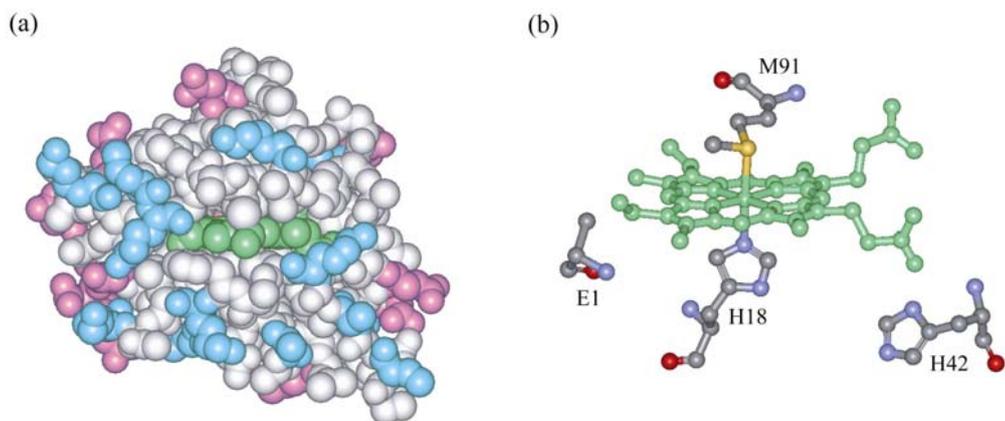
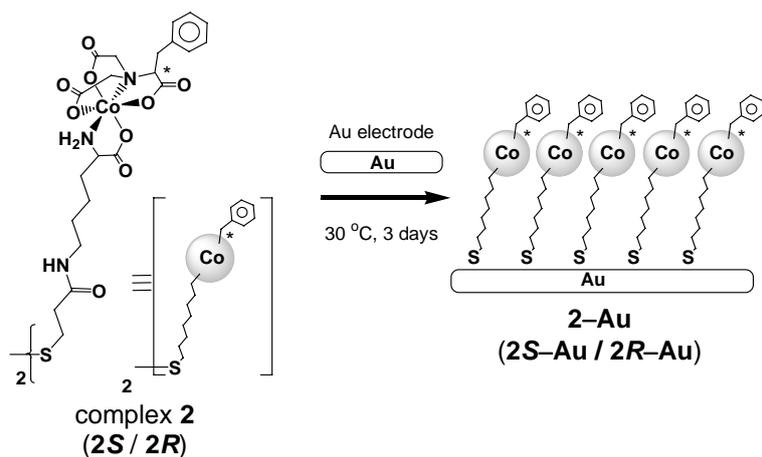


Figure 7-1. (a) Overall structure of *Rhodospirillum rubrum* cyt *c*₂ (PDB code: 3C2C) denoted by CPK model (Green: heme, blue: basic residue, red: acidic residue). (b) Local structure around heme denoted by ball and stick model.



Scheme 7-1. Schematic view of Co^{III} complexes (*2S*) and modified Au electrode with *2S* (*2S*-Au)

7.2. 実験

全ての試薬・溶媒は、ペプチド研究所、ナカライテスク、和光純薬、東京化成から購入したものをそのまま使用した。ミリ Q 水は Millipore Milli-Q biocel A により得た。錯体(2S)の合成および構造同定は第 2 章で示した方法により行った。2S-Au, pyS-Au は、それぞれ 5.2.3 項、6.2.3 項にて示した方法により作製した。

7.2.1. 菌体培養および各蛋白質の精製

Horse heart cyt *c* はナカライテスク社より購入したものを使用した。光合成細菌および脱窒菌は以下の様に培養し、各蛋白質の精製を行った。また、その過程においてトミー精工社製オートクレーブ BS-235、同社製超音波発生器 UD-201、同社製微量高速冷却遠心機 MX-160、アズワン社製クリーンベンチ卓上型 NS-AST および日立工機社製日立高速冷却遠心機 CR20G を使用した。

7.2.1.1. Cyt *c*₂ (from *Rhodospirillum rubrum*) の精製

7.2.1.1.1. 菌体培養

光合成細菌 *Rhodospirillum rubrum* は既報に従って以下の様に培養を行った。^[8,9] 使用した液体培地の組成は、水 1000 mL に対し KH₂PO₄ 600 mg, K₂HPO₄ 900 mg, MgSO₄·7H₂O 200 mg, CaCl₂·2H₂O 7.5 mg, FeSO₄·7H₂O 11.8 mg, EDTA 20 mg, biotin 15 mg, DL-りんご酸 6 g, (NH₄)₂SO₄ 1.25 g, trace element solution (水 100 mL に対し H₃BO₃ 280 mg, MnSO₄·4H₂O 210 mg, NaMoO₄·7H₂O 24 mg, Cu(NO₃)₂·3H₂O 4 mg) 1 mL を含むものであり、これを NaOH により pH 7.0 に調整した後、120 °C, 15 分間加圧滅菌処理した。

培養は 30 °C, 100 W の光源下にて 2 段階の手順により行った。1 段階目は 80 mL 培地 10 本に植菌し 7 日間培養した。2 段階目は、この培養液を 800 mL 培地 10 本に植菌し 7 日間培養した。この培養液を遠心分離(8000 rpm, 4 °C, 15 min)することで約 80 g の湿潤菌体を得た。

7.2.1.1.2. Cyt *c*₂ の精製

湿潤菌体 50 g を 50 mM Tris-HCl buffer (pH 8.0) 溶液 400 mL に懸濁させ、超音波破碎 (180 W, 30 min) した後、50 % 飽和となるように硫酸アンモニウムを加え、遠心分離(12000 rpm, 4 °C, 30 min)し、上澄み液を回収した。この上澄み液を 5 mM phosphate-citrate buffer (pH 4.7) 溶液にて透析し、析出した白色沈澱を遠心分離(12000 rpm, 4 °C, 30 min)にて除去した。得られた上澄み液を、同 buffer 溶液にて平衡化した CM-32 cellulose (Whatman) を用いてイオン交

換クロマトグラフィー(0-0.1 M KCl)を行い、還元型および酸化型 cyt c_2 を得た。

7.2.1.2. Cyt c_{553} (from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051)の精製

脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 は 5.2.1 項で示した方法により培養、精製した。5.2.1.2 項にて得られた cyt c_{553} を含む褐色分画を、5 mM phosphate-citrate buffer (pH 4.7)溶液にて透析し、析出した白色沈澱を遠心分離(12000 rpm, 4 °C, 30 min)にて除去した。得られた上澄み液を、同 buffer 溶液にて平衡化した CM-32 cellulose (Whatman)を用いてイオン交換クロマトグラフィー(0-0.1 M KCl)を行い、酸化型 cyt c_{553} を得た。

7.2.2. UV-vis スペクトル

測定装置は日本分光社製 Ubest V-570 spectrophotometer を使用し、200-800 nm について測定した。セルは光路長 1 cm の石英セルを使用し、サンプルは蛋白質濃度 10-50 μM の 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)溶液を用いた。

7.2.3. 電気化学測定

測定装置は北斗電工社製 HZ-5000 automatic polarization system を使用した。測定は三電極系で行い、作用極に種々の修飾電極、対極に Pt 線、参照極に Ag/AgCl (3 M NaCl)を使用した。測定前に約 15 分間 Ar バブリングすることで溶存酸素を除去した。測定には 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)溶液もしくは 0.5 M KOH 水溶液のいずれかを用いて行った。

各蛋白質溶液は、7.2.1 項にて精製した cyt c_2 , cyt c_{553} および購入した cyt c を 20 μM となる様に 0.1 M phosphate buffer (pH 7.0)溶液により調製した。濃度は既報のモル吸光係数^[7,10]を用いて、UV-vis スペクトルにより決定した。

7.3. 結果・考察

7.3.1. Cyt *c*, cyt *c*₂間の電流応答の比較

2S-Au は第 5 章で記した様に **2S** の水溶液に 30 °C にて 3 日間浸漬することで作製した。得られた **2S-Au** を用いた cyt *c*, cyt *c*₂ 溶液中における CV 測定を行い、各掃引速度におけるボルタモグラムを Figure 7-2a, 7-2b にそれぞれ示した。第 2 章で述べた様に、cyt *c* を用いた場合では cyt *c* の酸化還元電位(+55 mV^[11])近傍において酸化還元応答はほとんど観測されなかった(Figure 7-2a)。これは、cyt *c* のヘムが蛋白質内部に埋没しており、^[12] Co^{III} ユニットと cyt *c* との会合体形成が妨げられることにより、効率的な電子移動が出来ないためと考えられる。

一方、結晶構造からヘムが蛋白質表面に位置することが示されている cyt *c*₂ の場合では、^[2] cyt *c* の場合とは異なり、明確な酸化還元応答が観測された(Figure 7-2b)。得られたピーク電流値と掃引速度の平方根との関係を Figure 7-3 に示した。いずれのピーク電流値もほぼ直線関係を示したことから、得られた応答は溶液中に存在する cyt *c*₂ の応答であると帰属した。^[13] これは、ヘムが蛋白質表面に存在するため、電極-cyt *c*₂間の効率的な電子移動が行われた結果と考えられる。

7.3.2. Cyt *c*₂の 2 種類の酸化還元応答

Cyt *c*₂ は 1 つの酸化波と 2 つの還元波(I, II)を示した。還元波"II"は掃引速度の増加に伴って大きくシフトし、200 mV s⁻¹ 以上ではピークが観測されなかった(Figure 7-2b)。しかし、10 mV s⁻¹ における酸化波のピーク電気量は、2 つの還元波のピーク電気量の和とほぼ等しかった。従って、2 つの還元波は 1 つの酸化波とそれぞれカップルしているものと考えられる。また、上述の様にいずれのピークも溶液中に存在する酸化還元活性種に由来することから(Figure 7-3)、cyt *c*₂ は溶液中に 2 種類の酸化還元活性種、すなわち可逆的な酸化還元応答(I: $E_{1/2} = +93$ mV, $\Delta E_p = 74$ mV (10 mV s⁻¹))と不可逆的な酸化還元応答(II: $E_{1/2} = +63$ mV, $\Delta E_p = 134$ mV (10 mV s⁻¹))を示す 2 種類のコンフォメーション状態が存在するものと考えられる。

中性溶液中において、cyt *c*₂ は 2 種類のコンフォメーション状態(His42 のプロトン化体/脱プロトン化体)が検出されているものの、同様の測定を行った場合 cyt *c* はプロトン付加/脱離によるコンフォメーション変化を示さないことが報告されている。^[4-6] 第 2 章で示した様に、低密度に修飾した **2S-Au** を用いた場合では cyt *c* は一対の応答のみを示す。これは本系において得られた結果と一致するため、cyt *c*₂ の 2 種類の酸化還元応答は His42 のプロトン化体/脱プロトン化体であると帰属した。**pyS-Au** を用いた場合では還元波"II"は観測されず、一対の可逆的

な酸化還元応答($E_{1/2} = +104 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 65 \text{ mV}$ (10 mV s^{-1}))のみを示した。従って、**2S-Au** を用いることによって、蛋白質のコンフォメーション変化を検出可能であることが示された。観測された可逆的、不可逆的な酸化還元応答は、2つのコンフォメーション状態と**2S-Au**との電子移動速度が大きく異なることを示唆している。^[13] この **cyt c₂** のプロトン化に由来した速度差は、電子伝達部位周りの構造変化およびネットチャージの変化が寄与している可能性が挙げられる。前者は金表面上の **Co^{III}** ユニットとの立体的な相互作用に、後者は負に帯電した **2S-Au** との静電的な相互作用にそれぞれ影響を与えうる。その片方もしくは両方の寄与により2つのコンフォメーション状態と**2S-Au**の電子移動速度に大きな差が生じ、その結果として2つの酸化還元応答が観測されたと考えられる。

7.3.3. 溶液中における **cyt c₅₅₃** の構造情報

構造情報がほとんど得られていない **cyt c₅₅₃** 溶液中における CV 測定を行い Figure 7-2c に示した。**Cyt c₅₅₃** のボルタモグラムは明確な酸化還元応答を示した。得られたピーク電流値は掃引速度の平方根に比例していたため(Figure 7-3)、溶液中に存在する **cyt c₅₅₃** の酸化還元波であると帰属した。^[13] 7.3.1, 7.3.2 項において、ヘムが蛋白質内部に埋まっている **cyt c** の場合では酸化還元応答が得られず、逆に蛋白質表面に存在する **cyt c₂** の場合では明確な酸化還元応答を示した。従って、**cyt c₅₅₃** の良好な酸化還元応答は **cyt c₅₅₃** のヘムが蛋白質表面近くに存在することを示唆している。

また、**cyt c₅₅₃** はいずれの掃引速度においても一対の酸化還元応答($E_{1/2} = +49 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 144 \text{ mV}$ (10 mV s^{-1}))を示した(Figure 7-2c)。上述の様に中性溶液中において2種のコンフォメーション状態が存在する **cyt c₂** は2種類の酸化還元応答を示し、その様な構造異性体を持たない **cyt c** は一対の応答のみを示す。従って、一対の酸化還元応答のみを示した **cyt c₅₅₃** は少なくとも中性溶液中において異なるコンフォメーションを有した化学種が存在しないものと考えられる。また、得られた半波電位は **pyS-Au** を用いた場合($E_{1/2} = +7 \text{ mV}$, $\Delta E_p = 69 \text{ mV}$ (10 mV s^{-1}))とは大きく異なっていた。これは第6章で示した様に酸化速度、還元速度の違いに影響されたものと考えられ、可逆的な酸化還元応答を示す **pyS-Au** を用いた場合の半波電位の方がより正確な **cyt c₅₅₃** の酸化還元電位であると考えられる。今回用いた3つの蛋白質はいずれも類似の機能を有した電子移動蛋白質であるものの、その構造的な特徴は大きく異なっていた。そして、本系ではその違いを簡易な電気化学測定により検出可能であることが示された。

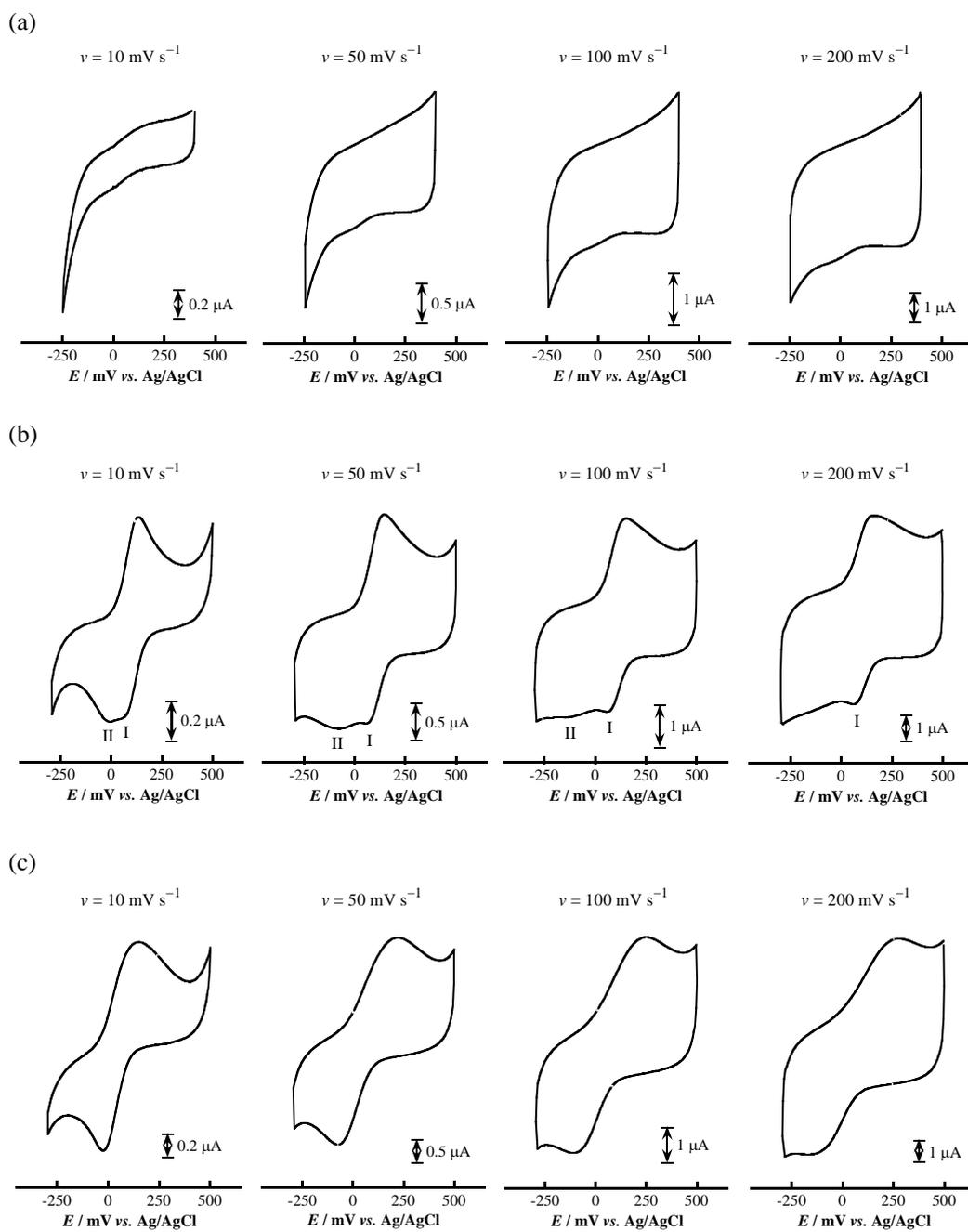


Figure 7-2. Cyclic voltammograms of cyt *c* (a), cyt *c*₂ (b), and cyt *c*₅₅₃ (c) using 2S–Au at several scan rates.

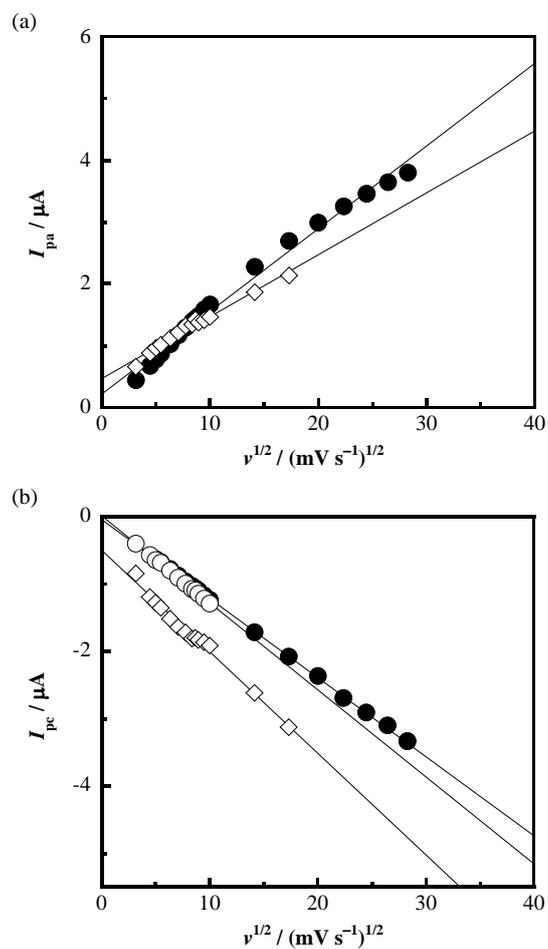


Figure 7-3. Relationship between the square root of scan rates and anodic (a) and cathodic peak currents (b) of cyt c_2 (circle) and cyt c_{553} (square) as measured with **2S-Au**, respectively. Filled and open circles represent the reduction waves “I” and “II,” respectively.

7.4. 総括

本章では、第 5 章にて構築した Co^{III} 錯体修飾電極(**2S-Au**)を用いて、horse heart 由来の cytochrome *c* (cyt *c*)、*Rhodospirillum rubrum* 由来の cytochrome *c*₂ (cyt *c*₂)、*Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 由来の cytochrome *c*₅₅₃ (cyt *c*₅₅₃)との電子移動挙動について検討を行った。

密にオーダーした **2S-Au** を用いた cyt *c* のボルタモグラムは酸化還元応答を示さなかった。これは、cyt *c* のヘムが蛋白質内部に埋設しているため、電極-cyt *c* 間の効率的な電子移動反応が阻害されたものと考えられる。一方、ヘムが蛋白質表面に位置する cyt *c*₂ は明確なピーク応答を示した。従って、**2S-Au** を用いた場合のピーク応答はヘムの位置によって大きく影響されることがわかった。また、cyt *c*₂ は 2 種類の酸化還元応答を示し、過去の報告から中性溶液中に存在する His42 のプロトン化体/脱プロトン化体に由来するものと帰属した。

ほとんど構造情報の得られていない cyt *c*₅₅₃ を用いた場合、そのボルタモグラムは明確なピーク応答を示した。これは、cyt *c*、cyt *c*₂ との比較から cyt *c*₅₅₃ のヘムが蛋白質表面に存在することを示唆している。また、cyt *c*₅₅₃ は cyt *c*₂ とは異なり一対の酸化還元応答のみを示した。従って、cyt *c*₅₅₃ は中性溶液中において上述の様な異なるコンフォメーションを有した化学種が存在しないものと考えられる。

この様に、類似の機能を有した電子移動蛋白質であってもその構造は大きく異なっており、本系における **2S-Au** を用いることによってその違いを簡易に検出可能であることが示された。

參考論文

- [1] Miki, K.; Sogabe, S. *Handbook of Metalloproteins*; Wiley: Chichester, 2001; Vol. 1.
- [2] Salemme, F. R.; Freer, S. T.; Xuong, N. H.; Alden, R. A.; Kraut, J. *J. Biol. Chem.* **1973**, *248*, 3910-3921.
- [3] Axelrod, H. L.; Abresch, E. C.; Okamura, M. Y.; Yeh, A. P.; Rees, D. C.; Feher, G. *J. Mol. Biol.* **2002**, *319*, 501-515.
- [4] Brautigam, D. L.; Feinberg, B. A.; Hoffman, B. M.; Margoliash, E.; Peisach, J.; Blumberg, W. E. *J. Biol. Chem.* **1977**, *252*, 574-582.
- [5] (a) Pettigrew, G. W.; Bartsh, R. G.; Meyer, T. E.; Kamen, M. D. *Biochim. Biophys. Acta* **1978**, *503*, 509-523. (b) Moore, G. R.; Harris, D. E.; Leitch, F. A.; Pettigrew, G. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *764*, 331-342.
- [6] (a) Smith, G. M. *Biochemistry* **1979**, *18*, 1628-1634. (b) Yu, L. P.; Smith, G. M. *Biochemistry* **1988**, *27*, 1949-1956. (c) Yu, L. P.; Smith, G. M. *Proc. Natl. Acad. Sci., U. S. A.* **1988**, *85*, 2894-2898. (d) Yu, L. P.; Smith, G. M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2914-2919. (e) Yu, L. P.; Smith, G. M. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2920-2925.
- [7] Sakurai, N.; Kumita, H.; Sakurai, T.; Masuda, H. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1998**, *71*, 135-140.
- [8] Bose, S. K.; Gest, H.; Ormerod, J. G. *J. Biol. Chem.* **1961**, *236*, 13-14.
- [9] Sponholtz, D. K.; Brautigam, D. L.; Loach, P. A.; Margoliash, E. *Anal. Biochem.* **1976**, *72*, 255-260.
- [10] Otsuka, S.; Yamanaka, T. *Metalloproteins, Chemical properties and biological effects*; Elsevier, 1988.
- [11] Scott, R. A.; Mauk, A. G. *Cytochrome c: A Multidisciplinary Approach*; University Science Books: California, 1996.
- [12] Bushnell, G. W.; Louie, G. V.; Brayer, G. D. *J. Mol. Biol.* **1990**, *214*, 585-595.
- [13] Bard, A. J.; Faulkner, L. R. *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, 2nd ed.; Wiley: New York, 2001.

第 8 章 結言

生体内において電子移動を司る電子移動蛋白質は、種々の非共有結合性相互作用を多重的に利用することでその redox partner を認識(会合)し、電子移動反応を行っている。電子移動蛋白質の電気化学測定は、4-mercaptopyridine の様なプロモーターと呼ばれる分子を修飾した金電極を用いることにより行われている。これまでに様々な修飾分子を用いた電気化学測定が報告されており、静電的相互作用、水素結合相互作用の様に非共有結合的に蛋白質表面と相互作用出来ることがプロモーター電子移動系において重要とされている。しかし、修飾分子を少し変化させるだけでも膜表面としての性質が変化してしまうこともあり、蛋白質-修飾分子間の相互作用については未だ不明な点が多い。

本研究では、アミノ酸誘導体を導入した Co^{III} 錯体を金表面に修飾し、数種の電子移動蛋白質との電気化学測定を行った。 Co^{III} 中心周りの構造は類似であり、アミノ酸側鎖部分の不斉および構造のみが異なる一連の Co^{III} 錯体を用いることにより、電子移動過程における蛋白質-修飾分子間の相互作用について検討を行った。

第 1 章では、生体内での蛋白質間相互作用の特異性ならびにプロモーター修飾電極を用いた電子移動反応について紹介した。さらに、蛋白質-修飾分子間相互作用についての知見・研究状況を記し、本研究の意義・目的を明確に示した。

第 2 章では、蛋白質-修飾分子間相互作用を検討するための新たなプロモーター分子として Phe 誘導体配位子を有した Co^{III} 錯体(**2**; **2S/2R**)を合成し、**2** の修飾金電極(**2-Au**; **2S-Au/2R-Au**)の作製および horse heart cytochrome *c* (cyt *c*)との電子移動挙動について検討した。Cyt *c* は高密度に集積化した **2-Au** に対しては酸化還元応答を示さず、低密度に集積化した **2-Au** を用いた場合に良好な酸化還元応答を与えた。これにより、cyt *c* が Co^{III} ユニットの認識(会合)することで電子移動反応が進行することが示され、蛋白質-電極間の電子移動反応においても会合過程が重要であることを明らかとした。

第 3 章では、低密度に集積化した **2-Au** と cyt *c* との電子移動反応における Phe 部位の不斉が与える影響について検討を行った。不斉を変化させると、cyt *c* との全体の電子移動速度(k)が大きく変化し、それは Co^{III} ユニットの cyt *c* との会合速度(k_A)が変化することに起因したものであった。 Co^{III} ユニットの不斉部分を変化させただけでも関わらず、cyt *c* との立体的な相互作用には大きな違いをもたらし、全体の電子移動速度に大きな影響を与えることを示した。

第 4 章では、低密度に集積化した **2R-Au** の Co^{III} ユニットの間に cyt *c* のプロモーター分子と

して機能する末端ヒドロキシルアルカンチオールを挿入した混合分子膜の作製を試みた。アルカンチオールの鎖長に依存して cyt *c* との電子移動挙動は大きく変化し、それらの結果から Co^{III} ユニットとアルカンチオールが比較的均一に分散した混合分子膜であることを明らかとした。

第 5 章では、高密度に集積化した **2-Au** を用いて、脱窒菌 *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 株から産出される非常に構造の類似した 2 種類の azurin (azurin-1, azurin-2) との電気化学測定を行った。Co^{III} ユニットの不斉部分を変化させると、azurin-1 は会合速度に差が観測されるものの、azurin-2 の場合ではほとんど差が観測されなかった。Azurin-1, azurin-2 の活性中心近傍の構造は非常に類似しており、43 番目の残基にのみ違いを示す (azurin-1: Val, azurin-2: Ala)。この様なわずかな違いにも関わらず、**2-Au-azurin** 間の立体的相互作用には明確な違いをもたらすことを示した。

第 6 章では、**2-Au** の不斉部分 (Bzl 基) を除去した Co^{III} 錯体 (**4**) を用いた修飾電極 (**4-Au**) を作製し、第 5 章で用いた 2 種の azurin に対して電気化学測定を試みた。**2-Au**, **4-Au** の測定結果から、蛋白質との全体の電子移動速度 (k) は、電子移動距離の増加により電子移動速度 (k_{ET}) が減少した場合においても、蛋白質との速い会合速度 (k_A) により加速しうることが明らかとなった。また、酸化型 azurin の還元反応時と還元型 azurin の酸化反応時ではそれぞれ異なる反応速度が得られ、酸化状態の変化に伴う蛋白質のコンフォメーション変化が示された。

第 7 章では、高密度に集積化した **2S-Au** を用いて cyt *c* (horse heart), cyt *c*₂ (*Rhodospirillum rubrum*), cyt *c*₅₅₃ (*Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051) との電気化学測定を行った。3 種の蛋白質の測定結果から、構造が得られていない cyt *c*₅₅₃ に対して、そのヘムが蛋白質表面に位置すること、中性溶液中において異なるコンフォメーションを有した化学種が存在しないことを推測した。

以上、本研究においては蛋白質-修飾分子間相互作用を検討するため、アミノ酸誘導体を導入した Co^{III} 錯体修飾電極を作製し、数種の電子移動蛋白質との電子移動反応を行った。その結果、蛋白質に対するプロモーター電子移動系において、蛋白質-修飾分子間における会合相互作用が全体の電子移動速度に大きな影響を与えることを実証した。本系において得られた会合相互作用の知見が、各酸化状態における溶液中および会合状態での蛋白質構造の評価、正確な酸化還元電位の測定、より巨大な蛋白質・酵素の電気化学測定など蛋白質機能解明に繋がる様々な分野へ応用されることを期待し、結言とする。

著者発表の論文

- (1) “Self-Assembled Monolayers of Optically Active Co^{III} Complexes: a New Promoter Electrode Recognizing the Electron Transfer Site in Cytochrome *c*”
Isao Takahashi, Tomohiko Inomata, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, Koichiro Jitsukawa, and Hideki Masuda
Chem. Commun. **2005**, 471-473
- (2) “Electrochemical Evaluation of the Structural Difference in Azurins-1 and -2 from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 in Aqueous Solution Using Self-Assembled Monolayers of Optically Active Co^{III} Complexes”
Isao Takahashi, Tomohiko Inomata, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, and Hideki Masuda
Chem. Lett. **2006**, 1404-1405
- (3) “Structures of Various Cytochromes *c* Evaluated from the Redox Behaviors Using the Optically Active Co(III) Complex-Modified Au Electrode”
Isao Takahashi, Chika Nishijima, Tomohiko Inomata, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, and Hideki Masuda
Drug Metabolism Letters **2007**, *1*, 73-75
- (4) “Electron Transfer Reactions *via* the Associated Interaction between Cytochrome *c* and Self-assembled Monolayers of the Optically Active Co^{III} Complexes: Molecular Recognition Ability Induced by the Chirality of the Co^{III} units”
Isao Takahashi, Tomohiko Inomata, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, and Hideki Masuda
Chem. Eur. J. **2007**, *13*, 8007-8017
- (5) “Electron Transfer Reactions of Cytochrome *c* Using the Mixed Monolayer Au Electrode Composed of Co^{III} Complex and Hydroxyl-Terminated Alkanethiols”
Isao Takahashi, Tomohiko Inomata, Daisuke Tsujimoto, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, and Hideki Masuda
Trans. Mater. Res. Soc. Jpn. **2007**, *32*, 583-586

- (6) “Electron Transfer Reactions of C-type Cytochromes with the Self-Assembled Monolayer of the Optically Active Co^{III} Complex on Au”
Chika Nishijima, Isao Takahashi, Tomohiko Inomata, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, and Hideki Masuda
Trans. Mater. Res. Soc. Jpn. **2007**, 32, 591-594

参考論文

- (1) “物質・エネルギー変換素子としての有機－無機ハイブリッドナノデバイス”
猪股 智彦, 高橋 勇雄, 船橋 靖博, 増田 秀樹
表面技術 **2005**, 56, 875-881
- (2) “Basic Approach toward Sensor Searching for a Molecular Recognition Site of Electron Transfer Proteins”
Takashi Kato, Isao Takahashi, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, and Hideki Masuda
Adv. Mater. Res. **2006**, 11-12, 343-346
- (3) “Probing Electron Transfer Reactions between Two Azurins from *Alcaligenes xylosoxidans* GIFU 1051 with Optically Active Ru Complexes as Molecular Recognition Probes: Importance of the 43rd Residue”
Takashi Kato, Hideyuki Kumita, Isao Takahashi, Aki Murakami, Kunue Yoshimoto, Yasunori Ikeue, Kunishige Kataoka, Shinnichiro Suzuki, Takeshi Sakurai, Tomohiro Ozawa, Koichiro Jitsukawa, and Hideki Masuda
Inorg. Chim. Acta **2007**, 360, 1555-1567
- (4) “Enantio-Selectivity in Electron Transfer Reactions between Cytochrome *c* and (S)-/(R)-Ruthenium Complexes. Importance of Non-polar Interaction in Molecular Recognition Process”
Takashi Kato, Isao Takahashi, Hideyuki Kumita, Yasuhiro Funahashi, Tomohiro Ozawa, Koichiro Jitsukawa, and Hideki Masuda
Inorg. Chem. Commun. **2007**, 80, 1577-1579

謝辞

本研究は、名古屋工業大学工学部応用化学科増田研究室において、増田秀樹教授の適切なご指導のもとで大学院工学研究科博士後期課程の研究として行ったものであります。ここに増田秀樹教授に対し深く感謝の意を表すとともに謹んでお礼申し上げます。

本研究を行うにあたって、日頃より叱咤・激励して頂いた実川浩一郎教授、研究に対するご助言をして頂いた小澤智宏助教授ならびに船橋靖博博士に厚くお礼申し上げます。また、日頃から様々な便宜を図って頂いた谷山八千代技官、野田さえ子技官にお礼申し上げます。

Cyt *c* の電気化学的なバックグラウンドについてご指導頂いた熊本大学の谷口功教授に厚くお礼申し上げます。脱窒菌の取り扱い方および azurin, NiR についてご指導頂いた大阪大学の鈴木晋一郎教授、山口和也助教授に深く感謝いたします。また、菌体回収の際に遠心分離機を快くお貸し頂いた名古屋工業大学の下村吉治教授ならびに下村研究室の皆様に謹んでお礼申し上げます。

金表面への修飾法、電気化学的な解析など常に的確なご指導、ご助言をして頂いた猪股智彦博士、電子移動反応の速度論的な取り扱いについてご指導をして頂いた加藤貴志博士に厚くお礼申し上げます。また、常に的確なご助言をして頂き、研究者としてのあり方をご教示して頂いた大畑奈弓博士、汲田英之博士、小林照幸博士、松本健司博士、有井秀和博士、梶田裕二博士、山口修平博士、大谷将人氏をはじめとする諸先輩方、苦楽をともに過ごした奥村健志氏、藤井達也氏、河内美樹さん、榎崎敦子さんをはじめとする同期の皆様、そして日々の実験をともにした篠崎数馬氏、中西愛さん、矢野卓真氏、網屋大輔氏、西島千佳さん、江口弘氏、安達利哉氏、辻本大祐氏、林裕也氏、棚橋宏仁氏をはじめとする増田研究室の皆様深く感謝いたします。

最後になりましたが、長きにわたる学生生活を精神的に支えてくださった両親に感謝の意を表し、これをもって謝辞とさせていただきます。

2007年3月

高橋 勇雄