金電極によるチトクロム b5の直接電子移動反応 _{指方}研二¹

Direct Electron Transfer of Cytochrom b₅ at Gold Electrode

Kenji SASHIKATA¹

¹Department of Human Education, Faculty of Human Studies, Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki 986-8580

Abstract

Measurement of the electron transfer reaction between a hemoprotein and an electrode can be considered to be a means of elucidating in vivo electron transfer. Studies have shown that direct electron transfer between cytochrome c and a gold electrode can occur if the electrode surface is modified using a promotor such as 4.4'-dithiodipyridine. It has also been found that using highly purified cytochrome c enables reversible redox reactions on a bare gold electrode. In the present study, we used cytochrome b_5 solubilized by trypsin from bovine liver microsome, and we investigated its redox behavior on a gold electrode by voltammetry. The results showed that highly purified cytochrome b_5 undergoes direct electron transfer with a gold electrode. The intermediate potential (Ep_{1/2}) midway between the peak oxidation and reduction potentials in the cyclic voltammogram was -250 mV vs. SCE, a value approximately equal to the redox potential determined by titration method. In addition, square-wave voltammetry yielded a transfer coefficient of a = 0.51 and a transfer rate constant of k = 2.7×10^{-3} cm/s. The results indicate that cytochrome b_5 undergoes reversible electron transfer with a gold electrode.

1. はじめに

本稿ではチトクロム類の電極による電子移動反応、およびヘムタンパク質間での長距離電子移動反応を概観したうえで、電気化学会第56回大会で発表した内容をもとにチトクロム b5の金電極による直接酸化還元、および電極過程での速度論的な検討を行った結果を報告する。

チトクロムは鉄が配位したポルフィリンを酸化 還元中心に持つ金属蛋白質で、鉄の2価/3価の 間で酸化還元が可逆的に起こる。これにより、酸 化還元電位の異なるヘムタンパク質間を電位の低 い方から高い方に向かって(エネルギーの高い方 から低い方に向かって)電子を橋渡しする役割を 担っている。電子伝達の経路はほぼ明らかになっ ているが、各々の要素が互いの配向や距離など、 どのような状態で電子移動を行っているかについ ては不明な点も多い。

電気化学的手法によるヘム蛋白質の酸化還元反応は、当初、固体電極とタンパク質問の電子移動 速度が極めて遅いため測定が困難であるとされて いたが、1970年代後半に Kuwana 等が In₂O₃電極 がチトクロムcと準可逆的に酸化還元可能である ことを見いだした⁽¹⁾。ほぼ同時期に Hill らはチ トクロム c 水溶液中に 4.4 - ビピリジン (PvPv) が共存すると、金電極上でチトクロムcが準可逆 的に酸化還元できることを報告している⁽²⁾。チ トクロム c が酸化還元を受ける電位では電気化学 的に不活性であるが、その物質が存在することに よってチトクロムcと電極との早い電子移動が可 能になるような物質を"プロモーター"と称する。 Taniguchi らは、4.4 – ジチオジピリジン (PySSPy) や6-メルカプトプリン (PuSH) で金 電極表面を修飾すると、これがプロモーターと なってチトクロムcとの可逆な酸化還元反応が可 能になることを見いだした⁽³⁾。Hill らが報告した PyPy はピリジン環の一方の窒素原子で金電極表 面に吸着し、他端の窒素原子を溶液側に向けて配 向している。PySSPy では S-S 結合が開裂して金 原子とスルフィド結合(Py-S-Au)を形成し、金 電極表面に Py-S-Au の自己組織化単分子膜が形

1石卷専修大学人間学部人間教育学科教授

成されており^(4,5)、ピリジン環の窒素原子は溶液 側に配向している。チトクロム c は等電点が約 10の塩基性タンパク質で、酸化還元中心であるポ ルフィリン環はヘムクレバスと呼ばれる溝の中に はまり込んでおり、ヘムクレバス周辺はリシン残 基の影響で正に帯電している。リシン残基の正電 荷と、電極表面で溶液側に配向したピリジン環の 窒素原子の負電荷が静電的に引きつけ合うことで チトクロムcのヘムクレバスが電極側に配向し、 電極との直接電子移動が可能になったと考えられ ている。この要因の他に、市販のチトクロムcに 含まれる不純物が電極表面を被毒することで電極 反応を妨げていることが指摘されており、カラム クロマトグラフィーで精製したチトクロムcで は、銀電極との間で準可逆に電子移動することが 報告されている⁽⁶⁾。凍結乾燥の際に生じた、変性 したポリペプチド鎖などが電極表面に吸着し、電 子移動が阳害されていることも示されている。こ れらの研究をきっかけにチトクロムcと電極間の 電子移動反応の解明が進んだばかりでなく^(7,8)、 その後の様々な生体関連物質の電気化学的研究の きっかけとなり、バイオセンサーやバイオキャタ リスト、エネルギー生産のためのデバイスとして の応用など、生物電気化学の新しい展開につな がった $^{(9, 10)}$ 。

チトクロムと電極との電子移動反応では上述の ようにヘムタンパク質の配向が重要な要因となる が、電子伝達系内での電子移動過程においても、 その配向は重要である。構造が完全に決定されて いるヘムタンパク質間の電子移動として、 Hoffman らはヘモグロビンサブユニットの一方 のヘム鉄を亜鉛に置換した混成ヘモグロビン内で の電子移動過程を検討した(11,12)。ヘモグロビン のサブユニットは互いのヘムクレバスが向き合っ て結合しているので、酸化還元中心であるポル フィリン環の間に遮るものはない。この混成ヘモ グロビンに閃光を照射(flash photolysis 法)する ことで3重項状態に励起された亜鉛プロトポル フィリンから、相手のサブユニットにある3価の ヘム鉄に向かって 2.5 nm もの長距離電子移動反 応が起こることを報告している。Miller らは、チ トクロム c とチトクロムム b5からなるタンパク 質複合体を形成させて長距離電子移動反応の検討

を行った⁽¹³⁾。チトクロム b_5 は等電点が約5の酸 性タンパク質で、ヘムクレバス周辺の43、44、48 残基のグルタミン酸、60残基のアスパラギン酸に より、開口部周辺は負に帯電している。このため チトクロム c とチトクロム b5は、互いのヘムクレ バスが向き合うようにして会合定数 k = 10^8 とい う安定な複合体を形成する。電子移動反応の△G を変化させるために未処理のチトクロム c、チト クロムcのヘム鉄を亜鉛に置換したチトクロムc (ZnC)、およびヘム鉄を除去したチトクロム c (PorC) を調製し、これらとチトクロム b5からな る複合体の電子移動過程を解析した結果、マーカ ス理論^(14, 15)で示される inverted region $(-\Delta G)$ が増大していくと電子移動速度が極大から減少に 転じる領域)がタンパク質間の電子移動過程でも 現れることが初めて見いだされた。一連の解析結 果から、これらの長距離電子移動は、酸化還元中 心に配位した化学結合を経由するのではなく、電 子トンネリングで空間を直接移動していること や、電子移動中心周辺の環境が電子移動速度に大 きく影響することが示されている⁽¹⁶⁻¹⁸⁾。

ここまで、チトクロム類の電極による電子移動 反応と、ヘムタンパク質間での長距離電子移動反 応に関してきわめて大まかに概観した。チトクロ ム類による電子伝達系の経路についてはかなりの 部分が明らかにされているが、電子移動にとも なって酸化還元中心をとりまいているポリペプチ ド鎖のカゴが変形したり、複合体ユニット間のコ ンフォメーションが変化しているのではないかと 推測されている部分の知見は未だに少ない。ま た、タンパク質複合体内の電子移動を解明するう えで、個々のタンパク質の電極過程を平衡論、速 度論の両側面から解析することは重要である。そ こで、電極との電子授受に関する報告が少ないチ トクロムロ b5について、プロモーターを介さない 電子移動の可能性と、電極反応速度について検討 した結果を以下に述べる。

2. 実験方法

チトクロム b_5 は Omura らの方法⁽¹⁹⁾に基づき ウシ肝臓ミクロソームからトリプシン処理によっ て可溶化し、Purity index A₄₁₂/A₂₈₀> 5.4 となる まで DE52 および Sephadex G-75 のカラムで精 製した。電気化学測定は、ボテンショスタット (PAR Model 177) および Cypress systems を用 いた。Square-Wave Voltammetry (SWV)の測 定は Cypress systems で行った。電気化学セル は自作の微量試料用セル (容積 1 mL)を用い、参 照電極には飽和カロメル電極 (SCE)を用いた。 作用電極にはゆ 0.5 mm の金、および白金電極 (田 中貴金属、99.99%)を用い、測定直前に粒径 0.05 μ mのアルミナ研磨剤で研磨した後、純水中で超 音波洗浄した。PuSH 修飾金電極は、金電極を粒 径 0.05 μ mのアルミナ研磨剤で研磨、純水中で超 音波洗浄した後、10 mM PuSH メタノール溶液に 5分間浸漬して準備した。

3. 結果および考察

3.1 サイクリックボルタンメトリー

精製したチトクロム b_5 を DEAE セルロースカ ラムで濃縮し、濃縮用カラムから溶出させた試料 を直ちに測定に用いた。図 1(a) に 0.2 M KCl (10 mM リン酸緩衝溶液 pH 7.3) 水溶液中での 0.13 mM チトクロム b_5 のサイクリックボルタモグラ ム (CV) を示す。 – 200 mV と – 300 mV vs. SCE にチトクロム b_5 の 2 価/3 価の酸化還元に 対応する準可逆なピーク波形が現れており、精製 したチトクロム b_5 が、プロモーターのない状態で 電極と直接電子移動することが示された。CV 測 定で得られた酸化ピーク電位と還元ピーク電位の 中間の電位 (Ep1/2) は-250 mV vs. SCE であり、 酸化還元滴定法で決定された酸化還元電位(20)と ほぼ同一の値が得られた。チトクロムcの電気化 学的な測定では、電極表面にタンパク質が強く吸 着して変性すると酸化還元電流が全く流れなくな る、酸化還元電位がカソード側にシフトする、ピー クセパレーションが大きくなるなどが報告されて いるが、図1(a)の結果から精製したチトクロム b5は金電極上で変性することなしに直接電子授受 を行っていると考えられる。図1(b) にアノード ピーク電流値の電位走引速度依存性を示す。プ ロットは直線上に乗っており、酸化還元電流が電 極上の吸着種ではなく、拡散律速の化学種による ものであることがわかる。このことからもチトク ロム b5は電極に強く吸着していないと考えられ る。プロットの勾配から、チトクロム b5の拡散係 数は D = 5.8×10^{-7} cm²/s と求まり、In₂O₃電極 による測定から求められたチトクロムcとほぼ同 じ値が得られた。可溶化したチトクロム b5は約 12700 Da、チトクロム c は約 12400 Da と、同程度 のサイズなので、得られた拡散係数の値は妥当で あると考えられる。白金電極でも CV 測定を行っ た結果、金電極と同様の結果が得られ、チトクロ ム b5が白金電極とも直接電子移動が可能である ことがわかった。ただし、試料によっては酸化還 元ピークが得られなかったり、ピークセパレー ションが非常に大きくなることもある。これらの



Fig. 1 (a) Cyclic voltammograms of 0.13 mM Cytochrome b₅ in 10 mM phosphate buffer solution (pH 7.3) containing 0.2 M KCl at scan rates of 0.01, 0.05, 0.1 V/s with Au electrode. (b) Plots of i_p vs. v^{1/2} for Cytochrome b₅.

ことと、図1(a)のCV波形が準可逆であること を考えると、何らかの不純物が電極上に吸着して いて可逆な電子移動を妨げている可能性がある。

図 2 に PuSH 修飾金電極による 0.2 M KCl (50 mM リン酸緩衝溶液 pH 7.1) 水溶液中での 0.46 mM チトクロム b_5 の、異なる掃引速度での CV を示す。Ep_{1/2} = - 250 mV vs. SCE 付近にチトクロム b_5 の可逆な酸化還元波が得られた。またピーク電流値の電位掃引速度依存性の勾配から、D = 1.6×10^{-6} cm²/s となった。PuSH で電極表面を 覆うことで不純物が電極上に強く吸着することが が妨げられ、その結果、吸着不純物による電子移動の阻害が軽減され、可逆な CV 波形になったと 考えられる。



Fig. 2 Cyclic voltammograms for reduction of 0.46 mM Cytochrome b₅ in 50 mM phosphate buffer solution (pH 7.1) at PuSH modified Au electrode. Scan rate: 0.02, 0.05, 0.1, 0.2 V/s.

3.2 速度論的な解析

チトクロム b₅と電極との直接電子移動におけ る電子移動速度定数は、これまで報告がなされて いない。金電極を PuSH で修飾すると可逆な CV 波形になることが見いだされたので、この電極に よるチトクロム b₅の電極反応速度論的な解析を 行った。SWV 法は Osteryoung らによって開発 された手法で⁽²¹⁾、電位パルスを正方向に加えた 時の電流と、負方向に加えた時の電流の差をとる のでバックグランド電流を相殺でき、希薄な試料 溶液でも高感度な測定が可能である。本稿では測 定原理の詳細は省略し、SWV で得られたデータ から導かれた結果を示す。図3に PuSH 修飾電 極による 0.2 M KCl (50 mM リン酸緩衝溶液 pH 7.1) 水溶液中での 0.22 mM チトクロム b5の SWV を示す。開始電位 E_i = 50 mV vs. SCE、ス テップ電位 Es = 2 mV、印加する方形波の電位 Esw = ± 50 mV、ステップ周期 τ = 25 ms であ る。242 mV vs. SCE のピークがチトクロム b_5 の 還元によるもので、CV 測定で得られた結果とほ ぼ等しい。 τ を 35 ms から 1 ms の間で変化させ た場合の測定結果をもとに、電極反応過程での移 動係数aと電荷移動速度定数kはそれぞれa =0.51、k = 2.7×10^{-3} cm/s と決定された。 a は、 反応座標の鞍点より先に反応が進む割合に相当し ており、この結果からチトクロム b5は可逆に電子 移動することが示された。また、得られたkの値 は硫酸鉄や価塩素酸鉄などの標準速度定数と同程 度であり、精製されたチトクロム b5は電荷移動速 度としては中程度の速度で電極と電子授受するこ とが示された。チトクロムcの場合、報告されて いる k の値は 10^{-4} cm/s から 10^{-2} cm/s 程度に



Fig. 3 Differential square-wave voltammogram for reduction of 0.22 mM Cytochrome b₅ in 50 mM phosphate buffer solution (pH 7.1) at PuSH modified Au electrode.

-108 -

渡っているが、これは電極の種類や前処理の方法、 不純物の影響などによると思われる。

4. まとめ

チトクロム類による電極反応の研究経緯、およ びヘムタンパク質間での長距離電子移動反応につ いて概観したうえで、チトクロム b5の金電極によ る直接酸化還元と、速度論的な検討を行った結果 を示した。

ウシ肝臓 microsome からトリプシンによって 可溶化して精製したチトクロム b5を用い、ボルタ ンメトリー法で金、および白金電極による酸化還 元挙動を検討した結果、高度に精製したチトクロ ム b5はこれらの電極と直接電子移動することが 示された。CV の酸化ピーク電位と還元ピーク電 位の中間の電位(Ep1/2)は-250 mV vs. SCE で あり、これは酸化還元滴定法で決定された酸化還 元電位とほぼ同一の値である。PuSH 修飾金電極 では可逆な CV 波形が得られ、プロモーターが不 純物の吸着による電子移動の阻害を低減している ことが示唆された。また、SWV の測定結果から、 PuSH 修飾金電極によるチトクロム b5の酸化還元 過程で、移動係数 a = 0.51、電荷移動速度定数 $k = 2.7 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ と決定された。この結果は、 チトクロム b5が金電極と中程度の電荷移動速度 で可逆に電子移動することを示している。

なお、本報告で示した実験結果は電気化学会第 56回大会で発表した内容に⁽²²⁾、速度論的な解析 結果を加えて新たにまとめたものである。

文献

(1) P. Yeh, T. Kuwana, *Chem. Lett.*, **1977**, 1145, (1977).

(2) M. J. Eddowes, H. A. O. Hill, J. Chem. Soc. Chem. Commun., 1977, 771, (1977).

(3) I. Taniguchi, N. Higo, K. Umekita, K. Yasukouchi, J. Electroanal. Chem., 206, 341, (1986). (4) T. Sawaguchi, F. Mizutani, S. Yoshimoto, I. Taniguchi, *Electrochimica Acta*, 45, **2861**, (2000).

(5) S. Yoshimoto, Y. Ono, Y. Kuwahara, K. Nishiyama, I. Taniguchi, *J. Phys. Chem. C*, **120**, 15803, (2016).

(6) K. B. Koller, F. M. Hawkridge, J. Electroanal. Chem., 239, 291, (1988).

(7) R. Seetharaman, S. P. White, M. Rivera, *Biochemistry*, **35**, 12455, (1996).

(8) J. I. Blankman, N. Shahzad, B. Dangi, C. J. Miller,R. D. Guiles, *Biochemistry*, **39**, 14799, (2000).

(9) I. Taniguchi, *Chemistry and chemical industry*, 66, 728, (2013).

(10) I. Taniguchi, 平成29年度 化学系学協会東北大会 講演予稿集, (2017).

(11) J. L. McGourty, N. V. Blough, B. M. Hoffman, J. Am. Chem. Soc., 105, 4470, (1983).

(12) S. E. P. Kennedy, J. L. McGorty, B. M. Hoffman, J. Am. Chem. Soc., 108, 1739, (1986).

(13) G. McLendon, J. R. Miller, J. Am. Chem. Soc., 107, 7811, (1985).

(14) R. A. Marcus, J. Chem. Phys., 24, 966, (1956).

(15) R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta*, 811, 265, (1985).

(16) P. S. Ho, C. Sutoris, N. Liang, E. Margoliash, B. M. Hoffman, J. Am. Chem. Soc., 107, 1070, (1985).

(17) J. L. Karas, C. M. Lieber, H. B. Gray, J. Am. Chem. Soc., 110, 599, (1988).

(18) D. E. Khoshtariya, T. D. Dolidze, M. Shushanyan, R. Eldik, *J. Phys. Chem. B*, **118**, 692, (2014).

(19) T. Omura, S. Takesue, J. Biochemistry, 67, 249, (1970).

(20) H. Weber, W. Weis, H. Staudinger, *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **352**, 109, (1971).

(21) J. J. O'Dea, J. Osteryoung, R. A. Osteryoung, Anal. Chem., 53, 695, (1981).

(22) K. Sashikata, K. Itaya, *電気化学会第56回大会 講 演予稿集*, (1989).