スーパオキサイドディスムターゼ(SOD) 修飾電極

西山勝彦・三浦さき子・谷口 功

熊本大学工学部物質生命化学科 ☎ 860-8555 熊本県熊本市黒髪 2-39-1

(2003 年 12 月 27 日受理)

Superoxide Dismutase (SOD) Modified Electrodes

Katsuhiko NISHIYAMA, Sakiko MIURA and Isao TANIGUCHI

Department of Applied Chemistry and Biochemistry, Kumamoto University
2-39-1 Kurokami, Kumamoto 860-8555

(Received December 27, 2003)

Electrochemical properties and electron transfer processes of biopolymers such as metal proteins or enzymes have been studied extensively, since it provides us important information to understand the redox system in biosystems. However, for example, it is not easy to obtain the reversible electrochemical response of superoxide dismutase (SOD) which disproportionates superoxide to molecular oxygen and hydrogen peroxide catalytically. Recently, electrochemical properties of various types of SODs have been reported using the so called self-assembled monolayer-modified electrodes or other type of functional electrodes. However, the results reported are not necessarily in good agreements. The authors introduce the modified electrode system for CuZnSOD reported by other research groups and describe the redox response of various SODs including CuZnSOD studied by our research group in this article.

1. は じ め に

生体では紫外線, 放射線, 大気汚染などの外的要因や, 低酸素状態などの内的要因によるストレスに曝されると生体に傷害を引き起こす作用と免疫作用の2つの作用を有する活性酸素が生成する。活性酸素による生体成分の損傷は, 脂質に対しては過酸化, タンパク質・酵素に対しては酸化やニトロ化による不活性化, 核酸に対しては塩基の酸化および切断である。これらが蓄積するとゲノム異常や発ガンや老化など種々の疾患が生じる。生成した活性酸素の一部はスーパオキサイドディスムターゼ(SOD)により酸素と過酸化水素に分解される (Fig. 1)。

SODのような生体高分子の電気化学特性および電子移動過程を明らかにすることは, 生体システム内外の生物活性種の酸化還元挙動を解明するための重要な情報であるため, 金属たんぱく質の酸化還元挙動の生物化学的,

生化学的研究が近年盛んに行われている。しかしながら, SODは, 通常の金, 銀, プラチナ, グラッシーカーボン, グラファイト電極を用いたサイクリックボルタノメトリーでは, 可逆的な電気化学応答は得られない。これは, 電極表面にSOD分子が吸着することにより, SODの変性あるいは活性サイトの立体配位が変化するためと考えられている。

近年, 金と硫黄の強い相互作用を利用したいわゆる自己組織化型プロモーター修飾電極¹⁾, あるいは他のタイプの修飾電極によってCu₂Zn₂SODを始めとする種々の起源のSODの電気化学的特性が報告されているが, 測定結果は必ずしも一致していない。本報ではCu₂Zn₂SODの速い電子移動を可能とするこれまで報告されてきた種々のSOD用修飾電極について述べるとともに本研究グループで行ったCu₂Zn₂を含む種々のSODの酸化還元応答について述べる。今回用いたあるいは論文で使用された修飾剤分子の構造をその略号と共にFig. 2に示した。また, ここで用いた電位は特に記述しない限りAg/

E-mail: nisiyama@gpo.kumamoto-u.ac.jp

Fig. 1. Schematic illustration of the biological process of superoxide ion dismutation catalyzed by SOD.

Cystein: Cys

Mercaptopropionic acid: MPA

Mercaptoethylemine: MPE

4-Amino-2-mercaptopyrimidine: AMP

1,2-bis(4-pyridyl)ethane: PyE

Fig. 2. Chemical structure of modifies and their abbreviations.

AgCl(KCl sat.) 基準となっている。

2. 種々の機能電極上でのSODの電気化学応答

2.1 システイン修飾金ディスク電極での $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の電子移動反応²⁾

リン酸バッファー中、未修飾金電極上では $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$

の電気化学的応答は得られなかった。一方、システイン修飾電極上では、 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ と金電極間の電子移動は促進され、掃引速度 100 mVs^{-1} において酸化還元ピーク電位差 (ΔE) が 150 mV である準可逆的なボルタモグラムが得られた。酸化還元電位 (E^0) は、 $65 \pm 3 \text{ mV}$ であり、ピーク電流は基本的には濃度に比例し、 0.56 mM までは直線的に増加した。また、掃引回数の増加に伴い、ピーク電流値は時間と共に増加した。すなわち、この条件下では $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ が徐々にシステイン修飾電極上に固定化されたことを示している。 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ を含まないリン酸緩衝溶液中でもボルタモグラムは少なくとも 20 分間は安定で、ピーク電流は掃引速度に比例して増加したことより $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ は電極上に比較的安定に固定されていることが示された。

2.2 システイン修飾金ワイヤー電極上での $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の電子移動反応³⁾

0.2 mM の硫酸中で前処理した金線電極を 2 mM のシステインを含む $\text{pH } 7.0$ のリン酸バッファー溶液に浸漬し、蒸留水でリンスし風乾することによりシステイン修飾金ワイヤー電極を作製した。 $\text{pH } 7.0$ のリン酸バッファー中でのサイクリックボルタモグラムには $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の酸化還元に対応するピーク電流が観測された。酸化ピーク電位は 170 mV 、還元電位が 50 mV であり、 E^0 は 110 mV となった。 ΔE は掃引速度 10 mV/s の場合 120 mV であった。システイン分子は金電極の表面に吸着しており、 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の測定に用いたシステイン修飾金ワイヤー電極を超音波洗浄した後でも、 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 溶液中において同様な電気化学的応答が得られた。掃引速度を変化させたところピーク電流はスキャンレートに比例したことから $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ は電極上に吸着していることが示された。

2.3 MPA 修飾金ワイヤー電極での $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の電子移動反応⁴⁾

2.5 M KOH 中で 4 時間煮沸した後、濃硫酸に一晩浸漬した直径 0.5 mm 金ワイヤー電極を室温で 10 mM MPA 水溶液に 15 分間浸漬し、純水でリンスすることにより MPA 修飾金ワイヤー電極を作成した。 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$

固定化電極は、MPA 修飾金ワイヤー電極を 200 μM $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 溶液 (pH 7.5 の 10 mM HEPES バッファー) に 4°C で 30 分間浸すことにより作成した。また、共有結合による $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の固定化には前述の静電的な吸着の際に 1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル) カルボジイミドを用いた。

MPA 修飾金ワイヤー電極を用いた場合、250 μM $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ (支持電解質は 0.1 M HEPES バッファー (pH 7.5)) の CV には酸化還元電位が 60 ± 6 mV, ピークセパレーションが約 56 mV の酸化還元波が観測された。ピーク電流は 10~100 mV/s の掃引速度の範囲では掃引速度の平方根の値に比例したことから、この条件下では SOD の電極反応は拡散律速であることを示している。一方、SOD を含まない低いイオン強度バッファー中では MPA 修飾電極に吸着した $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の明瞭で安定な応答を得られた。サイクリックボルタモグラムより求めた E^0 は $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ が吸着している状態では 47 ± 6 mV, ΔE は 39 ± 9 mV であった。一方、共有結合により SOD を電極用面に固定化した状態では E^0 が 56 ± 9 mV (pH 7.5) ΔE は 54 ± 10 mV であった。酸化還元ピーク電流は 10~600 mV 間で掃引速度に比例しておりタンパクが電極表面に固定されていることが示された。

MPA は短いアルキル鎖を持っており金電極上で単分子膜を形成している。末端のカルボシキル基は pH 7.5 では解離していると考えられ、電極表面は負電荷を帯びることになる。この pH で $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ は全体としては負電荷を帯びているが、部分的に正電荷を帯びた活性中心との静電的な相互作用吸着していると考えられる。モル分率 9:1 で MPA とメルカプトエチルアミン (MEA) を混合し、電極表面が弱くネガティブチャージするようにしても $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の吸着量、酸化還元反応の可逆性等に変化は見られない。しかし興味深いことに、吸着の $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の E^0 は MEA のモル分率が増加するとともにわずかに高くなる。

2.4 金マイクロ電極を用いた $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の電気化学応答⁵⁾

未修飾の直径 50 mm の金マイクロディスクを用いて $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ 溶液中の酸化還元波が観測された。 E^0 は約 220 mV, ΔE は約 100 mV であった。 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の濃度は通常のタンパク質電気化学の測定条件よりも比較的高い 260 μM , 支持電解質には pH 7.0 のリン酸バッファーを用いた。ピーク電流は掃引速度にほぼ比例しており $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ は電極に吸着していると考えられる。

2.5 PyE 修飾金電極での $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の電気化学的応答⁶⁾

pH 7.4 のリン酸バッファー中プロモーターとして 0.1

mM 1,2-bis(4-pyridyl)ethane (PyE) を用いた場合の $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の酸化還元電位は 120 ± 10 mV であった。PyE にはチオール基が存在しないため、吸着力はそれほど高くないが、ピリジン部位と金との相互作用で電極に吸着しているものと考えられる。PyE の配向に関しての情報はなため、2つのピリジル基の両方が金と相互作用している並行的な配向、あるいは1つのピリジル基のみが吸着している垂直的な配向であるかは不明である。pH 7.4 ではピリジル基はプロトン化しているとは考えにくく、静電的な相互作用というよりもむしろ $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ が金に変性して吸着することを防いでいると考えられる。酸化還元電位は pH 5~pH 9 の範囲で pH が増加するごとに 55 mV/pH で減少した。この条件では酸化還元反応に関与する電子とプロトンの比はほぼ 1 であると考えられる。

2.6 メディエーターを用いた $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の分光電気化学⁷⁾

作用電極として金グリッド電極、十分な吸光度の変化を得るために 2 cm の光学セルを用いた長光路分光電気化学測定を行った。メディエーターとしては $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の 6 倍の濃度の $[\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6]$ を用いた。

SOD の酸化体はメディエーターによって還元され、酸化体と還元体の比は波長 680 nm をモニタすることにより決定した。 $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の酸化と還元の濃度比は各印加電位における吸光度から決定し、酸化還元電位は 209 mV となった。

3. 種々の起源の SOD の酸化還元電位と酸化還元電位の修飾電極による依存性⁸⁾

これまで報告してきた実験方法とその方法により測定された酸化還元電位を Table 1 にまとめた。酸化還元電位は 220 mV~47 mV の範囲に分布している。基本的には SOD は吸着種として反応しており、若干の構造変化あるいは活性中心の微妙な環境の変化が酸化還元電位に影響を与えていると著者は考えている。SOD としての機能を評価することで未変性であることを証明することはこの系においては容易なことではない。本研究グループでは SOD の i) 起源および ii) 活性中心の違いに着目し、主に電極表面の電荷に着目した 3 種類の修飾剤を用いて種々の SOD の酸化還元反応を追跡した。Bovine erythrocyte 由来の $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の全体的な構造と分子量、残基数などのデータを Fig. 3 に示した。用いた修飾剤はこれまで用いられてきた Cys (両性イオン型), MPA (アニオン型) に加えてピリミジン環を骨格としてアミノ基を有するチオールである AMP である (Fig. 2)。

Bovine erythrocyte 由来の $\text{Cu}_2\text{Zn}_2\text{SOD}$ の CV を Fig. 4

Table 1. Redox potential of CuZnSOD obtained by electrode systems.

Electrode	Method	Redox potential vs Ag/AgCl
Cys/Au-Disk	CV	65 ± 3 mV
Cys/Au-Wire	CV	110 mV
MPA/Au-Wire	CV	47 ± 6 mV
Au-Microdisk	CV	220 mV
Au + PyE	CV	120 mV
Au + Fe[(CN) ₆] ³⁻	Spectroelectrochemistry	209 mV

M.W.	32,000
Residues	302
Redox center	$\text{Cu}^{2+} + e \rightleftharpoons \text{Cu}^+$
Size	105 × 199 × 51 Å

Fig. 3. Structure and properties of Cu, Zn-SOD from *Bovine erythrocyte*. **Fig. 4.** (a) CVs of SOD from *Bovine erythrocyte* in 27 mM Bis-Tris buffer solution (pH 7.8) containing SOD at cystein modified Au wire electrode. Scan rate: 10, 20, 50, 100 mVs⁻¹. (b) Plots of I_{pa} and I_{pc} vs. v or $v^{1/2}$. Data were taken from Fig. 4 (a).

に示した。明瞭な酸化還元波が観測され、酸化還元電位は 67 mV とほぼこれまで報告された値と一致した。酸化還元電流は掃引速度に比例していることから電極表面に吸着していることがわかった。

酸化還元中心として Cu, Zn を有する SOD に加えて起源の異なる Fe-SOD, Mn-SOD など 6 種の SOD の測定を行った (Table 2)。SOD は中性領域で負に帯電していることから、アミノ基を有する AMP をプロモーターとして用いたが、ほとんどの場合この電極上では応答が得られなかった。ただし、Cys, AMP で全く応答が得られなかった *E. coli* 由来の Mn-SOD に関して若干ながら

応答が見られたことは SOD の起源あるいは活性中心の構造によっては AMP が有効なプロモーターとして機能する可能性が残っている。

Cys 修飾電極上では *E. coli* 由来の Mn-SOD の場合を除いた 5 種類の SOD の電極反応が観測された。また、MPA 修飾電極上では 3 種類の SOD の酸化還元応答が観測された。興味深いことに、MPA 上で得られた酸化還元電位は Cys 上で得られた酸化還元電位とは異なる値となった。*Bovine erythrocyte* の場合は MPA 上の値が 70 mV 高く、Human の場合は 17 mV 高くなったが、*E. coli* (Fe-SOD) の場合は 73 mV 低い値となり、これらの全

Table 2. Redox potential of several kinds of SODs obtained from cyclic voltammetry at modified electrodes.

Modifier	Bovine erythrocyte Cu, Zn-SOD	Human Cu, Zn-SOD	<i>E. coli</i> Fe-SOD	<i>E. coli</i> Mn-SOD	<i>P. gingivlis</i> Fe-SOD	<i>P. gingivlis</i> Mn-SOD
Cys	67 mV	85 mV	−40 mV	×	73 mV	74 mV
MPA	127 mV	102 mV	−113 mV	×	△	×
AMP	×	×	×	△	×	×

での結果を合理的に説明することは容易なことではない。基本的には今回用いた SOD は吸着種として反応しているため電極表面の電荷状態が吸着状態あるいは SOD の構造に比較的大きく影響を与えていると考えられる。

4. お わ り に

酵素固定化電極としてスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) のための修飾電極あるいは機能電極の紹介および著者の研究グループで行った結果を紹介した。酸化還元電位は活性部位、由来に応じて異なることが示されたが、逆に 1 種類の SOD を異なる修飾電極で測定した場合は必ずしも得られる酸化還元電位は一致しないことが示唆された。SOD を用いた活性酸素センサーの研究も増えているようであるが、可能な限り機能を維持した状態で固定化する方法の開発が必要であろう。

文 献

- 1) I. Taniguchi: Interface **4**, 34 (1997) and references therein.
- 2) Y. Tian, M. Shioda, S. Kasahara, T. Okajima, L. Mao, T. Hisahori and T. Ohsaka: Biochim. Biophys. Acta **1569**, 151 (2002).
- 3) X. Meng, X. Wu, Z. Wang, X. Cao and Z. Zhang: Bioelectrochemistry **54**, 125 (2001).
- 4) B. Ge, F.W. Scheller and F. Lisdat: Biosensors and Bioelectronics **18**, 295 (2003).
- 5) X. Wu, X. Meng, Z. Wang and Z. Zhang: Bioelectrochemistry and Bioenergetics **48**, 227 (1999).
- 6) H.A. Azab, L. Banci, M. Borsari, C. Luchinat, M. Sola and M.S. Viezzoli: Inorg. Chem. **31**, 4649 (1992).
- 7) C. Clair, B. Gay and J. Valentine: Inorg. Chem **31**, 925 (1992).
- 8) K. Nishiyama, S. Miura and I. Taniguchi: manuscript to be submitted.