なお NADPH が二電子反応することは NADPH の陽極ポーログラフィの結果¹⁰⁾、および Yahiro らのアルコール-NAD 系電池において NAD ラジカル ESR シグナルが得られなかったこととも一致する。

以上のことから、生体内エネルギー代謝を利用した有機燃料電池

- 10) H. G. Cassidy, *J. Amer. Chem. Soc.*, 71, 402 (1949); J. Manassen, J. Wallach, *ibid.*, 87, 2671 (1965); A. S. Lindsey, S. E. Hunt, N. G. Savill, *Polymer*, 7, 479 (1966).

池研究の第一階梯として、この報告では NADP の酸化還元系を電池のアノード反応に導入し得ることを示した。すなわち、燃料として G-6-P、電子伝達物質として NADP を用い、酵素 G-6-P デヒドロゲナーゼが存在すれば、G-6-P がすべて GA-6-P に酸化されるまで所期の生物化学的電池反応のサイクルが行なわれていることがわかった。

一般に電極活物質以外の物質が多種類混在する生物電池においては、酵素をはじめとして、これら各種の物質と電極との相互作用が基本的問題として重要であると考えられる。しかしこの種の検討は未だ余り行なわれていないようである。この研究では酵素が電極に吸着され酵素活性を失うものと考えられるので、電極における酵素等の吸着現象について今後検討するつもりである。

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドの酸化還元系を用いた電池^{*1}

(昭和 44 年 9 月 4 日 受理)

高橋不二雄・相沢益男・故水口 純・鈴木周一^{*2}

ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド (NAD) の酸化還元系を用いた電池のアノード反応が遅い原因を、アノード界面における反応物質 NADH、および反応生成物質 NAD の吸着状態から検討した。その結果、三角波ボルタンメトリーによる白金極の電流、電位曲線において、いわゆる水素前置波の抑制度から NAD が NADH よりも強く吸着していることが見出された。すなわち反応生成物が電極界面から脱着し難く、反応物質の活性点を奪っているためアノード反応が遅くなると考えられる。

これらの知見をもとに、アノード反応を速くする方策を検討した結果、つぎのような全反応式で示される電池、すなわち NADH に加えて、さらに NADH から水素を受容する化合物をも添加し、これを直接のアノード反応物質とすることにより、アノード特性を著しく向上し得た。

1 緒 言

生体内のエネルギー代謝を利用した有機燃料電池を目的として、著者らはすでに生体内電子伝達系物質ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドホスフェイト (NADP) を直接のアノード反応物質として電池反応に導入し得ることを明らかにした¹⁾。しかしその際、1) アノード反応が比較的遅いこと、2) 放電中に酵素がしばしば失活し易いことなどが検討すべき問題として残された。

著者らはアノード反応が遅い原因の一つは、アノード反応物質およびその生成物の電極界面における吸着に関連していると考えた。例えば、アノード反応物質 NADH はピリジン環を有するが、ピリジン類は電極に吸着し易い²⁾ ことが知られているので、NADH は電極に吸着されやすいと考えられる。一方、アノード

反応生成物質である NAD もピリジン環を有する。もし反応生成物が反応出発物質よりも電極に吸着し易い場合には、電極面上における反応活性点は反応生成物によって占められ、見かけのアノード反応は遅くなるものと考えられる。

白金あるいはパラジウム電極界面における物質の吸着量はサイクリックボルタンメトリーによって、いわゆる水素前置波におよぼすこれら物質の抑制度から推定できるとされている³⁾。すなわち、ある物質が電極界面に吸着すれば、水素吸着は抑制され、吸着水素に起因する水素前置波は抑制されることになる。たとえば NAD あるいは NADH が電極界面にも吸着されれば、水素前置波を抑制し、その抑制度から両者の吸着状態の差異を推定し得ると考えられる。本報ではサイクリックボルタンメトリーを用いて、NADH および NAD の吸着状態を比較検討し、NADH の電極反応についての基礎的資料を得ることとした。

さらに、これらの知見をもって、アノード反応の促進について各種の方法を試みた。

なお、NADP と NAD は電気化学的性質が同じであるとされ

*1 この報文を「生体反応を模した電池 (第 8 報)」とする。

*2 Fujio TAKAHASHI, Masuo AIZAWA, Jun MIZUGUCHI, Shuichi SUZUKI 東京工業大学資源化学研究所：東京都目黒区大岡山。

1) 高橋, 相沢, 水口, 鈴木, 工化, 73, 908 (1970)。

2) 松田好晴, 田村英雄, 工化, 70, 2121 (1967)。

3) 佐々木和夫, 電気化学, 37, 80 (1969)。

ているので、本報では NAD を用いた。

2 実 験

2.1 試 薬

NAD, NADH (ナトリウム塩), グルタチオン, グルタチオンリダクターゼ(硫酸アンモニウム懸濁液), およびキサンチンオキシダーゼ(硫酸アンモニウム懸濁液)などはいずれも Boehringer 製を用いた。

2.2 装置および測定

電流-電位曲線の測定には北斗電工製 PS-5003 B 型ポテンシオスタットおよび LS-1 D 型リニアスキニングユニットを用いた。サイクリックボルタンメトリーの際には菊水電子製 454-A 型ファンクションジェネレーターで常法にしたがい三角波電位走査を行なった。電位測定には Luggin 毛管を用いて飽和甘コウ電極に照合して行ない、東亜電波製 XYR-A 型 X-Y 記録計によって記録した。試験電極は 0.5 mmφ のパラジウム線および白金線を用い、見かけの表面積を 0.16 cm² とした。電解液は 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃ 溶液を基準液とし、測定に際してはあらかじめ窒素ガスを吹込み溶存酸素の除去を行なった。

電池の放電試験には、アニオン交換膜で仕切った 2 室型セルを用いた。カソードおよびアノードはともに白金黒付白金板 (4×6 cm²), カソード液 (pH 8) は 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃ 溶液, アノード液 (pH 8) は 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃ および各種添加物の溶液である。

2.3 分 析

NAD および NADH の濃度は紫外吸収スペクトル法⁴⁾によって、酸化型は 260 mμ, 還元型は 340 mμ の吸光度から求めた。吸収スペクトル測定には島津製 SV-50 AS 型自記分光光度計を用いた。

3 結果および考察

3.1 電極界面における NAD および NADH の吸着

白金およびパラジウム電極における NAD および NADH の吸着状態を、三角波ボルタンメトリーによって検討した。なお電解液の基準液としては、電池用電解液と同組成の 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃ (pH 8) 溶液を用いた。

この基準液にあらかじめ窒素ガスを吹き込み溶存酸素を除去した後、上記の方法にしたがって測定した白金電極の電流-電位曲線を図 1 に示す。電位走査速度は 3 V/min である。その結果、図 1 に示されるように、いわゆる水素前置波と呼ばれる二つの還元波と、酸化白金還元波を、それぞれ -0.6~-0.7 V および +0.1 V (vs SCE) 付近にみることができる。図中の実線はこの基準液に NAD を添加して 2.5 mmol/l とした場合の電流-電位曲線である。図から明らかなように、NAD の添加によって、水素前置波および酸化白金還元波は著しく抑制されることが示された。すなわち、この場合 NAD が電極界面に吸着するため、NAD が水素吸着活性点を占め、その結果水素前置波が著しく抑制されると考えられる。

さらに著者らは水素前置波の抑制度を吸着量の尺度と考え、NAD および NADH の吸着状態を上記の測定方法によって比較

図 1 三角波ボルタンメトリーによる電流-電位曲線 (1)

試験電極: Pt, 電位走査速度: 3 V/min, 温度: 25±1°C
電解液: 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃ (pH 8)
——: 添加物なし, ———: 2.5 mmol/l・NAD

図 2 三角波ボルタンメトリーによる電流-電位曲線 (2)

試験電極: Pt, 電位走査速度: 3 V/min, 温度: 25±1°C
電解液: 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaCO₃ (pH 8)
——: 添加物なし, ———: 2.5 mmol/l・NAD,: 2.5 mol/l・NADH

検討した。その結果を図 2 に示す。NAD および NADH の濃度はともに 2.5 mmol/l であるが、図 2 からわかるように両者の水素前置波抑制の度合は異なっている。すなわち NAD は NADH に比較して水素前置波に対する抑制度が大きい。

以上の結果から、アノード反応生成物である NAD は、アノード反応物質である NADH に比較して、電極界面に強く吸着されると推定され、NADH のアノード反応が遅いのは、電極反応の結果生成した NAD によって電極界面にある反応活性点が占められているためと考えられる。

3.2 NADH-水素受容体系電池

上記の NAD および NADH の電極界面における吸着状態の知見から、電池のアノード反応速度を速くすることを目的として、直接電極反応をしやすい水素受容体を電子伝達系物質に用いることを検討した。すなわち、NADH の水素受容体の酸化還元系を共役させた反応系を組み入れ、NADH によって還元された水素受容体をアノード反応物質に用いようとするものである。

4) S. P. Colowick, N. D. Kaplan, *J. Biol. Chem.*, 191, 447 (1951).

したがってこの電池の全反応は上式のように考えられる。

3・2・1 NADH の水素受容体 アノード反応物質として用いる水素受容体としては

- (1) NADH の酸化反応が速いこと
- (2) 還元型水素受容体のアノード反応が速いこと
- (3) 酸化還元電位が卑であること
- (4) アノード反応した水素受容体は再び NADH を酸化し、上式のサイクルを行なうこと

などの条件を満たすことが望ましい。

NADH の水素受容体としては、マラカイトグリーン⁵⁾やチオベンゾフェノン⁶⁾などが知られている。またメチルピオローゲン、ベンジルピオローゲンあるいはメチレンブルーなどの酸化還元色素、およびグルタチオンやフラビン類などの生体内電子伝達系物質はそれぞれ酵素を介して NADH の水素受容体になることも知られている。まず、これら各種の水素受容体が NADH を酸化する速さを比較検討した。

水素受容体による NADH の酸化反応は、あらかじめ窒素ガスを吹込み溶存酸素を除去した 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃ 溶液 (pH 8) 中で行なった。NADH および水素受容体の濃度はともに 2.5 mmol/l であり、酵素を必要とする場合には適応する酵素を添加した。なお水素受容体による NADH の酸化率は紫外吸収スペクトル法によって 340 mμ における吸光度の測定によって求めた。そのおもな結果を図 3 に示す。図 3 からわかるように、Flavine mononucleotide (FMN) やメチレンブルーなどによる NADH の酸化反応は極めて遅い。これに反してグルタチオンやメチルピオローゲンなどによる NADH の酸化反応は比較的速い。すなわち、酵素を介して NADH を酸化する水素受容体は一般にその反応が速く、アノード反応物質として用いる水素受容体の上記条件 (1) を満たすと考えられる。

このことから、酵素を介して NADH を酸化する水素受容体を

図 3 各種水素受容体による NADH の酸化

NADH 酸化条件: 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃, 2.5 mmol/l・NADH, 2.5 mmol/l 水素受容体, および酵素, pH 8, 室温
(水素受容体および酵素, —○—: グルタチオン, グルタチオンリダクターゼ, —□—: メチルピオローゲン, キサンチンオキシダーゼ, —■—: メチレンブルー, —●—: フラビンモノヌクレオチド (FMN))

以後の実験で用いることとした。上記実験においては、メチレンブルー (酵素: キサンチンオキシダーゼ), メチルオレンジ (酵素: キサンチンオキシダーゼ), メチルピオローゲン (酵素: キサンチンオキシダーゼ) およびグルタチオン (酵素: グルタチオンリダクターゼ) などが比較的速い NADH の酸化を示したので以後用いることとした。なおマラカイトグリーンは NADH の酸化反応が遅いが、酵素を介せず直接 NADH を酸化する物質の例として比較のため用いることとした。

3・2・2 NADH-水素受容体系のアノード反応 NADH-水素受容体系のアノード反応が速いほど、その水素受容体はアノード反応物質として適していることは上記のとおりである。そこで、NADH の酸化反応が比較的速い上記の水素受容体について、ポテンシャルスイープ法によって、NADH-水素受容体系のアノード反応を検討した。

0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃ 溶液 (pH 8) を電解液とし、この液に NADH および水素受容体をそれぞれ 2.5 mmol/l になるように加え、適応する酵素を添加し、30 分間放置した後、ポテンシャルスイープ法によって電流-電位曲線を測定した。

そのおもな結果を図 4 に示す。図 4 において、破線は NADH のみの場合における電流-電位曲線であり、+0.5 V (vs SCE) から立上がる NADH の酸化波がみられる。マラカイトグリーン (図 4 の 2 点鎖線) の場合には明瞭な酸化波は認められないが、NADH の場合よりいくぶんアノード反応が速い。一方、グルタチオン (図 4 の 1 点鎖線) およびメチルピオローゲン (図 4 の実線) においては NADH のみの場合に比して著しく卑な電位でのアノード反応が速くなっている。

図 4 NADH-水素受容体系の電流-電位曲線

試験電極: Pt (0.16 cm²), 電位走査速度: 1 V/min, 温度: 25±1°C
電解液: 0.5 mol/l・NaCl, 0.5 mol/l・NaHCO₃, 2.5 mmol/l・NADH, 2.5 mmol/l 水素受容体, 酵素

(水素受容体および酵素 ———: 水素受容体, 酵素なし, - - -: マラカイトグリーン, 酵素なし, ---: グルタチオン, グルタチオンリダクターゼ, —●—: メチルピオローゲン, キサンチンオキシダーゼ)

以上の結果から、これらの水素受容体をアノード反応物質に用いることによって、電池のアノード特性を向上し得ると考えられる。

3・2・3 NADH-水素受容体系電池 次に、上記の検討を行なった水素受容体を用いて、下記の全反応式で示される電池を組み立て、NADH-水素受容体系電池の特性を検討した。なおこの際前出の全反応式における燃料の酸化反応を除去してあるが、これは NADH-水素受容体系のみのアノード特性を調べるためである。

5) D. Mauzerall, F.H. Westheimer, *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 2261 (1955).

6) J.C. Powers, F.H. Westheimer, *ibid.*, **82**, 5431 (1960).