

### *In situ*ラマン分光法による界面電子移動プロセスの探索： 基礎から応用事例研究まで

*In situ* Raman Spectroscopy to Monitor Interfacial Electron Transfer Process:  
from Fundamental to Application Case Studies

葛目 陽義

Akiyoshi KUZUME, Ph.D.

東京工業大学科学技術創成研究院 (226-8503 横浜市緑区長津田町 4259)

特任准教授

Tel : +81-45-924-5873

電子メール : Kuzume.aaa@m.titech.ac.jp



*In situ*ラマン分光法は、固液界面の局所構造や反応特性の測定を通じて、電気化学的条件下での電子移動プロセスの検証を行うことができる。このため現在、*in situ*ラマン分光法は、たとえばエネルギー変換やバイオメディエーション(生物学的環境修復)を利用する装置の開発といった、基礎から応用研究まで広範囲にわたる分野・領域において、その場観察できる強力な表面特性評価ツールの一つとして認識されている。また、精密制御したナノ構造体を表面に導入することで、ラマン信号強度が特異的に増強され、分子レベルでの光学的特性の観察・評価が可能になる。本稿ではラマン分光法の歴史を序論にて簡潔に紹介し、続いて筆者のチームが最近手掛けた*in situ*ラマン分光分析の事例を、電位制御条件下の固液界面における電気化学的な、あるいは微生物学的な電子移動プロセスに特にスポットを当てて概観する。

*In situ* Raman spectroscopy is capable of probing electron transfer processes under electrochemical condition by monitoring local structure and reactivity properties of solid/liquid interfaces. Therefore, *in situ* Raman spectroscopy is now recognized as one of the powerful surface characterisation techniques for the investigation of the fundamental and application studies, such as development of energy conversion and bio-mediating devices. In addition, an introduction of nanostructured surfaces increases the sensitivity of Raman signals, capable of observing spectroscopic features from molecular level. This article gives a brief history of Raman spectroscopy in the introduction, followed by an overview of the recent *in situ* Raman spectroscopic studies in our group, particularly focusing on the electrochemical and microbial electron transfer processes at solid/liquid interfaces under electrochemical condition.

#### 序論

ラマン効果とは入射光(光子)と物質の間でのエネルギー授受に起因する光の非弾性散乱である。RamanとKrishnanによって1923年に初めて実験で確認され、「新たな種類の二次放射(*a new type of secondary radiation*)」として1928年に報告された<sup>[1]</sup>。この発見が分光学上の新原理として重大なものであったことは、発表からわずか2年後の1930年にノーベル物理学賞を受賞していることから明らかである。一般に、放射により対象分子に分極率の変化(単に“電子雲の体積変化”と言っても良い)を引き起こす振動がラマン活性である。ただし、ラマン散乱の散乱断面積はレイリー散乱の強度と比較すると $10^{-6}$ 倍とかなり小さい。強いレーザー光を照射すると一般にラマンバンドの強度は増すが、測定時に試料温度が上昇し、表面種に深刻な損傷を引き起こす。加えて、試料からの蛍光がスペクトルのバック

グラウンドを増大させることから、ラマン分光法の検出能力に対して制約となった。このラマン効果の「過度の微弱さ(*excessive feebleness*)」から、初期のこの段階では、まだ技術的に単分子レベルでのスペクトル特性の検出に十分な感度を持っていなかった。その後、ラマン分光法が「ルネサンス期」を迎えるまでには、1923年の初実験から実に50年近い年月が必要となった。

1973年、電気化学的に粗面化された銀電極表面に吸着したピリジン分子における表面増強ラマン散乱現象(SERS)が発見された(最初の報告は1974年、Fleischmannらによる<sup>[2]</sup>)。そのラマンバンドの著しく高い信号強度は、蛍光によるバックグラウンドを凌駕し、表面の単分子層の観測をも可能としたことで、表面科学分野にブレイクスルーをもたらした。この実験的に観測されたSERS現象について後日、別々にJeanmaireとVan Duyne<sup>[3]</sup>、Albrechtと

Creighton<sup>[4]</sup>らのグループによって1977年、論理的に増強メカニズムが説明された。これらは、電磁的効果および化学的効果によるSERSの増強メカニズムに起因すると、それぞれ提唱された。前者の効果がレーザー照射に伴い粗面化表面において励起される局在化表面プラズモンの増強電場に起因すると説明されたのに対し、後者の効果は金属基板と吸着分子間での電荷移動を含む相互作用に由来すると提案された。粗面における顕著なラマン増強に関するこれらのメカニズム解明を幕開けとして、SERSを用いた表面科学分析がより盛んになり、高感度の表面観測技法の構築・改良を通じて固体表面のみならず電気化学的・生物学的な(*in situ*)界面研究を行う大きな流れへとつながっていく。

その後、表面を電気化学的に粗面化する代わりに、表面にナノ構造体を精密制御して配置させるナノ技術が開発されることで、SERS測定法がさらに進展した。ナノテクノロジーの進歩と機器能力・技術の向上により、精密なナノ構造体を有するSERS向け基板表面の作成技術はこの20年で著しく発展し、今やナノ構造体を持つ表面の精密設計を1 nmレンジの精度で作製することが可能である。作製方法としては、トップダウン型の物理的アプローチと、コロイドを用いるボトムアップ型の化学的アプローチがある。トップダウン型アプローチでは、マイクロスケールのバルク材料を連続的に加工・研磨することによってナノ構造体を得る。一方、ボトムアップ型アプローチでは、原子や分子、あるいはクラスターなどの材料を一つずつ積み重ねることで構築する。金、銀、銅のナノ構造体のサイズが10 nm~100 nmの領域になると、特有の表面プラズモン共鳴特性が出現し、表面とその付近の分子のラマン信号を顕著に強める効果が発揮される。SERSの増強度は、ナノ構造体表面に伝搬する表面プラズモンの励起波長とその強さによって大きく変化する。このため、ナノ構造体のサイズ、形状、化学組成、および形態(合金型、コアシェル型など)を精密制御することにより表面プラズモン共鳴を調整でき、再現性の高いSERSデータを取得することが可能となる。データの再現性が高まることで定性分析のみならず定量分析をも可能にする。SERSのさらなる展開について、多数のレビューや書籍にその詳細が記されている<sup>[5]</sup>。

最近の電気化学分野では、局所的な電子移動反応と、反応活性に対する表面構造の影響・相関について解明するために、実験的・理論的に固液界面特性を詳細に制御・理解することが重要となっている。1980年代後半以降の界面電気化学は、金属の結晶構造によって明確に定義されたClavilier型単結晶表面が開発・導入されたことで著しい発展を遂げた<sup>[6]</sup>。つまりMiller指数で表記できる単結晶表面での電気化学特性を調査することで、表面構造と電気化学挙動の相関が詳細に調査された。さらにこの表面作製技術の進歩によって、顕微鏡・分光器技術などの新たな表面科

学技術や理論的シミュレーション技術が大きく飛躍・発展した。なかでも表面増強ラマン・赤外分光分析といった*in situ*分光法は、電極表面付近の酸化還元活性種の電気化学的反応性と固液界面構造の変化を同時に観測することができる<sup>[7]</sup>。電気化学と顕微鏡および分光器によるアプローチを組み合わせることで、電気化学的条件下の固液界面における電子移動(ET)プロセスの根本的原理が、この20年間で急速に解明されてきた。

本稿では基礎的な表面科学の領域から、エネルギー変換触媒やバイオメディエーション装置の開発における応用まで、筆者のチームが最近手掛けたいくつかの*in situ*ラマン分光分析について紹介する。ここで筆者が強調しておきたいのは、ナノスケールでの表面特性評価を可能とする*in situ*評価ツールと、3Dに構築したナノ構造体や、微生物学的システムなどの複雑な系とを組み合わせることによって、これまで未開発であった複雑な固液界面プロセスや相互作用を探究する新興研究分野を切り拓く絶好のチャンスをもたらしてくれるということである。

## 実験について

すべての*in situ*ラマン測定には共焦点ラマン顕微鏡LabRAM HR800(Horiba Jobin Yvon製品)が用いられた(Figure 1A)。本装置は焦点距離800 mmのモノクロメーターを搭載し、高い感度と優れた空間分解能で繊細な試料の特性評価を行うことができる。作動距離の長い対物レンズ(Olympus製LMPLFLN, 倍率50×:開口数0.5)を用い、ダイオード励起固体レーザー光(DPSS)とヘリウムネオンレーザー光(励起波長はそれぞれ532 nmと632.8 nm)のどちらも3~6 mW程度と標準的な出力で試料表面に照射した。ラマン散乱光の収集には後方散乱光学配置を採用した。

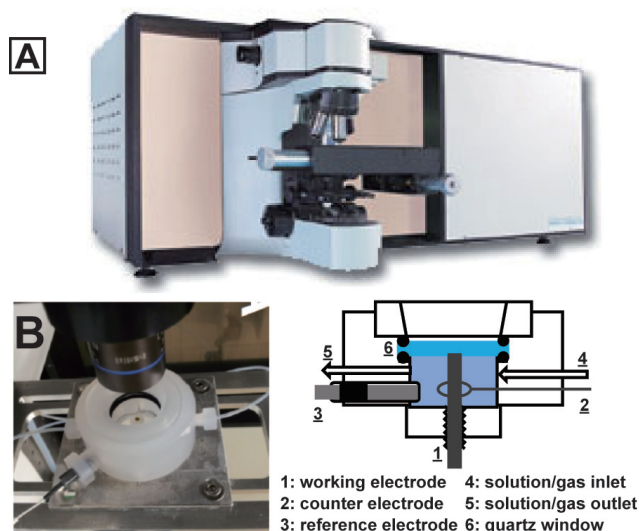


Figure 1 (A)共焦点ラマン顕微鏡LabRAM HR800と(B)自作のKel-F分光電気化学セル

また、自作のKel-F製 (polychlorotrifluoroethylene : PCTFE) 電気化学セルを *in situ* 測定に用いた (Figure 1B)。これにはセル上部に石英窓があり、さらに対極用の白金線、銀-塩化銀参照電極がそれぞれ取り付けられているほか、ガスや電解質溶液の出入口を設けてあり、分光測定時に光学的配置を乱すことなく溶液/ガスを交換することが可能となっている。

サイクリックボルタンメトリー (CV) は複雑な電極反応に対して、簡便に基礎情報を得るための初期的な電気化学測定法としてポピュラーな手法である。二つの電位値の間を、一定の走査速度で電極電位を両方向に連続して掃引することで、「電極の電位を循環」させたときの電極電流値を、印加した電位の関数として記録する。

## *in situ* ラマン分光法の事例研究

### Pt(100) 上でのCO酸化反応

白金表面における電気化学的な一酸化炭素 (CO) の吸着および酸化反応は、小さな有機分子の電極反応において最も重要かつ基礎的な界面反応の一つに数えられる。また、CO は固体高分子型燃料電池における白金アノード触媒の触媒毒として作用する。このことから、サイズ・形状をコントロールした白金ナノ粒子と同様に、モデル研究として白金単結晶電極についても、電気化学的CO吸着および酸化反応の分析が詳細にわたって研究され、表面構造と触媒活性との強い相関が明らかになっている。白金表面上での吸着CO分子と吸着酸素含有種との反応に基づくCO酸化反応は、Langmuir-Hinshelwood型メカニズムが提唱されている。(吸着酸素含有種の多くは、白金上の水分子の酸化的解離によって形成される吸着OHと帰属される。) 0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 中における白金表面上のCO酸化のCVは、特徴として2本の酸化ピーク、すなわちプレピーク (0.5-0.9 V) とそれに続

くメインの酸化ピーク (0.95 V) を示し、CO酸化プロセスが2段階で進行することを示唆している (Figure 2 黒実線)。メインピークは酸素含有種を伴うテラスサイト上の吸着COの酸化に相当する。一方、プレピークはステップや欠陥部といった活性サイトにおけるCO酸化に起因されると考えられてきた。プレピークの位置と大きさは結晶学的表面構造、欠陥の種類と密度、COの被覆率、および事前の表面処理に応じて異なる。このプレピークの強度は、配列の整ったPt(100)-(1×1)電極でかつ、高CO被覆率の場合に特に顕著となるが、どの表面でも、2周目のCVでは消失する (Figure 2 緑実線)。

Pt(100) 表面の顕著なプレピークの発生メカニズムと第2サイクルにおけるその消失メカニズムの要因は、これまで明らかになっていなかった。筆者らは複数の *in situ* アプローチ、すなわち走査型トンネル顕微鏡法 (STM) と *in situ* ラマン分光法を、単結晶電気化学と組み合わせ、*in situ* 状態におけるCOプレピークの界面プロセスの性質 (構造変化、活性、吸着・脱着など) の解釈を試みた<sup>[8]</sup>。

この研究では、シェル被膜ナノ微粒子増強ラマン分光法 (SHINERS) という手法を導入し、平坦なPt(100)表面に吸着したCO分子のラマン信号の側定を行った。通常は、SERS測定の実験要件として、貨幣金属の基材により構成され、粗面化またはナノ構造化された表面を使用する必要がある。しかしSHINERS法はSERS手法の応用例の一つで<sup>[9]</sup>、厚さ2~3 nmのシリカ層に被膜された金ナノ微粒子を光学アンテナである増強素子 (原文筆者らは「スマートダスト」と呼んでいた) として用いる。これらを平坦な表面上に敷きつめることで、その周辺の対象分子のラマン信号が増強させる。しかし、シリカシェルがあるために化学的にも電気的にも金ナノ微粒子が対象分子および基板表面と相互作用することはない。つまり、SHINERS法では平坦な表面を使うことができ、いかなる素材の表面でも対象分子のSERS測定が可能である。この実験では、CO分子は金ナノ粒子には吸着せず、Pt(100)の表面にのみ吸着するため、観測されるラマン信号はPt(100)表面の吸着COのみであることが確認されている。

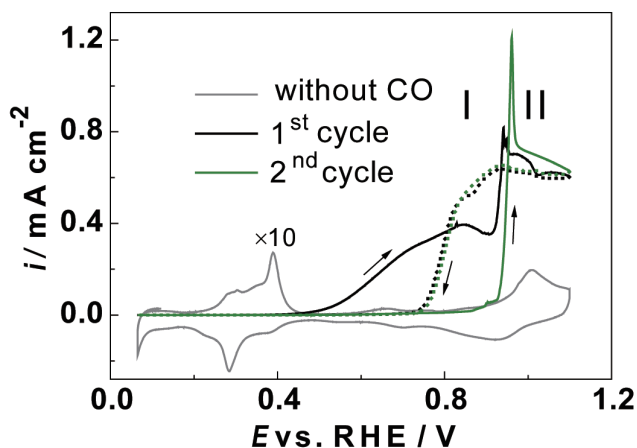


Figure 2 COを飽和させた0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中におけるPt(100)上のCOのサイクリックボルタモグラム。第1サイクルを黒、第2を緑で示す。実線と点線はそれぞれアノード・カソードの電位掃引を表す。(参考文献8より、許諾を得て転載。Copyright 2014, Elsevier Ltd.)

Figure 3A, 3Dに、Pt(100)表面の吸着COの電位依存ラマン分光スペクトルを示す。ラマンバンドは477~484, 1869~1877, および2054~2080 cm<sup>-1</sup>に現れ、それぞれon-top Pt-CO伸縮 ( $\nu$  (Pt-CO<sub>L</sub>)), bridge CO伸縮 ( $\nu$  (CO<sub>B</sub>)), およびon-top CO伸縮 ( $\nu$  (CO<sub>L</sub>))に帰属された。407 cm<sup>-1</sup>付近のショルダーは、bridgeのPt-CO伸縮モード ( $\nu$  (Pt-CO<sub>B</sub>))に相当すると考えられる。ラマンスペクトルで、bridgeおよびon-topの両モードが観察されたことは、CO分子が表面に密に吸着した単分子層の典型的な分光学的特徴であり、これは *in situ* STM測定からも示されている。Figure 3には、1回目のアノード/カソード掃引と、これに

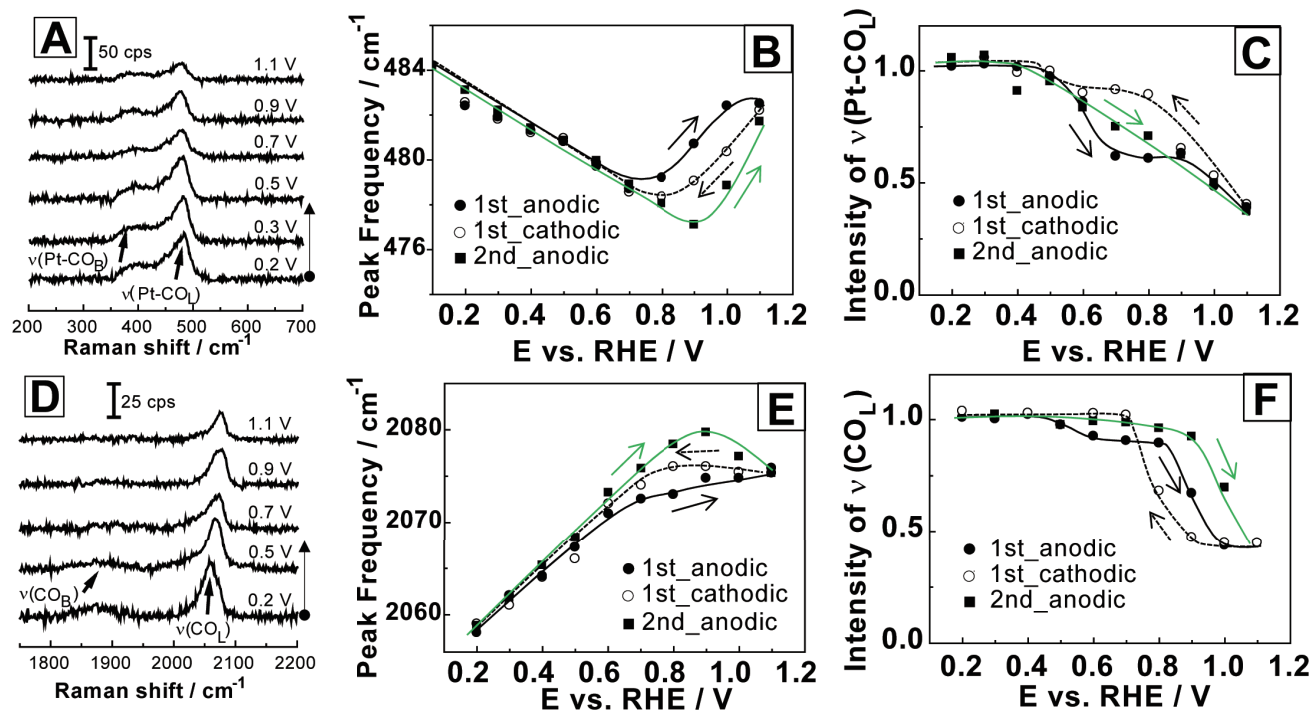


Figure 3 COを飽和させた0.1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>中におけるPt(100)上のCO吸着層の電位依存SHINER定常スペクトル(A, D)と、ラマン周波数シフト(B, E)および積分強度(C, F)を、 $\nu(\text{Pt-CO})$  (A-C)と $\nu(\text{CO})$  (D-F)の各モードについて示した。(参考文献8より、許諾を得て転載。Copyright 2014, Elsevier Ltd.)

続く2回目のアノード掃引時のラマンスペクトル、on-top COバンドの積分強度とラマンシフトの電位依存性をまとめた。低電位領域(0.2-0.4 V)では、二つのCOバンドのラマンシフトは直線的な電位依存変化を示す。その間、COバンドの積分強度値は一定である。これはStark効果によるスペクトル現象である。その後、高電位側( $E > 0.5$  V)では周波数のシフト傾向が変化する。これは近接CO分子間での相互作用の顕著な低下を示唆する。また同時に積分強度も低下することから、白金表面上のCO被覆率が低下したことが示唆される。どちらの変化もプレピークプロセスの開始時より高い電位で進行する。*in situ* STM測定では、基材の構造変化が $E = 0.83$  Vから始まること示された<sup>[6]</sup>。電位をさらにプラス側に掃引し、0.86 Vにすると、Pt(100)表面の再構成構造である大きな島状部位の周縁部から白金原子が引き抜かれる核形成・成長プロセスが示された。ここで指摘すべきは、プレピークが0.4 Vで発現するにも係らず、STM測定においては構造変化が観測されたのは0.83 V以上であること。つまりこれは、諸文献の著者が提唱する、プレピークが電位の上昇により形成される構造変化・欠陥サイトで引き起こされる、という仮説を否定することを強く示唆している。

COのプレピークがCVに現れない2回目の電位サイクリングでは(Figure 2), ラマンスペクトルが明らかに異なる電位依存性を見せる。つまり0.9 V付近まで、大きなシフト傾向の変化が見られなかった。さらに我々は、2サイクル後にArバブリングによりCOを溶液と電極表面から完全に除去し、その後、0.1 Vに印加することで水素吸着された白金

表面(0.1 V)にCOを再吸着させた時、1回目のアノード掃引における電気化学的応答、つまりプレピーク特性を再現できることを見出した。また、陰イオンが吸着する電位領域でCOを再添加した場合、プレピークの規模が顕著に小さくなった。これらの観測結果は、Pt(100)表面の「不可逆的劣化」がプレピーク特性の喪失につながったとする一部の文献とは食い違う。つまりCOを完全に除去した後で再添加した場合に、高電位で構造変化したPt(100)表面でも、プレピーク特性が回復する現象を説明することができない。

プレピーク領域におけるPt(100)の失活と再活性化に関わる別のメカニズムを提示するためには、活性中心サイトに加えて、反応物質のみならず阻害種としての吸着COの役割を検討する必要がある。特定の活性サイトの消失によってプレピーク特性の失活が引き起こされる可能性が説明できる。CO酸化では、COと酸素含有種が同時に活性サイトにアクセスできなければならない。したがって、Pt(100)表面失活の別の理由としては、潜在的に活性なサイトがCOによって塞がれ、酸素含有種の形成や共吸着が阻まれた結果、その後のCOの酸化が妨げられるということが考えられる。この仮説に従って我々はCVでの所見と*in situ*顕微鏡・分光分析を組み合わせ、Pt(100)表面におけるCO酸化反応のプレピーク特性の無効化について理論付けた。0.1 VにてPt(100)表面にCOを吸着した場合、吸着水素の一部がCO吸着層(吸着単分子層)に置換されないことで、特定のCOフリーサイトが少量形成されると考えられる。これらのサイトでは吸着水素が $E > 0.4$  Vで脱離し、競合的に酸素含有種、CO、および陰イオンにより占められる。酸素含有

種は近隣のCO分子と互いに作用し合い、やがて後者は電気化学的酸化に至り、低電位領域でプレピークとして現れる。電位を $E > 0.9$  Vまで上げると、テラスサイトでのCO酸化が起きる。その後のカソード掃引ではCO分子が、上に述べた特定のサイトを含む白金表面全体を覆い、酸素含有種の共吸着を阻害する。このため、2回目のアノード掃引ではCOのプレピークが抑制される。このメカニズムでは、構造変化・欠陥サイト生成後でも、プレピーク特性が再現される現象を問題なく説明できる。

我々は単結晶電気化学測定に、構造解析手法として*in situ* STMおよび*in situ* SHINERS分析を組み合わせることで、電位掃引中の電気化学的酸化反応特性および反応機構を解明することに成功した。

### SnO<sub>2</sub>系電解触媒上でのCO<sub>2</sub>還元反応

大気中の二酸化炭素(CO<sub>2</sub>)含有量の著しい増加と、化石燃料の燃焼や森林破壊といったさらなる人為的活動もたらす、地球の気候への重大な影響について前世紀から科学者たちの関心を大いに集めてきた。空気中のCO<sub>2</sub>含有量を低下させるための、CO<sub>2</sub>の回収や隔離に関する数々の技術が開発されている。そのなかでも特にCO<sub>2</sub>の電気化学的還元を扱った文献や論文の数は、1870年のRoyerの先駆的研究<sup>[10]</sup>で初めて取り上げられて以来、増え続けている。CO<sub>2</sub>の電気化学的還元は複数の電子-プロトン移動を伴い、室温の水性媒体中で、CO、ギ酸塩、炭化水素(CH<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>, C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>)およびアルコール(CH<sub>3</sub>OH, C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH, 1-プロパノール)が生産される。1980年代には、Horiらが様々な金属電極におけるCO<sub>2</sub>の電気化学的還元反応について、電極材料に関する生成物の選択性を報告した<sup>[11]</sup>。著者らは金属を、CO<sub>2</sub>の変換産物に基づいて二つのグループに分類した。一つは主にCOを生成し(Cu, Au, Ag, Pt, Pd, Zn, NiおよびGa)、もう一つはギ酸塩を生成する(Hg, Pb, Tl, Cd, In, Sn)。後者の金属の中で、ギ酸塩の生成に対する高い活性と白金族や貨幣金属と比べて著しく低いコストから、スズが注目されてきた。Sn/SnO<sub>x</sub>触媒系では、生成物の選択性と反応効率はさまざまな実験条件に左右される。一例として、形状や構造、化学的な酸化状態、温度、CO<sub>2</sub>の圧力・濃度、過電圧、および電解液のpH値などが挙げられる。このため、CO<sub>2</sub>の電気化学的還元によるギ酸生成のファラデー効率(FE)の報告値は、諸文献において5~90%と大きな差がある。

反応条件下における触媒の詳細な特性を評価することは、その触媒活性、すなわち反応性、選択性、および長期電解プロセスにおける安定性を把握するために欠かせない。しかし、不均一な、ナノ構造を持つ触媒の構造的・化学的特性に生じる同時発生的な動的変化を、実際の電解セル内での電解プロセス中、つまり“operando”で測定することは今もなお非常に難しい。そんな中、オペランド・ラマン

分光法<sup>\*1</sup>は、ナノ構造を持つ触媒の特性に関するリアルタイムな化学的情報を提供できる有望な技術である。これにより触媒自身の構造、活性、安定性、つまりは酸化スズの物性およびCO<sub>2</sub>の電気化学的還元活性に対する、反応生成物の選択性との相関を確かめることが可能となる。

\*1: オペランド・ラマン分光法: ラマン分光法を使った触媒特性評価手法で、実反応条件下で同時に触媒本体や反応生成物のリアルタイム・オンライン分析を行う。

そこで実際の酸化スズ触媒の化学的変化を電気化学反応条件下で観察するために、オペランド・ラマン分光分析を実施した。担体として還元型酸化グラフェン(rGO)に担持した酸化スズ ナノ粒子(SnO<sub>2</sub> NP)を電解触媒として合成・使用し、各種pH値での水溶液におけるCO<sub>2</sub>の電解還元を行った<sup>[12]</sup>。過去の文献から、酸化スズの安定性がpHと印加された電極電位の両者に影響されることが明らかになってきたため<sup>[13]</sup>、今回はpH 8.5~12を示す強アルカリ性または弱アルカリ性の溶液を用いた測定を行った。溶液の作製にあたっては、目的のpH値が得られるまで0.5 MのNaOH溶液へのCO<sub>2</sub>の通気時間を制御する方法を用いた。

一連の電位依存の定常状態ラマンスペクトルには、478, 628, および770 cm<sup>-1</sup>において、ルチル型SnO<sub>2</sub>に由来する三つの特徴的なラマンバンドが観測された。これらはE<sub>g</sub>, A<sub>1g</sub>, およびB<sub>2g</sub>の各モードに帰属される(Figure 4A)。CO<sub>2</sub>還元触媒反応と同じ電位領域においては、SnO<sub>2</sub> NP自体の金属Snへの電気化学的還元が進行する。したがって、SnO<sub>2</sub> NP上での還元電流には、CO<sub>2</sub>還元電流と並行して、SnO<sub>2</sub> NP自身の金属Snへの還元電流が重なり、二つを分離することは困難である。そこで後者の電流値の傾向を視覚化するために、各pH値溶液について、628 cm<sup>-1</sup>のメインピークの積分強度を電極電位に対してプロットした(Figure 4B)。プロットの傾向から三つの電位領域(I~III)に区分できた。(I)合成時のSnO<sub>2</sub>相の領域、(II)SnO<sub>2</sub>が部分的に(20~25%)金属Snへ還元された中間領域、(III)SnO<sub>2</sub>が金属Snに完全に還元された後の領域として、それぞれ区別した。領域IからIIへの転換は、pH 8.5の電解液では-0.5 V付近、pH 9.7と12.0では-0.7 Vに見られた。領域IIの強度値は領域Iの値の約75~80%で、 $E < -1.2$  Vまで強度値はほぼ一定であった。さらに、ガスおよびイオン交換クロマトグラフィーを用いた生成物分析を行うことで、ギ酸塩生成におけるファラデー効率(FE)の値が、溶液のpH値と電位との関数として得られた(Figure 4C)。

FEの測定値(SnO<sub>2</sub>の生成物選択性)をラマン分光分析の結果(SnO<sub>2</sub>の減成)と対比することで、ギ酸塩生成のFEが触媒表面の酸化状態に強く依存することが示された。中程度のカソード電位(II)においては、FEは電極電位の低下につれて上昇するが、さらにマイナス側の電位領域でFE曲線が

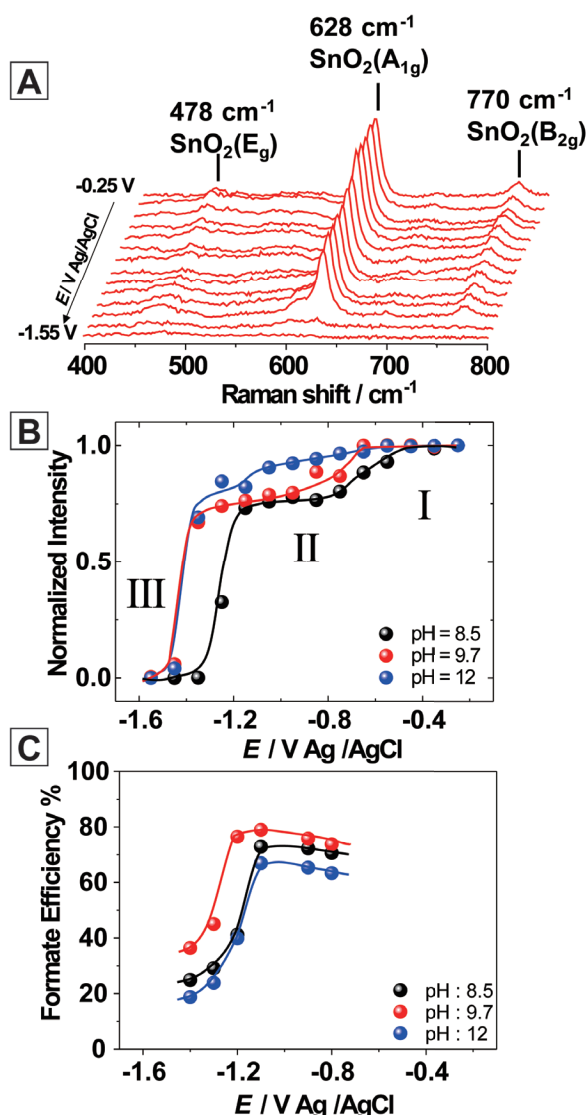


Figure 4 さまざまな電位とpHにおける、電位依存性のオペランドなラマン分析。(A) pH 9.7時の電位依存ラマンスペクトル、(B)  $A_{1g}$  ラマンピークの相対強度、(C) 印加電位の関数としてのFE値。(文献12のデータから、許諾を得て再プロット。Copyright 2015 American Chemical Society)

最大値を通り過ぎ、さらに低い電位領域(III)では、触媒が完全に金属Snに還元され、ギ酸塩生成FEと $A_{1g}$ ピークの強度が両方とも激しく減少した。興味深いことに、各FE曲線の最大値は、熱力学的に安定な相が金属Snとされる電位(プルベダイアグラムに基づき決定<sup>[13B]</sup>)に位置しているにもかかわらず、実働環境下では $SnO_2$  NPの還元は動力学的には妨げられ、触媒が部分的にしか還元されず、 $SnO_2$ 相が依然広く見られることが示された。

オペランド・ラマン分光法を用いることで、実働条件下でのスズ電極上の $CO_2$ 電気化学的還元により、ギ酸を形成する触媒作用において、表面酸化物の部分的な存在が重要な役割を果たすことが実証された。上記のように、我々は実働条件下におけるオペランド・ラマン分光分析の実行可能性を実証すると同時に、ナノスケールの表面検出ツールと市販分析装置とを注意深く組み合わせることにより、 $CO_2$

研究やエネルギー開発の新興分野の先端研究が可能であることを示した。

### 微生物と金属電極との界面における細胞外電子移動プロセス

起電性微生物<sup>\*2</sup>の発見は新たなエネルギー技術における大きなブレイクスルーであり、微生物燃料電池、微生物電気合成、微生物脱塩セル、そして汚染された環境を修復する微生物電気修復セルといった、微生物の起電性呼吸に基づく微生物電気化学技術(MET)の発展への道を切り拓いた。基礎的な理解として、電極と個々の起電性微生物との間で生じる界面プロセスのほとんどが電極表面に近い、最も外側の細胞膜に位置する外膜シトクロム(OMC)に関するものが主である。そのため、微生物と電極との間でOMCを介した効率的な電気的コミュニケーションを確立し、界面抵抗を低減させることにより、METでの微生物の全体的な電流生産量の増大やパフォーマンスの向上を図ることが重要である。

<sup>\*2</sup>: 細胞外電子伝達を含む新しい微生物代謝モードである起電性呼吸をする微生物。具体的には有機物などの燃料を酸化分解して電子を取り出し、外部電極へ移動させる能力・機能を有する微生物。多種多様な有機物から室温で電気を作り出すことができ、さらに自己増殖できる微生物の特徴を生かした廃棄物バイオマスを利用した発電システムへの応用が期待されている。

既知の純粋培養物では最も高い電流密度を作り出すことのできる嫌気性起電性微生物の*Geobacter sulfurreducens* (*Gs*)は、*Shewanella oneidensis*同様、起電性微生物の中で最も徹底的に調査されている科の代表種である。*Gs*表面のOMCは金属電極への直接的な電子移動(ET)を担うとされる。このプロセスはOMCの量が大きく制限された細胞では実際に機能しなくなることからも示唆される。直接的ヘテロ界面でのETにおけるOMCの役割がまだ十分に理解されていない状況で、電気化学的応答とOMCの構造変化の同時測定について検討し、動作条件下における電極/細胞界面に關与する相互作用やETプロセスの複雑な性質を理解することが重要である。

我々は最近、金電極に直接吸着させた*Gs*細胞の電気化学的活性と構造特性の変化を、*in situ*分光法、顕微鏡法、および電気化学的手法を組み合わせることで観察した<sup>[14-16]</sup>。我々の戦略は、(電気)化学的特性が十分理解されている単結晶電極上での電気化学に対し、*in situ*原子間力顕微鏡(AFM)を組み合わせることで*Gs*のサブ単分子層の形態を解明し、表面増強赤外吸収分光法(SEIRAS)およびギャップモード表面増強ラマン分光法(GM-SERS)を組み合わせることで*Gs*/電極界面の*in situ*の分子情報を高い表面選択性と感度で獲得することである。

微生物細胞はマイナスの表面電荷を帯びているので、プラスに帯電したAu(111)およびAg(111)電極上に静電吸着し、Gsのサブ単分子層(subML:被覆率が10-20%程度の吸着量)を作製できる。このとき電極は電子ドナーの役割を果たす20 mMの酢酸塩を含有した重炭酸塩緩衝液中にあり、同液はあらかじめN<sub>2</sub>とCO<sub>2</sub>の混合ガス(4:1)により脱酸素済みのものを使用した。これらの条件により、Gs細胞は安定な酸化型として電極表面に吸着する。12時間の分極処理の後に得られたこの微生物吸着層の形態について、電子顕微鏡法(SEM)と*in situ* AFMによる特性評価から、いずれにおいても、均一に分布した微生物細胞が、孤立して電極表面にしっかりと付着していることが確認された。Gs細胞の数は100 μm<sup>2</sup>につき平均で10±2個で、これは10%の被覆率に相当する。このsubMLの形成によって、以降の*in situ*分析では、近接する微生物間界面ではなく、微生物/電極界面でのETプロセスのみを観察ができる。

Au(111)上のGs細胞subMLの電気化学的酸化還元活性を、CVを用いて分析した(Figure 5A)。CVでは酸化還元信号が直接観測されたことから、微生物表面最外部の一部が電極から十分近い位置にあり、界面を介してETしている直接的証拠である。電位サイクルすることで、全電位領域でその酸化還元電流が顕著に低下し、5サイクル後にはほぼ定常状態に達した。対応するボルタモグラムは、中間点電位をそれぞれ-0.12 Vと-0.33 Vとする2組のピークを特徴とする(Figure 5A)。定常状態におけるこれらの電気化学的挙動は、表面に限定された酸化還元プロセスを示しており、その酸化還元電位は細胞外のc型シクロム(OmcZ)における以前の報告と同じ範囲にあった<sup>[17]</sup>。

CV実験と同様に、減衰全反射光-SEIRA(ATR-SEIRA)スペクトルでも、5サイクル後に分光学的応答が定常状態に達する。このときの挙動は電位に対して可逆的なものと

る。電位値を低くすると、1686 cm<sup>-1</sup>におけるアミドI由来のシグナルの変化が生じ、同時にカソード走査時の界面水の変角および伸縮モードの強度が増大した<sup>[14]</sup>。アミドIと水の吸収帯はその後のアノード走査時に低下した。こうした実験の観測結果から、次のような重要な側面が明らかになった。(i)Gs細胞の還元型と酸化型との間を行き来する電位サイクリングにおける定常SEIRAスペクトルの可逆的变化から、Gs細胞の被覆率が電位サイクリング中には変化しないことが示唆される。(ii)微生物細胞は金属電極への直接的な電気的コミュニケーションを維持する。(iii)1659 cm<sup>-1</sup>(酸化状態)から1686 cm<sup>-1</sup>(還元状態)までのアミドIバンドの顕著な電位依存シフトは、酸化還元活性を持つタンパク質の二次構造の変化(α-ヘリックスからβ-ターンへ)を示唆している。タンパク質構造における電場誘起型の立体配座(コンフォメーション)転移が、界面電子交換により適した立体配置(コンフィギュレーション)に導く可能性が示唆された。

外膜シクロムCユニット(OmcZなど)のヘム中心の構造特性について、*in situ* GM-SERSを用いて、電気化学的制御下での界面電子移動による構造変化を直接観察することができる。GM-SERSでは粒径55 nmの銀ナノ粒子(Ag NP)を光学アンテナとして使用した。同粒子をGs液と混合した後で、平滑なAg電極上に、subMLの被覆率(約10%)分を滴下した。Ag NPとAgの表面との組み合わせに適した緑色励起レーザー(波長532 nm)を選択した。これはナノ粒子のプラズモン共鳴だけでなく、ヘム中心のQバンド吸収にも対応する波長で、表面増強共鳴ラマン効果を利用した。

Figure 5Bに、GsのsubMLの酸化型(0.0 V)および還元型(-0.6 V)におけるGM-SERS応答を示す。バンド幅が大きい個々のバンドを明確に帰属することが困難であるが、純粋なGs試料の標準ラマンスペクトルとの比較によ

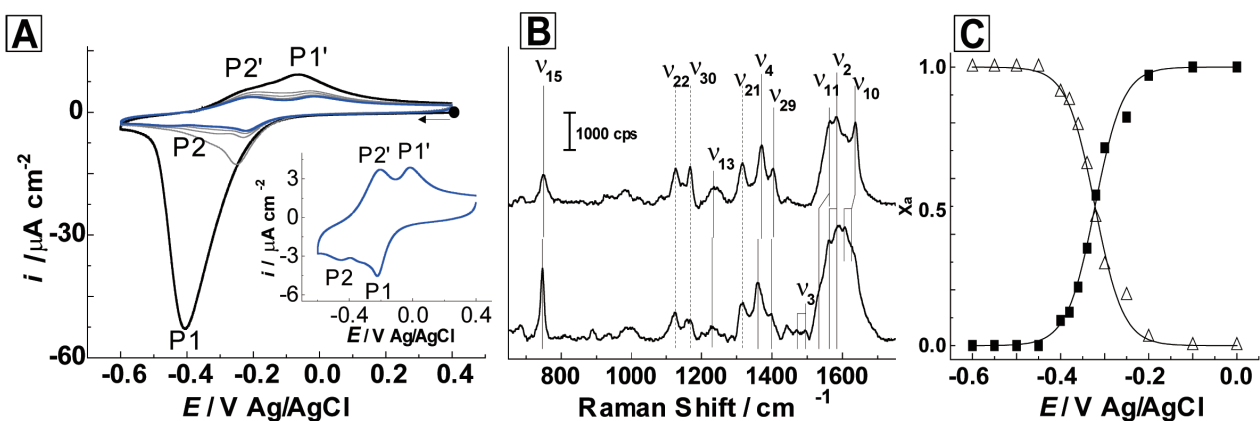


Figure 5 (A) Au(111)上のGs subMLのサイクリックボルタモグラム。走査速度は0.01 Vs<sup>-1</sup>。黒線: サイクル1, 灰色線: サイクル2~7。はめ込み図: 対応するサイクル8のCV(青色)。(B) Ag NPと混合されたGs subMLの電位依存性GM-SERSスペクトル。それぞれ、0.0 Vの酸化状態(上)、-0.6 Vの還元状態(下)。これらのスペクトルはλ=532 nmの励起により得られた(レーザー出力1 mW, 150 mmのデフォーカス, 取得時間10 s)。(C) GM-SERSスペクトル中のν15バンドの成分分析から取得した酸化型(中実の正方形)と還元型(中空の三角形)の電位依存モル分率(X<sub>a</sub>)。実線は一電子酸化還元反応のネルンスト式のフィットを表す。(文献14のデータから、許諾を得て再プロット。Copyright 2014 the Owner Societies)

て、酸化型のc型シトクロムを識別するためのバンドが明らかになった。酸化型Gs細胞では、スピン状態を表すマーカースバンドν2とν10の位置から、ヘムがヒスチジン基およびメチオニン基を軸配位子とし、六配位低スピン状態にあることを示した。この結果から、持続的なレーザー照射を受けても、プラスに分極された電極/電解質界面におけるOMCの固有構造は多くの場合、保持されることが示唆された。また我々のラマン測定では、Ag NPの存在がGs細胞の活性機能を妨害するようには見えないものの、Ag NPの部分的内部化の可能性は排除できない。

電位をマイナス方向に掃引するとGsが電気化学的還元され、それに伴いラマンスペクトルにも顕著な変化が現れる。波数の下方シフトとスピンマーカのピーク分裂がν2, ν4, ν10, ν11, およびν15のモードで観測された。ν4とν15の二つの強いバンドはとりわけヘムタンパク質の酸化還元状態に対する感度が高い。二つとも、中心のFeに対してNが配位されたピロール部分の対称なリングブリーディングモードを表している。そこで酸化還元マーカースバンドν15の積分強度を、印加電極電位の関数として定量的に分析し、吸着細胞の分光学的酸化還元応答として描写した。酸化型と還元型のモル分率の変化は、はっきりとしたS字型の挙動を示した(Figure 5C)。このGsのsubMLにおける酸化還元プロセスにおける成分変化について、二つの酸化還元状態の相対濃度を印加電極電位の関数としてNernst式から試算することができ、有効酸化還元電位-0.32 V, 有効電子交換数0.8が導かれた。前者の値はCV実験で得られたGs関連の酸化還元電位の範囲とよく一致するが、後者は均一な性質を持つc型シトクロムの酸化還元プロセスにおける期待値(1)をやや下回る。この結果は、界面酸化還元電位に特定の分布があることを示唆しており、ブロードなピークを示すポルタンメトリープロファイルとよく一致する。低スピンと高スピンの共存による、スピンマーカースモードν2, ν3およびν10が分裂することは特筆すべきであるが、この遷移の性質についてはまだ明らかになっていない。

我々は、金属電極と密な接触を持つOMCが、その構造や電気化学的性質を微生物/電極界面の電極電位に応じて変えている明確な証拠を、in situ分光分析手法の活用によって示すことができた。この界面効果は、自己組織化単分子膜(SAM)の導入によって微生物/電極表面間距離が広がるにつれて減少する<sup>[15]</sup>。さらに、我々は、各種の外部結合基を含むω-官能性アルキルチオールSAMでAu電極を修飾し、Gs細胞を固定化することで、SAMの生体適合性とGs細胞の電流生産特性に対する配位子効果を調べた<sup>[16]</sup>。カルボキシル基を末端に有する配位子では、微生物/電極界面におけるヘテロ界面ETを促進することを見出し、GsのOMCの生体適合性の条件として必要であることを示した。表面電気化学に基づいた、微生物細胞のsubMLに関する

我々のアプローチは、動作条件下における単一細胞の詳細なin situ分析が実現可能であることを示した。電気微生物学という新興分野にとって、ナノスケールやマイクロスケールの表面電気化学的ツールと微生物学的アプローチとの組み合わせは、微生物と電気装置とを組み合わせた新しいシステムのプロセスや相互作用を探究する新しい機会を提供してくれる。

## 結論

本稿では、ラマン分光法の歴史に続き、近年のin situラマン分光研究を、特に電気化学的条件下の固液界面における電気化学的および微生物学的電子移動プロセスに着目しつつ、手短に概観した。1974年に初めて表面増強ラマン散乱の発見が報告されて以来、分析装置の技術進歩に伴って、表面増強ラマン分光法は基礎研究・応用研究の分析における強力な診断的技法へと発展してきた。我々の研究室では、共焦点ラマン顕微鏡LabRAM HR800を用いたin situラマン分光分析による固液界面の局所構造と活性特性の測定を通じて、電気化学的条件下での分子レベルでの電子移動プロセスの検証を行っている。



## 参考文献

- [1] C.V. Raman, K.S. Krishnan, *Nature* 121, 501(1928).
- [2] M. Fleischmann, P.L. Hendra, A.J. McQuillan, *Chem. Phys. Lett.* 26, 163(1974).
- [3] D.L. Jeanmaire, R.P. Van Duyne, *J. Electroanal. Chem.* 84, 1 (1977).
- [4] M.G. Albrecht, J.A. Creighton, *J. Am. Chem. Soc.* 99, 5215(1977).
- [5] Just for examples, (a)S. Schluecker, *Angew. Chem. Int. Ed.* 53, 4756(2014);(b)Z.Q. Tian, B. Ren, D.Y. Wu, *J. Phys. Chem. B* 37, 9463(2002);(c)S. Schluecker "Surface Enhanced Raman Spectroscopy" Wiley-VCH, Weinheim (2011); (d)R. Aroca "Surface-Enhanced Vibrational Spectroscopy" Wiley, West Sussex(2006).
- [6] J. Clavilier, D. Armand, S.G. Sun, M. Petit, *J. Electroanal. Chem.* 205, 267(1986).
- [7] (a)Z.Q. Tian, B. Ren, *Annu. Rev. Phys. Chem.* 55, 197(2004);(b) D.Y. Wu, J.F. Li, B. Ren, Z.Q. Tian, *Chem. Soc. Rev.* 37, 1025 (2008).
- [8] A.V. Rudnev, A. Kuzume, Y. Fu, Th. Wandlowski, *Electrochim. Acta* 133, 132(2014).
- [9] J.F. Li, Z.Q. Tian et al. *Nature* 464, 392(2010).
- [10] M.E. Royer *Compt. Rend. Hebd. Séances Acad. Sci.* 70, 731 (1870).
- [11] Y. Hori, H. Wakebe, T. Tsukamoto, O. Koga, *Electrochim. Acta* 39, 1833(1994).
- [12] A. Dutta, A. Kuzume, M. Rahaman, S. Vesztergom, P. Broekmann, *ACS Catalysis* 5, 7498(2015).
- [13] (a)S. Lee, H.K. Ju, R. Machunda, S. Uhm, J.K. Lee, H.J. Lee, *J. Mater. Chem. A* 3, 3029(2015);(b)M. Pourbaix, *Atlas d'équilibres électrochimique; Gauthier-Villars et Cie: Paris*, P 479(1963).
- [14] A. Kuzume, U. Zhumaev, J. Li, Y. Fu, M. Füg, M. Estévez, Z. Borjas, Th. Wandlowski, A. Esteve-Nuñez, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 22229(2014).
- [15] M. Füg, Z. Borjas, M. Estévez, A. Esteve-Nuñez, I.V. Pobelov, P. Broekmann, Th. Wandlowski, A. Kuzume, *submitted to Bioelectrochemistry*.
- [16] A. Kuzume, U. Zhumaev, J. Li, Y. Fu, M. Füg, M. Estévez, Z. Borjas, A. Esteve-Nuñez, Th. Wandlowski, *Electrochim. Acta* 112, 933(2013).
- [17] (a)K. Inoue, X. Qian, L. Morgado, B.C. Kim, T. Mester, M. Izallalen, C.A. Salgueiro, D.R. Lovley, *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 3999(2010);(b)K. Inoue, C. Leang, A.E. Franks, T.L. Woodard, K.P. Nevin, D.R. Lovley, *Environ. Microbiol. Rep.* 3, 211(2011).