

藤 井 浩 (助 教 授)

A-1) 専門領域：生物無機化学、物理化学

A-2) 研究課題：

- a) 金属酵素反応中間体の電子構造と反応性の研究
- b) 磁気共鳴法による小分子活性化機構の研究
- c) 金属酵素が作る反応場の特色と機能との関わり
- d) 窒素循環過程に關与する金属酵素の研究

A-3) 研究活動の概略と主な成果

- a) 生体内には、活性中心に金属イオンをもつ金属酵素と呼ばれる一群のタンパク質が存在する。生体内で金属酵素が行う反応は、生体エネルギー合成、物質代謝、生体防御、生理活性物質の合成など多種多様である。金属酵素が、多くの生体反応をおこなうことができるのは、金属酵素それぞれが独自の反応場を使って、その反応中間体の電子状態、反応性を制御しているからだと考えられる。我々は、金属酵素の構造と機能との関わりを解明することを目指して、これまでにペルオキシダーゼやカタラーゼのヘム酵素反応中間体 (Compound I) のモデル錯体を合成した。現在、ヘムを活性中心に持たない非ヘム酸素活性化酵素の反応中間体の特色を解明するため、そのモデル錯体の合成を行っている。
- b) 金属イオンに配位した小分子 (酸素、窒素など) は、配位する金属イオンの種類、配位子、構造によりその反応性を大きく変化させる。このような多様な反応性を支配する電子構造因子がなにかを解明するため、磁気共鳴法により研究を行っている。金属イオンやそれに配位した小分子を磁気共鳴法により直接観測して、電子構造と反応性の関わりを解明することを試みている。生体内に多く存在する銅酵素を対象として、銅一酸化炭素錯体の⁶³Cu-NMRの測定を行った結果、極めてシャープなシグナルを観測することができた。その化学シフトは、銅イオンから一酸化炭素への電子の流れ込みを反映することがわかり、化学シフトから小分子の活性化を測定できることを示した。現在¹⁷O-NMRを用いて、銅イオンにより活性化される酸素分子の電子状態と反応性の研究へと展開している。また、ヘム鉄に配位するシアニオンをプローブとした酵素の反応場の解析法の開発も行っている。
- c) 金属酵素が作る反応場の特色と機能との関わりを解明するため、ヘムオキシゲナーゼを題材にして研究を行っている。ヘムオキシゲナーゼは、肝臓、脾臓、脳などに多く存在し、ヘムを代謝する酵素である。肝臓、脾臓の本酵素は、胆汁色素合成に關与し、脳に存在する本酵素は情報伝達に關与していると考えられている。本酵素の研究は、これら臓器から単離される酵素量が少なく、その構造、反応など不明な点を多く残している。最近、本酵素は大腸菌により大量発現することができるようになり、種々の物理化学的測定が可能になった。本研究では、大腸菌発現の可溶性酵素と化学的に合成したヘム代謝中間体を用いて本酵素による酸素の活性化およびヘムの代謝機構の研究を行っている。酵素の活性中心近傍のアミノ酸残基をミュートーションすることにより、反応選択性に関与する構造因子を解明することができた。
- d) 我々多くの動物は、生命エネルギー合成に酸素を利用しているが、酸素の乏しいところで生育する菌類やバクテリアなどは窒素をエネルギー合成に利用している。これらの菌類やバクテリアは、酸素の代わりに硝酸イオンを電子受容体として利用している。硝酸イオンは、菌体内のさまざまな金属酵素により亜硝酸イオン、一酸化窒素、

亜酸化窒素と還元されて、最終的に窒素になる。これらの菌類は、この反応過程で環境破壊につながる窒素酸化物を分解するため、環境保全の面で最近大きな注目を集めている。我々は、これら一連の酵素の中で、亜硝酸還元酵素に焦点をあて研究を行っている。菌体から本酵素を単離する研究は古くから行われているが、不明な点が多い。本研究では、本酵素の機能発現機構を解明する目的で、ミオグロビンという酸素貯蔵タンパク質をミュレーションにより亜硝酸還元酵素へ機能変換することを行っている。

B-1) 学術論文

K. CZARNECKI, J. R. KINCAID and H. FUJII, “Resonance Raman Spectra of a Legitimate Model for the Ubiquitous Compound I Intermediates of Oxidative Heme proteins,” *J. Am. Chem. Soc.* **121**, 7953-7954 (1999).

C. T. MIGITA, H. FUJII, K. M. MATERA, S. TAKAHASHI, H. ZHOU and T. YOSHIDA, “Molecular oxygen oxidizes the porphyrin ring of ferric α -hydroxyheme in heme oxygenase in the absence of reducing equivalent,” *Biochim. Biophys. Acta* **1432**, 203-213 (1999).

M. NAKAMURA, T. IKEUE, A. IKEZAKI, Y. OHGO and H. FUJII, “Electron Configuration of Ferric Ions in Low-Spin (Dicyano)(meso-tetraarylporphyrinato)iron(III) Complexes,” *Inorg. Chem.* **38**, 3857-3862(1999).

N. NISHIMURA, M. OOI, K. SHIMADZU, H. FUJII and K. UOSAKI, “Post-assembly insertion of metal ions into thiol-derivatized porphyrin monolayers on gold,” *J. Electroanal. Chem.* **473**, 75-84 (1999).

T. IKEUE, Y. OHOGO, A. UCHIDA, M. NAKAMURA, H. FUJII and M. YOKOYAMA, “High-Spin (meso-Tetraalkylporphyrinato)iron(III) Complexes As Studied by X-ray Crystallography, EPR, and Dynamic NMR Spectroscopies,” *Inorg. Chem.* **38**, 1276-1281 (1999).

K. CZARNECKI, L. M. PRONIEWICZ, H. FUJII, D. JI, R. S. CZERNUSZEWICZ, and J. R. KINCAID, “Insensitivity of Vanadyl-Oxygen bond Strengths to Radical Type (${}^2A_{1g}$ vs ${}^2A_{2g}$) in Vanadyl Porphyrin Cation Radicals,” *Inorg. Chem.* **38**, 1543-1547 (1999).

B-2) 国際会議のプロシーディングス

H. FUJII, “ ${}^{13}\text{C}$ -NMR study of cyanide complexes of iron porphyrins and hemoproteins,” *J. Inorg. Biochem.* **74**, 132 (1999).

B-4) 招待講演

藤井 浩, 「多核NMRによる生体内金属酵素の構造と機能の研究」, MRサイエンス99, 理化学研究所, 和光, 1999年12月.

C) 研究活動の課題と展望

これまで生体内の金属酵素の構造と機能の関わりを、酵素反応中間体の電子構造から研究してきた。金属酵素の機能をより深く理解するためには、反応中間体の電子状態だけでなく、それを取り囲むタンパク質の反応場の機能を解明することも重要であると考え。これまでの基礎研究で取得した知見や手法を活用し、酵素タンパクのつくる反応場の特質と反応性の関係を解明していきたいと考える。さらにこれらの研究成果を基礎に、遺伝子組み替えによるアミノ酸置換の手法を用いて、金属酵素の機能変換および新規金属酵素の開発を行いたい。