

## 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) 酸化反応に関与する金属酵素反応中間体モデルの合成
- b) 磁気共鳴法による金属酵素の小分子活性化機構の研究
- c) ヘムオキシゲナーゼの酸素活性化機構の研究
- d) アミノ酸の位置特異的ミューテーションによる酵素機能変換

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。これらの中で酸化反応に関与する金属酵素は、その反応中に高酸化状態の反応中間体を生成する。この高酸化状態の反応中間体は、酵素反応を制御するキーとなる中間体であるが、不安定なため、詳細が明らかでないものが多い。高酸化状態の反応中間体の電子構造と反応性を解明するため、そのモデル錯体の合成を行った。配位子に独自のアイデアを加えること、 $-80$ 度以下の低温で反応を行うことにより、ペルオキシダーゼやチトクローム酸化酵素反応中間体のモデルを合成することができた。合成したモデル錯体と酵素反応中間体の吸収スペクトルを測定することにより、新たな酵素反応機構を提案した。
- b) 自然界にある窒素や酸素などの小分子は、金属酵素により活性化され、利用される。活性中心の金属イオンに配位した小分子は、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。小分子の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。銅型亜硝酸還元酵素の反応中間体である銅 1 価亜硝酸錯体を合成し、その活性化状態を $^{63}\text{Cu}$ -、 $^{15}\text{N}$ -NMRから研究した。その化学シフトから、銅イオンから亜硝酸イオンへの電子の流れ込みが非常に強いことを見いだした。また、酵素がもつヒスチジン配位子の役割を解明するため、イミダゾール基をもつ酵素類似に錯体を合成し、 $^{63}\text{Cu}$ -NMRから電子的性質を検討した。その結果、ピラゾールやピリジンに比べ、強く亜硝酸イオンを活性化する性質があることがわかった。
- 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、胆汁色素合成に関与し、脳に存在する本酵素は情報伝達に関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テーションすることにより、酸素活性化に関与するアミノ酸残基を同定することができ、新しい酸素活性化機構を提案した。
- 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ーテ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

**N. NISHIMURA, M. OOI, K. SHIMATZU, H. FUJII and K. UOSAKI**, “Post-Assembly Insertion of Metal Ions into Thiol-Derivatized Porphyrin Monolayers on Gold,” *J. Electro. Chem.* **473**, 75 (1999).

**K. FUKUI, H. FUJII, H. OHYA-NISHIGUCHI and H. KAMADA**, “Electron Spin-Echo Envelope Modulation Spectral properties of Amidate Nitrogen Coordinated to Oxovanadium(IV) Ion,” *Chem. Lett.* 198 (2000).

**T. IKEUE, Y. OHGO, T. SAITOH, M. NAKAMURA, H. FUJII and M. YOKOYAMA**, “Spin Distribution in Low-Spin (meso-Tetraalkylporphyrinato)iron(III) Complexes with  $(dxz,dyz)^4 (dxy)^1$  Configuration. Studies by  $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$ , and EPR Spectroscopies,” *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 4068 (2000).

**H. ZHOU, C. T. MIGITA, M. SATO, D. SUN, X. ZHANG, M. IKEDA-SAITO, H. FUJII and T. YOSHIDA**, “Participation of Carboxylate Amino Acid Side Chain in Regiospecific Oxidation of Heme by Heme Oxygenase,” *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 8311 (2000).

#### B-3) 総説、著書

**Y. WATANABE and H. FUJII**, “Characterization of High-Valent Oxo-Metalloporphyrins” in *Mtal-Oxo and Mtal-Peroxo Species in Catalytic Oxidations*. B. Meunier, Ed., Structure & Bonding 97, Springer; Berlin 61 (2000)

#### B-4) 招待講演

藤井 浩, 「 $^{63}\text{Cu-NMR}$ による非ヘム銅酵素の反応場と反応性の研究」, 分子研研究会「タンパク質の振動分光」, 分子研, 岡崎, 2000年6月.

藤井 浩, 「EPRによる金属ポルフィリンラジカルの磁氣的相互作用の研究」, 分子研研究会「スピン化学の現状と展望 高周波EPRの可能性」, 分子研, 岡崎, 2000年8月.

藤井 浩, 「生体内で働く金属酵素の構造と機能の関わり」, 錯体化学若手の会東海地区勉強会, 名大, 名古屋, 2000年11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。