

## 藤 井 浩 ( 助教授 ) ( 分子スケールナノサイエンスセンター兼務 )

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。酸化反応に関わる金属酵素の機能制御機構を解明するため、それらのモデル錯体の合成を行った。モデル錯体を -80 度においてメタクロロ過安息香酸で酸化すると、緑色の錯体に変化することを見いだした。この錯体は低温においてのみ存在でき、酵素反応中間体のモデルになると考えられた。種々の測定から、配位子が酸化されたカチオンラジカル状態にあることがわかった。
- 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。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。銅イオンに配位した一酸化炭素の  $^{13}\text{C}$ -NMR を検討した。その結果、 $^{13}\text{C}$ -NMR シグナルを観測でき、その化学シフトと電子状態との相関を明らかにすることができた。
- 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。酵素がもつ反応選択性の機構を明らかにするため、代謝中間体の異性体を化学的に合成した。それらと酵素との反応から各代謝過程における選択性を明らかにすることができた。また、反応選択性に酸素分子活性化機構が関与することがわかった。
- d) 酵素は、高い反応選択性を示すことがよく知られている。活性中心近傍のアミノ酸残基を新たに設計することにより、酵素の反応選択性を人工的に制御できないかを検討している。本年度は、ヘムオキシゲナーゼの反応選択性の機構をもとに、その反応選択性の変換を試みた。酵素の立体構造をもとに活性中心近傍のアミノ酸残基のミューテーションを行い、反応場の再構築を行った。その結果、反応選択性を人工的に制御することに成功した。ある種のバクテリアの酵素では、設計どおりの活性中心の再構築ができ、反応選択性をほぼ 100% 変換することができた。

#### B-1) 学術論文

**X. ZHANG, H. FUJII, K. M. MATERA, C. T. MIGITA, D. SUN, M. SATO, M. IKEDA-SAITO and T. YOSHIDA**, “Regiospecificity of Each of the Three Steps of Heme Oxygenase Reaction from Hemin to *meso*-Hydroxyhemin, from *meso*-Hydroxyhemin to Verdoheme, and from Verdoheme to Biliverdin,” *Biochemistry* **42**, 7418–7426 (2003).

**M. OHASHI, T. KOSHIYAMA, TAKAFUMIENO, M. YANASE, H. FUJII and Y. WATANABE**, “Preparation of Artificial Metalloenzymes by Insertion of Chromium(III) Schiff Base Complexes into Apomyoglobin Mutants,” *Angew. Chem., Int. Ed.* **42**, 1005–1008 (2003).

**R. DAVYDOV, T. MATSUI, H. FUJII, M. IKEDA-SAITO and B. M. HOFFMAN**, “Kinetic Isotope Effects on the Rate-Limiting Step of Heme Oxygenase Catalysis Indicate Concerted Proton Transfer/Heme Hydroxylation,” *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16208–16209 (2003).

**R. DAVYDOV, J. SATTERLEE, H. FUJII, A. SAUER-MASARWA, D. H. BUSCH and B. M. HOFFMAN**, “A Superoxo-Ferrous State in a Reduced Oxy-Ferrous Hemoprotein and Model Compounds,” *J. Am. Chem. Soc.* **125**, 16340–16346 (2003).

#### B-3) 総説、著書

**M. IKEDA-SAITO and H. FUJII**, “EPR Characterization of the Heme Oxygenase Reaction Intermediates and its implication for the Catalytic Mechanism,” in *Paramagnetic Resonance of Metallobiomolecules*, J. Telesr, Ed., ACS Book Series; Washington, pp. 97–112 (2003).

#### B-4) 招待講演

**H. FUJII**, “<sup>13</sup>C-NMR Signal Detection of Iron Bound Cyanide Ions in Ferric Cyanide Complexes of Heme Proteins,” 生物無機ミニシンポジウム, 岡崎, 2003年8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。