

藤 井 浩 (助教授) (1998 年 3 月 1 日着任)

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非ヘム金属酵素反応中間体モデルの合成
- b) 亜硝酸還元酵素の反応機構の研究
- c) 小分子をプローブとした金属酵素の活性中心の構造と機能の相関
- d) 位置特異的ミューテーションを用いた基質配向制御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。立体障害を導入した新規サレン鉄錯体を合成した。1電子、2電子酸化生成物を種々の物理化学的手法により検討した。その結果、サレン鉄錯体では、鉄イオンが酸化されるが、配位子のサレンがフェノキシラジカルに酸化されることがわかった。
- b) 地中のバクテリアの中には、嫌気条件で硝酸イオンを窒素に還元する一連の酵素が存在する。これらの過程で、亜硝酸イオンを一酸化窒素に還元する過程を担う酵素が亜硝酸還元酵素である。銅イオンを活性中心にもつ本酵素の反応機構をモデル錯体から研究した。銅1価亜硝酸錯体とプロトンとの反応を低温ストップフローにより追跡した結果、反応中間体の検出に成功した。速度論解析から構造を推定し、新たな反応機構を提唱することができた。
- c) 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。シアニオンをプローブとしてFixLを研究した。その結果、活性中心近傍のアルギニン残基の役割を明らかにすることができた。
- 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。酵素の活性中心にある基質結合に関わるアミノ酸残基に着目し、基質の中で反応させたい部位が活性サイトに来るような酵素を設計し、作成した。この手法に従い、酵素選択性を持たない酵素に選択性を持たせることに成功した。

B-1) 学術論文

M. KUJIME and H. FUJII, "Synthesis of Sterically Hindered Tris(4-imidazolyl)carbinol Ligands and Their Copper(I) Complexes Related to Metalloenzymes," *Tetrahedron Lett.* **46**, 2809–2812 (2005).

T. MATSUI, A. NAKAJIMA, H. FUJII, K. M. MATERA, C. T. MIGITA, T. YOSHIDA and M. IKEDA-SAITO, "O₂- and H₂O₂-Dependent Verdoheme Degradation by Heme Oxygenase. Reaction Mechanisms and Potential Physiological Roles of the Dual Pathway Degradation," *J. Biol. Chem.* **280**, 36833–36840 (2005).

T. KURAHASHI, Y. KOBAYASHI, S. NAGATOMO, T. TOSHA, T. KITAGAWA and H. FUJII, "Oxidizing Intermediates from the Sterically Hindered Salen Iron Complexes Related to the Oxygen Activation by Nonheme Iron Enzymes," *Inorg. Chem.* **44**, 8156–8166 (2005).

B-4) 招待講演

藤井 浩, 「一原子酸素添加酵素における酸素分子活性化の化学」, チトクロームP450研究会, 神戸, 2005年7月.

藤井 浩, 「モデル錯体や発現酵素を使った金属酵素機能発現メカニズムの解明とその応用」, 生体関連化学若手フォーラム, 岡崎, 2005年9月.

H.FUJII, "¹³C and ¹⁵N NMR of Iron Bound Cyanide Ions of Ferric Heme Proteins: Useful Probe for Studying Hydrogen Bonding Networks in the Active Site," Seventh International Conference of Peroxidases, Fukuoka (Japan), September 2005.

B-8) 他大学での講義、客員

名古屋市立大学薬学部, 大学院特別講義, 「磁気共鳴を用いた金属酵素の研究 原理と応用」, 2005年6月29日.

B-10) 外部獲得資金

奨励研究(A), 「ヘム酵素の軸配位子が多様な酵素機能を制御する機構の解明」, 藤井 浩 (1997年-1999年).

重点領域研究(公募)「生体金属分子科学」, 「チトクロームc酸化酵素反応中間体モデル錯体の構築と反応機構の研究」, 藤井 浩 (1997年-1998年).

上原記念生命科学財団 研究奨励金, 「ヘムオキシゲナーゼにおける反応特異性およびヘム代謝機構の研究」, 藤井 浩 (1999年).

重点領域研究(公募)「生体金属分子科学」, 「¹⁷O-NMRによる銅-酸素錯体の配位した酸素の電子構造と反応性の研究」, 藤井 浩 (1999年).

内藤財団 科学奨励金, 「ヘムオキシゲナーゼによる位置特異的ヘム代謝機構の解明」, 藤井 浩 (2000年).

基盤研究(C), 「合成ヘムとミオグロビン変異体による亜硝酸還元酵素モデルの構築と反応機構の研究」, 藤井 浩 (2000年-2002年).

基盤研究(B), 「単核非ヘム酵素反応中間体として的高酸化オキソ錯体の合成と反応性の研究」, 藤井 浩 (2002年-2004年).

基盤研究(B), 「立体構造にもとづく基質結合サイトの再構築による酵素反応選択性の制御」, 藤井 浩 (2004年-2007年).
大幸財団 海外学術交流助成金, 「第3回ポルフィリンとフタロシアニンに関する国際会議での研究発表」, 藤井 浩 (2004年).

特定領域研究(公募)「配位空間」, 「金属酵素のナノ反応空間における基質の配向および反応選択性の制御」, 藤井 浩 (2005年-2006年).

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。また、これらの研究を通して得られた知見を発展させ、酵素機能変換法の新概念を確立できるように研究を進めたいと考える。