

2-4 生体物理

藤井 浩（助教授）

1) 専門領域：生物無機化学，磁気共鳴

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) 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

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 生体内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，高酸化反応中間体のモデル錯体の合成を行った。非ヘム酵素モデルとして立体障害を導入した新規サレン鉄錯体を合成した。構造解析や電子構造を研究した結果，カテコールジオキシゲナーゼの特異な活性中心の構造が，電子的要因によることを明らかにした。
- 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。酵素がもつ反応場が酵素機能に果たす役割を解明するため，種々の配位環境をもつモデル錯体を合成した。モデル錯体の合成と構造解析に成功した。モデル錯体は，配位環境によらず窒素原子で配位した構造をとることが明らかになった。
- c) 金属酵素と強く結合する小分子をプローブとした構造・機能測定法の開発を行った。金属酵素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，構造によりその電子状態を大きく変化させる。この電子状態の変化を磁気共鳴法により検出し構造や機能との相関を示すことができれば，新規構造・機能測定法になると考える。ヘムに配位したオキソ原子の ^{17}O NMR の測定を行い，酸化活性との相関を研究した。またヘムに配位したシアンイオンの ^{13}C NMR や ^{15}N NMR が，ヘム近位側，遠位側の水素結合の特性を知るよい手法であることを示した。さらに，銅タンパク質と強く結合する一酸化炭素 (CO) が ^{63}Cu NMR による構造・機能解析のよいプローブになることを見出した。
- 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。この手法に基づき，反応選択性をもたない特異な酵素を選択性をもつ酵素に変換することに成功した。

4) 学術論文

M. KUJIME and H. FUJII "Spectroscopic Characterization of Reaction Intermediates in Nitrite Reduction of Copper(I) Nitrite Complex as a Reaction Model for Copper Nitrite Reductase" *Angew. Chemie. Int. Ed.* **45**, 1089-1092 (2006).

A. TANAKA, H. NAKAMURA, Y. SHIRO, and H. FUJII “Roles of the heme distal residues of FixL in O₂ sensing: A single convergent structure of the heme moiety is relevant to the down-regulation of kinase activity” *Biochemistry*, **45**, 2515-2523 (2006).

H. FUJII, T. KURAHASHI, T. TOSHA, T. YOSHIMURA and T. KITAGAWA “¹⁷O NMR Study of Oxo Metalloporphyrin Complexes: Correlation with Electronic Structure of M=O Moiety” *J. Inorg. Biochem.* **2006**, 100, 533-541.

H. FUJII and T. YOSHIDA “¹³C and ¹⁵N NMR Studies of Iron-Bound Cyanides of Heme proteins and related model complexes: Sensitive Probe for Detecting Hydrogen Bonding Interactions at the Proximal and Distal Sides” *Inorg. Chem.* **45**, 6816-6827 (2006).

T. KURAHASHI, K. ODA, M. SUGIMOTO, T. OGURA, and H. FUJII “A Trigonal-Bipyramidal Geometry Induced by an External Water Ligand in a Sterically Hindered Iron Salen Complex, Related to the Active Site of Protocatechuate 3,4-Dioxygenase” *Inorg. Chem.* **45**, 7709-7721 (2006).

6) 国際会議発表リスト

H. Fujii, “Spectroscopic Characterization of Reaction Intermediates in a Model for Copper Nitrite Reductase” Post Hyaishi Symposium “Chemical Biology of Redoxmetalloenzymes”, Hrima (Japan), April 2006.

H. Fujii, X. Zhang and T. Yoshida “Mechanism of the Unique Regioselectivity and Alteration of Regioselectivity of Heme Oxygenase in *P. aeruginosa*”, 4th International Conference on Porphyrins and Phthalocyanines, Roma(Italy), July 2006.

H. Fujii, “Control of Regioselectivity of Heme Oxygenase by Reconstruction of Hydrogen-Bonding Interactions between Substrate and Enzyme”, 5th East Asia Biophysics Symposium, Okinawa (Japan), November 2006.

7) 招待講演

藤井 浩, 「金属酵素の機能発現メカニズムの解明とそれに基づく人工酵素の開発」, 化学と生物の新融合領域のフロントランナー 札幌 2006年2月.

H. Fujii, “Spectroscopic Characterization of Reaction Intermediates in a Model for Copper Nitrite Reductase” Post Hyaishi Symposium “Chemical Biology of Redoxmetalloenzymes”, Hrima (Japan), April 2006.

藤井 浩, 「立体障害を導入した新規サレン錯体による単核非ヘム酵素の構造と機能の研究」, 分子研研究会「金属機能中心を持つ高性能分子システムの創成—その構造と機能—」, 岡崎 2006年6月.

H. Fujii, “Control of Regioselectivity of Heme Oxygenase by Reconstruction of Hydrogen-Bonding Interactions between Substrate and Enzyme”, 5th East Asia Biophysics Symposium, Okinawa (Japan), November 2006.

9) 他大学での非常勤講師, 客員教授

兵庫県立大学大学院生命理学研究科 客員助教授 (2007年2月~)

11) 外部獲得資金

科研費基盤研究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

(代表) (2004年–2007年)

科学技術振興機構戦略的創造研究推進事業 (CREST) 「 ^{63}Cu NMR による酵素およびそのモデル錯体の反応場の機能計測」 藤井 浩 (分担) (2005年–2010年)