

2-3 生体物理

藤井 浩 (准教授)

1) 専門領域：生物無機化学，物理化学

2) 研究課題：

- a) ヘム酵素反応中間体の機能発現の分子機構の研究
- b) Jacobsen 触媒の不斉誘起機構の研究
- c) シアンイオンを NMR プローブとしたヘムタンパク質の機能解明

3) 研究活動の概略と主な成果：

- a) 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を合成し，電子構造と反応性の関わりを研究した。オキソ鉄 4 価ポルフィリン π -カチオンラジカル錯体は，チトクローム P450 の活性反応中間体として知られ，さまざまな炭化水素の水酸化反応を行う。シトクローム P450 によるアルカンの水酸化反応における水素原子のトンネル効果の作用機構を解明するため，オキソ鉄四価ポルフィリン π -カチオンラジカル錯体を低温下で合成し，ベンジル位に水素を持つ炭化水素の水酸化反応の反応過程を研究した。反応速度の温度依存性や H.D 同位体効果から，水素原子のトンネル効果について考察した。モデル錯体に結合する軸位の配位子を変化されることにより，モデル錯体の活性を変化させ水素原子トンネル効果への影響を研究した。また，異なる C-H 解離エネルギーをもつ炭化水素を用いて，C-H 結合エネルギーと水素原子トンネル効果に関わりを検討した。これらの実験から，水素原子トンネル効果を制御する因子を解明した。
- b) 不斉酸化能を有するマンガン 3 価サレン錯体の反応選択性の機構を研究した。エチレンジアミン部位に不斉を導入したマンガンサレン錯体は，Jacobsen 触媒として知られ，不斉エポキシ化反応を可能にする。我々は，Jacobsen 触媒がどのような機構で不斉エポキシ化反応を誘起しているのかを，活性反応中間体から研究を行ってきた。これまでの研究で，マンガンイオンが 3 価から 4 価に酸化されると，サレン骨格が不斉歪みを起こすこと，軸配位子の配位力の強さが不斉歪みを制御する因子であることを見出した。本年度は，エポキシ化反応の活性種と考えられているマンガンオキソ錯体の同定と反応性の解明に成功した。マンガン 4 価オキソ錯体を合成し，種々の分光法で同定することができた。マンガン 4 価オキソ錯体は，非常に容易にプロトン化を受けマンガン 4 価ヒドロキシ錯体を生成することを示した。これらオキソ錯体とヒドロキシ錯体の反応性を比較した結果，オキソ錯体が高い反応性を有することを見出すことができた。
- c) 金属酵素と強く結合するシアンイオンをプローブとした金属酵素の構造・機能測定法の開発を行った。我々はこれまで，ヘムタンパク質に結合したシアンイオンの ^{13}C ， ^{15}N NMR シグナルがヘム近傍の構造や水素結合ネットワークを検索する優れたプローブであることを明らかにした。この手法をペルオキシダーゼの変異体に適応した。ヘム近傍のアミノ酸を置換したさまざまな変異体を作成し，水素結合ネットワークと酵素機能の関わりを研究した。その結果，ヘムの軸位に配位するヒスチジン残基からの電子供与性効果と過酸化水素との反応により生成する活性種の生成速度が相関することを見出した。この相関がどのような機構で発現しているかを研究した結果，ヒスチジン残基からの電子供与性がヘム近傍の水分子とヘム鉄の結合の強さを変化させ，こ

れが過酸化水素との反応速度を制御しているという新しい制御機構を提案することができた。

4) 学術論文

T. Kurahashi, A. Kikuchi, Y. Shiro, M. Hada and H. Fujii, “Unique Property and Reactivity of High-Valent Manganese-Oxo versus Manganese-Hydroxo in the Salen Platform,” *Inorg. Chem.* **49**, 6664-6672 (2010).

H. Ishimura, H. Fujii and T. Ogura, “Resonance Raman Study of a High-Valent Fe=O Porphyrin Complex as a Model for Peroxidase Compound II,” *Chemistry Letters* **39**, 332-333 (2010).

S. Nozawa, T. Sato, M. Chollet, K. Ichyanagi, A. Tomita, H. Fujii, S. Adachi, and S. Koshihara, “Direct Probing of Spin State Dynamics Coupled with Electronic and Structural Modifications by Picosecond Time-Resolved XAFS,” *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 61-63 (2010).

D. Nonaka, H. Wariishi, K. G. Welinder and H. Fujii, “Paramagnetic ¹³C and ¹⁵N NMR Analyses of the Push-and Pull-Effects in Cytochrome c Peroxidase and Coprinus cinereus Peroxidase Variants: Functional Roles of Highly-Conserved Amino Acids around Heme,” *Biochemistry* **49**, 49-57 (2010).

6) 国際会議発表リスト

H. Fujii, “Functional Role of Heme *d*₁ in Catalytic Nitrite Reduction by Heme-containing Nitrite Reductase” International Symposium on Picobiology, Hyogo (Japan), March (2010).

H. Fujii and S. Mochizuki, “Functional Role of Unique Heme *d*₁ in Nitrite Reduction by Heme-containing Nitrite Reductase” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka (Japan), September (2010).

T. Kurahashi and H. Fujii, “Critical Factors for the Formation of a Chiral Conformation in Manganese Salen Complexes, Related to Enantioselective Epoxidation” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka (Japan), September (2010).

H. Fujii and S. Mochizuki, “Functional Role of Unique Heme *d*₁ in Nitrite Reduction by Heme-containing Nitrite Reductase” 5th Asian Bioinorganic Chemistry Conference, Kaohsiung (Taiwan), November (2010).

7) 招待講演

H. Fujii and S. Mochizuki, “Functional Role of Unique Heme *d*₁ in Nitrite Reduction by Heme-containing Nitrite Reductase” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka (Japan), September (2010).

T. Kurahashi and H. Fujii, “Critical Factors for the Formation of a Chiral Conformation in Manganese Salen Complexes, Related to Enantioselective Epoxidation” 60th Anniversary Conference on Coordination Chemistry, Osaka (Japan), September (2010).

藤井浩, 「アキシシャル位配位子による高原子価サレンマンガン錯体の電子構造と反応性の制御」, 日本化学会第4回関東支部大会筑波大学(筑波)2010年8月.

藤井浩, 「酸化反応を触媒する金属酵素の反応中間体の電子構造」, 第4回生物物質科学フォーラム東京工業大学(東京)2010年5月.

H. Fujii and D. Nonaka, “¹³C and ¹⁵N NMR Spectroscopy of Heme-bound Cyanide (¹³C¹⁵N) in Ferric Heme Peroxidases” Japan-Korea Seminars on Biomolecular Sciences-Experiments and Simulations, Nagoya, Japan December (2009).

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，客員准教授，2007年2月～

11) 外部獲得資金

基盤研究B「高原子価オキソ金属錯体の反応性と反応選択性を制御する分子機構の解明」，藤井浩（2010年－2013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）.

グローバル COE プログラム「ピコバイオロジー：原子レベルの生命科学」拠点形成事業（分担）（2007年－2012年）.