

## 海外特別研究員最終報告書

独立行政法人日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 30年

受付番号 201860393

氏名 中村 伸

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

### 記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： ローマ (国名： イタリア )
2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。  
量子化学計算による光合成水分解反応の分子メカニズムの解析
3. 派遣期間：平成 30年 6月 13日 ～ 令和 2年 3月 15日
4. 受入機関名及び部局名  
Department of biochemical science “Alessandro Rossi Fanelli”, University of Rome “Sapienza”
5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**  
(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)  
(注) 「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

## 5. 所期の目的の遂行状況及び成果

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

### 研究実施状況

#### 【研究の背景】

我々呼吸生命の生存に必要不可欠な大気中の酸素は、ほぼ全て光合成水分解反応により生成される。光合成における水分解反応は、光化学系 II タンパク質 (PSII) の Mn クラスターにおいて行われる。この反応では、光を吸収した P680 は電子を放出し、生成された P680<sup>+</sup>は、酸化還元活性があるチロシン残基 Y<sub>Z</sub> を介して、Mn クラスターから電子を引き抜く(図 1)。Mn クラスターには、酸化により遷移する 5 つの中間状態(S<sub>0</sub>-S<sub>4</sub>)が存在し、中間状態が一周するごとに、2 つの水分子が酸素分子と 4 つのプロトンに分解される(S 状態サイクル)。プロトンはタンパク質のルーメン側へと放出され膜内外のプロトン濃度勾配を形成し、最終的に化学エネルギーへと変換される。

近年、暗中において最も安定な S<sub>1</sub> 状態における PSII の X 線結晶構造解析[1]により、Mn クラスターから、タンパク質外へと続く複数の水素結合ネットワークの存在が示された。そのうちの 1 つのネットワークでは、チロシン Y<sub>Z</sub> を経由しており、チロシン Y<sub>Z</sub> は水分解反応において、電子移動経路としての機能を持つだけでなく、プロトン放出に関与することが示唆されている。しかし、チロシン Y<sub>Z</sub> の酸化に伴う構造変化の詳細は示されておらず、その水分解における機能は、未だ明らかになっていない。そこで、本研究では、水分解反応におけるチロシン Y<sub>Z</sub> の役割を解明することを目的として、Ab initio molecular dynamics (AIMD) 計算および X 線結晶構造[1]に基づく quantum mechanics/molecular mechanics molecular dynamics(QM/MM-MD)計算により、水溶液中のチロシン残基およびチロシン Y<sub>Z</sub> の水素結合特性を調べた。

#### 【研究方法】

本研究では、量子化学計算ソフト CP2K プログラムパッケージにより、AIMD 計算および QM/MM-MD 計算を実行した。水溶液中のチロシンのシミュレーションでは、AIMD のセットアップのため、AMBER プログラムパッケージを用いた MD 計算により、初期構造を得た。水溶液中のチロシンのシミュレーションにあたり、チロシン残基のモデルとして、*p*-cresol を用いた。AIMD シミュレーションでは、298 K で 80 ps (0.5 fs/1 trajectory) 間の計算を実行した。AIMD 計算にあたり、全ての原子は、PBE 関数形および DZVP-MOLOPT-SR-GTH 基底系を用いて計算した。また、Y<sub>Z</sub> の QM/MM-MD 計算では、X 線結晶

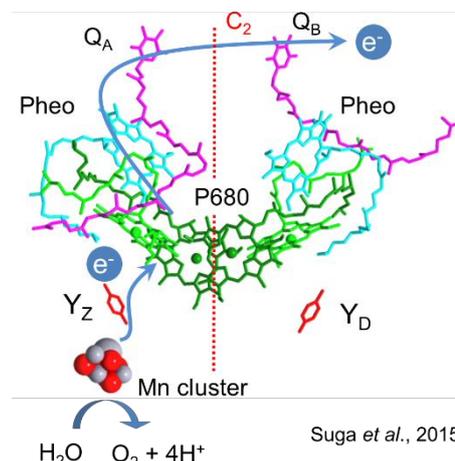


図1 光化学系 II の電子伝達鎖

構造を初期構造として、Mn クラスタおよびその周辺のアミノ酸および水分子、Cl イオンを量子力学計算(PBE 関数形および DZVP-MOLOPT-SR-GTH 基底系)により計算し、その他の原子を分子力学計算(AMBER99SB および GAFF 力場)を用いて計算した。QM/MM-MD 計算では、Mn クラスタの各 S 状態( $S_1$ ,  $S_2$ , および  $S_3$ )において、5 ps の平衡化の後、298K で 20 ps(0.5 fs/1 trajectory)間の計算を実行した。チロシン酸化型の計算( $S_2Y_Z^+$ )では、 $S_2$  の安定構造から 8.5 ps(0.5 fs/1 trajectory)の MD 計算を実行した。

### 【研究成果】

チロシン残基は、フェノール基を持ち、3 つの異なる酸化・プロトン化状態を持つため、それらに対応する 3 つのモデル( $p$ -cresol, および  $p$ -cresol<sup>-</sup>,  $p$ -cresol<sup>•</sup>)を用いた AIMD 計算を実行した。それぞれのモデルにおける水素結合構造を調べるため、フェノール基と水素結合距離にある

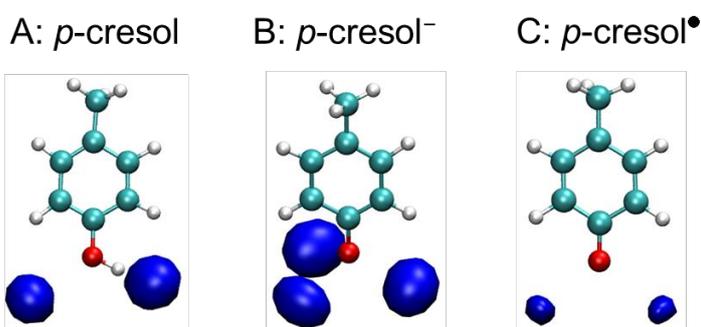


図 2 3 つのチロシンモデル(A;  $p$ -cresol, B;  $p$ -cresol<sup>-</sup>, and C;  $p$ -cresol<sup>•</sup>)の AIMD 計算における水分子の酸素原子の密度マップ

水分子の分布を確認した(図 2)。その分布では、脱プロトン化(アニオン)型のチロシン( $p$ -cresol<sup>-</sup>)は、3 つの水分子と水素結合を形成し、中性型( $p$ -cresol)および酸化型( $p$ -cresol<sup>•</sup>)では、2 つの水分子と水素結合を形成した。

それに対して、PSII のチロシン  $Y_Z$  の還元状態( $S_1$  および  $S_2$ ,  $S_3$ )では、3 つの水素結合(2 つの水分子およびイミダゾール基)を形成した。また、 $Y_Z$  の酸化状態( $S_2Y_Z^+$ )では、1 つの水分子との水素結合が切断された。チロシンモデルの結果(図 2)と比較すると、酸化型の  $Y_Z^•$  および  $p$ -cresol<sup>•</sup> は同じ水素結合数であったのに対し、還元状態では、 $Y_Z$  の還元

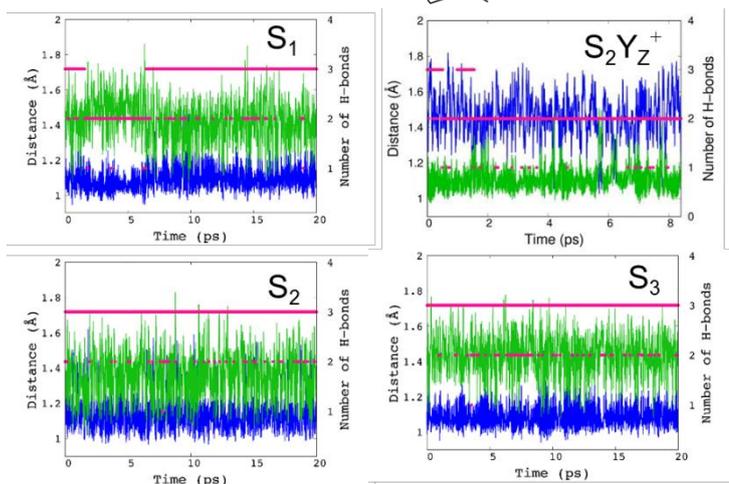
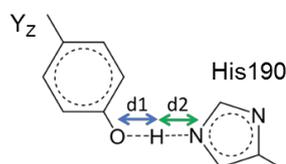


図 3 各中間状態( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_2Y_Z^+$  および  $S_3$ )における  $Y_Z$  の水素結合数(赤点)および O-H(青)・N-H(緑)距離

型は中性型の *p*-cresol の水素結合数より多くなった(図 3)。この違いを生む起源を解明する鍵は、 $Y_Z$ -His 間の水素結合距離にあると考え、 $Y_Z$  の水素結合数と  $Y_Z$  の水素結合距離をプロットした(図 3)。 $S_1$  状態では、水素結合 3 つの状態は、水素結合 2 つの状態より長い  $Y_Z$ -His 間の水素結合距離を持っていた。これは、 $Y_Z$  の水素結合数は  $Y_Z$ -His 間の水素結合の強さと強く相関していることを示す。このことから、中性型の *p*-cresol と還元型の  $Y_Z$  の水素結合数の違いの起源は、 $Y_Z$ -His 間の強い水素結合であると結論付けた。

PSII のチロシン  $Y_Z$  の QM/MM-MD 計算では、さらに、 $Y_Z$  の酸化に伴う Mn クラスタ周辺の水素結合ネットワークの再構築が示された(図 4)。 $Y_Z$  の酸化により  $Y_Z$ -W4 間の水素結合が切断され、 $W4 \rightarrow Wa \rightarrow Wb$  とつながる水素結合ネットワークが新たに形成された(図 4; 上)。X 線結晶構造解析では、このネットワークはタンパク質外へと続くことから、 $Y_Z$  の酸化還元反応が水分子の Mn クラスタへのアクセスを制御していることを示す。また、水素結合ネットワークの再構築は、 $Y_Z$  近傍だけでなく、 $Y_Z$  と直接相互作用していない Asp61 周辺の水素結合ネットワークにおいても観測された(図 4; 下)。

$Y_Z$  の水素結合特性および  $Y_Z$  の酸化に伴う構造変化から、水分解のプロトン放出に  $Y_Z$  が関与する新たなプロトン放出モデルを提唱した(図 5)。まず、 $Y_Z$  の酸化に伴い  $Y_Z$ -W4 間の水素結合が切断され、新たに W4 からタンパク質外へと続く水素結合ネットワークが形成される(図 5: 青矢印)。水素結合構造の再構築後、Mn クラスタの O5 のプロトンは近傍の Glu189 へと向く。その後、Mn クラスタから  $Y_Z$  への電子移動の際に、W4 からタンパク質外へとグロッタス機構に従うプロトン放出が起こり、同時に、O5 のプロトンは Glu189 を介して W4 へと移動し、 $Y_Z$  と新たに水素結合を形成する。このようなプロトン放

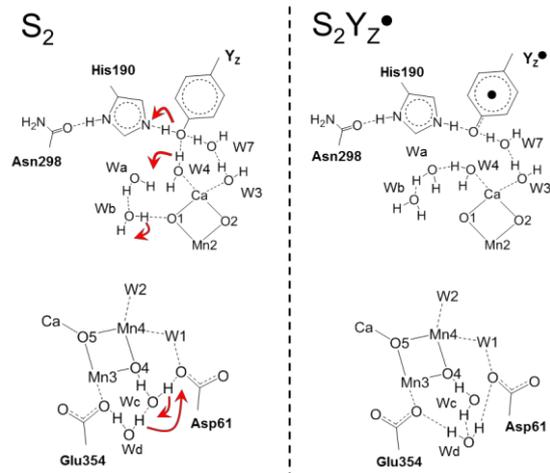


図 4  $Y_Z$  の酸化に伴う Mn クラスタ周辺の水素結合ネットワークの構造変化

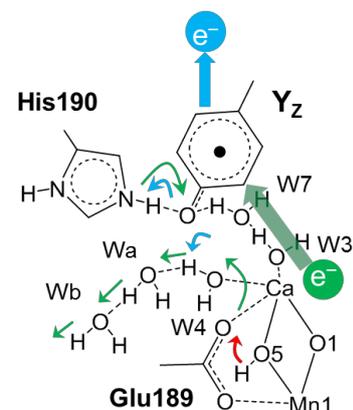


図 5  $Y_Z$  が関与するプロトン放出モデル

出は、O5 からのプロトン放出が示唆されている、 $S_0 \rightarrow S_1$  および  $S_3 \rightarrow S_0$  遷移において有効であると考えられる[4]。

1. Suga, M. et al., (2015) *Nature*, **517**, 99-103.
2. Saito, K., et al. (2015) *Nat Commun.* **6**, 8488.
3. Capone, M., et al. (2016) *J Phys Chem Lett.* **7**, 592-596.
4. Nakamura, S, et al. (2020) *Phys. Chem. Chem. Phys.* **22**, 273-285

#### 成果の発表および学会への参加状況

本研究における水溶液中のチロシン残基の水素結合特性については、ドイツで開催された国際会議”BUR meeting Photochemistry and Molecular Science”において、発表題目”Hydrogen-bonding properties of Tyrosine, Tyrosil and Tyrosine anion”として発表した(研究発表：2-1)。そして、チロシン  $Y_z$  の水素結合特性やその水分解における役割についての成果は、イタリアで開催された会議”XLVII National meeting of the Physical Chemistry Division of the Italian Chemistry Society”および国際会議”International Congress on Biophysics of Photosynthesis: from molecules to the field”において発表した(研究発表：2-2, 2-3)。以上の成果は 1 つの論文にまとめられ、学術雑誌である *Physical Chemistry Chemical Physic* 誌に掲載された(研究発表: 1-3)。