

# 蛋白質における電子・プロトン・エネルギー移動反応の

## 分子機構の理論解析

### Theoretical investigation of molecular mechanisms of electron, proton and energy transfer reactions in proteins

齊藤圭亮

東京大学 先端科学技術研究センター

#### 1. 研究目的

蛋白質におけるプロトン( $H^+$ )/電子/エネルギー移動反応はあらゆる生体反応において重要な役割を演じているが、その分子機構は不明であることが多い。本研究の目的は、計算機科学と生命分野との共同研究により蛋白質構造を用いた理論計算を行い、 $H^+$ /電子/エネルギー移動の機構を調べる手段を確立し、それを種々の蛋白質(光受容・物質輸送蛋白質等)に応用し生体内の反応機構の解明に役立てることである。

#### 2. 研究成果の内容

##### 2.1 光合成光化学系 II に関する研究

光化学系 II は植物などの光合成で水分解・酸素発生反応を触媒する蛋白質である。触媒部位には  $Mn_4CaO_5$  錯体がある。これに関する以下の成果を得た。

【成果 1】水分解・酸素発生反応に伴って放出される 4 つのプロトンのうち、2 つのプロトン放出経路に関わる重要なアミノ残基の変異体について解析することで、プロトン放出機構を特定した[4]。

【成果 2】水分解・酸素発生反応に伴って放出される 4 つのプロトンのうち、1 つのプロトン放出機構を水輸送膜蛋白質アクアポリンと比較した。その結果、光化学系 II では、蛋白質内部に結合している少数の水分子のゆらぎが他の水分子に比べて特異的に小さく、それらの水分子により高効率なプロトン輸送を可能にする経路が形成されているのに対し、アクアポリンでは蛋白質内水分子のゆらぎが大きく水輸送を実現していることがわかった[13](=図 1)。

【成果 3】光化学系 II で起こるプロトン共役電子移動過程について調べた。プロトン移動を促進すると指摘

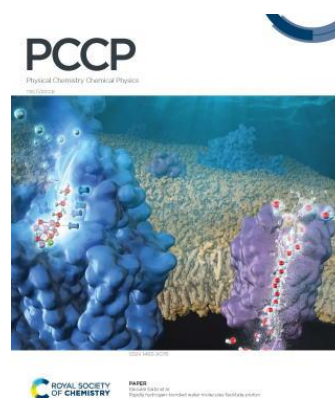


図 1. プロトン移動機構[13]

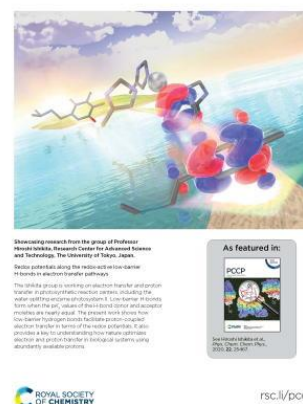


図 2. 低床壁水素結合とカププル下電子移動[8]

されている「低障壁水素結合」が、電子移動をも促進していることをはじめて示し、その機構も明らかにした[8] (=図 2).

【成果 4】植物などの光合成で光吸収を行っているクロロフィル *a* 色素について、蛋白質内で吸収エネルギーが変化する機構を明らかにした. その結果を用いて光化学系 II 反応中心にある低エネルギーの吸収帯を持つ特別なクロロフィル *a* を解析し、周囲の極性アミノ酸側鎖、水分子、塩化物イオンがその吸収帯を低エネルギーシフトさせていることを明らかにした[9].

【成果 5】 $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  錯体では、Ca が  $\text{H}_3\text{O}^+$  で置換された場合、電子移動能・プロトン放出能は維持されるが、 $\text{H}_2\text{O}$  で置換されるとそれらの機能が損なわれることを示した. また、Ca は(1)周辺の水素結合ネットワークの形状を保つ役割、(2)反応中のプロトン移動を促進する役割、(3)正常に電子移動するための電位を調整する役割、の 3 つを担っていることを明らかにした[11] (=図 3).

【成果 6】 $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  錯体の Mn に配位している水分子(W1, W2)と Ca に配位している水分子(W3, W4)の酸解離定数( $\text{pK}_a$ )を算出した. 蛋白質中では近くの酸性アミノ酸側鎖(D1-Asp61)により、W1 が特異的に脱プロトン化しやすいことを明らかにした[12].

【成果 7】光化学系 II の初期電荷分離過程を紅色光合成細菌のそれと比較した. PSII では中心クロロフィル二量体の静電的環境が特殊なため、中心クロロフィル二量体ではなくその隣の「アクセサリクロロフィル」から電荷分離が起こる機構を詳細に明らかにした[14].

【成果 8】 $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  錯体の「反応中間体」とされる  $\text{Mn}_4\text{CaO}_6$  錯体の結晶構造について理論解析を行った. その結果、中間体で新しく挿入された「O6」がラジカルでない限り O6 周辺の結晶構造距離は保たれないことがわかった[7] (=図 4). また、錯体の頂点に孤立して存在する「O4」の隣にヒドロキシラジカル( $\text{OH}^\bullet$ )が存在しないかぎり、O4 周辺の結晶構造距離は保たれないことがわかった[1].

## 2.2 光化学系 I に関する研究

【成果 9】植物や藻類の光合成で  $\text{CO}_2$  を還元するための還元力を固定する役割を持つ光化学系 I について、電荷分離反応の機構を解析し、中心で二量体を構成するク



図 3.  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  錯体における Ca の役割[11]

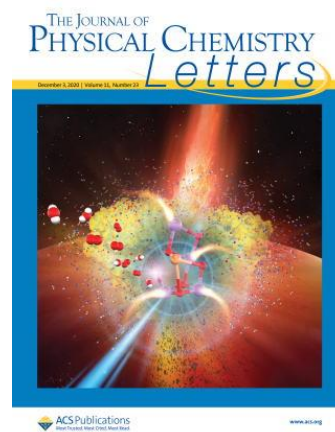


図 4.  $\text{Mn}_4\text{CaO}_6$  錯体の O6 の性質[7]

ロロフィルのひとつが立体異性化していることが、電子移動の方向を決めていることを明らかにした。これは光化学系 II と同様に紅色光合成細菌の反応中心とも異なる [2].

### 2.3 ロドプシンに関する研究

【成果 10】光遺伝学では実用上、チャネルロドプシンに含むチナール色素の吸収帯を赤色（長波長）側にシフトさせることが求められている。本研究では理論解析によりそれを実現するアミノ酸変異を予測し、その予測が正しいことを実際に実験で確かめた [5].

【成果 11】微生物型ロドプシンにおいて、吸収波長と分子機能の両方に重要な 3 つのアミノ酸残基がある。そのため、微生物型ロドプシンの吸収波長に、その分子機能（例えばセンサー、プロトン・Cl<sup>-</sup>ポンプ、カチオンポンプ・チャネル）が直接投影されることを示した [6].

【成果 12】ナトリウムポンプ機能を持つ KR2 ロドプシンについて、光反応サイクルにおけるプロトン移動反応の機構を明らかにし、プロトン移動が光化学系 II と同様の水分子クラスターによって制御されていることを見出した。また、ナトリウムイオンを結合する中間体構造において、2 つの結合サイトが合理的であることを示した [3].

## 3. 学際共同利用が果たした役割と意義

上記の成果は分子動力学シミュレーション (MD) をはじめとするすべて理論計算を主軸にするものである。MD では大規模な計算を、条件をいろいろと変えながら、複数回行う必要がある。今回、学際共同利用で十分な計算資源を割り当てていただいたので、それらの計算を効率的に実行することができた。これにより、短期間でこれらの研究成果を上げることにつながった。以上の理由により学際共同利用が果たした意義は非常に大きい。

## 4. 今後の展望

これまで、プロトン移動や電子移動に関する研究を進めてきた。当年度の研究成果では、それらに加えて、光吸収過程や、光誘起電荷分離過程など、光が関わる化学反応までその対象を広げ、理論解析する手法を確立し、成果を挙げた。今後はこれらの方法を組み合わせることで、さらに複雑な蛋白質内反応機構の全体像を解明し、蛋白質として機能を発揮する原理を明らかにすることに挑戦したい。

## 5. 成果発表

### (1) 学術論文

1. Manoj Mandal, Keisuke Saito, Hiroshi Ishikita, "Two distinct oxygen-radical

- conformations in the X-ray free electron laser structures of photosystem II”,  
*J. Phys. Chem. Lett.* **12** (2021) 4032-4037.
2. Koji Mitsuhashi, Hiroyuki Tamura, Keisuke Saito, Hiroshi Ishikita, “Nature of asymmetric electron transfer in the symmetric pathways of photosystem I”,  
*J. Phys. Chem. B* **125** (2021) 2879-2885.
  3. Masaki Tsujimura, Hiroshi Ishikita, “Identification of intermediate conformations in the photocycle of the light-driven sodium-pumping rhodopsin KR2”  
*J. Biol. Chem.* **296** (2021) 100459.
  4. Hiroshi Kuroda, Keisuke Kawashima, Kazuyo Ueda, Takuya Ikeda, Keisuke Saito, Ryo Ninomiya, Chisato Hida, Yuichiro Takahashi, Hiroshi Ishikita, “Proton transfer pathway from the oxygen-evolving complex in photosystem II substantiated by extensive mutagenesis”  
*Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* **1862** (2021) 148329.
  5. Masaki Tsujimura, Tomoyasu Noji, Keisuke Saito, Keiichi Kojima, Yuki Sudo, Hiroshi Ishikita, “Mechanism of absorption wavelength shifts in anion channelrhodopsin-1 mutants”  
*Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics)* **1862** (2021) 148349.
  6. Masaki Tsujimura, Hiroshi Ishikita, “Insights into the protein functions and absorption wavelengths of microbial rhodopsins”,  
*J. Phys. Chem. B* **124** (2020) 11819-11826.
  7. Manoj Mandal, Keisuke Saito, Hiroshi Ishikita, “The nature of the short oxygen-oxygen distance in the  $Mn_4CaO_6$  complex of the photosystem II crystals”  
*J. Phys. Chem. Lett.* **11** (2020) 10262-10268.
  8. Keisuke Saito, Manoj Mandal, Hiroshi Ishikita, “Redox potentials along the redox-active low-barrier H-bonds in electron transfer pathways”  
*Phys. Chem. Chem. Phys.* **22** (2020) 25467-25473.
  9. Keisuke Saito, Koji Mitsuhashi, Hiroshi Ishikita, “Dependence of the chlorophyll wavelength on the orientation of a charged group: why does the accessory chlorophyll have a low site energy in photosystem II?”  
*J. Photochem. Photobiol. A* **402** (2020) 112799.
  10. Keiichi Kojima, Natsuki Miyoshi, Atsushi Shibukawa, Srikanta Chowdhury, Masaki Tsujimura, Tomoyasu Noji, Hiroshi Ishikita, Akihiro Yamanaka, Yuki Sudo, “Green-sensitive, long-lived, step-functional anion channelrhodopsin-2 variant as a high-potential neural silencing tool”  
*J. Phys. Chem. Lett.* **11** (2020) 6214-6218.
  11. Keisuke Saito, Manoj Mandal, Hiroshi Ishikita, “Energetics of ionized water molecules in the H-bond network near the  $Ca^{2+}$  and  $Cl^-$  binding sites in photosystem II”  
*Biochemistry* **59** (2020) 3216-3224.
  12. Keisuke Saito, Minesato Nakagawa, Hiroshi Ishikita, “ $pK_a$  of the ligand water molecules in the oxygen-evolving  $Mn_4CaO_5$  cluster in photosystem II”  
*Commun. Chem.* **3** (2020) 89.
  13. Naoki Sakashita, Hiroshi Ishikita, Keisuke Saito, “Rigidly hydrogen-bonded water molecules facilitate proton transfer in photosystem II”  
*Phys. Chem. Chem. Phys.* **22** (2020) 15831-15841.

14. Hiroyuki Tamura, Keisuke Saito, Hiroshi Ishikita, “Acquirement of water-splitting ability and alteration of charge-separation mechanism in photosynthetic reaction centers”  
*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **117** (2020) 6373-6382.

(2) 学会発表

1. 三橋 孝司, 斉藤 圭亮, 石北 央「Effect of chlorophyll epimerization on the electron transfer in photosystem I reaction center」第 58 回日本生物物理学会年会(2020), 9/16-18, オンライン (学生発表賞受賞)
2. 辻村 真樹, 野地 智康, 小島 慧一, 須藤 雄気, 石北 央「Mechanism of absorption wavelength shifts in anion channelrhodopsin mutants」第 58 回日本生物物理学会年会(2020), 9/16-18, オンライン (学生発表賞受賞)
3. 西尾 俊哉, 斉藤 圭亮, 石北 央「Origin of exchange couplings of the Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> cluster in photosystem II」第 58 回日本生物物理学会年会(2020), 9/16-18, オンライン
4. 菅生 優「光合成反応中心におけるプロトン移動経路同定と機能解明」第 10 回日本生物物理学会関東支部会(2021), 3/2-3, オンライン
5. 西尾 俊哉, 斉藤 圭亮, 石北 央「水分解酸素発生触媒における S<sub>2</sub> 中間体の同定」第 10 回日本生物物理学会関東支部会(2021), 3/2-3, オンライン
6. 菅野 南花, 斉藤 圭亮, 石北 央「Fucoxanthin chlorophyll *a/c*-binding protein 中 chlorophyll *c* の光吸収エネルギーを決定する要因」第 10 回日本生物物理学会関東支部会(2021), 3/2-3, オンライン
7. 神田 知樹, 斉藤 圭亮, 石北 央「光化学系 I における鉄硫黄錯体を介した特異な電子移動機構」第 10 回日本生物物理学会関東支部会(2021), 3/2-3, オンライン
8. 辻村 真樹, 石北 央「光駆動ナトリウムポンプロドプシン KR2 における中間体構造の同定」第 10 回日本生物物理学会関東支部会(2021), 3/2-3, オンライン

(3) その他

なし.

使用計算機	使用計算機 に○	配分リソース*	
		当初配分	追加配分
Cygnus	○	27,000	
Oakforest-PACS	○	225,000	45,000
※配分リソースについてはノード時間積をご記入ください。			