

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26400429

研究課題名(和文) 光化学反応に於ける光照射ストレス下の電子伝達体ダイナミクスに関する理論的研究

研究課題名(英文) Theoretical study on dynamics of electron carriers in photosynthesis stressed by light irradiation

研究代表者

長尾 秀実 (Nagao, Hidemi)

金沢大学・数物科学系・教授

研究者番号：30291892

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：光化学反応における電子伝達体の会合解離過程と拡散過程を理論的に解析し次の主な結果を得た。(1)全原子分子動力学シミュレーションからプラストシアニンとシトクロムfの酸化還元反応に関わる自由エネルギープロファイルを算出した。プラストシアニンからシトクロムfへの電子移動のポテンシャル障壁はほとんどないと結論できた。(2)タンパク質間相互作用を取り入れた新しい粗視化モデルを提案した。粗視化モデル解析から両タンパク質の活性部位間距離と電子移動反応係数に正の相関を見出した。(3)光照射下の電子伝達体の拡散過程の解析からチラコイドルーメンの膜タンパク質による障害が反応活性増減の一つの要因となると示唆できた。

研究成果の概要(英文)：The association/dissociation process of the electron carriers in photosynthesis has been theoretically and numerically investigated in relation to the diffusion of the proteins. The following main results have been obtained in this study. (1) Free energy profile of plastocyanin, which is one of carriers to bring one electron to cytochrome f, has been calculated by all-atom molecular dynamics simulations. The result suggests that there is no potential barrier for the electron transfer. (2) A novel coarse-grained model describing intermolecular interactions has been proposed, and the results by simulations suggest the positive correlation between the distance between the active sites and the reaction coefficient of the electron transfer. (3) Some simulations for the diffusion of plastocyanin inside the thylakoid lumen suggest that the obstacle by membrane proteins in thylakoid membrane for the electron carrier contribute to the decrease of the activity of the electron transfer.

研究分野：生物物理学、理論化学

キーワード：光化学反応 電子伝達体 会合解離過程 プラストシアニン シトクロムf 拡散過程 光照射ストレス

### 1. 研究開始当初の背景

親水性であるプラストシアニン(PC)はチラコイド膜で覆われたチラコイドルーメン内の液中を拡散し、グラナチラコイド(GT)にあるシトクロム  $b_6/f$  複合体(Cyt  $b_6/f$ )からストロマチラコイド(ST)にある光化学系 I タンパク質複合体(PS I)まで電子を運搬する。

W. Haehnel 等の実験結果から、GT 中の Cyt  $b_6/f$  から ST 中の PS I までの平均距離は約 200nm である。PC の拡散が通常の溶液中の拡散と同程度であるとする(拡散係数が  $10^{-9} \text{m}^2/\text{s}$  程度)、Cyt  $b_6/f$  から PS I への平均移動時間は約 50ms となる。PC は Cyt  $b_6/f$  中のシトクロム  $f$  (Cyt  $f$ )と会合解離し還元され、PS I 中の P700 と会合解離し酸化され、これらの結合サイトの研究が盛んに進められてきた。

また Haehnel 等は PC は ST よりも GT の方に多く分布していることを示した。この実験事実は未だに論理的に説明がされていない。PC は負電荷を持ち、GT の表面電荷 ( $-0.037 \text{C}/\text{m}^2$ ) が ST の表面電荷 ( $-0.02 \text{C}/\text{m}^2$ ) よりも負になっているために PC が GT に存在すると静電エネルギー的に不安定になるということが従来から議論されている論理矛盾点となる。

さらに、光照射によりチラコイドルーメン(TL)の幅が約 15nm から 19nm に増大することが知られている。この幅増加の基本原理は未解決のままである。Haehnel 等は光照射により PC の移動距離が増加することを示唆している。

### 2. 研究の目的

光化学反応に於ける電子伝達体の会合・解離過程と拡散過程を解析・検証することを目的とする。

(1) 電子伝達体であるプラストシアニンの会合解離過程に対する自由エネルギー地形を分子動力学シミュレーションの実施と粗視化モデルによる考察により評価し、光化学系との酸化還元反応ダイナミクスを検討する。

(2) プラストシアニン及びプラストキノンが電子運搬する拡散過程を分子動力学シミュレーションの実施と粗視化モデルによる考察により解析し、実験結果を検証する。

(3) 過度の光照射により光化学反応が阻害される光照射ストレス環境では、チラコイド膜幅が増加することが観測されている。粗視化モデルによる考察により、光照射ストレス下の電子運搬ダイナミクスを検討する。

### 3. 研究の方法

水溶性であるプラストシアニン(PC)は 99 残基からなり、2 個の  $\alpha$  ヘリックス及び 8 個の  $\beta$  シートの二次構造を持つ(図 1 a)。活性部位には銅イオンがあり、ヒスチジン 37 と 87 の窒素及びシステイン 84 の硫黄と強く配位結合している。またメチオニン 92 の硫黄とも弱く配位結合しておりピラミッド構造を有している(図 1 b)。一方、シトクロム  $f$  (Cyt  $f$ )は膜中に埋もれている膜ドメインとルーメンサイドドメインに分けられる。膜ドメイン側は疎水性部位が多く膜貫通構造を

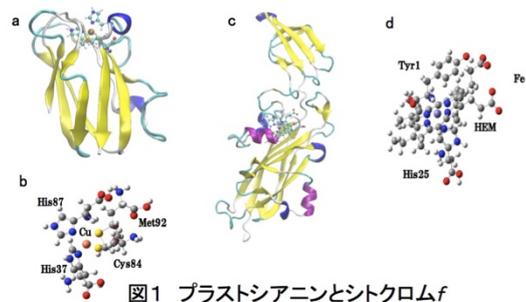


図1 プラストシアニンとシトクロム  $f$

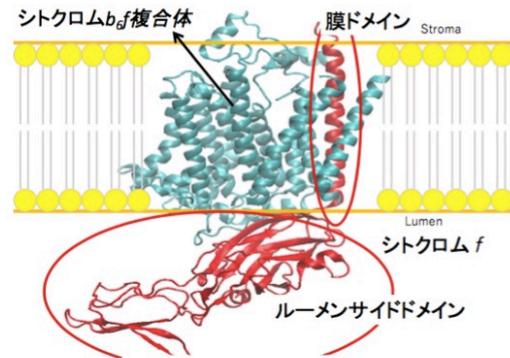


図2 シトクロム  $f$  のドメイン

取る(図 2)。一方ルーメンサイドドメインは親水性残基によりルーメン内に飛び出した配置を有する(図 2)。本研究では、Cyt  $f$  のルーメンサイドドメインに焦点を絞り、シトクロムルーメンサイドドメインと PC 間の会合及び解離過程をシミュレーションにより検証する。

Cyt  $f$  のルーメンサイドドメインは 250 残基からなり 6 個の  $\alpha$  ヘリックスと 17 個の  $\beta$  シートがある(図 1 c)。活性部位にはポルフィリン環がある(図 1 d)。なお、以降は Cyt  $f$  のルーメンサイドドメインのことを単に Cyt  $f$  と表記する。

Cyt  $f$  から PC への電子移動を考察するにあたり、電子移動反応前と反応後の二つのモデルを考える。すなわち、還元型 Cyt  $f$  と酸化型 PC からなる系を反応前に相当するモデル 1 とし、酸化型 Cyt  $f$  と還元型 PC からなる系を反応後に相当するモデル 2 とする。シミュレーションで用いた PC と Cyt  $f$  の構造は X 線構造解析で得られたものを使用した (PDB ID: 1TKW)。

#### (1) 全原子分子動力学シミュレーション

常温常圧時の上記のモデル 1 及び 2 に対する全原子分子動力学(MD)シミュレーションを実施した。自由エネルギープロファイルを MD シミュレーション結果と熱力学的積分法 [Kawaguchi et. al. 2013]により計算した。結果として PC と Cyt  $f$  の重心間距離に関する自由エネルギー地形が得られる[雑誌論文 ③③]。

MD シミュレーションに用いた力場は CHARMM27 を使い、活性部位金属イオン周りの力場は量子化学計算により決めた[雑誌論文 ③]。また MD シミュレーションプログラムは MODYLAS [Andoh et. al. 2013]を用いた。

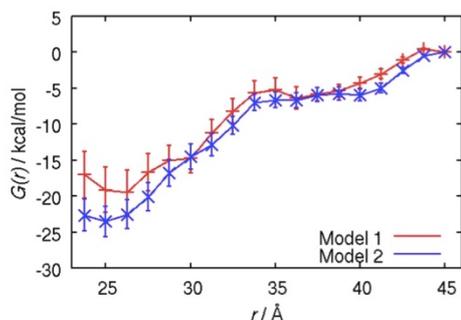


図3 反応前後の自由エネルギープロファイル

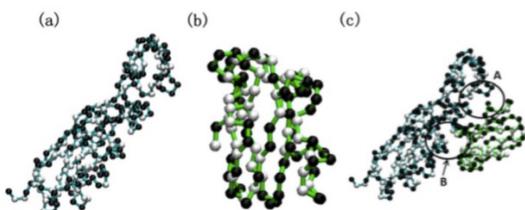


図4 シトクロム*f*とプラストシアニンの粗視化モデル

#### (2) 粗視化モデルシミュレーション

タンパク質の粗視化には Go-like モデルを用いた [Taketomi et. al. 1975]。Go-like モデルは、タンパク質の1残基を1粒子として表現した粗視化モデルであり、その粗視化した粒子間には有効タンパク質内相互作用を定式化している。タンパク質フォールディング過程の理論的研究等に使用されており、Go-like モデルはタンパク質を粗視化する場合に用いられる一般的なモデルである。

Go-like モデルはタンパク質間相互作用は定式化されていない。そこで Go-like モデルの粗視化レベルに対応するタンパク質間相互作用を定式化し、全原子分子動力学シミュレーションにより評価した。すなわち別のタンパク質の粗視化粒子間に働く有効相互作用を見積もった [雑誌論文⑤⑦⑭⑮]。

疎水性有効相互作用に分子混雑効果を含めた有効タンパク質間相互作用を記述した新しい粗視化モデル提案し、この粗視化モデルをランジュバン方程式を用いて解くことによりブラウニアンダイナミクスシミュレーションを実施した。結果として PC と Cyt *f* の会合解離過程を含む拡散現象が解析できる [雑誌論文⑥]。

#### 4. 研究成果

##### (1) プラストシアニンの会合解離過程に対する自由エネルギー地形

シトクロム *f* (Cyt *f*) からプラストシアニン (PC) への電子移動反応前後の状態 (モデル 1 と 2 に対応) に対する自由エネルギープロファイル [雑誌論文⑧⑬] を図 3 に示す。反応前の酸化型 Cyt *f* と還元型 PC の結合自由エネルギーは約 19.5 kcal/mol となった。一方、反応後の還元型 Cyt *f* と酸化型 PC の結合自由エネルギーは 23.9 kcal/mol となった。従って反応自由エネルギーは 4.4 kcal/mol と評価できた。また、反応前の状態では重心間距離が 35 Å 付近で約 1.8 kcal/mol のエネルギー障壁

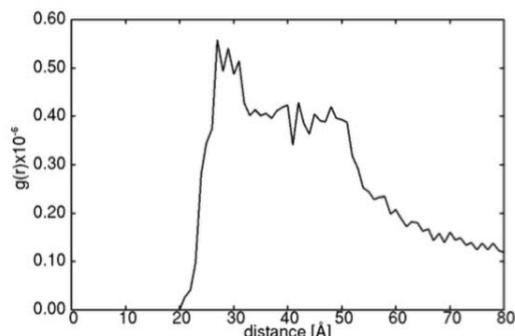


図5 重心間距離の動径分布関数

があることを見出した。反応前と後の自由エネルギー地形は交差していないため、酸化型 Cyt *f* と還元型 PC が接触すると反応は障壁なく早く起こるものと示唆できた [雑誌論文③]。また、自由エネルギー計算に深く関連する酸化還元電位計算に対する検討も行った [雑誌論文①⑨⑩⑪]。

##### (2) プラストシアニン及びプラストキノンの電子運搬する拡散過程

粗視化モデル [雑誌論文⑤⑦⑭⑮] を用いてプラストシアニン (PC) とシトクロム *f* (Cyt *f*) の混合系の拡散現象を解析した。粗視化モデルで表した PC と Cyt *f* の構造をそれぞれ図 4 (a) と (b) に示す。白丸と黒丸はそれぞれ疎水性残基と他残基を示す。図 4 (c) は X 線構造解析で得られた PC と Cyt *f* の複合体構造を示す。

重心間距離に対する動径分布関数を図 5 に示す。27 Å にピークを持っている。このことは PC と Cyt *f* の拡散に構造を持っていることを示している。X 線構造解析では PC と Cyt *f* の複合体構造時の重心間距離は 26.1 Å である。また動径分布関数から重心間距離が離れた場合にも分布があることが分かった。このことは PC と Cyt *f* の複合体構造は弱く、会合解離を繰り返していることが示唆できる [雑誌論文⑥]。

溶脂性であるプラストキノンの (PQ) に関する拡散現象は脂質膜内部であるため、PQ の拡散係数も含め脂質分子や膜タンパク質等との相互作用が複雑である [雑誌論文②④⑫]。定量的な解析をするためには、粗視化レベルも含め再度考察を要する。これらの検証から膜タンパク質の拡散現象という新しい研究ソースへの展開が可能であるとの結論に至った。

##### (3) 光照射ストレス下の電子運搬ダイナミクス

粗視化モデルを用いたブラウニアンダイナミクスは電子移動反応を記述できる。プラストシアニン (PC) とシトクロム *f* (Cyt *f*) の有効タンパク質間相互作用を有する混合系の拡散現象では、会合解離過程を繰り返すことが分かった。このダイナミクスから電子移動反応係数が評価できる。

PC と Cyt *f* の活性部位に含まれる金属イオン間距離をパラメータと取り、単位時間当たりその金属イオン間距離パラメータよりも

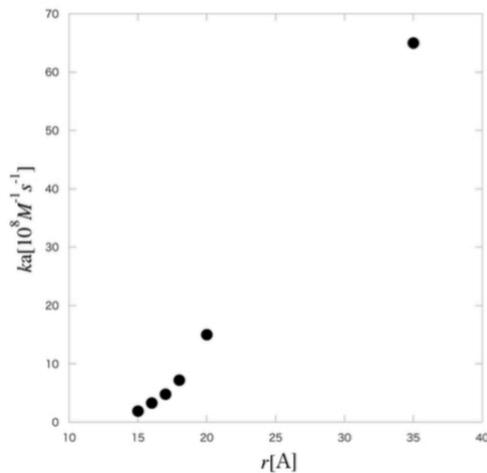


図6 金属イオン間距離パラメータに対する反応係数

短くなった場合の数をカウントする。単位時間当たりの総数に対する割合から反応係数が見積もれる。金属イオン間距離パラメータと反応係数の関係を図6に示す。金属イオン間距離パラメータが大きくなると反応係数も大きくなることが分かる。

実験結果から Cyt *f* から PC への電子移動反応係数は約  $10^8 M^{-1} s^{-1}$  と見積もられている。実験結果を再現するためには金属イオン間距離パラメータが最大で 18 Å であることが示唆される。PC と Cyt *f* の複合体結晶時での金属イオン間距離は約 14 Å であることから複合体構造から少し離れた距離にまで近づかないと反応が進まないことが理解できる[雑誌論文⑥]。

光照射によりチラコイドルーメン(TL)の幅が増大し、PCの移動距離が増加することについての検証では、グラナチラコイド(GT)にはシトクロム *b<sub>6</sub>f* 複合体(Cyt *b<sub>6</sub>/f*)の他に光化学系 II タンパク質複合体(PS II)がある。この PS II は TL 内部に大きく張り出しており PC の拡散を減少させる。光照射により TL 幅が増大すると PC の拡散が増大することが示された[学会発表⑤]。

#### (4)まとめ

本研究で検討した上記の主な研究成果(1)、(2)及び(3)の結果から、植物の光合成に深く関わる電子伝達体であるプラストシアニンに関するいくつかの考察ができた。

植物の葉緑体細胞膜中には主要な膜タンパク質複合体が三つあり、そのタンパク質複合体間の電子伝達を担うタンパク質の拡散は光合成を行う上でもキーとなっている。シミュレーションによる解析により、プラストシアニンの電子受け取りに関する反応では、電子を与えるシトクロム *f* との会合過程は非常に弱いことを検証できた。この結果はプラストシアニンとシトクロム *f* 複合体の結晶化が陽ではなかったことと一致する。

光照射ストレス下の電子運搬ダイナミクスは未だ理解できない部分が多い。光照射に

よる光合成活性の低下や、強光照射による光化学系タンパク質複合体の損傷、損傷タンパク質の修復機構などが挙げられる。これらの現象はチラコイドルーメン幅の増大がキープポイントとなる。すなわちチラコイドルーメン幅の増大に伴う膜タンパク質の流動性の問題に起因すると思われる。

光合成の真の理解は、光化学反応の理解を深めるだけでなく人工光合成系に向けた新規な人工膜生成設計指針を与える可能性を秘め、理学的にも工学的にも意義深い。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計15件)

- ① Isman Kurniawan, Kazutomo Kawaguchi, Mitsuo Shoji, Toru Matsui, Yasuteru Shigeta, Hidemi Nagao, A Theoretical Study on Redox Potential and pKa of [2Fe-2S] Cluster Model from Iron-Sulfur Proteins, 査読有, *The Bulletin of the Chemical Society of Japan*, in press.
- ② Hiroyuki Nakao, Chihiro Hayashi, Keisuke Ikeda, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, Minoru Nakano, Effect of Hydrophilic Residues and Hydrophobic Length on Flip-Flop Promotion by Transmembrane Peptides, 査読有, *The Journal of Physical Chemistry B*, in press.
- ③ Isman Kurniawan, Takahiro Matsui, Satoshi Nakagawa, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao, Theoretical studies on association/dissociation process of plastocyanin and cytochrome *f* in photosynthesis, 査読有, *Journal of Physics: Conference Series*, in press.
- ④ Hiroaki Saito, Tetsuya Morishita, Taku Mizukami, Ken-ichi Nishiyama, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao, Molecular dynamics study of binary POPC bilayers: molecular condensing effects on membrane structure and dynamics, 査読有, *Journal of Physics: Conference Series*, in press.
- ⑤ Kazutomo Kawaguchi, Satoshi Nakagawa, Isman Kurniawan, Koichi Kodama, Muhammad Saleh Arwansyah, Hidemi Nagao, A coarse-grained model of the effective interaction for charged amino acid residues and its application to formation of GCN4-pLI tetramer, 査読有, *Molecular Physics*, in press.
- ⑥ Satoshi Nakagawa, Isman Kurniawan, Koichi Kodama, Muhammad Saleh Arwansyah, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao, Theoretical study on

- interaction of cytochrome f and plastocyanin complex by a simple coarse-grained model with molecular crowding effect, 査読有, *Molecular Physics*, in press.
- ⑦ Kazutomo Kawaguchi, Satoshi Nakagawa, Shogo Kinoshita, Makoto Wada, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, A simple coarse-grained model for interacting protein complex, 査読有, *Molecular Physics*, **115** (2017) 587-597, 10.1080/00268976.2016.1234652
- ⑧ Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, Decomposition analysis of free energy profile for Hsp90-ADP association, 査読有, *Molecular Simulation*, **42** (2016) 896-901. 10.1080/08927022.2015.1102249
- ⑨ Masashi Iwayama, Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, A hybrid type approach with MD and DFT calculations for evaluation of redox potential of molecules, 査読有, *Molecular Simulation* **41** (2015) 936-941.
- ⑩ Takeshi Miyakawa, Ryota Morikawa, Masako Takasu, Kimikazu Sugimori, Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, Analysis of water molecules around GTP in Hras-GTP complex and GDP in Hras-GDP complex by molecular dynamics simulations, 査読有, *Molecular Physics* **112** (2014) 526-532.
- ⑪ Takeshi Miyakawa, Ryota Morikawa, Masako Takasu, Kimikazu Sugimori, Tomokazu Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, Network of water molecules around guanine nucleotide in the Hras-GTP and -GDP complexes by MD simulations, 査読有, *JPS Conference Proceedings*, 016006 (2014).
- ⑫ Hiroaki Saito, Masashi Iwayama, Kazutomo Kawaguchi, Taku Mizukami, Takeshi Miyakawa, Masako Takasu, Hidemi Nagao, Molecular Dynamics Study of Gramicidin A in Lipid Bilayer: Electrostatic Map and Ion Conduction, 査読有, *JPS Conference Proceedings*, 012053 (2014).
- ⑬ Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, Molecular Dynamics Study of Hsp90 and ADP: Hydrogen Bond Analysis for ADP Dissociation, 査読有, *JPS Conference Proceedings*, 012056 (2014).
- ⑭ Micke Rusmerryani, Masako Takasu, Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao, Protein-protein interactions of Azurin complex in liquid system, 査読有, *JPS Conference Proceedings*, 012054 (2014).
- ⑮ Muhamad Koymatu, Hideto Shimahara, Kimikazu Sugimori, Kazutomo Kawaguchi, Hiroaki Saito, Hidemi Nagao,  $\pi$ -stacking Interaction between Heterocyclic Rings in a Reaction Field of Biological System, 査読有, *JPS Conference Proceedings*, 012055 (2014).
- [学会発表] (計 57 件)
- ① K. Kawaguchi, S. Nakagawa, I. Kurniawan, K. Kodama, M. Wada, H. Nagao, Theoretical study of a coarse grained model of electrostatic interaction between protein molecules, The 57th Sanibel Symposium, Feb. 19-24, 2017, St. Simons Island, USA.
- ② S. Nakagawa, S. Kinoshita, K. Kawaguchi, H. Nagao, Theoretical study on intermolecular interaction and structural stability of plastocyanin and cytochrom f complex by using Go-like model” (Poster) The 57th Sanibel Symposium, Feb. 19-24, 2017, St. Simons Island, USA.
- ③ Isman Kurniawan, Koichi Kodama, Makoto Wadal, Satoshi Nakagawa, Kimikazu Sugimori, Kazutomo Kawaguchi, Takeshi Sakurai, Hidemi Nagao, Theoretical Study on Contribution of Long-Range Interaction to Electronic Structure of Type I Copper Center in Multicopper Oxidase, 第 31 回分子シミュレーション討論会, 2017 年 11 月 29 日～12 月 2 日, 金沢
- ④ Saleh Arwansyah Muhammad, Kurniawan Isman, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao, The Free Energy Profile for Dissociation of Ligand from  $Zn^{2+}$  Ion of CA I Activesite, 第 31 回分子シミュレーション討論会, 2017 年 11 月 29 日～12 月 2 日, 金沢
- ⑤ 和田慎、高木晶平、中川聖、川口一朋、長尾秀実, Langevin 動力学を用いたチラコイドルーメン内腔のプラストシアニンの拡散現象に関する理論的研究, 第 31 回分子シミュレーション討論, 2017 年 11 月 29 日～12 月 2 日, 金沢
- ⑥ Arwansyah Muhammad Saleh, Isman Kurniawan, Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao, The Free Energy Profile for Dissociation of Ligand from  $Zn^{2+}$  Ion of CA I Activesite, 第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月 19 日 - 21 日 熊本
- ⑦ Hidemi Nagao, Satoshi Nakagawa, Isman Kurniawan, Koichi Kodama, Muhammad Arwansyah, Kazutomo Kawaguchi, Theoretical studies on dynamics of

electron carriers in photosynthesis,  
第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9  
月 19 日 - 21 日 熊本

- ⑧ Tetsu Matsuura, Shohei Takagi,  
Kazutomo Kawaguchi, Hidemi Nagao,  
Theoretical study on the structural  
stability of vesicle consisting of  
mixed lipids by coarse-grained model,  
第 55 回日本生物物理学会年会 2017 年 9  
月 19 日 - 21 日 熊本
- ⑨ K. Kawaguchi, S. Nakagawa, H. Nagao,  
Development of a coarse-grained model  
for charged amino acid residues 第 55  
回日本生物物理学会年会 2017 年 9 月 17  
日 - 19 日 熊本
- ⑩ Satoshi Nakagawa, Kazutomo Kawaguchi,  
Isman Kurniawan, Arwansyah Saleh,  
Koichi Kodama, Hidemi Nagao,  
Theoretical Studies on Dynamics of  
Electron Carriers in Photosynthesis by  
a Coarse-grained Model, 19th  
International Union for Pure and  
Applied Biophysics Congress, 11<sup>th</sup>  
European Biophysics Congress, July  
16<sup>th</sup>-20<sup>th</sup>, 2017, Edinburgh, UK
- ⑪ Satoshi Nakagawa, Kazutomo Kawaguchi,  
Isman Kurniawan, Arwansyah Saleh,  
Koichi Kodama, Hidemi Nagao,  
Theoretical Studies on Stability and  
Dynamics of Protein by a Coarse-  
grained Model, XXIX IUPAP Conference  
on Computational Physics, CCP2017,  
July 9<sup>th</sup>-13<sup>th</sup>, 2017, Paris, France

[図書] (計 0 件)

なし

[産業財産権]

なし

○出願状況 (計 0 件)

なし

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://hal.s.kanazawa-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

長尾 秀実 (NAGA0, Hidemi)

金沢大学・理工研究域数物科学系・教授

研究者番号：3 0 2 9 1 8 9 2

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

齋藤 大明 (SAITO, Hiroaki)

金沢大学・理工研究域数物科学系・助教

研究者番号：4 0 5 0 6 8 2 0

川口 一朋 (KAWAGUCHI, Kazutomo)

金沢大学・理工研究域数物科学系・助教

研究者番号：9 0 4 0 2 4 2 9

### (4) 研究協力者

中川 聖 (NAKAGAWA, Satoshi)

Isman Kurniawan

Arwansyah Saleh

兒玉 浩一 (KODAMA, Koichi)