

令和 5 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18H01186

研究課題名(和文)水素結合ネットワーク構造に基づく蛋白質内プロトン移動の予測

研究課題名(英文)prediction of proton transfer in proteins based on hydrogen-bond network structures

研究代表者

斉藤 圭亮 (Saito, Keisuke)

東京大学・先端科学技術研究センター・准教授

研究者番号：20514516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：プロトン移動現象を蛋白質の構造的観点から簡便に予測する手法を確立することをめざし、プロトン移動の分子機構と水素結合ネットワークを含む蛋白質構造との関係を明らかにした。例えば、植物等の光合成において水分解・酸素発生反応を触媒する光化学系IIでは、蛋白質内部に結合している少数の水分子の構造ゆらぎが特異的に小さく、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。一方、水輸送チャネルであるアクアポリンでは蛋白質内水分子の水素結合が弱く、水分子の構造ゆらぎが大きい。そのためプロトン移動に適した水素結合ネットワーク構造を維持できないので、プロトン移動が起らない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

プロトン移動は生物におけるエネルギー代謝において重要であり、材料分野でも例えば燃料電池の新規電解質の電気伝導機構として注目されている。プロトン移動の移動度は他のイオンの移動に比べて一桁大きい。この理由はプロトンリレー移動(Grotthuss)機構にある。本研究は、このプロトンリレー移動機構の実現には、水分子が作るプロトン移動経路の水素結合ネットワーク構造が重要であることを初めて示し、効率的なプロトン移動経路の設計指針を具現化した。これが学術的意義である。これにより生物におけるエネルギー代謝の理解や、高い電気伝導性を持つ新規電解質の開発に役立つことが期待される。これが社会的意義である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to elucidate the relationship between proton transfer mechanisms and protein structures involving H-bond networks in order to establish a method to predict proton transfer phenomena in proteins from a structural perspective. In photosystem II, which catalyzes the water-splitting and oxygen-evolving reactions in photosynthesis, the structural fluctuations of certain water molecules bound to the protein are sufficiently small, and the water molecules form a pathway that enables efficient proton transfer. In contrast, in aquaporins, which are water transport channel proteins, H-bonds between the water molecules and the protein are weak, resulting in large structural fluctuations of the water molecules. Consequently, aquaporins cannot maintain the H-bond network structure suitable for efficient proton transfer, resulting in the absence of the proton transfer ability.

研究分野：生物物理学理論

キーワード：水素結合 子力学法 プロトン移動 蛋白質構造 光合成 水分子 アクアポリン 分子動力学シミュレーション 量子力学/分子力学

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

プロトン移動は生物におけるエネルギー代謝において重要であるばかりでなく、材料分野でも例えば燃料電池の新規電解質の電気伝導機構として着目されている。プロトン移動の特徴として、その移動度が他のイオンの移動に比べて桁大きいことが知られている。この理由はプロトンリレー移動機構 [いわゆる Grotthuss 機構] にあると考えられている (図 1): 溶液中でプロトン以外のイオンが移動する場合、そのイオンそのものが実際に移動する必要があるのに対して、プロトンの場合はプロトンそのものが移動する必要はない。複数の水分子で作る水素結合ネットワークが組み替わることで実際にプロトンが移動しなくても、玉突き衝突のように、見かけ上プロトン移動ができるからである。

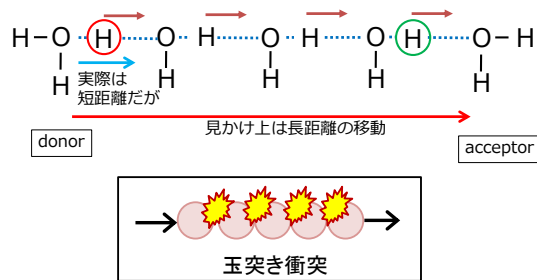


図 1 Grotthuss 機構によるプロトン移動

プロトン移動は蛋白質内でも水分子などの水素結合上で起こる。近年の蛋白質構造解析技術の発展により、プロトン移動が重要な働きを担う多くの蛋白質の立体構造が明らかになっている。しかし、蛋白質中のどこの水素結合上でプロトン移動が起こるのか、見ただけでは分からない。蛋白質の立体構造に基づく量子化学的理論解析により予測できるが、量子化学計算には時間がかかるという欠点がある。

2. 研究の目的

蛋白質内プロトン移動においては、分子構造の中でもとりわけ水分子の水素結合ネットワーク形状が重要な働きをしていると考えられる。そこで本研究では、プロトン移動現象を、量子化学計算だけに頼るのではなく、蛋白質の構造的観点から簡便に予測する手法を確立することをめざし、プロトン移動の分子機構と水素結合ネットワークを含む蛋白質構造との関係を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

実際にプロトン移動が起こる蛋白質の例として、植物や藻類の光合成において水を分解し酸素を発生する反応を触媒する蛋白質である光化学系 II に着目した。また、プロトン移動が起こらない蛋白質の例として、水輸送タンパク質であるアクアポリンに着目した。蛋白質の結晶構造に基づく量子化学計算 [quantum mechanical/molecular mechanical (QM/MM) 法] を利用し水素結合内のプロトンの位置に対するポテンシャルエネルギーのプロファイルを描画し、プロトン移動可能性を判断した。光化学系 II とアクアポリンのポテンシャルエネルギーのプロファイルと水素結合ネットワーク構造を比較することで、プロトン移動が起こりうる水素結合ネットワーク構造の条件を明らかにした。

他にもプロトン移動が起こる蛋白質の例として紅色光合成細菌反応中心とロドプシンを、プロトン移動が起こらない蛋白質の例として、アクアポリンによく似た構造をしているケイ酸輸送チャネル蛋白質を解析対象とした。

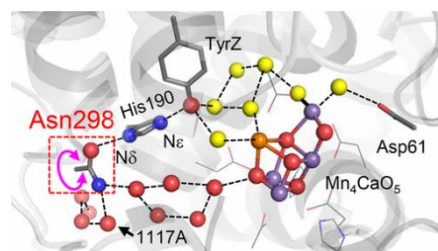


図 2 光化学系 II における TyrZ 周辺の水素結合ネットワーク

4. 研究成果

(1) 光化学系 II 蛋白質では、光誘起電子移動反応が起こり、それにより触媒部位が活性化される。その電子移動を仲介しているアミノ酸であるチロシン Z (TyrZ) の隣にはヒスチジン (His190) とアスパラギン (Asn298) が存在し、水素結合を形成しているが (図 2)、その役割は不明であった。量子科学計算によってその役割を調べたところ、TyrZ と His の水素結合にあるプロトンの位置によって His がラジカル化する可能性があること、また Asp の側鎖の向きによって His のプロトン化状態が変化し、His のラジカル化の可否を制御していることを明らかにした [Biochemistry 57 (2018) 4997]。

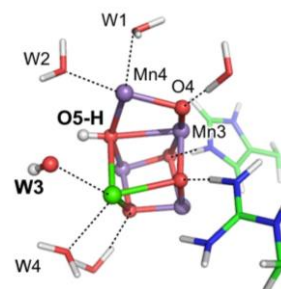


図 3 Mn₄CaO₅ 錯体の過還元状態の構造

(2) 光化学系 II 蛋白質では Mn₄CaO₅ 錯体が水分解反応 (2H₂O → O₂ + 4H⁺ + 4e⁻) を触媒している。この反応は Mn₄CaO₅ 錯体の酸化状態の変化 (S₀→S₁→S₂→S₃→S₄→S₀) に伴って進行する。X 線結晶構造解析

では、X線照射による還元を受けている可能性があるため、量子化学/分子力学法により過還元状態の Mn_4CaO_5 錯体の構造を調べた。その結果、過還元状態ではCaに配位した水分子W3が向きを変え、水素結合を通じてW3のプロトンはO5に移動しうることがわかった(図3) [Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics) 1860 (2019) 148059].

(3) 光化学系IIの Mn_4CaO_5 錯体からの電子移動について調べた。具体的には量子化学/分子力学法により軌道エネルギーを計算し、そこから酸化還元電位を算出した。その結果、 Mn_4CaO_5 錯体の $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移における酸化還元電位(730 mV)は $S_1 \rightarrow S_2$ 遷移における酸化還元電位(826 mV)よりも低いことがわかった。この違いは酸素発生反応に伴って最初に放出されるO4のプロトン放出経路が使われた前か後かで水素結合ネットワーク構造が変化することに起因する(図4) [J. Phys. Chem. Lett. 11 (2020) 249].

(4) 光化学系IIにおいて酸素発生反応に伴って最初に放出される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。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構造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ことがわかった。一方、アクアポリンでは水分子の水素結合が弱く、水分子の構造ゆらぎがあるので、プロトン移動に適した水素結合ネットワーク構造を維持できないために、プロトン移動が起こらない(図5) [Phys. Chem. Chem. Phys. 22 (2020) 15831].

(5) 光化学系IIにおいて酸素発生反応に伴って2,3番目に放出される2つのプロトンの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し、プロトン放出機構を特定した。プロトン放出に特に重要なアミノ酸残基はD1-Asp61とD1-Glu65/D2-Glu312ペアであり、それらをつなぐ水分子の水素結合ネットワークによりプロトン移動が起こることが明らかになった(図6) [Biochim. Biophys. Acta (Bioenergetics) 1862 (2021) 148329].

(6) 光化学系IIのキノン分子間で起こるプロトン共役電子移動と触媒部位 Mn_4CaO_5 錯体から酸化還元活性を持つチロシン残基(TyrZ)への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(図7) [Phys. Chem. Chem. Phys. 22 (2020) 25467].

(7) 光化学系II触媒部位の Mn_4CaO_5 錯体を構成するCa原子が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 [Biochemistry 59 (2020) 3216].

(8) 触媒部位の錯 Mn_4CaO_5 体を構成するMn原子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(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、すなわちプロトン移動を起こしやすいことを明らかにした [Commun. Chem. 3 (2020) 89].

(9) 紅色光合成細菌反応中心のキノンの放出に伴うプロトン移動の機構とその経路を解明した(図8) [Proc. Natl. Acad. Sci.

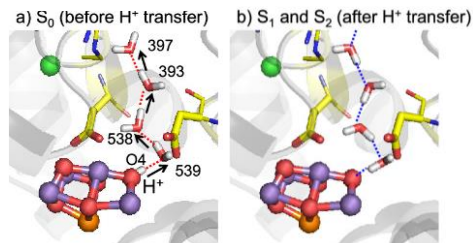


図4 O4のプロトン放出経路の水素結合ネットワーク構造の違い

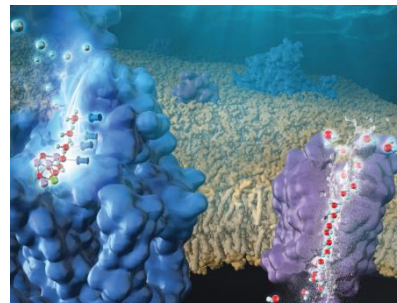


図5 光化学系II(左)とアクアポリンの水チャネルの性質の違い

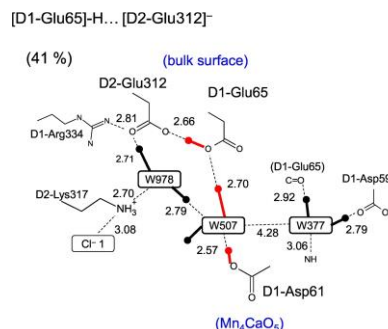


図6 D1-Asp61とD1-Glu65/D2-Glu312ペアによるプロトン移動経路

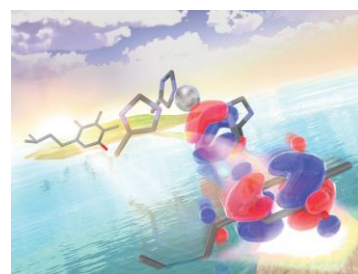


図7 キノン分子間で起こるプロトン共役電子移動過程のイメージ図

(2) PT to Q_B^-

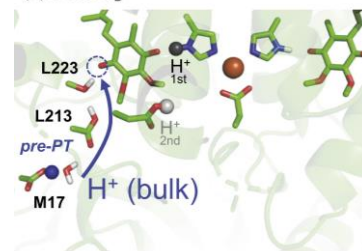


図8 紅色光合成細菌反応中心におけるキノンの放出に伴うプロトン移動の経路

U. S. A. 118].

(10) 光化学系 II の非アクティブな電子移動経路上に存在する酸化還元活性をもつチロシン残基(TyrD)の酸化還元に伴い、低障壁水素結合が形成されることを明らかにした (図 9) [ACS Phys. Chem Au 2 (2022) 423].

(11) 植物の光化学系 II に特異的にみられる表在性蛋白質の変異体では、変異アミノ酸周辺の水素結合ネットワークが変化するために酸素発生反応に影響を与えることを明らかにした (図 10) [PNAS Nexus 1 (2022) pgac136].

(12) ロドプシンにおいて色素が形成する低障壁水素結合で起こるプロトン移動により、色素の吸収波長が変化する機構を明らかにした [iScience 25 (2022) 104247].

(13) ヘリオロドプシンではプロトン移動に誘起されて構造変化が起こることを明らかにし、その分子機構を解析した [Commun. Biol. 5 (2022) 1336].

(14) イネに存在するケイ酸輸送蛋白質における輸送機構と水素結合ネットワークとの関係を明らかにした [Sci. Adv. 8 (2022) eabj2667]

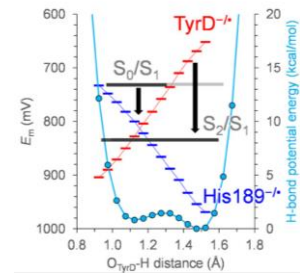


図 9 TyrD の酸化還元電位と低障壁水素結合ポテンシャル

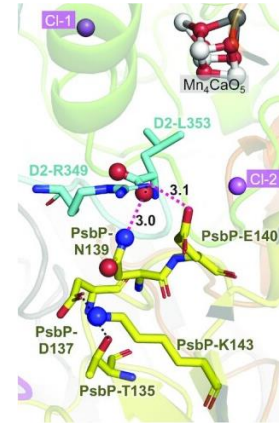


図 10 表在性蛋白質の変位アミノ酸 (PsbP-N139) 周囲の水素結合ネットワーク

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計38件（うち査読付論文 38件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 32件）

1. 著者名 Tamura Hiroyuki, Saito Keisuke, Nishio Shunya, Ishikita Hiroshi	4. 巻 127
2. 論文標題 Electron-Transfer Route in the Early Oxidation States of the Mn ₄ CaO ₅ Cluster in Photosystem II	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 205 ~ 211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcc.2c08246	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Tsujiura Masaki, Chiba Yoshihiro, Saito Keisuke, Ishikita Hiroshi	4. 巻 5
2. 論文標題 Proton transfer and conformational changes along the hydrogen bond network in heliorhodopsin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42003-022-04311-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Imaizumi Ko, Nishimura Taishi, Nagao Ryo, Saito Keisuke, Nakano Takeshi, Ishikita Hiroshi, Noguchi Takumi, Ifuku Kentaro	4. 巻 1
2. 論文標題 D139N mutation of PsbP enhances the oxygen-evolving activity of photosystem II through stabilized binding of a chloride ion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgac136
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgac136	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Sugo Yu, Saito Keisuke, Ishikita Hiroshi	4. 巻 61
2. 論文標題 Conformational Changes and H-Bond Rearrangements during Quinone Release in Photosystem II	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1836 ~ 1843
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.2c00324	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mandal Manoj, Saito Keisuke, Ishikita Hiroshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Release of a Proton and Formation of a Low-Barrier Hydrogen Bond between Tyrosine D and D2-His189 in Photosystem II	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ACS Physical Chemistry Au	6. 最初と最後の頁 423 ~ 429
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acspchemau.2c00019	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tsujimura Masaki, Tamura Hiroyuki, Saito Keisuke, Ishikita Hiroshi	4. 巻 25
2. 論文標題 Absorption wavelength along chromophore low-barrier hydrogen bonds	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 iScience	6. 最初と最後の頁 104247 ~ 104247
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.isci.2022.104247	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saitoh Yasunori, Mitani-Ueno Namiki, Saito Keisuke, Matsuki Kengo, Huang Sheng, Yang Lingli, Yamaji Naoki, Ishikita Hiroshi, Shen Jian-Ren, Ma Jian Feng, Suga Michihiro	4. 巻 12
2. 論文標題 Structural basis for high selectivity of a rice silicon channel Lsi1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 6236
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-021-26535-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sugo Yu, Saito Keisuke, Ishikita Hiroshi	4. 巻 118
2. 論文標題 Mechanism of the formation of proton transfer pathways in photosynthetic reaction centers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2103203118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2103203118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kuroda Hiroshi, Kawashima Keisuke, Ueda Kazuyo, Ikeda Takuya, Saito Keisuke, Ninomiya Ryo, Hida Chisato, Takahashi Yuichiro, Ishikita Hiroshi	4. 巻 1862
2. 論文標題 Proton transfer pathway from the oxygen-evolving complex in photosystem II substantiated by extensive mutagenesis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148329 ~ 148329
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2020.148329	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Keisuke, Mandal Manoj, Ishikita Hiroshi	4. 巻 22
2. 論文標題 Redox potentials along the redox-active low-barrier H-bonds in electron transfer pathways	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 25467 ~ 25473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D0CP04265J	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Keisuke, Mandal Manoj, Ishikita Hiroshi	4. 巻 59
2. 論文標題 Energetics of Ionized Water Molecules in the H-Bond Network near the Ca ²⁺ and Cl ⁻ Binding Sites in Photosystem II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 3216 ~ 3224
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.0c00177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Keisuke, Nakagawa Minesato, Ishikita Hiroshi	4. 巻 3
2. 論文標題 pKa of the ligand water molecules in the oxygen-evolving Mn ₄ CaO ₅ cluster in photosystem II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Communications Chemistry	6. 最初と最後の頁 89
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s42004-020-00336-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sakashita Naoki、Ishikita Hiroshi、Saito Keisuke	4. 巻 22
2. 論文標題 Rigidly hydrogen-bonded water molecules facilitate proton transfer in photosystem II	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Chemistry Chemical Physics	6. 最初と最後の頁 15831 ~ 15841
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cp00295j	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Mandal Manoj、Kawashima Keisuke、Saito Keisuke、Ishikita Hiroshi	4. 巻 11
2. 論文標題 Redox Potential of the Oxygen-Evolving Complex in the Electron Transfer Cascade of Photosystem II	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 249 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.9b02831	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Keisuke、Ishikita Hiroshi	4. 巻 1860
2. 論文標題 Mechanism of protonation of the over-reduced Mn4CaO5 cluster in photosystem II	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148059 ~ 148059
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2019.148059	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kawashima Keisuke、Saito Keisuke、Ishikita Hiroshi	4. 巻 57
2. 論文標題 Mechanism of Radical Formation in the H-Bond Network of D1-Asn298 in Photosystem II	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochemistry	6. 最初と最後の頁 4997 ~ 5004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.biochem.8b00574	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 斉藤 圭亮
2. 発表標題 Molecular mechanisms of light-harvesting and electron-transfer reactions in photosystem II
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Regulation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 斉藤圭亮
2. 発表標題 蛋白質構造に基づく理論化学で光合成のしくみを理解する
3. 学会等名 令和元年第一回高圧力蛋白質研究センターセミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Keisuke Saito
2. 発表標題 Mechanism of proton, electron and energy transfers in photosynthetic proteins
3. 学会等名 光合成日米二国間セミナー (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斉藤 圭亮
2. 発表標題 光合成蛋白質におけるエネルギー変換と情報伝達の分子機構
3. 学会等名 蛋白研セミナー：生体分子内情報伝達機構の 新展開 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 斉藤 圭亮
2. 発表標題 光合成蛋白質における分子内電子・プロトン・エネルギー移動
3. 学会等名 蛋白質科学会（招待講演）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関