

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 基盤研究 (C)
 研究期間： 2010 ~ 2012
 課題番号： 22550010
 研究課題名 (和文) マンガンイオンを活性中心に含む金属酵素の触媒機構に関する理論的研究
 研究課題名 (英文) Theoretical Study on Catalytic Mechanism of Metalloenzyme including Manganese Ions at Active Site
 研究代表者
 吉岡 泰規 (YOSHIOKA YASUNORI)
 三重大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号： 00291451

研究成果の概要 (和文) : マンガンイオンを触媒活性中心に含む金属酵素の一つに、水 2 分子の酸素 1 分子への 4 電子酸化を触媒する酵素の中に酸素発生複合体(OEC)がある。OEC は葉緑体の中にあり光合成の一部を担っている。OEC による触媒機構はまったく解明されておらず、実験と理論の両面から精力的に研究がなされている。我々は理論化学計算から、Kok サイクルとして提案されている五つの酸化状態である S_0 , S_1 , S_2 , S_3 , S_4 の各状態の分子構造と電子状態を決定し、触媒機構を提案した。これによって、次世代のエネルギー源である酸素と水素を水分子から生成する装置開発へと繋がっていくことが期待される。

研究成果の概要 (英文) : Oxygen-Evolving Complex (OEC), which is one of metalloenzymes including manganese ions at active site, catalyzes four-electron oxidation of two water molecules to give oxygen. The catalytic mechanism of OEC is unclear and has been investigated intensively based on theoretical and experimental viewpoints. We have determined the molecular and electronic structures of five oxidative states, S_0 , S_1 , S_2 , S_3 , and S_4 proposed as Kok cycle using theoretical study. We have also proposed the catalytic mechanism. It is expected that our results will be basis to develop a new unit producing oxygen and hydrogen as next-generation energy.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2011 年度	700,000	210,000	910,000
2012 年度	400,000	120,000	520,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：生物物理科学

1. 研究開始当初の背景

光合成植物が二酸化炭素を吸って酸素分子を吐き出すことはよく知られており、太古、還元型であった大気を酸化型に変えた。光合成系は機能ごとに分かれた多くの系から成り立っているが、その一つである光化学系 II

の中にある酸素発生複合体(OEC)は、4 電子酸化によって水 2 分子から酸素分子を生成する反応を触媒する機能を有している。OEC の活性中心は四つのマンガン原子からなる Mn クラスターである。OEC は自然界において水分子を酸化する唯一の触媒であり、生成さ

れる酸素・水素分子は次世代のエネルギー源となることから注目されている。4回の照射によって活性中心が酸化され、 S_0 , S_1 , S_2 , S_3 , S_4 の五つの酸化状態を経る Kok サイクルが提案されているものの、その反応機構は未だに解明されていないのが現状である。

反応機構解析には、分子構造すなわち酵素の反応活性中心の構造を知ることが必要不可欠である。その構造を決める最も強力な方法はX線構造解析である。2004年に3.5 Å 続いて2005年に3.0 Å と解像度が改良されてきた。3.5 Å は London 構造、3.0 Å は Berlin 構造と呼ばれている。London 構造の活性中心は CaMn_4O_4 の Mn クラスターであり、一つの Mn 原子がダングリング結合で6面体につながっている。Berlin 構造では、 CaMn_4O_4 の Mn クラスター周囲のアミノ酸が確認された。

一方、分光実験から Mn 間の距離が評価され、さらに四つの Mn 原子の酸化数が提案されていた。三つの 2.7 Å と一つの 3.3 Å Mn 間距離があることがわかり、それに基づいて CaMn_4O_4 の構造が提案されていたが、London 構造および Berlin 構造とは異なっていた。 CaMn_4O_4 コアから Tyr Z (Tyr161) を介して P680 への電子移動によって、 CaMn_4O_4 コアが酸化されることはすでに解明されていた。一方、プロトンの活性中心外への移動では Asp61 を経て抜けていくとされていた。London と Berlin 構造では、周囲の水分子が解像されていないため Asp61 への水素結合ネットワークがなく、プロトン移動経路が確認できない状況である。このために、実験面から多くの反応機構の提案があるものの、決定的な結論には至っていなかった。

理論的研究では、London と Berlin 構造を基にして検討されていた。London と Berlin 構造は共に水分子が解像されていないために、水分子を CaMn_4O_4 コアに任意に付加したモデルが組み立てられ、電子状態と反応機構の検討がなされていた。しかし、検討に用いられたモデルは研究者によって異なり、その結果、種々の異なる反応機構が提案されている状況であった。

このような背景を踏まえ、我々は触媒機構の解明を行うことにした。本研究課題以前に我々は $[\text{L}_n\text{MnO}_2\text{MnL}_m]$ の Mn 2核系で電子状態の研究を行っており、さらに、London 構造を基に触媒機構の解明に着手していた。しかしながら、2011年5月に解像度 1.9 Å のX線構造が発表された。その解像度の高さによる信頼性と CaMn_4O_5 コアに配位している水分子が解像されていることから、我々は London 構造に基づく研究を停止し、1.9 Å のX線構造を基に反応モデルを組み立て、研究を再開した。

2. 研究の目的

本研究は、OEC のよる水分子の4電子酸化機構を理論化学計算から全解明するのが目的である。目的達成への戦略は、まず、Kok サイクルで提案されている五つの酸化状態、 S_0 , S_1 , S_2 , S_3 , S_4 の活性中心の構造と CaMn_4O_4 コアの電子状態を決定し、続いて、各酸化状態間の変化、すなわち、プロトン移動の経路を明らかにすることである。この研究課題では、次の不明な点を明確にする。

- ① CaMn_4O_5 コアの四つの Mn 原子のうちどの Mn 原子が活性サイトであるかを決定する。
- ② 配位している水分子のうちどの水分子が酸化されるのか、すなわち、substrate はどの水分子であるかを決定する。
- ③ EXAFS および EPR 測定から S_0 状態の四つの Mn 原子の酸化数は、 $\text{Mn}_4(\text{II}, \text{III}, \text{IV}, \text{IV})$ または $\text{Mn}_4(\text{III}, \text{III}, \text{III}, \text{IV})$ であると言われている。理論化学計算からどちらの酸化状態が正しいかを明らかにし、反応の出発点である S_0 状態を明確に決定する。
- ④ S_1 状態は $\text{Mn}_4(\text{III}, \text{III}, \text{IV}, \text{IV})$ であると言われているが、 $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移においてどの Mn 原子が酸化されるのかを決定する。さらに、どの水分子からプロトンが移動し OH^- が生成されるのかを明らかにする。
- ⑤ S_2 状態は $\text{Mn}_4(\text{III}, \text{IV}, \text{IV}, \text{IV})$ であると言われているが、 $S_1 \rightarrow S_2$ 遷移においてどの Mn 原子が酸化されるのかを決定する。
- ⑥ S_3 状態に対しては、実験サイドから Mn 原子が酸化されて $\text{Mn}_4(\text{IV}, \text{IV}, \text{IV}, \text{IV})$ であるという説と、 $\text{Mn}-\text{OH}$ の OH^- が酸化されて $\text{Mn}(\text{IV})-\text{O}^-$ が形成されるという説に大きく分かれ、現在論争がなされている。我々は S_3 状態の構造を決定し、電子状態を明らかにすることによって、どちらの説が正しいかを明らかにする。
- ⑦ S_4 状態は不安定であり、分光測定で捕らえることができず、その構造は不明であり多くの提案がなされている。 $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ 遷移では、酸素・酸素間の結合が生じる過程であり、 S_4 状態は酸素分子形成への key となる。我々は S_4 状態の分子構造と電子状態を決定する。
- ⑧ 各酸化状態間の遷移における電子移動とプロトン移動をともなった中間体を決定し、OEC の触媒機構の全容を解明する。

3. 研究の方法

1.9 Å のX線構造を基に、 CaMn_4O_5 コアに配位するアミノ酸、Asp170, Glu189, His332, Glu333, His337, Asp342, Ala344, Glu354, Arg357 を CaMn_4O_5 コアに加えて反応モデルとした。さらに、プロトンの受容体である Asp61、電子移動の出口である Tyr161 とそれに水素結合する His190, Tyr161 に平行な分子面を有する Gln165 を加えた。さらに、1.9 Å で解像されている九つの水分子を加えて反応モデルを構築した。五つの酸化状態に対して

CaMn₄O₅ コアと九つの水分子を構造最適化した。

遷移金属系では開殻系の縮退した電子間の相関が重要であり、電子相関効果を含まない Hartree-Fock 法ではなく、静的な電子相関を含む密度汎関数法(DFT)を用いる。2核以上の多核系では、各原子上に電子スピンの局在しており、低スピン状態に対しては Broken Symmetry(BS)法を用いる。現在、金属酵素のような多原子系では、DFT-BS 法が簡便で timely に目的とする電子状態および反応機構の評価を可能にする。しかしながら、BS 法では高スピン状態の混入があり、 $\langle S^2 \rangle$ 値が純粋なく S^2 値とならない欠点がある。このためにエネルギー評価等 DFT-BS 法では定性的にならざるを得ないが、定量性を増すにはスピン混入を取り除いたエネルギー評価が求められる。DFT-BS 法から得られる自然軌道を用いて、スピン混入を除いた密度行列を書き下すことは容易である。

全電子理論に基づく酵素機能の解析例は非常に少なく、本申請で取りあげた酵素の触媒機構はまだまだ決着がついていない。鍵鍵穴形式すなわち分子構造のみに基づく議論ではなく、第一原理に基づく理論的研究は酵素内での電子移動またはプロトン移動を電子論から解明できることを可能し大きなインパクトを与える。これらの研究成果は、酵素をモデルとした触媒設計やナノマシンなどの設計に重要かつ基礎的な知見となり得る。

4. 研究成果

1.9 Å X線構造を基にした反応活性サイトのモデルの概略図を図1に示す。

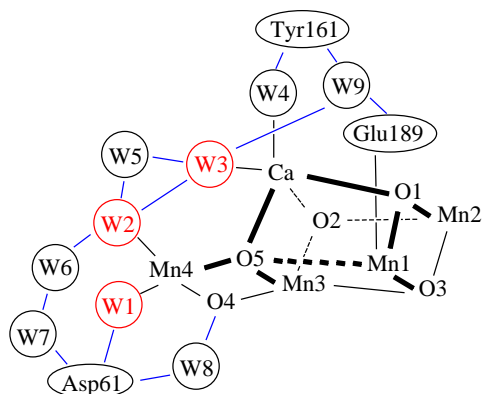


図1. 反応活性サイトの概略図

水分子である W1 と W2 が Mn4 に、W3 と W4 が Ca に配位しており、Mn4 から Asp61 に向かって、Mn4-W2-W6-W7-Asp61 と Mn4-W1-Asp61 の二つの水素結合ネットワークが確認できる。W3 もまた W2 と水素結合を形成している。このことから、我々は W1, W2, W3 が反応活性の可能性があると判断して各酸化状態の検

討をした。

S_0 状態のスピン状態が $S=1/2$ であることを考慮して検討したが、Mn₄(Mn1(III), Mn2(III), Mn3(IV), Mn4(III)) (1) と Mn₄(Mn1(III), Mn2(IV), Mn3(IV), Mn4(II)) (4) の二通りの電子状態を得た。4 は 1 よりも 12.5 kcal/mol 高エネルギー状態であり、 S_0 状態は 1 であることが判った。実験サイドから Mn の価数は Mn₄(III, III, III, IV) と Mn₄(II, III, III, IV) が提案されていたが、我々の検討から S_0 状態は Mn₄(II, III, III, IV) ではなく Mn₄(III, III, III, IV) であり、IV 価の Mn 原子は Mn3 であると結論付けた。

図2は周囲の水分子を含めた CaMn₄O₅ クラスターの最適化された構造を示している。1 と 4 では明らかに水素結合のパターンが異なっている。1 では W5→W3→W2 であり、4 では W3→W5→W2 である。さらに CaMn₄O₅ コアにおいて、1 は Mn3-(O4, O5)-Mn4 が菱形構造をとっているが、4 は菱形がくずれ Mn4-O5 の距離が 2.253 Å と、 S_1 状態を想定した 1.9 Å の X線構造に近くなっている。これらの結果から、1.9 Å の X線構造は還元状態が混入していると推察した。さらに、CaMn₄O₅ コアの構造と周囲の水分子の水素結合のパターン様式が各酸化状態を検討する上で重要な因子であると結論づけた。

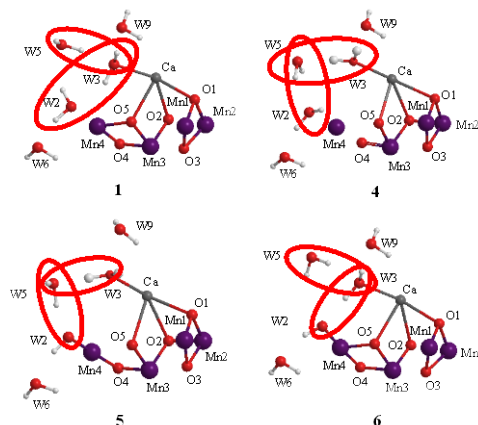


図2. CaMn₄O₅ クラスターの最適化構造

$S_0 \rightarrow S_1$ 遷移では、プロトンと電子が反応系外に放出される。我々は W1, W2, W3 が反応活性な水分子であると想定していることから、それぞれの水分子からプロトンを取り除いた。W2 からプロトンを取り除いた S_1 状態には、Mn₄(Mn1(III), Mn2(IV), Mn3(IV), Mn4(III)) (5) と Mn₄(Mn1(III), Mn2(III), Mn3(IV), Mn4(IV)) (6) の二通りの電子状態を得られた。6 は 5 よりも 15.8 kcal/mol 高エネルギー状態である。すなわち、 $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移において、5 では Mn3 が、6 では Mn4 が酸化されている。W1 からプロトンが抜けた状態は 5 よりも 21.9 kcal/mol 高エネルギー状態である。さらに、W3 からプロトンが抜けた状

態は安定ではなく、構造最適化によって **5** に収束した。これらの結果から、反応活性の水分子は W1 と W3 ではなく W2 であると結論づけた。

図 2 より **5** の水分子の水素結合は W3→W5→W2 であり、S₀ 状態で高エネルギーであった **4** と同じである。高エネルギー状態である **6** の水素結合パターンは S₀ 状態で最安定な **1** と同じである。すなわち、S₀→S₁ 遷移では CaMn₄O₅ コアの構造変化とともに水素結合パターンが入れ替わるという興味深い事実が判った。また Mn4-O5 の距離は 2.067 Å と 1.9 Å の X線構造で言われている距離よりは若干短くなっている。

S₂ 状態は S₁ 状態から電子が失われた状態であり、Mn₄(Mn1(III), Mn2(IV), Mn3(IV), Mn4(IV)) の電子状態が得られ、Mn4 が酸化されて **5** から連続して得られることを確認した。

以上の結果をまとめ論文①、③、⑤に発表した。

S₂→S₃ 遷移では、プロトンと電子が反応系外に放出される。我々が論文③で予想した通り Mn(IV)-O⁻ となる構造が得られた。現在問題になっている、Mn 原子が酸化されるのかそれとも substrate が酸化されるのかの議論に対して、Mn 原子の酸化ではなく Mn4(IV)-OH⁻→Mn(IV)-O⁻ のように substrate の酸化であること示し、問題を解決した。

S₂→S₃ 遷移では、プロトンと電子が反応系外に放出されるとして検討を行った。その結果、Ca に配位する W3 からのプロトン移動でないことが判った。

以上の結果は、現在、論文にすべくまとめている状況である。

本研究課題において、実験では判明していなかった個々の Mn 原子の価数を S₀, S₁, S₂, S₃ 状態に対して決定した。S₀ では Mn₄(Mn1(III), Mn2(III), Mn3(IV), Mn4(III))、S₁ では Mn₄(Mn1(III), Mn2(IV), Mn3(IV), Mn4(III))、S₂ では Mn₄(Mn1(III), Mn2(IV), Mn3(IV), Mn4(IV))、S₃ では Mn₄(Mn1(III), Mn2(IV), Mn3(IV), Mn4(IV)) である。さらに、反応活性な水分子は Mn4 に配位する W2 であることが解明された。反応の各状態を追跡することによって、CaMn₄O₅ コアの構造と周囲の水分子の水素結合のパターン様式が重要であることを見出した。

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 8 件)

- ① T. Ichino and Y. Yoshioka, Theoretical Study on the Mechanism of Dioxygen Evolution in Photosystem II. I. Molecular and Electronic Structures at the S₀, S₁, and S₂ States of

Oxygen-Evolving Complex, *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **86**, 479-491 (2013). DOI:10.1246/bcsj.20120223. 査読有.

- ② K. Yamaguchi, S. Yamanaka, H. Isobe, T. Saito, K. Kanda, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, H. Nakamura, M. Shoji and Y. Yoshioka, “The Nature of chemical bonds of the CaMn₄O₅ cluster in oxygen evolving complex of photosystem II. Jahn-Teller distortion and its suppression by Ca doping in cubane structures”, *Internat. J. Quantum Chem.* **113**, 453-473 (2013). DOI:10.1002/qua.24280. 査読有.
- ③ T. Ichino and Y. Yoshioka, “Which oxidation state is preferable at S₀ state in oxygen-evolving complex, Mn₄(II, III, IV, IV) or Mn₄(III, III, III, IV) ? A B3LYP study”, *Chem. Phys. Lett.* **545**, 107-111 (2012). DOI:10.1016/j.cplett.2012.07.029. 査読有.
- ④ M. Katsuda, E. Hishikawa, M. Mitani and Y. Yoshioka, “A B3LYP Study on Electronic structures of [(X)_mMn(μ-oxo)₂Mn(Y)_n]^{q+} (X, Y = H₂O, OH and O) as a Mn cluster model of OEC”, *J. Biophys. Chem.*, **3**, 111-126 (2012), DOI:10.4236/jbpc.2011. 査読有.
- ⑤ T. Ichino, K. Yamaguchi and Y. Yoshioka, “Effectiveness of optimizing geometry for CaMn₄O₅ cluster at 1.9 Å resolved OEC and proposal for oxidation mechanism from S₀ to S₃ states”, *Chem. Lett.*, **41**, 18-20 (2012), DOI:10.1246/cl.2012.18. 査読有.
- ⑥ T. Saito, S. Yamanaka, K. Kanda, H. Isobe, Y. Takano, Y. Shigeta, Y. Umeda, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, M. Shoji, Y. Yoshioka and K. Yamaguchi, “Possible Mechanisms of Water Splitting Reaction Based on Proton and Electron Release Pathway Revealed for CaMn₄O₅ Cluster of PSII Refined to 1.9 Å X-Ray Resolution”, *Internat. J. Quantum. Chem.*, **112**, 253-276 (2012), DOI:10.1002/qua23218. 査読有.
- ⑦ Y. Yoshioka and M. Mitani, “B3LYP Study on Reduction Mechanisms from O₂ to H₂O at the Active Site of Fully Reduced and Mixed-Valence Bovine Cytochrome *c* Oxidases”, *Bioinorg. Chem. Appl.* Volume **2010**, Article ID 182804, 18 pages, doi:10.1155/2010/182804 (2010). 査読有.
- ⑧ M. Katsuda, E. Hishikawa, M. Mitani and Y. Yoshioka, “Theoretical study of electronic structures of [(H₂O)₃(O)-Mn(μ-oxo)₂Mn(OH₂)₄]^{q+} (q = 2 or 3) with Mn-O bond”, *Phys. Chem. Chem. Phys.*, **12**, 2730-2739 (2010). 査読有.

[学会発表] (計 10 件)

- ① 市野智也, 三谷昌輝, 吉岡泰規, “OEC の S_2 から S_3 状態遷移での一電子酸化およびプロトン移動に関する理論的研究”, 日本化学会第 93 春季年会, 1PA-092, 2013 年 3 月 22-25 日, 立命館大学びわこ・くさつキャンパス, 草津.
- ② T. Ichino M. Mitani, Y. Yoshioka, “Theoretical study on mechanism of water oxidation from S_0 to S_3 states catalyzed by OEC”, International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU, EP-29, November 1 and 2, 2012, Mie University, Tsu, Japan.
- ③ 市野智也, 三谷昌輝, 吉岡泰規, “OEC による S_0 から S_4 状態までの水分子酸化機構に関する理論的研究”, 第 6 回分子科学討論会 2012 東京, 4P097, 2012 年 9 月 18-21 日, 東京大学本郷キャンパス, 東京.
- ④ 市野智也, 三谷昌輝, 吉岡泰規, “OEC による S_0 から S_3 状態までの水分子酸化機構に関する理論的研究”, 日本化学会第 92 春季年会, 3A4-36, 2012 年 3 月 25-28 日, 慶應義塾大学日吉キャンパス, 横浜.
- ⑤ T. Ichino, Y. Yoshioka, “Theoretical Study on Electronic Structures at S_0 and S_1 States of the OEC in Photosystem II”, International Symposium for Sustainability by Engineering at MIU, EP-05, December 1 and 2, 2011, Mie University, Tsu, Japan.
- ⑥ 市野智也, 吉岡泰規, “OEC の高解像度 X 線構造における CaMn_4O_5 クラスターの電子状態に対する構造最適化の効果”, 分子科学討論会 2011 札幌, 1P086, 2011 年 9 月 20-23 日, 札幌コンベンションセンター, 札幌.
- ⑦ K. Kanda, S. Yamanaka, T. Saito, Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, Y. Yoshioka, K. Yamaguchi, “Development of Broken Symmetry Methods-Application to the CaMn_4O_5 Cluster at OEC of PSII Refined to 1.9 Å X-Ray Resolution-”, 7-th Congress of the International Society for Theoretical Chemical Physics (ISTCP-VII), September 2-8, 2011, Waseda University, Tokyo, Japan.
- ⑧ Y. Yoshioka, T. Ichino, and M. Mitani, “Theoretical Study on Intermediates from S_0 to S_1 States of OEC in Photosystem II”, Ninth Triennial Congress of the World Association of Theoretical and Computational Chemist (WATOC 2011), PI-070, July 17-22, 2011, University of Santiago, Santiago de Compostela, Spin.

- ⑨ 市野智也, 三谷昌輝, 吉岡泰規, “ S_0 から S_1 状態への遷移に対する OEC の反応活性部位と電子状態に関する理論化学計算”, 日本化学会第 91 春季年会, 2PC-181, 2011 年 3 月 26-29 日, 神奈川大学横浜キャンパス, 横浜.
- ⑩ 市野智也, 三谷昌輝, 吉岡泰規, “ S_0 および S_1 状態にある OEC の反応活性部位の構造と電子状態に関する理論化学計算”, 分子科学討論会 2010, 2P123, 2010 年 9 月 14-17 日, 大阪大学豊中キャンパス, 豊中.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 泰規 (YOSHIOKA YASUNORI)

三重大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号： 00291451