

平成 30 年 6 月 1 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2017

課題番号：26800224

研究課題名(和文) 構造に基づく理論的手法による光合成蛋白質におけるプロトン移動機構の解明

研究課題名(英文) Theoretical study on mechanism of proton transfer in photosynthetic proteins based on protein 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・講師

研究者番号：20514516

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高等植物・藻類が行っている酸素発生型の光合成では、光化学系II (PSII) 蛋白質が光エネルギーを使って水分子を分解し、1つの酸素分子と4つのプロトンが発生する。この水分解反応の機構を量子化学的計算によって明らかにした。4段階からなる水分解反応において、第一段階で1つのプロトンがPSIIの活性部位(Mn4CaO5錯体) 近くの水分子鎖を通して排出される。第三段階では、別のプロトンが錯体付近に存在するアスパラギン側鎖(D1-Asp61)を経由して排出される。第四段階から第一段階に戻るときに残りのプロトンが排出される。

研究成果の概要(英文)：In photosynthesis of higher plants and algae, the photosystem II (PSII) protein catalyzes a water-splitting reaction where two water molecules are split into one oxygen molecule and four protons by using light energy. We clarified the reaction mechanism of the water-splitting reaction by using quantum chemical calculations. The reaction is composed of four steps. In the first step, one proton is transferred through a water chain near the active site (the Mn4CaO5 cluster) of PSII. In the third step, other proton is transferred via the asparagine side chain (D1-Asp61) located at the vicinity of the Mn4CaO5 cluster. The remaining protons are released when turning over from the fourth step to the first step.

研究分野：生物物理学理論

キーワード：光合成 プロトン移動 水分解 量子化学 分子動力学 水素結合 酸解離定数 蛋白質

### 1. 研究開始当初の背景

光合成は地球上のあらゆる生命のエネルギー源であり根源的な光エネルギー変換過程である。高等植物・藻類が行っている酸素発生型の光合成では、その第一段階として、光エネルギーを使って水が分解され酸素が発生する。この水分解反応を触媒しているのが光化学系 II (PSII) と呼ばれる蛋白質・色素複合体である。水分解反応は、蛋白質内の活性部位(Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> 錯体) において2つの水分子から4回にわたってプロトンが引き抜かれて起こる(図1)。したがって、4回のプロトン移動こそがこの反応の本質であるが、Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> 錯体内のどこで、いつ、どのようにプロトン移動が起こるのか、また引き抜かれたプロトンはどのようにして外へ排出されるのか、その分子機構の詳細は謎に包まれていた。そのような背景の中、2011年に、Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> 錯体の詳細な分子構造を含む、高解像度(1.9 Å)のX線結晶構造が発表された。この構造には、水分解のからくりが隠されていると考えられ、構造情報を有効に利用して水分解の機構を解明することが待望されていた。

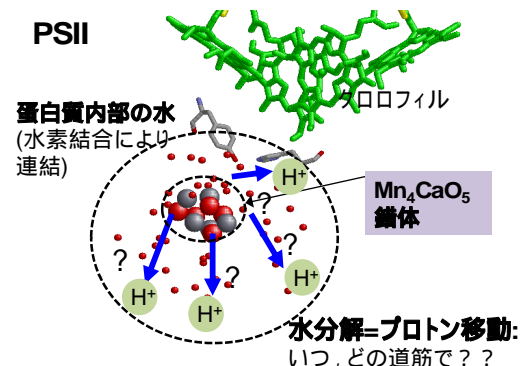


図1 PSII 活性部位の構造。赤玉は水分子を示す。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、蛋白質内で起こるプロトン移動の機構を蛋白質構造に基づく理論計算によって解明するための手法を具体的に示し、PSIIの水分解反応に対し応用することである。PSIIでは水分解反応に伴ってMn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> 錯体から水由来のプロトンが放出され蛋白質外部へと運ばれる。このプロトン移動を調べる。プロトンが、反応におけるどのタイミングで、どこからどこへ、どのような時間スケールで移動するのかを明らかにする。同時に、その機能を実現するために蛋白質環境のどの部分がどのように重要なかを特定する。

### 3. 研究の方法

蛋白質におけるプロトン移動の特徴は、蛋白質内がしっかりと組まれた水素結合の中で起こることにある。プロトン移動を駆動している源は水素結合を作る分子間の酸解離

定数(pKa) 差であり、これを正しく把握することが機構解明の鍵になる。そのために代表者が開発してきた「水素結合ポテンシャル」を通じて蛋白質構造から pKa 差を調べる手法を利用する。また、プロトン移動ではそれが起こる場所だけでなくそこから少し離れた蛋白質からの静電的影響が重要な働きをしていることも多い。このため着目している分子だけでなくそのまわりの蛋白質の影響を考慮できる QM/MM 法を用いて計算を行う。QM/MM 手法は精度の高い QM(quantum mechanics) 計算と速度の速い MM(molecular mechanics) 計算を組み合わせることでそれを可能とする手法である。

### 4. 研究成果

(1) 蛋白質内において、水分子が連なって水素結合ネットワークを構築している部位はプロトン移動の経路となる可能性がある。実際にプロトンが移動するかどうかを計算により明らかにする手法を確立した[論文]。そこでは、水と水との間の各水素結合それぞれに対し「水素結合ポテンシャル」を計算することで、プロトン移動の障壁を調べる。

(2) この手法を実際に PSII 蛋白質内に適用した。水分解が起こる触媒部位(Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> 錯体) 付近にみられる水分子の集団に対して、プロトン移動が可能かどうかを調べた。その結果、Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> 錯体の特定の部位(O4 と呼ばれる酸素原子) 近傍の水分子鎖(「O4 経路」と呼ぶ) においてのみ、プロトン移動が起こることが明らかになった(図2) [論文]。このプロトン移動は、4段階からなる水分解反応の第一段階目に起こることも同時に明らかにした。

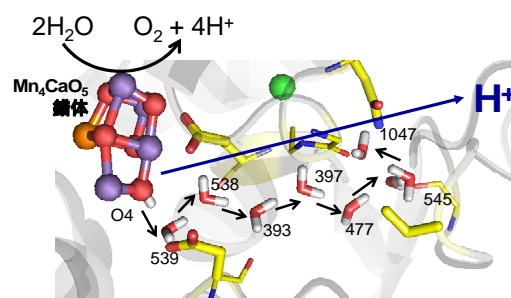


図2 水分解反応の第一段階目に放出されるプロトンが通る「O4 経路」。

(3) プロトン移動経路をより詳細に調べるため、プロトン移動と密接に関係している、かつ実験で観測することができる酸解離定数 pKa に着目した。(1) 量子的なエネルギー差と(2) プロトンの NMR 化学シフトという2つの独立な量子化学計算から pKa の値を算出するための式をそれぞれ発見し、pKa の値を計算によって算出する方法を確立した[論文]。

(4) その方法を PSII の O4 経路を構成する水分子に適用し、水分子の性質の違いを pKa の観点から解析した。その結果、プロトン移動経路の入り口にある 3 つの水分子は互いに強く相互作用しており、触媒部位のプロトン放出の駆動力を遠くへ伝える媒体として働いていることがわかった[論文]。この強結合水分子グループがプロトンを効率的に輸送する助けになっていると考えられる。

(5) 4 段階からなる水分解反応の第二段階目以降について、プロトンの放出だけでなく、反応機構の解明をも行った。その結果以下のことが明らかとなった[論文]。第二・第三段階において、 $Mn_4CaO_5$  錯体の「Mn4」原子に配位している水分子 W1 のプロトンが 2 つとも抜ける(図 3)。プロトンの 1 つは D1 サブユニットのアスパラギン酸 61(D1-Asp61)を経由し蛋白質の外へ向け放出され、もう 1 つは D1-Asp61 まで移動する(図 3)。その後、第四段階において、第一段階においてプロトンが放出される O4 酸素原子と W1 の酸素原子が単結合をつくり、D1-Asp61 のプロトンが外部へ排出されることをきっかけに、酸素分子が形成される。酸素分子が外部へと排出されると、空になった  $Mn_4CaO_5$  錯体のサイトに再び水分子が入り込む。この反応の律速過程は酸素分子間の単結合生成過程(1ms 程度)である。

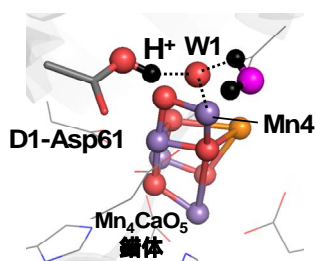


図 3 Mn4 に配位した水分子 W1 のプロトンは D1-Asp61 を経由して排出される。

## 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 13 件)

Keisuke Kawashima, Tomohiro Takaoka, Hiroki Kimura, Keisuke Saito, Hiroshi Ishikita, "O<sub>2</sub> evolution and recovery of the water-oxidizing enzyme", Nat. Commun. 9:1247 (2018), 査読有 doi: 10.1038/s41467-018-03545-w

Keisuke Saito, Takumi Suzuki, Hiroshi Ishikita, "Absorption-energy calculations of chlorophyll a and b with an explicit solvent model", J. Photochem. Photobiol. A (2017), 査読有 , doi:

10.1016/j.jphotochem.2017.10.003

Shinnosuke Kishi, Keisuke Saito, Yuki Kato, Hiroshi Ishikita, "Redox potentials of ubiquinone, menaquinone, phylloquinone, and plastoquinone in aqueous solution", Photosynth. Res. 134 (2017) 193-200, 査読有, doi: 10.1007/s11120-017-0433-4

Takuya Ikeda, Keisuke Saito, Ryo Hasegawa, Hiroshi Ishikita, "Existence of isolated H<sub>3</sub>O<sup>+</sup> in the protein interior", Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 56 (2017) 9151-9154, 査読有, doi: 10.1002/anie.201705512

Naoki Sakashita, Hiroshi C. Watanabe, Takuya Ikeda, Keisuke Saito, Hiroshi Ishikita, "Origins of water molecules in the photosystem II crystal structure", Biochemistry 56 (2017) 3049-3057, 査読有, doi: 10.1021/acs.biochem.7b00220

Ryo Hasegawa, Keisuke Saito, Tomohiro Takaoka, Hiroshi Ishikita, "pKa of ubiquinone, menaquinone, phylloquinone, plastoquinone, and rhodoquinone in aqueous solution", Photosynth. Res. 133 (2017) 297-304, 査読有, doi: 10.1007/s11120-017-0382-y

斉藤圭亮, 「Photosystem II における水素結合ネットワークを介したプロトン移動」, 光合成研究 27 (2017) 39-47, 査読有, <https://ci.nii.ac.jp/naid/40021207577/>

石北 央, 斉藤圭亮, 「低障壁水素結合とプロトン移動の化学」, 触媒 59 (2017) 256-262, 査読有

斉藤圭亮, 新進気鋭シリーズトピックス「光合成水分解反応におけるプロトン移動」, 生物物理 330 (2017) 98-100, 査読有, doi: 10.2142/biophys.57.098

Keisuke Saito, Naoki Sakashita, Hiroshi Ishikita, "Energetics of the proton transfer pathway for tyrosine D in photosystem II", Aust. J. Chem. 69 (2016) 991-998, 査読有, doi: 10.1071/CH16248

Tomohiro Takaoka, Naoki Sakashita, Keisuke Saito, Hiroshi Ishikita, "pKa of a proton conducting water chain in

photosystem II", J. Phys. Chem. Lett. 7 (2016) 1925-1932, 査読有, doi: 10.1021/acs.jpcllett.6b00656

Keisuke Saito, A. William Rutherford, Hiroshi Ishikita, "Energetics of proton release on the first oxidation step in the water-oxidizing enzyme", Nat. Commun. 6:8488 (2015), 査読有, doi: 10.1038/ncomms9488

斉藤圭亮, 石北 央, 総説「クロロフィルのかたちは機能にどう影響を及ぼすか: Photosystem II を例に」, 植物の生長調節 50 (2015) 133-138, 査読無

[学会発表](計 17 件)

河島圭佑, 高岡友裕, 木村一貴, 斉藤圭亮, 石北央, 「光化学系 II における酸素発生反応と水の再取り込みの機構」, 第 59 回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 2018 年

斉藤圭亮, 「光合成蛋白質内の水分子のシミュレーション」, 第 5 回 JCAHPC セミナー(招待講演), 東京大学柏キャンパス, 2017 年

斉藤圭亮, 「光合成蛋白質の理論解析で知るプロトンと水の移動経路」, 平成 29 年度ラン藻ゲノム交流会(招待講演), 東京大学駒場キャンパス, 2017 年

Keisuke Saito, "Energetics of the proton transfer from tyrosine D in photosystem II: comparison with tyrosine Z", 7th Meeting "Photosynthesis Research for Sustainability"(招待講演)(国際学会), Pushchino (ロシア), 2016 年

斉藤圭亮, 「光化学系の構造に基づく理論解析からわかること」, 第 7 回日本光合成学会年会(招待講演), 東京理科大学葛飾キャンパス, 2016 年

斉藤圭亮, 「蛋白質の理論化学解析で光合成反応を理解する」, 化学系学協会東北大会(招待講演), いわき明星大学, 2016 年

斉藤圭亮, 「構造に基づく理論解析で蛋白質の分子機構を探る」, 第 10 回日本化学会東海支部若手研究者フォーラム(招待講演), 名古屋大学(愛知県), 2016 年

Keisuke Saito, "Mechanics of Long-Distance Proton Transfer in Photosynthetic Protein", the Seventh

Asia-Pacific Conference of Theoretical and Computational Chemistry (APCTCC 7)(招待講演)(国際学会), 高雄(台湾), 2016 年

Keisuke Saito, "The first proton release on the water-oxidizing reaction in photosystem II", 7th OCARINA International Symposium(招待講演)(国際学会), 大阪市立大学, 2016 年

斉藤圭亮, 石北央, 「蛋白質におけるプロトン移動: 短い水素結合の役割」, 第 15 回東京大学生命科学シンポジウム, 東京大学本郷キャンパス, 2015 年

斉藤圭亮, 石北央, 「光合成水分解反応の初期に起こる蛋白質内プロトン移動の経路と機構」, 日本物理学第 71 回年次大会, 東北学院大学, 2015 年

斉藤圭亮, 石北央, 「光合成光化学系 II における MnCa クラスターの歪んだ椅子型構造の起源」, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京農業大学, 2015 年

斉藤圭亮, 石北央, 「光合成光化学系 II における MnCa クラスターの歪んだ椅子型構造の起源」, 日本物理学第 70 回年次大会, 早稲田大学, 2015 年

Keisuke Saito, A. William Rutherford, Hiroshi Ishikita, "Proton Transfer Mechanisms in Photosystem II: Quinone Reduction and Tyrosine Radical Formation, Tokyo ATPase Workshop(国際学会), 東京大学本郷キャンパス, 2015 年

斉藤圭亮, 「蛋白質におけるプロトン移動 ~ 短い水素結合の役割 ~」, 生体分子系量子化学計算の最前線(招待講演), 理化学研究所(和光市), 2015 年

斉藤圭亮, 「光合成蛋白質の中のクロロフィルのかたちと機能」, やわらか光受容分子の理解と利用に迫るブレインストーミング研究会(招待講演), 岡山県瀬戸内市, 2015 年

斉藤圭亮, 石北央, 「光合成光化学系 II における MnCa クラスターの歪んだ椅子型構造の起源」, 第 52 回日本生物物理学会年会(招待講演), 札幌コンベンションセンター, 2014 年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

東京大学プレスリリース「光合成水分解  
反応初期に利用される水素イオン移動  
経路を解明～これまでの定説を覆す結  
果に～」2015年10月7日,  
<https://www.u-tokyo.ac.jp/ja/utokyo-research/research-news/pathway-for-initial-proton-released-from-water-oxidizing-enzyme.html>

## 6. 研究組織

### (1) 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・講  
師

研究者番号: 20514516