

課題名 (タイトル) :

## 計算科学による光合成膜タンパク PSII のメカニズムの解明

利用者氏名 : ○畠山 允

所属 : 社会知創成事業 イノベーション推進センター 中村特別研究室

## 1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

光合成の初期過程を担っている膜蛋白質 Photosystem II (PSII) は、光エネルギーを効率よく利用して水の酸化を行っている。この反応は、PSII 内にある  $Mn_4O_5Ca$  クラスタと周りの残基の協調により、5 つの状態 ( $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ ) を周期的に経て行われる (図 1)。

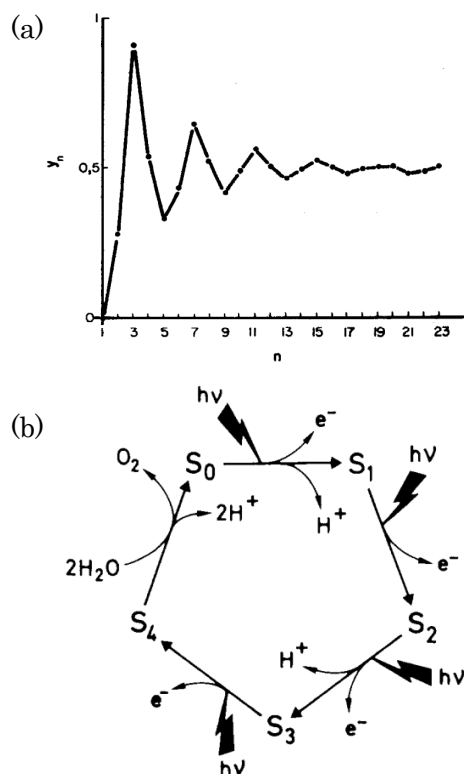
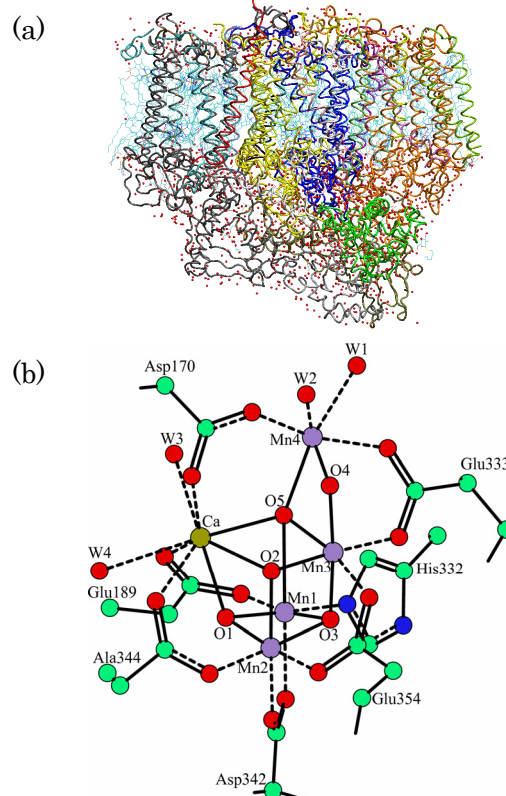


図 1 : (a) 酸素発生量 ( $y_n$ ) と光照射回数 ( $n$ ) の相関 (P. Joliot, *Photosyn. Res.*, **76** (2003) 65) (b) 光照射に伴う  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ状態変化 A. W. Rutherford, *TIBS*, **14** (1989) 227)

酸素発生触媒である  $Mn_4O_5Ca$  クラスタと周囲残基の詳細は、定常状態 ( $S_1$ ) における構造が 2011 年の 3 月に分解能 1.9 Å で解明され、Protein Data Bank (PDB-entry:3ARC) に公開された (図 2)。しかしその構造は水素原子位置を含んでおらず、周囲残基や酸素材料である水配位子のプロトン化状態はいまだ未決定である。光合成内酸素発生反

応は光駆動 Mn 酸化とプロトン移動の協調を利用する事が知られており、 $Mn_4O_5Ca$  クラスタ周囲のプロトン化状態を知る事は酸素発生機構解明にとって重要である。

図 2 : PSII 結晶構造 (PDB-entry:3ARC) の全体像



(a) 及び  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ周辺構造 (b)

酸素発生反応を理解する上で、 $Mn_4O_5Ca$  クラスタの電子状態もまた重要である。結晶構造が解析された  $S_1$  状態については、吸収スペクトル解析等に基づいて以下の知見が得られている。即ち、(i) Mn(III) と Mn(IV) を其々 2 個ずつ含む (ii) エネルギー最低スピン状態は Singlet ( $S=0$ ) で、2.5K 以上の温度下で Triplet ( $S=1$ ) への熱励起が起こる。

本研究では、光合成内酸素発生触媒である  $Mn_4O_5Ca$  クラスタの  $S_1$  状態における詳細決定を目的として、そのプロトン化状態や Mn 酸化数配置の異なる  $Mn_4O_5Ca$  クラスタモデルの比較・検

討を電子状態計算を利用して行った。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

### 2. 1. 計算モデル作成

PSII 最新結晶構造 (PDB-entry:3ARC) から  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ周囲  $20\text{\AA}$  以内のアミノ酸、結晶水、イオン(含  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ)を切り出し、 $Mn_4O_5Ca$  クラスタ周辺 0 原子のプロトン化状態や Mn 酸化数配置 (III $\times$ 2, IV $\times$ 2) を様々に変えて各モデル構造を作成した。

$Mn_4O_5Ca$  クラスタのプロトン化状態異性体については、Ca と 3 つの Mn を架橋する O5(図 2) を ( $\mu_4-O^{2-}$ ,  $\mu_4-OH$ ,  $\mu_4-OH_2$ ) と変えた場合、配位水 W2, 3 を (OH, H<sub>2</sub>O) と変えた場合及び各状態の組み合わせを検討した。O5 は、結晶構造における特異的に長い Mn-O 距離の為にプロトン化サイトとして既に指摘されていた為、検討した。W2, W3 については、W1, W4 と異なり陰イオン側鎖に配位されていない為、脱プロトン化候補として検討した。

Mn 酸化数配置 (III $\times$ 2, IV $\times$ 2) の異なる異性体については、まず Mn(III)候補を  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ中の 3 つの Mn(図 2、Mn1, 3, 4) に絞り、異なる酸化数配置 3 つを考慮した。これは、Mn1, 3, 4 が最新結晶構造において示す特異的に長い Mn-O 架橋結合を、Mn(III)由来の Jahn-Teller 軸として注目した為である。

3 つの酸化数配置に基づき、Mn2 が Mn(III)となる異性体も検討した。具体的には、3 つの配置の内エネルギーの低いものに共通する Mn(III)を用い、残りの Mn(III)を Mn2 とした異性体を検討した。

### 2. 2. 電子状態計算

結晶構造から切り出した  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ周辺構造の電子状態を QM/MM 法で計算した。QM 領域は  $Mn_4O_5Ca$  クラスタの第一配位圏と一部の第二配位圏を含む 340 原子をとり、DFT (UB3LYP) で扱った。UB3LYP 計算においては、4 つの Mn 上 3d 電子が上向き或いは下向きスピンの局在化した古典的スピン状態が求まり、スピン配向の異なる 8 つの状態が得られる。各スピン状態は、Hamiltonian 部分対角化により求めた初期電子

密度を用いて計算・比較した。MM 領域は  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ周囲  $20\text{\AA}$  から切り出した構造から QM 領域を抜いた物とし、Amber03 分子力場で評価した。また MM 領域原子電荷による QM 領域電子雲の分極も考慮した。

定常状態  $Mn_4O_5Ca$  クラスタのエネルギー最低スピン状態が Singlet となる実験事実検証の為に、Heisenberg-model を用いてスピン固有状態を求めた。具体的には、Heisenberg-Hamiltonian の未知パラメータである超交換相互作用項 ( $J_{ij}$ ) を、UB3LYP から求まる古典的スピン状態間のエネルギー差から計算した。その後、Heisenberg-Hamiltonian を対角化してスピン固有状態及びそのエネルギー準位を求めた。

## 3. 結果

### 3. 1. QM/MM 最適化構造

3 つの Mn を架橋する O5 が ( $\mu_4-OH$ )<sup>-</sup> の場合の各最適化構造を図 3 に示した。モデル (a-c) は Mn1, 3, 4 の何れかが III 価であり、モデル (d) では Mn1, 4 が III 価である。O5 が ( $\mu_4-O$ )<sup>2-</sup> の場合でもモデル (a-d) に類似の Mn 酸化数配置を持つモデルが得られたが、O5 が ( $\mu_4-OH_2$ ) の場合は Mn 酸化数配置が (III, IV, III, III) となった。

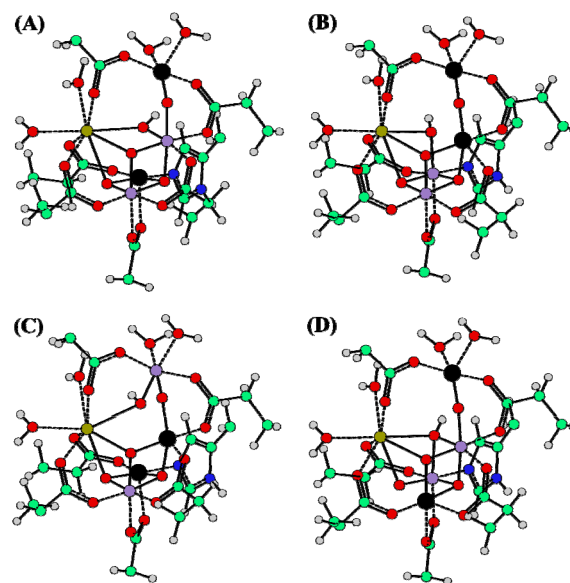


図 3 : O5 が ( $\mu_4-OH$ )<sup>-</sup> の  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ-QM/MM 最適化構造 (● : Mn(III), ● : Mn(IV), ● : Ca, ● : O, ● : N, ● : C, ● : H)

O5 及び W2(W3)を OHとしたモデルを其々図

4(共に Mn1, 4 が III 価の構造)に示した。W2 が脱プロトン化した場合、 $Mn_4O_5Ca$  クラスターの最適化構造は結晶構造から殆ど変わらず、代わりに W2 から第二配位圏 C1 までの水素結合構造が変化した。一方 W3 が脱プロトン化した場合には、 $(\mu_4-O_5H)^-$  から  $W3(OH^-)$  へ  $H^+$  が移動し、O5 は  $(\mu_4-O)^{2-}$  となった。この  $H^+$  移動は Mn 酸化数配置に関わらず構造最適化中に必ず起こった。

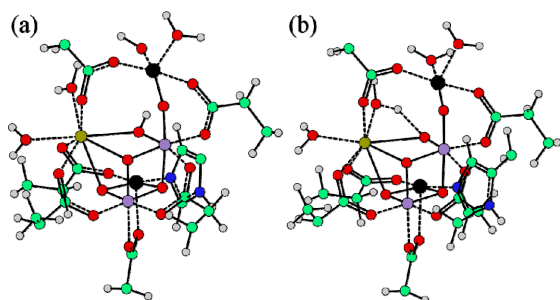


図 4 : O5 及び水配位子 (W2, W3) が OH<sup>-</sup> の  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ QM/MM 最適化構造 (● : Mn (III), ● : Mn (IV), ● : Ca, ● : O, ● : N, ● : C, ● : H)

O5 が  $(\mu_4-O^{2-})$  或いは  $(\mu_4-OH^-)$  で得られる Mn1, 4 が III 価の構造は、QM/MM 最適化構造と結晶構造 (PDB-entry:3ARC) の差異 (RMSD) は 0.21Å 程度と最小になった。Mn1, 3 が III 価数の場合も RMSD が 0.22Å 程度と小さい値になったが、 $Mn_4O_5Ca$  クラスタに限定して RMSD を求めると、0.35Å と他の Mn 酸化数配置に比べて大きな値となった。

### 3. 2. 最安定 Mn 酸化数配置のプロトン化状態依存性

$Mn_4O_5Ca$  クラスタ  $S_1$  状態における Mn 酸化数配置間のエネルギー差や最安定 Mn 酸化数配置は、3 つの Mn を架橋する O5 のプロトン化状態によって大きく変化した。

O5 が  $(\mu_4-OH^-)$  の場合は、Mn1, 3, 4 が III 価となったモデルが他に比べて 10(kcal/mol) 以上低いエネルギーを示した。エネルギー最低 Mn 酸化数配置は、結晶構造との RMSD が最小となる Mn1, 4 が III 価のものではなく、RMSD が次に小さい Mn3, 4 が III 価のものであった。

O5 が  $(\mu_4-O)^{2-}$  の場合は、Mn4 が III 価のモデルが他に比べてエネルギーが低く、エネルギー最低 Mn 酸化数配置は結晶構造との RMSD が最小となる

Mn1, 4 が III 価のものであった。

### 3. 3. $Mn_4O_5Ca$ クラスタのスピンの状態

O5 が  $(\mu_4-O^{2-}, \mu_4-OH^-)$  で W2, W3 が水配位子のモデルを用いて、エネルギー最低スピン状態の解析及び EPR 実験結果 (Singlet がエネルギー最低固有スピン状態) との比較を行った。

まず UB3LYP における古典的スピン状態のエネルギーを用いて、Mn 間超交換相互作用項 ( $J_{ij}$ ) を求めた (表 4)。Mn のような第一遷移金属間の J 値は負 (反平行スピン対形成でエネルギー安定化) になる傾向が知られている。 $Mn_4O_5Ca$  クラスタにおいては、Mn4 は Mn3 とのみ近接しているため、Mn3-Mn4 間の J 値は O5 のプロトン化状態に関わらず負となった。一方 Mn1, 2, 3 間は、3 つの Mn による三角構造内でペア間相互作用が働く為、一概に負とはならなかった。具体的には、O5 プロトン化状態の変化に伴う Mn 酸化数配置の変化に依存した。

表 6 : O5 が  $(\mu_4-OH^-, \mu_4-O^{2-})$  のエネルギー最低 Mn 酸化数配置における Mn 間超交換相互作用 ( $J_{ij}$ )

O5 プロトン化状態	超交換相互作用 ( $J_{ij}$ ) の大きさ (kcal/mol)					
	Mn1-Mn2	Mn1-Mn3	Mn1-Mn4	Mn2-Mn3	Mn2-Mn4	Mn3-Mn4
$\mu_4-OH^-$	+0.086	+0.017	+0.000	-0.171	+0.005	-0.107
$\mu_4-O^{2-}$	-0.136	+0.064	-0.042	+0.132	+0.005	-0.094

表 6 の J 値で特徴付けられる Heisenberg-Hamiltonian を対角化して得られたスピン固有状態エネルギー準位を図 5 に示した。青点はスピン固有状態のエネルギー、赤点は Ising-model におけるエネルギー及びスピン量子数の期待値である。O5 が  $(\mu_4-OH^-)$  の場合のエネルギー最低スピン固有状態は Septet ( $S=3$ ) となり、Singlet 内エネルギー最低状態とのエネルギー差は 0.265 kcal/mol ( $\approx 133.6$  K) となった。一方で O5 が  $(\mu_4-O)^{2-}$  の場合の最低スピン固有状態は Singlet となり、第二スピン状態である Triplet とのエネルギー差は 0.029kcal/mol ( $\approx 14.6$  K) となった。O5 が  $(\mu_4-O)^{2-}$  の場合の結果は、EPR 実験結果 (2.5K 以上で Singlet (エネルギー最低状態) から Triplet へ熱励起が起こる) と定性的に一致した。エネルギー差に関する定量的な議論には、

Triplet 状態における構造最適化等が必要と考えられる。

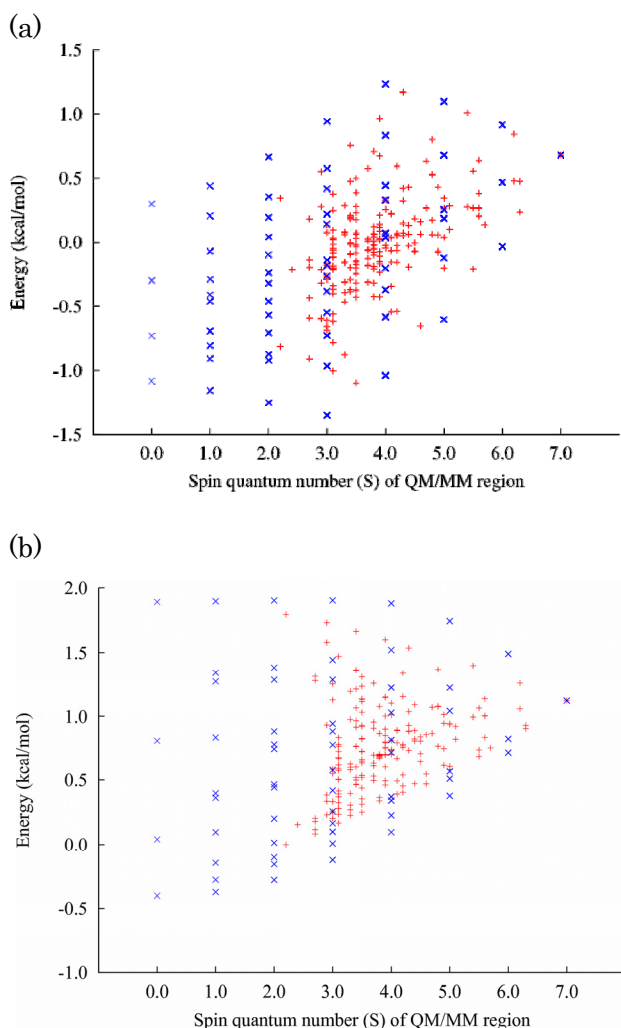


図 5 : Heisenberg-model における  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ・ $S_1$  状態のスピ固有状態エネルギー ;  
(a) O5 が  $(\mu_4-OH)^-$  の場合 (b) O5 が  $(\mu_4-O)^{2-}$  の場合

#### 4. まとめ

本研究では光合成内  $O_2$  発生触媒である  $Mn_4O_5Ca$  クラスタの定常状態電子-スピン状態とプロトン化状態に注目し、実験結果を最もよく満足する  $Mn_4O_5Ca$  クラスタモデルを見出す事に取り組んだ。特に最新結晶構造において特異的に長い Mn-O5 架橋構造に注目し、Mn(III) の Jahn-Teller 歪み、O5 原子プロトン化による結合伸長の両方の可能性を検討した。結果、O5 原子が完全に脱プロトン化した  $(\mu-O5)^2$  状態におけるエネルギー最低 Mn 酸化数配置が結晶構造や EPR 実験結果をよく再現することがわかった。

光合成内  $O_2$  発生反応に対する  $H^+$  の寄与は、光

誘起 Mn 酸化の際に協調してプロトン移動する事で活性化エネルギーを下げる役割が知られてきた。今回の結果はそれに加えて、触媒である  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ上により酸化力の高い(低い) Mn(III) (Mn(IV)) 位置がそのプロトン化状態によって制御されている可能性を示した。

#### 5. 今後の計画・展望

本研究で見出された  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ電子スピン状態とそのプロトン化状態の相関を、光誘起 Mn 酸化後の中間状態  $S_2$  において検討する。同時に、定常状態  $S_1$  と  $S_2$  其々でのエネルギー最低 Mn 酸化数配置・スピン状態の連続性について検討する。従来の  $Mn_4O_5Ca$  クラスタ電子状態計算では、1 つの  $S_i$  状態でエネルギー最低 Mn 酸化数を決定した後は、その配置を保ったまま他の  $S_i$  状態計算に取り組む例が殆どだった。その為、 $S_i$  状態間の連続性を詳細に検討する事は  $O_2$  発生機構解明にとって有用であると期待している。

安定状態 ( $S_{0-4}$ ) だけでなく、Kok-cycle における遷移状態の解明も計画している。 $S_i$  状態遷移の活性化エネルギーは、水酸化を含む  $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$  過程でさえ 5 kcal/mol 程度と低い事が知られており、その遷移状態を解明する事は人工光合成ないし光機能性分子開発にとって有用であると考えている。

#### 6. 一般利用で演算時間を使い切れなかった理由

構造異性体候補の選定や効率的な QM/MM 構造最適化手順の検討に時間を費やし、大規模計算に取り掛かる時期が遅れたため。

平成 23 年度 RICC 利用研究成果リスト

**【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】**

(学会発表)

発表者名： 畠山 允、緒方 浩二、横島 智、中村 振一郎

講演題名： 光化学系 II・四核 Mn クラスターの酸化数配置に関する理論的研究

会議名： 第 25 回分子シミュレーション討論会

発表年月日：2011 年 12 月 5 日

場所： 東京工業大学 大岡山キャンパス