

課題名 (タイトル) :

## 光合成のメカニズムの解明と生体膜のシミュレーション

利用者氏名 : ○緒方 浩二\*、打田 和香\*

所属 : \*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

本研究課題に於いては、次の三つのテーマに関して研究を行った。

- (1) 光合成蛋白質 PSII の酸素発生機構の解明
- (2) 生体膜の力場パラメータの改良
- (3) 生体系キノン化合物の酸化還元反応機構の解析

## 1.1 光合成蛋白質 PSII の酸素発生機構の解明

光合成蛋白質 PSII 及び活性中心の構造は X 線結晶構造解析により明らかになっているが、そのメカニズムは未だに解明されていない。我々は MD シミュレーションにより活性中心までの水の供給経路を同定し、更に新たなる水の経路を見つけ出すことが出来た(Ogata et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 15670–15673, 2013)。現在、この MD シミュレーションを継続し、このシミュレーションから水の経路を通過する水の動きと PSII の揺らぎの関係の調査を行い、PSII が作る場と酸素発生機構との関係について解析を行った。

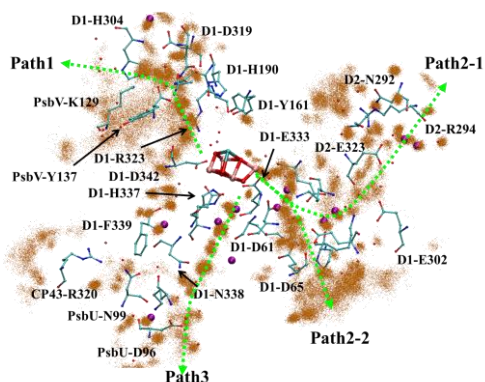


図 1.1 PSII 活性近傍のシミュレーションにおける水の配置

## 1.2 生体膜の力場パラメータの改良

昨年は ricc を使用して、生体膜を構成している脂質

であるフォスファチジルコリン(PC)とフォスファチジルエタノールアミン(PE)の単一脂質二重膜のシミュレーションを行った。その結果、シミュレーションにおける相転移温度を同定し、各相における脂質のコンフォメーションを原子レベルで解析することが出来た。これらの解析の結果、実験結果から示唆されている構造と似たものであることが分かり、各相における原子レベルで脂質のコンフォメーションを提示を行った。また、単一 DPPC 二重膜におけるリップル相が生成されるメカニズムの解明を試みた。その結果、ゲル相において、DPPC の上と下の層がお互いに逆方向に動き出す運動が観察され、この力がリップルを形成する一つの要因であることをシミュレーションにより示唆した。しかし、シミュレーションで得られた相転移温度は実験値と比べて 50 K 程高く、生体のシミュレーションで設定している 300 K に於いては、本来示すはずの脂質の構造とは異なったものであった。そこで本研究に於いて、脂質二重膜の相転移温度を再現するように力場パラメータの改良を行った。

## 1.3 生体系キノン化合物の酸化還元反応機構の解析

光合成で電子伝達体として機能しているプラストキノンは酸化還元反応を行うことで電子を伝達している。その類似物質である、他の生体系キノンも同様に、酸化還元反応を行うことで、電子伝達を行っている。本研究ではそれら生体系キノンのうち、ピロロキノリンキノンに着目し、量子化学計算を用いて水溶液中におけるピロロキノリンキノンによるグリシン酸化反応機構の解析を行った。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

## 2.1 光合成蛋白質 PSII の酸素発生機構の解明

PSII とチラコイド膜のモデルは、文献(Ogata et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 15670–15673, 2013) に示すものを

用いた。このモデルは、PSII 複合体の構造を天然のチラコイド膜を忠実に再現したもので、そのサイズは 275 Å×195 Å×225 Å である。このモデルを用いて、25ns の MD シミュレーションを行い、MD シミュレーションから得られるトラジェクトリの解析を行った。本研究に於いて、すべての MD シミュレーションは amber ソフトウェアパッケージを用いて行った。

## 2.2 生体膜の力場パラメータの改良

現在求められている脂質の amber 力場のパラメータを用いて、温度を上げながらシミュレーションを行うと、相転移点が実験値よりも 50 K 前後高い値に観察される。そのことを解決するために、DPPC に関して、シミュレーションの相転移温度が実験値に近い値になるようにアルキル鎖の炭素と水素の vdW のポテンシャルの深さを表す well-depth の値にかけるある係数 $\alpha$ に関して、 $\alpha$ の最適な値を求めることを行った。また、得られたパラメータを用いて、DOPC と POPC、DSPC、DPPE、及び、POPE に関してシミュレーションを行い、最適化したパラメータの効果を確認した。シミュレーションは、10ns 毎に 5K 温度を上昇させて行く方法を用いた。また、相転移は、脂質二重膜に於ける脂質一分子あたりの面積を示す  $A_L$  とアルキル鎖の二面角が gauche を示している割合を示す  $R_F$  の二つの指標により、その同定を行った。改良するパラメータは、脂質のパラメータセットである GAFFlipid と化合物など広く使用されているパラメータである GAFF に関して行った。GAFFlipid に関しては、アルキル鎖の水素の well-depth がすでに小さな値を示しているので、炭素の well-depth のみの変化を考慮した。また、GAFF に関しては、アルキル鎖の炭素と水素両方の well-depth の変化を考慮した。

## 2.3 生体系キノン化合物の酸化還元反応機構の解析

ピロロキノリンキノンによるグリシン酸化の反応機構 (stepwise, concerted) を検討した(図 2.1)。それらの反応の始状態、中間体、終状態、そして遷移状態を Gaussian09 により求めた。

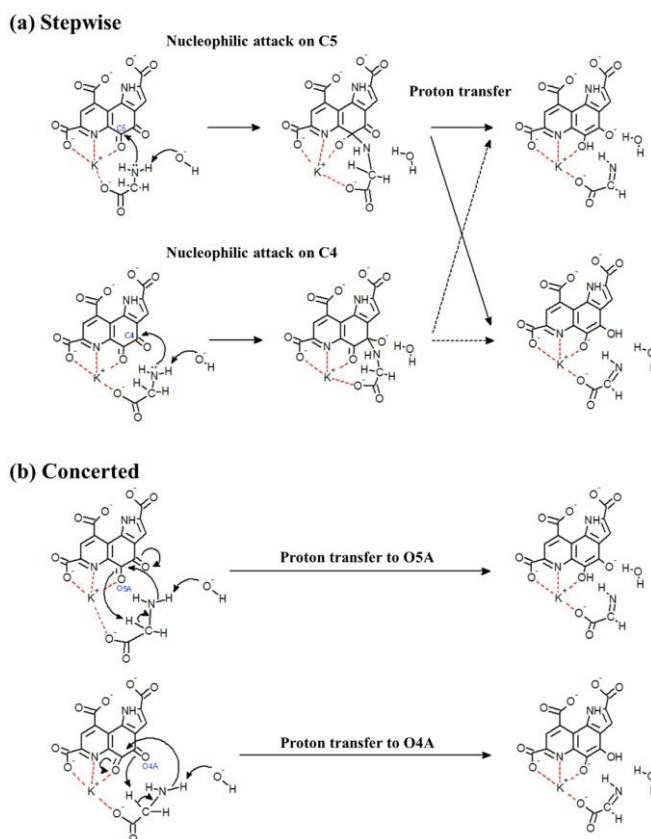


図 2.1 ピロロキノリンキノンによるグリシン酸化反応の反応機構

## 3. 結果

### 3.1 光合成蛋白質 PSII の酸素発生機構の解明

図 3.1 は 25ns のトラジェクトリから得られた水の分布を示している。赤い点がシミュレーションに於いて、水が位置していたとこで、 $Mn_4O_5Ca$  を中心に外に向けて水のパスが存在することが観察される。また、PSII 外部から内部へと動いた水と、内部から外部へ移動した水の軌跡が観察されている。

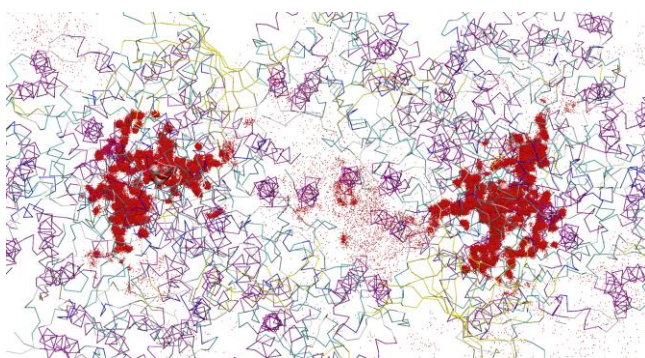


図 3.1  $Mn_4O_5Ca$  近傍の水の分布

これらの水のパスの中で、PSII 二量体の中心に伸びているパスは、一昨年度論文で発表した新たに見出した

水のパスと同じもので、今回、新たに  $Mn_4O_5Ca$  から外側に伸びるパスがシミュレーションで確認された。このパスは、文献などで示唆されているもので、制約なしのシミュレーションで初めてそのパスが機能していることが示された。

次に、MD シミュレーションのトラジェクトリを基に、主成分分析により分子の揺らぎの方向の解析を行った。図 3.2 にその結果を示す。ここで、図 3 に対して、向かって左側の  $Mn_4O_5Ca$  と同じ方向に揺らいでいる残基を青、また、向かって右側の  $Mn_4O_5Ca$  と同じ方向に揺らいでいる残基を赤の矢印で示している。図に示すように、 $Mn_4O_5Ca$  はお互いに反対方向に揺らいでいることが分かる。また、右側及び左側の  $Mn_4O_5Ca$  に共鳴している残基はそれらの周辺に位置していることが観察される。これらの結果から、 $Mn_4O_5Ca$  を中心にその周りの残基は反対方向に揺らいでいることが分かった。これらの揺らぎは、水の供給、排出に関わっている可能性がある。

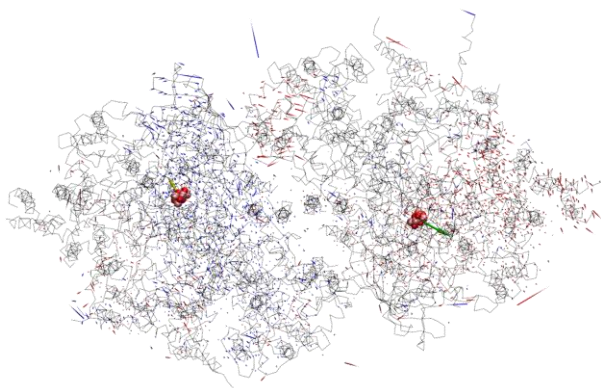


図 3.2 主成分分析によるアミノ酸及び  $Mn_4O_5Ca$  の揺らぎの方向

### 3.2 生体膜の力場パラメータの改良

図 3.3 と図 3.4 に GAFFlipid、及び、GAFF を用いた時の  $A_L$  と  $R_F$  のグラフを示している。これらのグラフから、温度上昇のシミュレーションに於いて、温度変化に伴って、脂質膜の相が変化していることが解る。特に、高い温度帯に於いて、DPPC と DSPC、DPPE、POPE は急激に  $A_L$  及び  $R_F$  の値が上昇していることが解る。これらのグラフが急激に変化している温度がシミュレーションに於ける相転移温度であることが解る。実際に脂質のコンフォメーションを観察すると、低い温度帯に於いては、伸びきった脂質のアルキル鎖が規

則正しく並んでいるのに対して、相転移点を境にアルキル鎖が無秩序な状態に変化している。このことは、実験により示唆されている脂質のコンフォメーションと類似しており、シミュレーションに於いて相転移点を再現できたことを意味している。

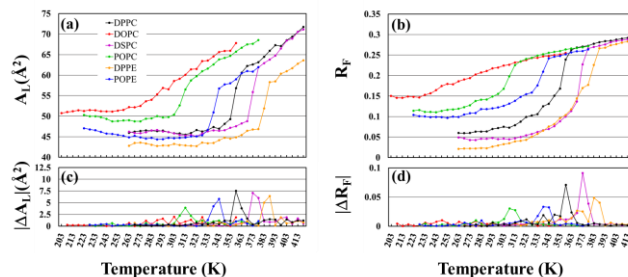


図 3.3 GAFFlipid を使用した MD シミュレーションの  $A_L$  と  $R_F$  のグラフ

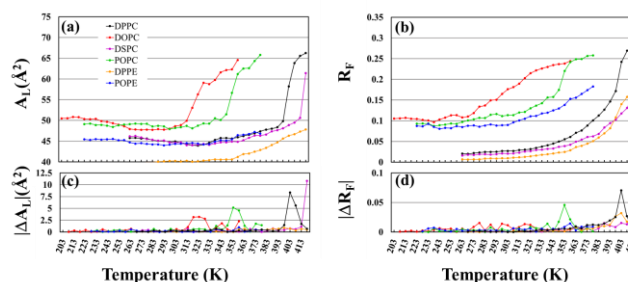


図 3.4 GAFFlipid を使用した MD シミュレーションの  $A_L$  と  $R_F$  のグラフ

図 3.3 と 3.4 の解析により得られた各脂質の相転移温度を表 3.1 に示す。この表から GAFFlipid を用いたシミュレーションで得られた相転移温度は実験値と比べても 50K 前後高い温度に現われていることが解る。更に、GAFF を用いたシミュレーションに於いては、大きなもので 80K 近くの実験値との差異が観察される。従って、これらのパラメータをそのまま用いたシミュレーションは、脂質の構造が実際に与えた温度とは異なったコンフォメーションを取っている可能性が高く、結果としてシミュレーションの大きな誤差を生じることになる。これらの誤差を少なくするためにパラメータのフィッティングが必要であり、以下、その方法に関して述べる。

表 3.1 GAFFlipid と GAFF を用いたシミュレーションにおける相転移温度

Lipids	Experiment	GAFFlipid	GAFF
DPPC	314.15	358	403
DOPC	253.15	303	318
DSPC	328.15	373	418
POPC	271.15	313	353
DPPE	336.15	388	< 418
POPE	298.15	343	< 378

図 3.5 は GAFFlipid を用いたシミュレーションに関して、vdW の係数の最適化を行った結果を示す。ここで行ったシミュレーションは温度を 303K から 323K まで変化させて、70 ns のシミュレーションからその相転移温度を求めた。図 3.5 に示すように、係数  $\alpha$  が小さなきは相転移点が低いところに現われ、逆に、大きなきは高い温度に現われることが確認できる。これらのグラフから最適  $\alpha$  の値は、DPPC の主相転移点は約 314.15K であり、 $\alpha=4/8$  であることが解る。

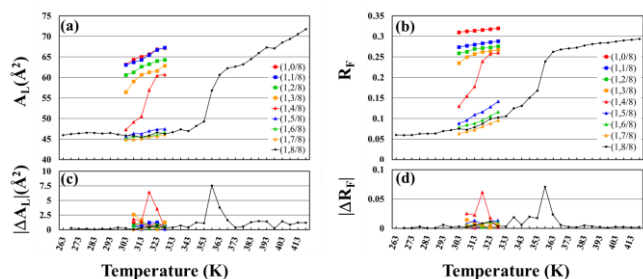


図 3.5 GAFFlipid のパラメータフィッティングの結果

図 3.6 は GAFF のパラメータを変えた場合の相転移温度の概要を示している。この図から係数の微小な変化に対して、相転移温度は過敏に反応することが解る。例えば、 $\alpha_{c3}=5/8, \alpha_{hc}=5/8$  に於いて相転移温度は 303K 以下に現われたが、炭素の係数を少し大きくした  $\alpha_{c3}=6/8, \alpha_{hc}=5/8$  に於いては、相転移点が 328K よりも大きな温度に現われている。これらの値の中で、 $\alpha_{c3}=4/8, \alpha_{hc}=8/8$  と  $\alpha_{c3}=6/8, \alpha_{hc}=4/8$  の二つの組み合わせの相転移温度が実験値に近い値を示していることが解る。

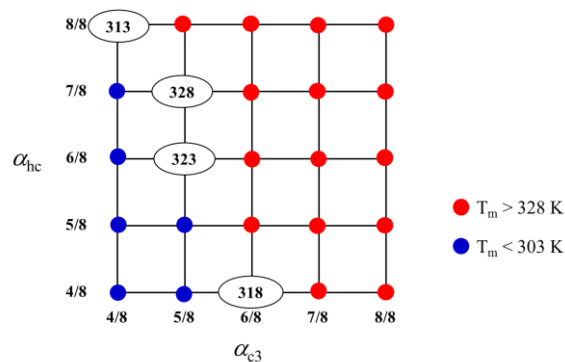


図 3.6 GAFF のパラメータフィッティングの概要

図 3.7 と図 3.8 は上で求めた最適な GAFFlipid と GAFF のパラメータを用いた場合のシミュレーションのそれぞれの結果を示す。これらのグラフと図 3.3 及び 3.4 を比較すると全体的にグラフが低い温度帯にシフトしていることが確認される。また、相転移温度もオリジナルのパラメータを用いた場合に比べて、低い温度に現われていることが確認される。これらの結果から、本研究において、相転移温度を考慮したパラメータフィッティングが成功したことを意味している。

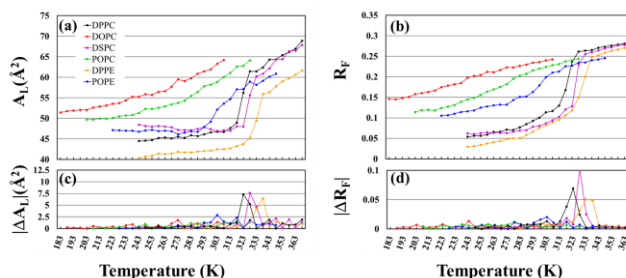


図 3.7 フィッティングを行った GAFFlipid のパラメータを用いたシミュレーション結果

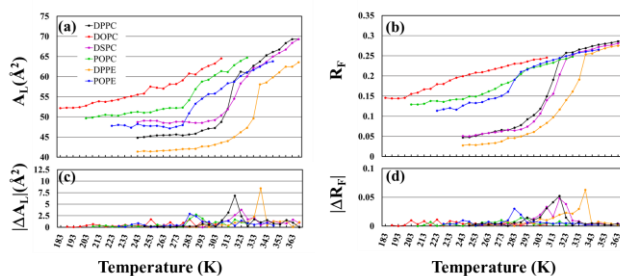


図 3.8 フィッティングを行った GAFF のパラメータを用いたシミュレーション結果

表 3.2 最適な GAFFlipid と GAFF を用いたシミュレーションにおける相転移温度

Lipids	Exp.	GAFFlipid	GAFF <sup>1</sup>	GAFF <sup>2</sup>
DPPC	314.15	323	318	313
DOPC	253.15	243	253	243
DSPC	328.15	328	323	323
POPC	271.15	283	288	293
DPPE	336.15	338	338	328
POPE	298.15	303	283	293

<sup>1</sup> GAFF( $\alpha_{c3}=4/8$ ,  $\alpha_{hc}=8/8$ )    <sup>2</sup> GAFF( $\alpha_{c3}=6/8$ ,  $\alpha_{hc}=4/8$ )

### 3.3 生体系キノン化合物の酸化還元反応機構の解析

#### (a) Stepwise reaction

stepwise reaction の第一段階の反応（求核攻撃）（図 2.1(a) 上段左と下段左）の活性化エネルギーを比較した。その結果、C5 に求核攻撃する可能性が高いことが解った。次に、第二段階の反応（プロトン移動）（図 2.1(a) 右）の活性化エネルギーを比較した。その結果、O5A にプロトン移動する可能性が高いことが解った（図 3.9）。

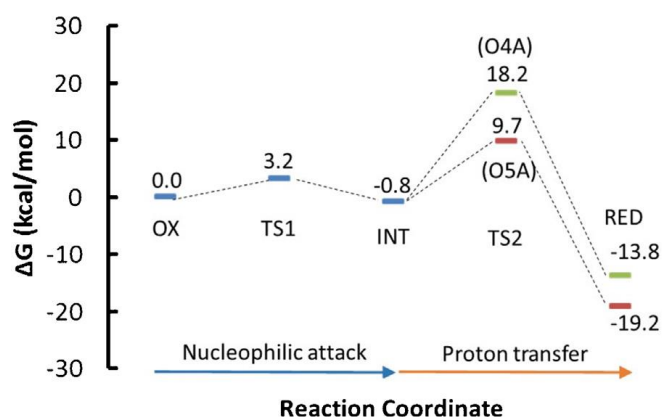


図 3.9 各状態のエネルギー

#### (b) Concerted reaction

concerted reaction では 2 つの経路を検討した（図 2.1(b)）。その結果、各経路とも活性化エネルギーが高いことが解った（図 3.10）。

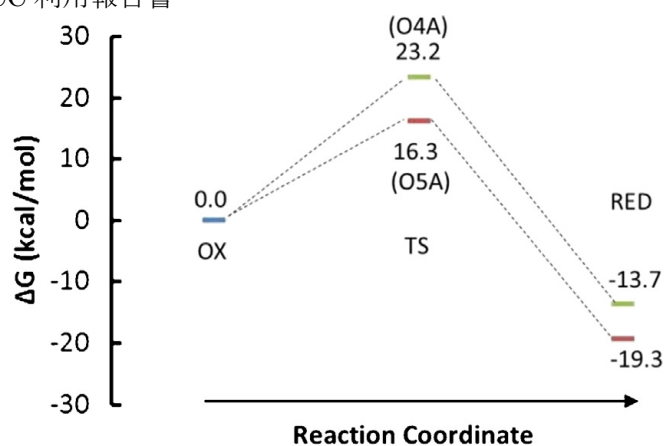


図 3.10 各状態のエネルギー

## 4. まとめ

### 4.1 光合成蛋白質 PSII の酸素発生機構の解明

本研究に於いて、25ns の MD シミュレーションを実行し、 $Mn_4O_5Ca$  近傍の水の分布を観察することが出来た。それらの分布から、実際に PSII に出は入りしている水を観察することが出来、それらの水が  $Mn_4O_5Ca$  で分解される水である可能性が有り、これらの水の軌跡を追うことにより、水の供給経路である可能性があることを示唆することが出来た。

### 4.2 生体膜の力場パラメータの改良

上記の結果から、実験値を反映して MD シミュレーションのパラメータを得ることが出来た。これらのパラメータは、実験値と比べて 15K 前後の誤差となり、実際にシミュレーションで用いられている 300K に於いては、脂質のコンフォメーションは実際のものと同様のものであると考えられる。これらのパラメータを用いて生体膜に埋もれた蛋白質のシミュレーションを行うと、既存のパラメータを用いた時よりも良い精度でシミュレーションを行うことが出来ることが期待できる。

### 4.3 生体系キノン化合物の酸化還元反応機構の解析

本研究ではグリシン酸化反応の反応機構を検討した。stepwise reaction と concerted reaction の 2 つの反応機構を検討した。concerted reaction はエネルギーの観点から反応進行が難しいと示唆された。stepwise reaction ではエネルギーの観点から、C5 に求核攻撃し、O5A にプロトン移動する可能性が高いことが示唆された。

## 5. 今後の計画・展望

### 5.1 光合成蛋白質 PSII の酸素発生機構の解明

現在の 25ns のシミュレーションのトラジェクトリを用いて、エネルギー移動の経路を観察することを考えている。もしも、25ns のシミュレーションで観察できない場合は、もう少し長いタイムスケールの MD シミュレーションを行い、解析を行うことを予定している。

### 5.1 生体膜の力場パラメータの改良

改良したパラメータを用いて、膜蛋白質と膜の相互作用を解析することを計画している。実際の生体膜を模倣した脂質二重膜のモデルを作成し、その脂質二重膜の温度に対する挙動に関して観察を行うことを計画している。

平成 26 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】

1. Ogata, K., Uchida, W., and Nakamura, S. All-atom Molecular Dynamic Simulation of Phospholipid Bilayer for Understanding in Atomic Details across Thermal Phases, *J. Phys. Chem. B.*, **118**, 14353-14365, 2014. (査読有)
  2. Yang, J., Hatakeyama, M., Ogata, K., Nakamura, S., and Li, C. A Theoretical Study on the Role of the IIA Metal Ions ( $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ) at the  $\text{S}_2$  State in Photosystem II S2. *J. Phys. Chem. B*, **118**, 14215-14222, 2014. (査読有)
  3. Uchida, W., Wakabayashi, M., Ikemoto, K., Nakano, M., Ohtani, H., and Nakamura, S. Mechanism of glycine oxidation catalyzed by pyrroloquinoline quinone in aqueous solution. *Chem. Phys. Lett.* **620** 13-18, 2015
- 
1. 緒方浩二、畠山允、打田和香、中村振一郎 第26回光合成学会（奈良）, 2014