

課題名 (タイトル) :

光合成膜蛋白質 PSII の MD シミュレーション

利用者氏名 : ○緒方 浩二, 打田 和香, 中田 浩弥, 由木 太一, 曾 旭
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
東京工業大学大学院 生命理工学研究科 生体分子機能工学専攻

College of Environmental Science and Engineering Tongji University, China

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、チラコイド膜に存在する 20 個のサブユニット (総分子量 350kDa) から成る複合体蛋白質で、光エネルギーを利用して水の酸化を行っている。その構造は X 線構造結晶解析で決定されており、Protein Data Bank(PDB)に公開されている。特に、2011 年の 3 月に公開された構造は、高い分解能で解かれおり、PSII の詳細な構造が明らかになった。

光エネルギーを利用した水の酸化反応は、PSII の内部にある Mn_4O_5Ca 錯体とその周りの残基の協調により、周期的な 5 つの状態 ($S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$) を経て行われる。具体的には、外部から PSII 内部に取り込まれた水分子が Mn_4O_5Ca 錯体によって酸化され、酸素分子とプロトン、電子に分解される。生成された酸素分子は PSII の外部に放出され、プロトンと電子はそれぞれ ATP 合成酵素とチトクロム b_6f に受け渡され、ATP と NADPH を生成する反応に使用される。この反応の分子レベルのメカニズムは未解明であり、今までに多くの実験や理論計算の研究が成されている。

そこで本研究は、PSII の動的挙動を、古典分子動力学シミュレーション (以下、MD シミュレーション) と量子化学計算、量子分子動力学シミュレーション (以下、QM/MD シミュレーション) を用いて観察することであり、次に示す 2 つのテーマに関して主に研究を行った。

(1) PSII の MD シミュレーション(2) QM 計算による Mn_4O_5Ca 錯体とその近傍の蛋白質が作る場と動的挙動の解析

下記にこれらテーマの詳細に関して述べる。

(1) PSII の MD シミュレーション

X 線で解かれた PSII 複合体を標的としている植物種のチラコイド膜を再現した 3D モデルの中に配置し MD シミュレーションを行う。このシミュレーションにより、水分子が取り込まれる経路と生成された酸素分子が排出される経路の解明を行う。また、水の酸化反応と PSII 全体の揺らぎとの関係についても解析することを考えている。この解析により水の酸化に間接的に貢献している残基など見つけだすことを考えている。

(2) QM による Mn_4O_5Ca 錯体とその近傍の蛋白質が作る場の解析

Mn_4O_5Ca クラスタは光合成の初期過程における水の酸化反応の重要な鍵となる。その水の酸化反応は周囲のタンパク質が基質である水や光エネルギーを Mn_4O_5Ca クラスタへ伝達することで非常に高効率に成し遂げられる。その水や光エネルギーが Mn_4O_5Ca クラスタへ至る伝達経路の正確な理解のために広大な範囲にわたる量子化学計算が必要である。我々は FMO を用いて水の酸化反応に関わる重要なコファクターやアミノ酸を明らかにすることを目指す。

さらに熱による動的なタンパク質の変化は水の酸化反応の効率に大きな影響を与える事が MD シミュレーションによって示唆された。そのタンパク質による動的な変化を、我々は QM/ MD 計算によって考慮して、 Mn_4O_5Ca クラスタの複数の電子状態解析をした。この手法によって得られた、電子状態や構造の変化を解析することで、水の酸化反応機構解明に関わる重要な知見を提出することを試みる。

2. 具体的な利用内容、計算方法

本研究のすべのテーマにおいて、PSII の立体構造は、PDB に登録されている分解能 1.9Å で解かれた構造(PDB-entry: 3ARC)を用いた。

(1) PSII の MD シミュレーション(緒方、由木、曾)

チラコイド膜上に配置した PSII の MD シミュレーションを行う準備として、チラコイド膜の 3D モデルを作成する必要がある。また、作成されたモデルの各原子に力場パラメータを割当てる必要がある。

チラコイド膜を構成している脂質の頭部は主に 4 種類 (MDGD, DGDG, SQDG, PG) あり、4 種類の組成は植物種によって異なっている。また、脂質の一部である二本の脂肪酸は、主に 6 種類存在し、同じ頭部で異なった脂肪酸を持つ脂質が 36 種類存在する。従って、チラコイド膜は合計 144 種類の脂質によって構成されている。それら 144 種類の脂質の 3D モデルの作成を行い、力場パラメータの割り当てを行った。力場パラメータは GAFF (General Amber Force Field)を用いた。また、各原子の電荷は、Gaussian09 を用いた B3LYP/6-31G(d)計算により求めた。更に、PSII の結晶構造に結合しているクロロフィルなど 9 種類の化合物に関しても同様の操作により、力場パラメータと電荷の割当を行った。

生成した 144 種類の脂質を用いて、チラコイド膜の 3D モデルの作成を行った。チラコイド膜の作成は、計算に用いる PSII 複合体の構造がシアノバクテリア由来のものであることから、シアノバクテリアのチラコイド膜の脂質の組成を再現した 3D モデルの作成を行った。更に、作成したチラコイド膜に PSII 二量体を配置させ、その系を覆うように水分子を配置した。これら一連の操作を自動的に行うプログラム開発も同時に行った。得られた PSII 複合体の系の MD シミュレーションは AMBER11 を用いて行った。

(2) QM 計算による Mn_4O_5Ca 錯体とその近傍の蛋白質が作る場の解析 (中田、打田)

本年度は主に広大な範囲に渡る量子化学計算を

実行する準備を行った。具体的には gaussian を用いて Broken-Symmetry法による非制限密度汎関数計算を用いて Mn_4O_5Ca クラスターの安定構造を求めた。交換相関汎関数として B3LYP を、基底関数として 6-31G(d)を用いた。その結果 3 つの酸化数が異なる構造異性体が S1 について得られた。それらの構造異性体の整合性を検証するため振動解析をおこない、FTIR スペクトルの実験結果と比較をした。

次に S1 の酸化数が異なる構造異性体にたいして、誘電率 4.0 の連続誘電体近似を用いて MD シミュレーションをおこなった。時間発展は Langevin 方程式を用いて、ただし摩擦係数を 10 (/ps)に、time step を 0.5 (fs)、そして温度を 300 (K) に設定した。

3. 結果

(1)PSII の MD シミュレーション(緒方、由木、曾)

脂肪酸の長さが異なる 4 種類の脂質、合計 144 種類の脂質に関して、3D モデルの作成を行い、GAFF のパラメータの割り振りを行った。また、Gaussian09 による B3LYP/6-31G(d)計算により得られた電荷の値を各原子に割当てることを行った。更に、PSII の結晶構造に結合している 9 種類の化合物の力場パラメータの割振りと電荷の付加を行った。我々のが作成した力場の精度を検証するために、クロロフィルに関して、我々の結果と先に報告されている PALENČÁR らの結果の比較を行った。その結果、電荷や原子間の結合長など PALENČÁR らの結果 (PALENČÁR, et al., *PHOTOSYNTHETICA*, **43**, 417-420, 2005)と相違ないことが確認できた。従って、我々が求めた力場は、MD シミュレーションで一般的に用いられている力場と同等の精度であることが確認された。

また、144 種類の脂質の 3D モデルを用いて、植物種が持つチラコイド膜のモデルを作成するシステムの開発を行った。開発したシステムにより、様々な植物種のチラコイド膜の 3D モデルを容易に作成することができ、チラコイド膜に存在する内在性膜蛋白質のシミュレーションを容易に実行できるようになった。このシステムを用いてシアノバクテリアの脂質の組成と同じチラコ

イド膜のモデルの作成を行った。

チラコイド膜に PSII の二量体を配置し、更に、周りを水分子で覆ったモデルの作成を行った。作成したモデルは約 30 万個の水を含む 120 万原子からなり、系の大きさは $275\text{\AA} \times 195\text{\AA} \times 220\text{\AA}$ となり、生体のシミュレーションとしては大きな系となった (図 1)。

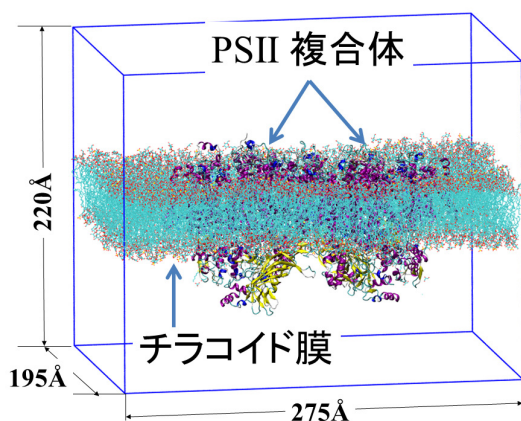


図 PSII のモデル

上記で示した系の MD シミュレーションを行った。シミュレーションは構造最適化の後、等温・等圧のもとで 2ns の平衡化シミュレーションを行い、そこから 1ns のシミュレーションを行った。1ns のシミュレーションから 50ps 毎のスナップショット、合計 200 個のスナップショットの解析を行った。スナップショットの解析の結果、PSII の外部から D1 ドメインに埋まっている $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ クラスターまでの水の排出経路を確認することが出来た。また、水の排出経路上に位置するアミノ酸残基の役割などについて観察を行った結果、活性に直接寄与している残基を確認することが出来た。更に、チラコイド膜と PSII 蛋白質の動きが協調していることが確認された。

(2)QM 計算による $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ 錯体とその近傍の蛋白質が作る場の解析 (中田、打田)

X 線を初期構造の構造最適化を行うことにより、4 つの Mn の酸化数が異なる 3 つの S1 状態の構造、 $\text{Mn}_4(\text{III,IV,IV,III})$ と $\text{Mn}_4(\text{IV,IV,III,III})$ 、 $\text{Mn}_4(\text{III,IV,III,IV})$ を得た。更に、S2 状態の構造を得るために、3 つの S1 状態の構造それぞれに対して、Mn(III)を Mn(IV)へ酸化させた 3 つの構造を得た。

それら得られた 3 つの S1 構造異性体のエネルギー

ギーダイアグラムを図 2 に示す。

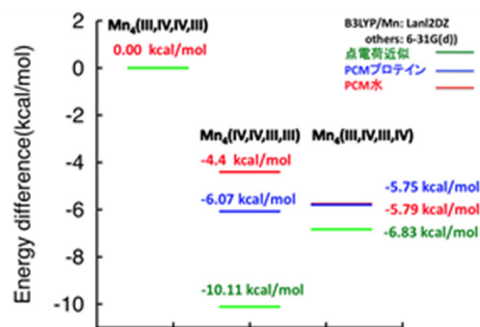
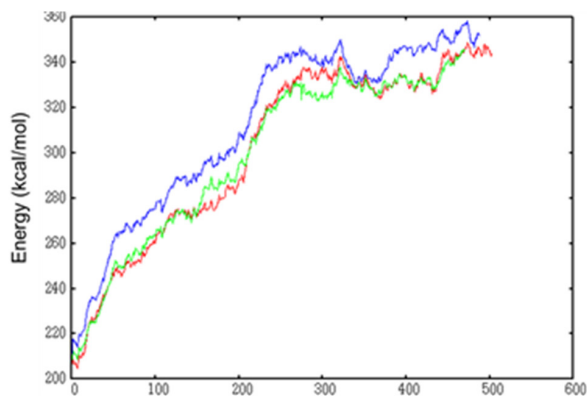


図 2)S1 の構造異性体エネルギーダイアグラム

図 2 において、周囲の場の効果を取り込む近似方法に依らず全ての方法で安定構造が得られ、さらにそれらの構造異性体の振動解析結果は IR の実験結果とよく対応していることが観察された。エネルギー差異を比較すると、3 つの Mn_4 のモデルの中で、 $\text{Mn}_4(\text{IV,IV,III,III})$ が最初のエネルギーを示している。しかし、その差は 10kcal/mol で、この値は周囲の構造変化や自由エネルギーを考慮することで大きく変動する値である。そのため、3 つの構造異性体の安定性を議論するためにはエントロピーの効果を含まない図 2 の結果は不十分である。

そこでエントロピーの効果を考慮するために、得られた酸化数が異なる S1 の構造異性体について、QM/MD シミュレーションを実行した。150fs 後の平衡化計算の後に 100fs (200 スナップショット)の解析を行った。解析の結果、時間発展後の平衡状態は、初期構造である安定構造と Mn の酸化数、および $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ クラスターの骨格について有意な差が見られなかった。しかし、MD シミュレーションによりエントロピーを考慮したところ、初期構造で観測された 10kcal/mol のエネルギー差は減少した。したがって、周囲の動的な変化が $\text{Mn}_4\text{O}_5\text{Ca}$ クラスターの安定性を評価するために必要不可欠であることを示唆している。



4. まとめ

研究において、チラコイド膜を構成している脂肪酸の長さが異なる 4 種類の脂質の力場の作成を行った。また、ターゲットとしている植物種と同じ脂質の組成を持つチラコイド膜のモデルを作成するシステムの開発を行った。更に、光合成の初期反応を司る PSII 蛋白質二量体をチラコイド膜に配置させたモデルの MD シミュレーションを行った。MD シミュレーションの結果、PSII 蛋白質が取り込む水の侵入・排出経路が分かった。また、PSII とチラコイド膜の相互作用の中心となっている残基を示すことが出来た。

また、QM/MD の方法においては、光合成タンパク質の計算は周囲のタンパク質場の効果をできる限り考慮しながら、初期構造と反応中間体の安定構造を求め、その解析を行った。光合成反応中心は周囲の柔軟なタンパク質場のために複数の反応中間体があり、我々はその可能な構造異性体を求め、振動計算や電子状態の解析を行った。こうして得られた光合成反応中間体の安定構造における周囲の場の効果を QM/MM や MD 計算および FMO を用いて解析するとより詳細な光合成のメカニズムが解明できると期待できる。

5. 今後の計画・展望

本研究の MD シミュレーションにおいては、チラコイド膜に内在する PSII の MD シミュレーションを行ったが、光合成に関わる PSII 以外の蛋白質に関して MD シミュレーションを行い、その挙動を観察することが出来る。また、チラコイド膜

に内在する蛋白質を生体膜に配置した場合のシミュレーションなどを行い、膜の組成が異なるシミュレーションを比較することにより、PSII などの脂質の選択性などを観察することが出来る可能性がある。

QM/MD シミュレーションに関しては、もっと長いタイムスケールのシミュレーションを行うことにより、今までに観察することが出来なかった水の酸化反応が観察できることが期待できる。また、QM/MD シミュレーションで得られた構造を全原子 MD シミュレーションで得られた構造に埋め込んで、更に、FMO を用いた大規模な領域にわたる量子化学計算を行い、 Mn_4O_5Ca クラスタと周囲の相互作用を明確にしていくことにより、光合成の反応メカニズムの解明に貢献できるものと考えられる。

6. RICC の継続利用を希望の場合は、これまで利用した状況（どの程度研究が進んだか、研究においてどこまで計算出来て、何が出来ていないか）や、継続して利用する際に行う具体的な内容

現在、チラコイド膜上に配置した PSII の MD シミュレーションにおいては、系が平衡に達してから 1ns、200 スナップショットの抽出が終了したところである。しかし、PSII とチラコイド膜と挙動の関係など観察する上で、このタイムスケールはとても短く、詳細な解析は困難である。また、QM/MD シミュレーションに関しても同様で、100fs のシミュレーションが終了しており、もっと長い時間のシミュレーションを行う必要がある。従って、もっと長いシミュレーションを行うために、RICC の継続利用が必要である。

平成 23 年度 RICC 利用研究成果リスト

【国際会議、学会などでの発表】

1. 中田 浩弥、畠山 允、横島 智、中村 振一郎 「水の酸化を触媒する 2 核 Mn 錯体の理論的研究」、2011 年生物物理学会年会、姫路、2011 年 9 月 17 日
2. 畠山 允、中田 浩弥、緒方 浩二、横島 智、中村 振一郎 「二核 Mn 錯体で触媒された酸素発生反応の理論的研究」、分子科学討論会 2011、札幌、2011 年 9 月 22 日
3. 中田 浩弥、畠山 允、横島 智、中村 振一郎 「水の酸化反応を触媒する 2 核 Mn 錯体の理論的研究」、2011 年物理学会秋季大会、富山、2011 年 9 月 23 日
4. 中田 浩弥、打田 和香、由木 太一、横島 智、松下 信之、中村 振一郎 「*o*-フェニレンジアミン Pt 錯体の理論的研究」、2011 年光化学討論会、宮崎、2011 年 9 月 8 日
5. 畠山 允、緒方 浩二、横島 智、中村 振一郎 「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」、第 25 回分子シミュレーション討論会、東京、2011 年 12 月 5 日
6. 打田 和香、木村 嘉朗、畠山 允、若林 政光、中田 浩弥、緒方 浩二、横島 智、中村 振一郎 「光合成膜タンパク質 PSII の Mn_4O_5Ca クラスターに熱ゆらぎを取り込んだ理論的研究」、第 25 回分子シミュレーション討論会、東京、2011 年 12 月 5 日