

課題名 (タイトル) :

光合成膜蛋白質 PSII と脂質二重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

本課題に於いて、我々は次の二つのテーマに関して研究を行った。

(1) 光合成の S1 状態に於ける水の供給、及び、排出経路の同定

(2) 脂質二重膜のシミュレーション

以下、それぞれのテーマの詳細を述べる。

(1) 光合成の S1 状態に於ける水の供給、及び、排出経路の同定

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) を持つ複合体蛋白質で、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 線構造結晶解析法で決定され、Protein Data Bank(PDB)上で公開されている (図 1)。

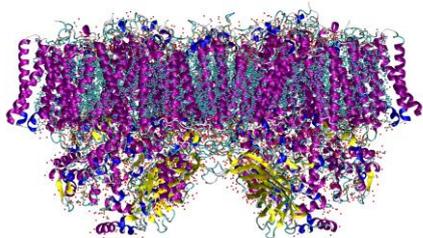


図 1 (a) 1.9Å で解かれた PSII の構造(Umena et al., *Nature*, **273**, 55, 2011).

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 クラスタと呼ばれる Mn_4O_5Ca 錯体と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。この時生成された

酸素分子は PSII の外部に放出される。また、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。これらの反応の詳細は未だ不明な点が多い。そこで計算機を用いて、我々の最初の試みとして水の排出経路と供給経路を同定することを目的とし、チラコイド膜に PSII を配置し、その分子動力学シミュレーションを行った。

(2) 脂質二重膜のシミュレーション

生体膜は二層の脂質が会合した脂質二重膜から成っている。生体の細胞膜の挙動を観察することは非常に困難である。従って、そのモデルケースとして単一の脂質から成る単一脂質二重膜の実験が盛んにおこなわれている。単一脂質二重膜の熱に対する挙動は実験的に観察されており、それらの相転移温度などが解明されている。しかし、単一脂質二重膜に於ける各相の原子レベルでの振舞いは解明されていない。従って、シミュレーションにより各相の原子レベルでの振舞いを観察することは、脂質二重膜の熱に対する揺らぎなどを理解する上で非常に有用である。我々は、DPPC と DPPE 二重膜に関して MD シミュレーションを行った。MD シミュレーションに於いては、温度を徐々に上げていき各相を動的な動きの解析を行い、すべての相での分子の動きなどの観察を行った。

2. 具体的な利用内容、計算方法

(1) 光合成の S1 状態に於ける水の供給、及び、排出経路の同定

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モデルに配置し、更に、それらを水のボックスの中に入れたモデルの作成を行った。系のサイ

ズは 275 Å×195 Å×225 Å であり、シミュレーションに於いては比較的大きなサイズである。

チラコイド膜のモデルは、約 30 種類の脂質から構成されている。これらの脂質の力場を作成するために、それぞれの脂質に対して 1000 個程度のコンフォメーションを MD シミュレーションにより発生させ、更に、量子化学計算を行い力場の作成を行った。また、PSII と結合しているリガンドに関しても力場の作成を行った。それらの力場を用いて、PSII 複合体とチラコイド膜からなるモデルの 10 ns の MD シミュレーションを行った。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た。

(2) 脂質二重膜のシミュレーション

DPPC または DPPE を xy-平面に 8×8×2 個並べた脂質二重膜のモデルの作成を行った。更に、4000 個弱の水分子を配置して、水和した脂質二重膜のモデルの作成を行った。

次に、作成された脂質二重膜のモデルの MD シミュレーションを行った。シミュレーションは 263 K の温度から始めて、10 ns 毎に 5 K ずつ温度を上昇させていき、418 K になるまで、合計 330 ns のシミュレーションを行った。

得られたトラジェクトリからシミュレーションにおける相転移温度を定めた。また、一つの脂質が脂質二重膜上に占める表面積の大きさ(A_L)やアルキル鎖のねじれ角がゴーシュ型を占める割合(R_F)などの解析により、sub 相転移温度や pre 相転移温度などの同定を行った。更に、各相における脂質のコンフォメーションの解析を行った。

3. 結果

(1) 光合成の S1 状態に於ける水の供給、及び、排出経路の同定

我々は、チラコイド膜に配置した PSII の MD シミュレーションから、今までに報告されていなかった新たな水の排出または供給経路を見出すことが出来た(図 2 中の Path2-2; Ogata et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 15670–15673, 2013)。この経路は PSII 外部からの距離が非常に短く、また、水の排出において、直接関与しているアミノ酸残基の同定を行うことが出来た。この水の排出経路を調整することが出来れば、

水の酸化反応の調整ができ、高活性の PSII 変異体を設計できる可能性がある。

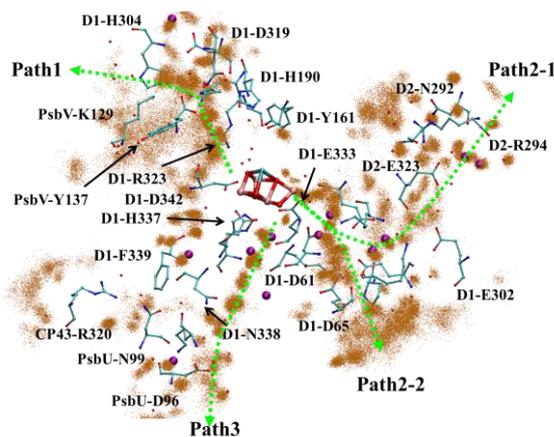


図 2 水の供給および排出経路

(2) 脂質二重膜のシミュレーション

DPPC のシミュレーションの結果、図 3 に示すように結晶(L_c)相→ゲル(L_β)相→液晶(L_α)相への変化を観察することが出来た。また、DPPE に関しては、結晶相→液晶相への変化を観察することが出来た。

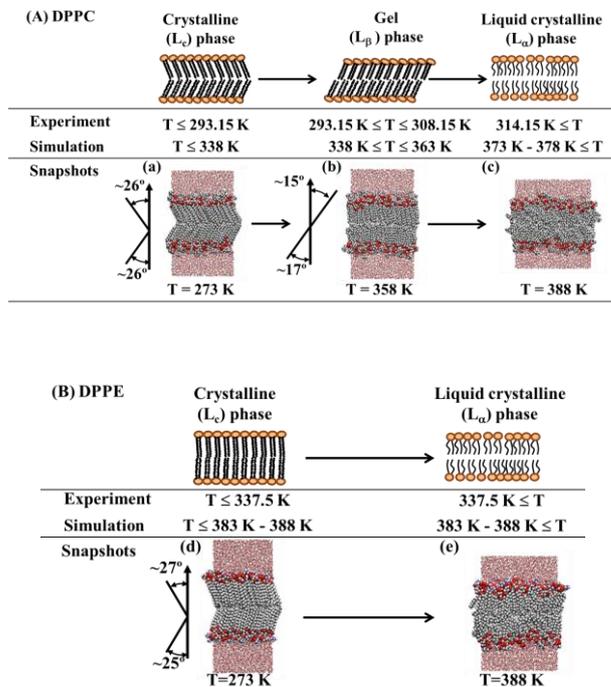


図 3 (A) DPPC と (B) DPPE の各相とその温度

図 4 に示すように A_L や R_F の温度に対する値からもシミュレーションに於ける主相転移温度を観察することができる。特に、差分のグラフから、主相転移点を表す明らかなピークを観察することが出来る。

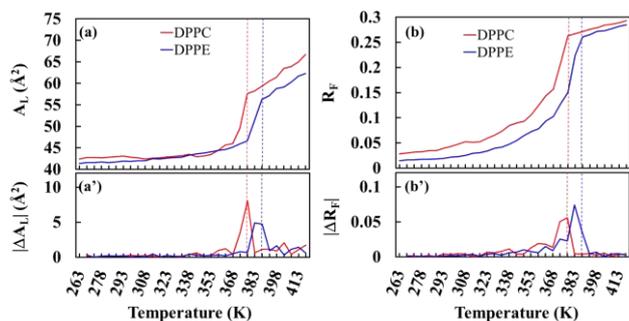


図 4 温度変化に対する(a) A_L と (b) R_F 、及び、それらの差分(a') $|\Delta A_L|$ と (b') $|\Delta R_F|$ のグラフ

図 5 は脂質の xy 平面に対する角度と上段と下段の脂質がなす角、更に、脂質同士が xy 平面上でのなす角を示している。

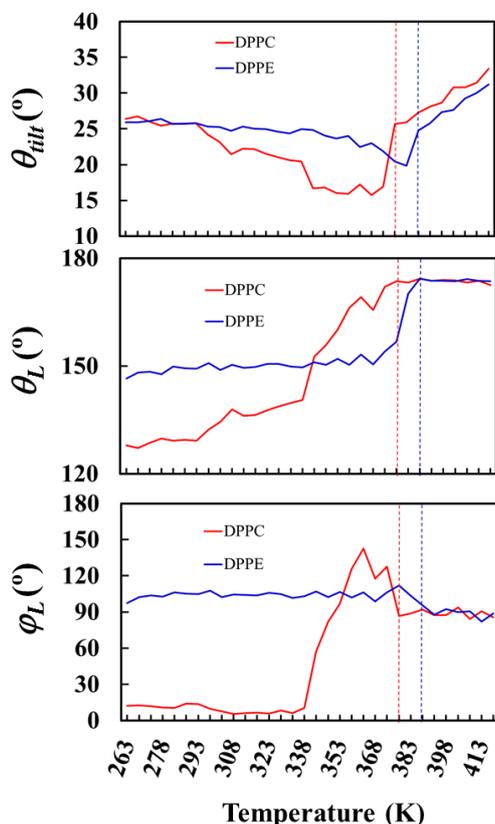


図 5 (a) 脂質の xy 平面の角と (b) 上段と下段の脂質の角度、(c) 上段と下段の脂質の xy 平面上でのなす角

これらのグラフを観察すると、DPPC に関しては 338 K でグラフが変化していることが観察される。また、338 K ~ 363 K, 363 K ~ 373 K でそれぞれ異なったグラフが観察される。これらの変化から、338 K と 363 K, 並びに 373 K をそれぞれ、sub, pre, main 相転移点に対応することが解った。また、DPPE に関して

は、383 K でグラフが変化していることが観察される。この温度が DPPE に於ける主相転移であることが解る。

図 6 は DPPC の xy 平面上での動きを表している。この図から液晶相では動きがほとんど無いことが解る。それに対して、ゲル相ではお互いに逆方向に動いていることが観察される。この動きは DPPE には観察されなかった。

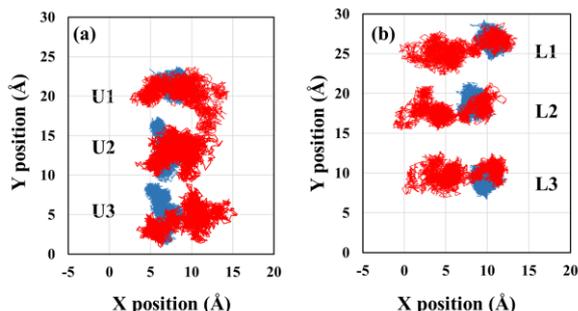


図 6 DPPC の結晶相と L_β 相の (a) 上段と (b) 下段の脂質の動き。U1~U3 と L1~L3 は上段と下段から無作為に選んだ脂質とその隣接している脂質を表している。青は液晶相、また、赤はゲル相での動きを表す。

また、DPPE には DPPC には存在するリップル (P_β) 相が観測されていないことから、この動きは DPPC がゲル相からリップル相への相転移を行う上で重要であると考えられる。そこで我々は、少し大きな系 ($18 \times 18 \times 2$) を用いて 313 K から温度を 5 度ずつ挙げた時に 363 K でリップル相のコンフォメーションを形成するか否かを確認するシミュレーションを行った。

図 7 は少し大きな相でのシミュレーションによるコンフォメーションを示している。この図から DPPC の脂質膜はリップル相のコンフォメーションと似たものが観察される。これは我々のシミュレーションに於いて 368 K でリップル相を再現出来たことを示している。このトラジェクトリを解析した結果、ゲル相において温度の上昇とともに DPPC が回転し、その後には並進運動が起こることが観察された。それと同時に脂肪酸部分が溶けた脂質が並進運動を止め、更に、周りの脂質がその脂質を押しことによりリップル相の構造が現れることが観察された(図 7)。従って、 L_β 相に於ける並進運動を、はゲル相からリップル相へ相転移を行う上で重要な動きであると考えら

れる。

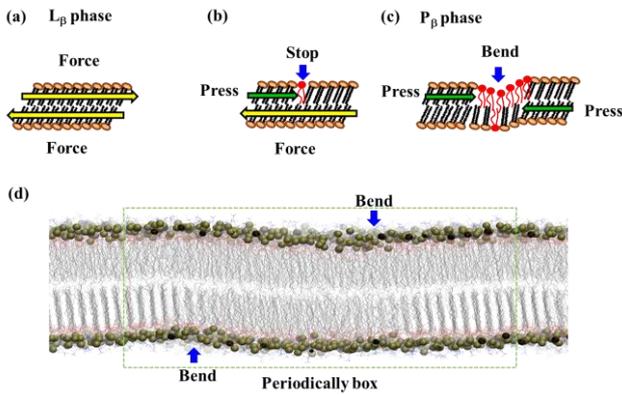


図 7 リップル相が起きるメカニズムの仮説

上記の仮説を検証するために結晶相→リップル相に温度を変化するようなゲル相がないシミュレーションを行った。それらの結果を図 8 に示す。

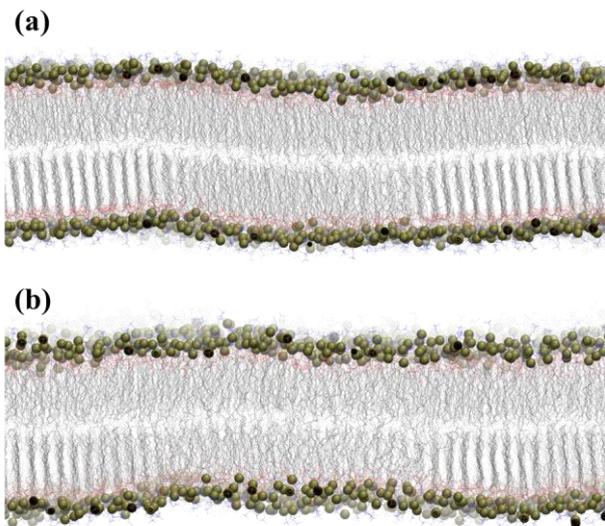


図 8 (a) 結晶相→ゲル相→リップル相と(b) 結晶相→リップル相のシミュレーション結果

図 8 から上記でも述べたように、ゲル相からリップル相に相転移を行ったシミュレーションはリップル相のコンフォメーションを取っているのが観察される。一方、結晶相からリップル相まで温度をいっきに上げたシミュレーションは図の上段の層にリップルの構造が観察されず、リップル相の構造にはならなかった。また、図 8 の(a)に於いては、脂肪酸が溶けた脂質の割合が 50%前後に対して、(b)のシミュレーションに於いては、脂肪酸が溶けた脂質の割合

が 80%前後になり、殆どの脂質が溶けた状態になっている。これらの結果から、リップル相の構造を作成するためにはゲル相の構造に於いて、図 7 に示すようにお互いに異なった方向に力が働く必要があることが考えられる。以上の結果は現在論文投稿中である。

3. まとめ

(1) 光合成の S1 状態に於ける水の供給、及び、排出経路の同定

我々は、チラコイド膜を再現したモデルに PSII 複合体を配置して MD シミュレーションを行った。その結果、今まで報告されていなかった水の供給、及び、排出経路を見出すことが出来た。また、プロトンと酸素の排出経路も同時に示唆することが出来た。

(2) 脂質二重膜のシミュレーション

我々は、DPPC と DPPE の単一脂質二重膜のシミュレーションに於いて、主相転移を観察することが出来た。DPPC に関しては、3 回の相転移、DPPE に関しては、1 回の相転移を観察することが出来、さらに、各相の構造を解析することが出来た。これらのシミュレーションで得られた脂質の構造が実験で想像されている各相に於ける構造と一致していることが確認された。

4. 今後の計画・展望

PSII 複合体の MD シミュレーションに関しては、もう少し長い時間のシミュレーションを行い、複合体の動きの相関や各サブユニットの動きの相関、更に、PSII とリガンドや水との相関などの解析を行う。

脂質の MD シミュレーションに関しては、色々な脂質の力場を作成し、実際の細胞膜を模倣したモデルのシミュレーションを行う。それらのシミュレーションにより、水や酸素などの小分子の細胞膜の透過性などを観察することを考えている。

【論文、学会報告・雑誌などの論文発表】

Ogata, K., Yuki, T., Hatakeyama, M., Uchida, W., Nakamura, S. All-Atom molecular dynamics simulation of photosystem II embedded in thylakoid membrane. *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 15670–15673, 2013.