

課題名 (タイトル) :

光合成および光合成模倣系における水分解活性構造の解明

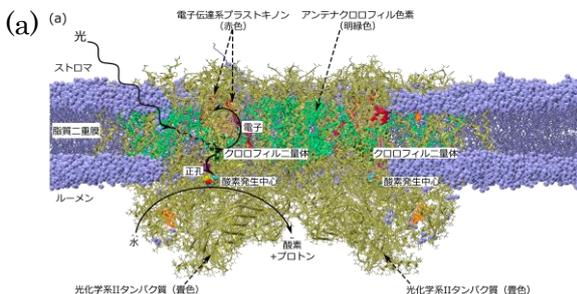
利用者氏名 : ○畠山 允, 王元庆, 栗田 康夫

所属 : 和光研究所 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

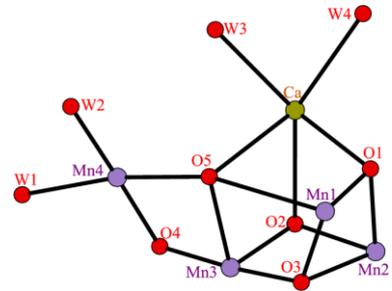
1. 本課題の研究の背景、目的、関係するプロジェクトとの関係

石油をはじめとした化石燃料の枯渇が予想される中、再生可能エネルギーの利用法開拓が近年期待されている。この観点から我々は、(I) 植物や一部細菌が行う天然光合成の機構解明およびそれに基づいた人工光合成系の開発、(II) 天然光合成に倣い Mn を触媒とした人工水分解系の機構解明に取り組んできた。

課題(I) “天然光合成の機構解明” では、水分解・酸素発生過程 (図 1-(a)) に注目し、電圧印加を必要とする現行の人工光合成とその水分解電極反応への示唆を検討してきた。特に、光合成タンパクが内包する水分解触媒  $Mn_4Ca$  クラスタ (図 1-(b)) に注目し、実験研究から報告されてきた断片情報と対応するクラスタ立体構造を量子化学計算から探索してきた。これまでの RICC 一般利用から、水分解過程で  $Mn_4Ca$  クラスタが経由する 5 つの酸化状態  $S_i$  ( $i=0-4$ 、添字は光酸化色素から受容した酸化当量、図 1-(c) 参照) のうち安定状態  $S_1$  と中間状態  $S_2$ 、 $S_0$  の解析を終えた。本申請課題では、 $Mn_4Ca$  クラスタ  $S_3$  状態の構造の解明に取り組んだ。EXAFS 分光から隣接 Mn 間の距離が 2.7-2.8 Å と示唆されており、対応するクラスタ立体構造の解明が待たれている。 $Mn_4Ca$  クラスタ  $S_3$  状態の構造解明によって、人工光合成と関連して、複数回酸化可能な触媒の設計およびその安定化指針が期待される。



(b)



(c)

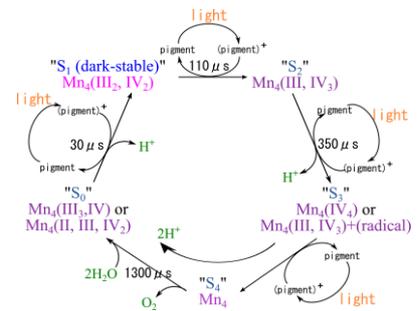


図 1. (a) 天然光合成-水分解反応を駆動する膜タンパク模式図 (c)  $Mn_4Ca$  クラスタの結晶構造 (c) 水分解過程における  $Mn_4Ca$  クラスタの状態変化

課題(II) “Mn を触媒とした人工水分解系の機構解明” では、 $\delta$ - $MnO_2$  酸化物に触媒された水分解・酸素発生反応の解明に取り組んだ。 $\delta$ - $MnO_2$  酸化物は、水分解-電極反応の電極として機能する事が近年報告され、安価な水分解素子として注目されている (T. Takashima, *et al.*, *JACS*, **2012**, *134*, 1519)。またその電極反応は、必要最小電圧が pH や添加塩基剤の種類によって変化する為、必要電圧をより小さくする添加剤が期待されている。本申請課題では、上記水分解反応の機構解明を通して新規添加剤探索を試みる。具体的には、反応電圧の pH 依存性の原因として Mn 酸化・還元と配位水脱プロトン化の連動に注目し、プロトン連動型 Mn 酸化のエネルギー変化が添加塩基剤に依存するか解析する。

本課題では次の 2 つの課題の解決を目的とし

た；(1) 天然光合成の水分解過程でその触媒  $Mn_4Ca$  クラスタが経由する 5 つの状態の内、中間状態  $S_3$  における立体構造を予測する。EXAFS 分光結果 ( $S_3$  状態における Mn-Mn 距離；2.7-2.8Å) を満足するクラスタ構造を解明し、合わせて安定状態  $S_1$  の構造との違いを解析する。(2)  $MnO_2$  酸化物における Mn 酸化・還元過程のモデルとして、2-4 個の Mn から成る小規模 MnO クラスタを検討し、Mn 間電子移動の遷移状態に Mn 配位水脱プロトン化が寄与する程度を解析する。 $MnO_2$  酸化の実験結果を踏まえ、Mn(II) から Mn(IV) への電子移動を解析した。実験を参考に Pyridine 等の添加塩基剤を変え、塩基性増大に伴って Mn 酸化の活性障壁が低下するか解析する。

## 2. 具体的な利用内容、計算方法

目的 (1) “天然水分解触媒  $Mn_4$  クラスタの中間状態  $S_3$  の解明” については、まず  $Mn_4Ca$  クラスタが 2.7-2.8Å の Mn-Mn ペアで構成されるか検討する為に、クラスタとその配位子をタンパク結晶構造から切り出し、切り出し部の拘束無しに完全に構造最適化した。最適化は DFT 計算で行い、その初期電子には  $\alpha$  スピンを  $\beta$  スピンより 12 個多くとって以下実験事実を考慮した；(i)  $Mn_4Ca$  クラスタ- $S_3$  状態における Mn 酸化数の XANES 分光結果 ( $Mn_4(III, IV_3)$  と非 Mn ラジカル、ないし  $Mn_4(IV_4)$ )、(ii) Mn(III/IV) 単体では一般的に、3d 電子がスピン並行で安定。多核クラスタ内の Mn 間スピン配向は、DFT 計算におけるスピンコンタミネーションを避ける為に、各 3d スピンを全てスピン並行とした。 $S_2 \rightarrow S_3$  状態遷移によって水基質が脱プロトン化する実験事実 (図 1-(c)) をふまえ、金属配位水 (図 1-(b)、W1-W4) は  $H_2O$  と OH の 2 種を考慮した。含有 OH の総数には、 $Mn_4Ca$  クラスタ- $S_2$  状態の 2 種の先行研究 (Mn 配位水 1 つが OH の物と OH 全く含まない物) を考慮し、OH を 1 つないし 2 つ含むモデルの 2 つを考慮した。

切り出しモデルの完全最適化構造とタンパク場のすり合わせには QM(DFT)/MM(Amber) を用い、2.7-2.8Å の Mn-Mn から成るクラスタがタ

ンパク場において保持されるか検討した。 $CaMn_4O_5$  クラスタ触媒から半径 40Å 以内のタンパク構造を Gaussian の ONIOM-QM(DFT)/MM(Amber) を用いて最適化する。 $Mn_4Ca$  クラスタと第一配位圏(原子数:約 130、基底関数:約 1200) を QM 領域とし、更に外縁(原子数:約 32,000) を MM 領域とした。

目的 (2) “ $MnO_2$  酸化物における Mn 酸化過程と配位水連動の解明” については、1 個の Mn(II) と 3 個の Mn(IV) から成る  $Mn_4O_4$  立方体を用い、Mn(II) から Mn(IV) への電子移動をモデル化した。 $Mn_4O_4$  立方体では Mn と O が密に並び、Mn(II) ないし Mn(III) の反結合性 3d 軌道による Mn-O の伸長が抑制され、電子移動前後でクラスタ構造が保持された。その為、 $MnO_2$  固体における電子移動のモデルとして考慮した。 $MnO_2$  固体では Mn は六配位環境にある為、 $Mn_4O_4$  立方体も  $H_2O$ 、OH および Pyridine 様塩基を加えて Mn 六配位と電荷中性を考慮した (図 2)。その構造は DFT-TPSSH で最適化し、Mn 価数は Mulliken' s spin population 解析で求めた。

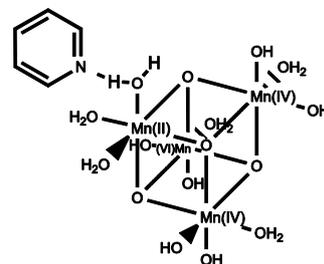


図 2. プロトン連動型電子移動の解析モデル

## 3. 結果

$Mn_4Ca$  クラスタ- $S_3$  状態における構造のモデルとして、タンパクから切り出したクラスタの完全最適化構造を図 3 に示した。図 3-(A) の構造では所謂ダングリング Mn (図 3-(A) の Mn4) の配位水 W1 が OH であり、また各 Mn-Mn ペア距離は 2.7-2.8Å となって EXAFS 実験結果を満足した。各 Mn-Mn ペアはオキソ酸素 2 つで架橋されており (Mn1-Mn2 は O1 と O2、Mn1-Mn3 は O3 と O5、Mn2-Mn3 は O2 と O3、Mn3-Mn4 は O4 と O5)、2.7-2.8Å 距離の Mn-Mn に典型的な di- $\mu$ -oxo 架橋構造となった。Mn 配位水 W2 が OH の構造 (図 3-(B)) においても、Mn1-Mn2、

Mn2-Mn3、Mn3-Mn4 は 2.7-2.8Å 距離を示したが、Mn1-Mn3 は 2.9Å と僅かに長くなった。

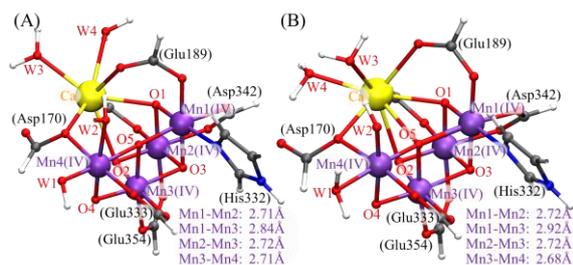


図 3. Mn<sub>4</sub>Ca クラスタース<sub>3</sub> 状態の切り出しモデル； (A) 配位数 W1 が OH<sup>-</sup> (B) W2 が OH<sup>-</sup>

次に、Ca 配位水 W3 や W4 が OH<sup>-</sup> のクラスタ一構造は EXAFS 実験結果を満足しない事が分かった。W3 が OH<sup>-</sup> の構造(図 4-(A))では Mn3-Mn4 が 3.2Å と長くなった。これは、W3-OH<sup>-</sup> が最適化中に Mn4 に接近・配位し、その代わりに Mn3-Mn4 間の O5 架橋が解けた為である。W4 が OH<sup>-</sup> の構造 (図 4-(B)) では Mn1-Mn3 距離が 3.1 Å となった。これは、W4-OH<sup>-</sup> が構造最適化中に Mn1 を 1 電子還元し、Mn(III)となった Mn1 が Jahn-Teller 歪みを Mn1-O5 間に示した為である。以上の結果から、Ca 配位水 W3 ないし W4 が OH<sup>-</sup> のモデルは以降の QM/MM 計算から非検討とした。

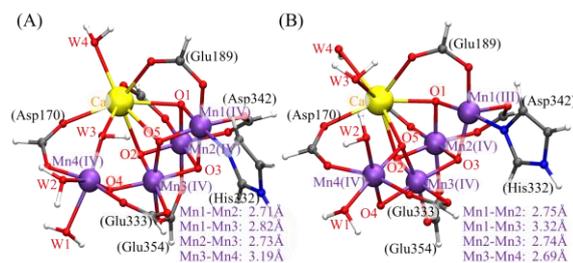


図 4. Mn<sub>4</sub>Ca クラスタース<sub>3</sub> 状態の切り出しモデル； (A) 配位数 W3 が OH<sup>-</sup> (B) W4 が OH<sup>-</sup>

OH<sup>-</sup> を 2 つ含む S<sub>3</sub> 状態モデルとして、まず W1 と W2 が OH<sup>-</sup> の場合の切り出し構造を図 5-(A)に示した。得られた Mn-Mn 距離は 2.7-2.8Å であり、W1 のみが OH<sup>-</sup> の構造 (図 3-(A)) と同様、EXAFS と対応する結果であった。これらの結果から、S<sub>3</sub> 状態の EXAFS に対応するクラスタ一立体構造では W1 が OH<sup>-</sup> である事が示唆された。一方で W2、W3、W4 の何れかが OH<sup>-</sup> の構造 (図 5-(B)、-(C)、-(D)、-(E)) では、W3 ないし W4

の 1 つが OH<sup>-</sup> の構造 (図 4-(A)、-(B)) と同様に、歪んだ Mn<sub>4</sub>Ca クラスタ一と 3Å 以上に伸びた Mn-Mn ペアを示し、EXAFS と対応しない結果となった。

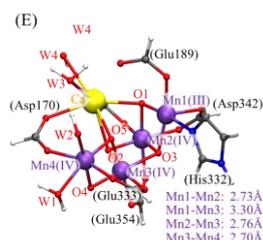
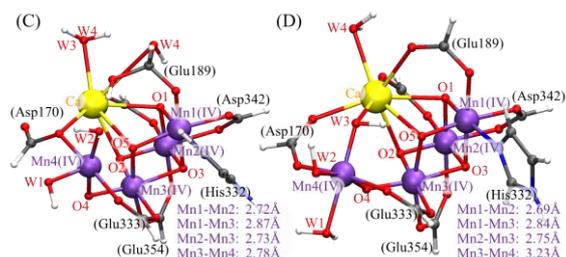
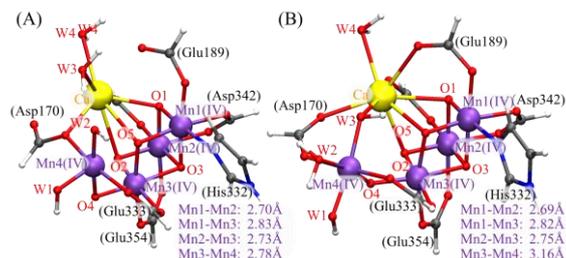


図 5. Mn<sub>4</sub>Ca クラスタース<sub>3</sub> 状態の切り出しモデル； (A) W1 と W2 が OH<sup>-</sup> (B) W1 と W3 が OH<sup>-</sup> (C) W1 と W4 が OH<sup>-</sup> (D) W2 と W3 が OH<sup>-</sup> (E) W2 と W4 が OH<sup>-</sup>

以上の Mn<sub>4</sub>Ca クラスタ一切り出しモデルとタンパク場のすり合わせ、及び QM/MM 構造最適化は現在進行中である。最適化済みの構造として、W1 と W2 が OH<sup>-</sup> の QM/MM 構造に注目すると、Mn1-Mn3 と Mn3-Mn4 距離が 2.9Å と僅かに長くなっていた。これは、Mn<sub>4</sub>Ca クラスタ一が周辺タンパク場に引かれ、膨張した為であった。MM 領域としたタンパク場の原子座標は安定状態 S<sub>1</sub> の結晶構造に固定しており、S<sub>1</sub> における Mn<sub>4</sub>Ca クラスタ一 (Mn<sub>4</sub>(III<sub>2</sub>IV<sub>2</sub>)酸化状態と Mn(III)の Jahn-Teller 歪みを示す) に対応した形となっている。その為タンパク場は、切り出しモデル由来で Mn<sub>4</sub>(IV<sub>4</sub>)酸化状態の Mn<sub>4</sub>Ca クラスタ一に対して、消失した Jahn-Teller 歪み分の隙間を埋めるようにクラスタ一をタンパク側へ引

き寄せると考えられる。

$Mn_4O_4$  立方体で得られた  $Mn_4(II,IV_3)$  状態から  $Mn_4(III_3,IV)$  状態への自由エネルギー変化を図 6 に示した。始状態  $Mn_4(II,IV_3)$  と遷移状態のエネルギー差は  $pKa$  の大きい塩基を含むモデル程小さくなった。この傾向は、添加塩基の  $pKa$  が大きい程  $Mn$  酸化に必要な電圧が小さくすんだ実験事実とも対応する。現在、 $MnO$  モデルサイズを拡張した系を用いて、 $Mn$  間電子移動の傾向を同様に解析中である。

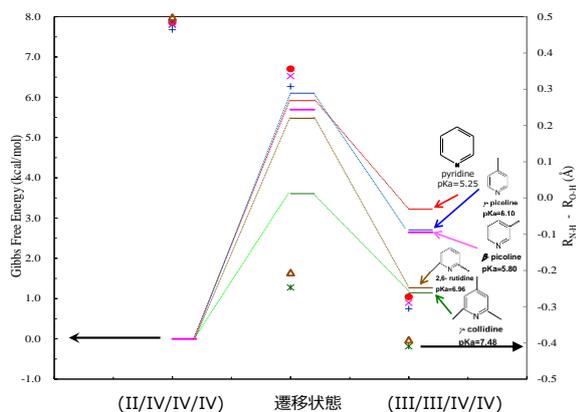


図 6.  $Mn_4O_4$  クラスタにおける  $Mn$  間電子移動の自由エネルギー変化と添加塩基依存性

#### 4. まとめ

天然光合成の水分解触媒  $Mn_4Ca$  クラスタについて、中間状態  $S_3$  におけるクラスタ立体構造を量子化学計算と既知 EXAFS 分光結果に基づいて予測した。 $S_3$  状態  $Mn$ - $Mn$  距離の EXAFS 分光結果 (2.7-2.8Å) を満足するクラスタ立体構造は、クラスタ外側に伸びた  $Mn$  配位水  $W1$  が  $OH^-$  のモデルで得られた。しかし、 $W1$  に加えて  $Ca$  配位水  $W3$  ないし  $W4$  も  $OH^-$  のモデルでは、EXAFS に対応しない歪んだクラスタ構造が得られた。これらの結果から、 $S_3$  状態に至る過程で脱プロトン化された反応基質として、 $Mn$  配位水  $W1$  が示唆される一方、 $Ca$  配位水の可能性は低い事が示唆された。タンパク場の立体拘束を考慮した  $QM/MM$  構造最適化は現在進行中であるが、小規模モデル計算と同様の傾向が確認されている。

#### 5. 今後の計画・展望

水分解触媒  $Mn_4Ca$  クラスタ  $S_3$  状態の立体構造について、切り出しモデルと  $QM/MM$  最適化構造の結果を成果報告してゆく。クラスタ最適化構造が  $S_3$  状態の EXAFS 分光結果と対応する条件として、クラスタ外縁に伸びた  $Mn$  配位水  $W1$  が  $OH^-$  である事が示唆された為、その検証計算を行う。具体的には、タンパク内色素の光酸化後にクラスタが  $S_2 \rightarrow S_3$  状態遷移する猶予期間に注目し、光酸化色素由来の正孔が  $S_2$  状態クラスタ付近に滞在した段階で  $W1$  が自発的に脱プロトン化するか検討する。正孔蓄積サイトには、光酸化色素から  $Mn_4Ca$  クラスタへ正孔移動を中継する Tyrosine160 を考慮する。これら  $S_3$  状態モデルの検証と並行して、水分解直前の  $S_4$  状態における  $Mn_4Ca$  クラスタ構造解明にも取り組む。