

研究報告書

「光反応中心・光受容体蛋白質における光反応の分子制御」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成21年10月～平成25年3月

研究者: 石北 央

1. 研究のねらい

「地上に降り注ぐ太陽光から有益なエネルギー源となる物質を生産する」という人工光合成の実現は、光化学系II (Photosystem II, PSII)の立体構造解明により、ますます現実味を帯びてきた。分子構造がわかれば原子間相互作用が推測でき、その分子が関わる化学反応解析も大きく進展する。本研究では、PSII結晶構造に理論化学的手法を適用することで、PSII水分解・酸素発生反応機構の解明に取り組む。この反応の仕組みがPSII蛋白質分子から抽出できれば、人工光合成の系を考える際の「さらに、何の視点が加われればもっと効率良く反応が進む系を構築できるのだろうか?」という、正しいストラテジーを明示することができるはずである。本研究の目指すところは、 Mn_4CaO_5 を取り囲むPSII蛋白質環境場を「 Mn_4Ca の関わる水分解反応を引き出すために適切に配置された場である」と解し、蛋白質環境の設計思想から、水分解反応に求められる条件を見出すことにある。

2. 研究成果

(1) 概要

酸素発生を行う蛋白質 photosystem II (PSII)での水分解反応機構を明らかにするため、蛋白質結晶構造に基づき分子化学・理論化学の立場で解析を行った。PSII蛋白質の解析だけでは困難な場合は、解析しやすい蛋白質をモデル蛋白質として取り上げ(例 プロトン移動現象解析に関して bacteriorhodopsin, photoactive yellow protein 等)、あわせて解析を行った。

(2) 詳細

光だけで水を酸素に分解する光合成膜蛋白質の反応機構: 「対称に隠れた非対称」Photosystem II(PSII)は、太陽光エネルギーを利用し、水分子から酸素を作り出す。この反応は、相同性が高いD1, D2という2つの蛋白質に埋め込まれた2分子のクロロフィル P_{D1} , P_{D2} の光励起反応から始まる。 P_{D1} , P_{D2} は2量体 $[P_{D1}, P_{D2}]$ として振る舞い、光を受けると一つの正電荷(+1)が生じて $[P_{D1}, P_{D2}]^+$ となる。この $[P_{D1}, P_{D2}]^+$ は非常に強い酸化力を持っており、究極的に水から電子を奪って、酸素に変える役割を果たしている。分光測定によれば、 $[P_{D1}, P_{D2}]^+$ は実際のところ8割の正電荷(+0.8)が P_{D1} 上に、残り2割(+0.2)が P_{D2} 上に「非対称」に分布した状態であることが知られている。D1側では金属性の Mn_4Ca を保持するため負電荷を帯びた酸性アミノ酸残基が多く分布する。一方、対するD2側は、中性・塩基性アミノ酸残基であることが多い。計算では、そういったD1, D2でアミノ酸が保存されていない箇所が中心となりPSII蛋白質内において P_{D1}^+ を(P_{D2}^+ に対して)安定化させていた。

- Keisuke Saito, Toyokazu Ishida, Miwa Sugiura, Keisuke Kawakami, Yasufumi Umena, Nobuo Kamiya, Jian-Ren Shen, and **Hiroshi Ishikita***
J. Am. Chem. Soc. **133** (2011) 14379-14388. "Distribution of the cationic state over the chlorophyll pair of photosystem II reaction center"
- Keisuke Saito and **Hiroshi Ishikita***
Biophys. J. **101** (2011) 2018-2025. "Cationic state distribution over the P700 chlorophyll pair in Photosystem I"
- Keisuke Saito, Jian-Ren Shen, and **Hiroshi Ishikita***
Biochim. Biophys. Acta **1817 (Bioenergetics)** (2012) 1191-1195 "Cationic state distribution over the chlorophyll α -containing P_{D1}/P_{D2} pair in photosystem II"
- Keisuke Saito, Jian-Ren Shen, and **Hiroshi Ishikita***
Biophys. J. **102** (2012) 2634-2640 "Influence of the axial ligand on the cationic properties of the chlorophyll pair in photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*"

なお、クロロフィル分子の形状(歪み)は結晶中の各部位において特徴的であるが、カチオンの分布には、上述の蛋白質静電場に比べれば寄与は小さかった。

- Keisuke Saito, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen, Nobuo Kamiya, and **Hiroshi Ishikita***
Biochemistry **51** (2012) 4290-4299 "Deformation of chlorin rings in the photosystem II crystal structure"

電子移動経路. 複数のコファクターによって構成される電子移動経路が蛋白質環境から受ける寄与を解析するため、フラビン蛋白質をモデル蛋白質として解析を行った。基質結合によって、活性部位構造が変化⇔電子移動を誘起する反応機構を解明した。

- **Hiroshi Ishikita***, Bryan T. Eger, Ken Okamoto, Takeshi Nishino, and Emil F. Pai
J. Am. Chem. Soc. **134** (2012) 999-1009. "Protein conformational gating of enzymatic activity in xanthine oxidoreductase"

PSIIの活性部位近傍に存在するTyrZの水素結合. PSIIの酸素発生部位Mn₄CaO₅上の水分子から電子を引きぬくD1-Tyr161 (TyrZ)は、D1-His190 と水素結合を形成している(proton "rocking" model)。PSII結晶構造では驚くことに、水素結合距離O_{TyrZ}-N_{His190}は2.46 Åである。この長さは、フェノール・イミダゾール化合物の最適化構造で見られる水素結合距離~2.8 Åと比べると、異常に短い。しかし、PSII蛋白質環境下QM/MM構造最適化を行ったところ、O_{TyrZ}-N_{His190}は2.47 Åとなり、結晶構造の結合長を再現した。その水素結合ポテンシャルを解析したところ、左右対称な形を持つsingle-well (ionic) H bondのものであった。これはTyrZとHisが同じ強さでHを引く、すなわち両者のpK_aがほぼ一致するために起こる現象である。

- Keisuke Saito, Jian-Ren Shen, Toyokazu Ishida, and **Hiroshi Ishikita***

Biochemistry 50 (2011) 9836-9844. "Short hydrogen-bond between redox-active tyrosine Yz and D1-His190 in the photosystem II crystal structure"

この現象を理解するため、「低障壁水素結合」についてモデル蛋白質を用いてあわせて検証を行った。

- Keisuke Saito and Hiroshi Ishikita*
Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 109 (2012) 167-172. [Direct Submission, Edited by A. Fersht] "Energetics of short hydrogen bonds in photoactive yellow protein"
- Keisuke Saito and Hiroshi Ishikita*
Biochemistry 51 (2012) 1171-1177. "H atom positions and nuclear magnetic resonance chemical shifts of short H bonds in photoactive yellow protein"

蛋白質中の水分子D₂OのO-D stretching frequency計算

bacteriorhodopsin(BR)は光励起を利用してプロトンポンプ(プロトン移動)として機能する。一方、*Anabaena* sensory rhodopsin(ASR)は、アミノ酸相同性が高いにもかかわらず、プロトンポンプとして機能しない。FTIR測定の結果、蛋白質中で最も水素結合が強い水のO-D stretchingが、BRの場合は2200 cm⁻¹と強いのに対し、ASRの場合は>2500 cm⁻¹であることがわかっている。BRとASRのプロトンポンプ能の有無に対応していると思われる。私たちはD₂OのO-D stretchの波数を計算し、なぜBRとASRで対応する水の水素結合強度が大きく異なっているのか、その理由を明らかにした。

- Keisuke Saito, Hideki Kandori, and Hiroshi Ishikita*
J. Biol. Chem. 287 (2012) 34009- 34018 "Factors that differentiate the H-bond strengths of water near the Schiff bases in bacteriorhodopsin and *Anabaena* sensory rhodopsin"

3. 今後の展開

本研究では、蛋白質内におけるプロトン移動を水素結合という基礎的な要素から着実に理解することができた。また、プロトン移動の解析に対してどうアプローチすれば良いかの知見を十分に得ることができた。今後は、より複雑な、「Mn₄Caクラスター部位を含んだプロトン移動」すなわち「水分解反応機構」を解明すべく、1)本研究成果として得られたプロトン移動パス候補の機能検証、2)他にもパスの候補として挙げられている部位の検証、3)それぞれのパスの特性・個性、以上を明らかにしていきたい。また、肝心の水分解部位Mn₄Caクラスターの計算も行うことで、パスとMn₄Caクラスターのどの部位とが直接リンクしているのかも明らかにしたい。Mn₄Caクラスターの酸化状態変化とその際のプロトン移動に使われるパスとのリンクがはっきりすれば、水分解反応機構解明における大きな一歩となる。このような個性的なアプローチにより、世界に先駆けて水分解反応機構の解明に挑む。

4. 自己評価

本さきがけ研究期間では、当初念頭にあった解析手法にとどまらず、必要があれば新しい手法も次々と取り入れていった。また、Photosystem IIだけにとどまらず、bacteriorhodopsinや



photoactive yellow proteinといった他の小さな蛋白質をモデル蛋白質としてとらえ、効率よく(=計算時間が早い、Photosystem IIに比べて複雑ではないので結果が解釈しやすい、等)水素結合、プロトン移動を解析できたことが大きく役だった。前者では水素結合の振動分光データの解釈や計算手法、水素結合ポテンシャルの解釈に関する経験値を増やせし、後者においては¹H-NMRや水素結合長と水素結合の強度との関連、低障壁水素結合の化学等を非常に深く学ぶことができた。また、これだけにとどまらず、両蛋白質の分野においても新たな重要な発見をすることができた。

これらの研究が果たしてさきがけ研究とどう関連するのか、周囲にはあまり理解してもらえなかったかもしれず、実際大変苦悩した時期もあったが、しかし研究総括は私を信じて自由に研究をやらせてくださった。そのおかげで、最後の最後になって、やっと花開くこととなった。最終年2013年になって立て続けに発表することができた二つのPNAS(米科学アカデミー紀要)の論文はPhotosystem IIのプロトン移動について新たに解明した反応機構に関する論文であり、これらの論文は、今までPhotosystem II以外の他の蛋白質で行ってきた「礎」的な研究がなければ、存在し得なかった。もし私がPhotosystem IIの研究だけをしていたとしたら、これらの点には興味すらわかなかつたかもしれない。こういった新たな箇所をついた結果の研究成果である。

ちょうど準備が整って、花も開き始めたこの時期にさきがけ研究期間自体は終了してしまうので、時間不足の感がどうしてもぬぐいきれないが、Photosystem IIのプロトン移動の研究に関して、申請時の予想を遙かに上回る高いレベルまで到達することができたと確信する。このさきがけ研究領域に参加できて本当に良かった。

5. 研究総括の見解

自然の不思議を「学び」、「理解する」研究姿勢、研究努力から得られる人類智としての研究成果は、その及ぼす波及効果は計り知れず、特に天然の光合成に学び、触発されて人工的な系、人工光合成を実現しようとする研究努力とは重層的に密接不可分の関係にある。石北博士は、自然を理解する視点を中心に、解析された実際の蛋白質結晶構造に基づいて理論化学の研究手法により、分子科学の立場から主に蛋白質集合体が発現する機能の解明に取り組んでいる。さきがけ研究では、光合成膜蛋白質、PSIIが発現する、電荷分離、水酸化の分子過程、水素結合ネットワークとプロトン移動等への取り組みと共に、他の蛋白質中における水素結合挙動の理解にも幅広く取り組んで研究を進めた。研究開始直後からPSII電荷分離状態の解析について実験事実と符合する瞠目すべき解釈を得ている。PSII以外の蛋白質中の水素結合挙動の解釈についても独自の視点で理解をすすめ、それらの基礎の上にPSII蛋白質中の水素結合挙動、プロトン移動挙動、など次々と研究成果を上げたことは高く評価される。その真摯な研究姿勢、研究成果が他のさきがけ研究者に大きいインパクトを与えた点も高く評価したい。今後の研究進展には大いに期待が持てる。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Keisuke Saito, A. William Rutherford, and Hiroshi Ishikita* “Mechanism of proton-coupled quinone reduction in Photosystem II” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* in press



2. Keisuke Saito, A. William Rutherford, and <u>Hiroshi Ishikita</u> * “Mechanism of proton-coupled quinone reduction in Photosystem II” <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 110 (2013) 954-959
3. Keisuke Saito, Hideki Kandori, and <u>Hiroshi Ishikita</u> * “Factors that differentiate the H-bond strengths of water near the Schiff bases in bacteriorhodopsin and <i>Anabaena</i> sensory rhodopsin” <i>J. Biol. Chem.</i> 287 (2012) 34009-34018
4. Keisuke Saito and <u>Hiroshi Ishikita</u> * “Energetics of short hydrogen bonds in photoactive yellow protein” <i>Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.</i> 109 (2012) 167-172
5. Keisuke Saito, Toyokazu Ishida, Miwa Sugiura, Keisuke Kawakami, Yasufumi Umena, Nobuo Kamiya, Jian-Ren Shen, and <u>Hiroshi Ishikita</u> * “Distribution of the cationic state over the chlorophyll pair of photosystem II reaction center” <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 133 (2011) 14379-14388

(2)特許出願

研究期間累積件数:0件

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【招待講演】第17回日本光生物学協会年会

2012年8月17~18日、大阪大学 産業科学研究所講堂(8月18日)

石北 央「分子構造が語る蛋白質の光エネルギー利用のしくみ」

【招待講演】CREST 有機太陽電池シンポジウム

2012年7月13~14日、京都大学 宇治構内 おうばくプラザ・きはだホール(7月14日)

石北 央「光化学系II結晶構造が語る電荷分離のエナジェティクス」

【招待講演】光合成セミナー

2012年6月30日~7月1日、大阪大学 理学研究科 (豊中キャンパス) (6月30日)

石北 央「光合成研究の最前線 電子移動について」

【国際・招待講演】17th Intl Symposium on Flavins and Flavoproteins

2011年7月24~29日、University of California Berkeley, California, USA (7月26日)

Hiroshi Ishikita “Exploring redox reactions in proteins using the crystal structures”

【アウトリーチ活動】サイエンスカフェ@京都での講師

2011年9月19日、セカンドハウス ケーキワークス銀閣寺店

石北 央

【受賞】

平成25年度 文部科学大臣表彰 若手科学者賞 受賞

