

博士論文審査報告書

氏名 中村 淳志(ナカムラ アツシ)
学位の種類 博士(理学)
学位記番号 論博理23号
学位授与報告番号 乙第69号
学位授与年月日 令和元年 9月30日
学位授与の要件 学位規則第4条2項
論文題目 Theoretical analysis of Cl-dependent H⁺ transfer mechanisms in water oxidation reaction of photosystem II
「PSII による水酸化反応における Cl 依存性プロトン移動メカニズムの理論解析」
論文審査委員 (主査) 教授 城 宜嗣
(副査) 教授 峰雪 芳宣
(副査) 教授 舘野 賢
(副査) 主任研究員 木野 日織
(国立研究開発法人・物質材料研究機構・統合型材料開発情報基盤部門)

1. 論文内容の要旨

光化学系 II (PSII) は、葉緑体のチラコイド膜に存在する膜貫通タンパク質であり、光合成の明反応における最も重要な、水の酸化反応を触媒する酵素である。PSII の活性中心 Mn クラスター(Mn₄CaO₅) で生じる水の酸化反応により遊離された電子は、NADPH に取り込まれ、Stromal 側に輸送される。他方、同様に遊離されたプロトン(H⁺)は、Lumenal 側に排出され、H⁺ の濃度勾配が形成される。これによって生じた化学ポテンシャルが、ATP 合成に用いられることから、水の酸化反応によって生じた H⁺ を適確に Lumenal 側に輸送するはたらきは、生体のエネルギー変換そのものであるといえる。さらに PSII の反応で特徴的なのは、反応サイクルにおける 4 つの状態(S₀-S₃)のそれぞれで生じる4回の H⁺ 輸送のうち、3 つが Cl 依存性を示す点にもあり、1970 年代より既に明らかになっている。

近年のX線結晶構造解析によって明らかになった PSII の立体構造においては、活性部位である Mn クラスター近傍に、実際2個の Cl⁻ イオンの結合サイトが同定された(Cl1 および Cl2 サイトと呼ばれる)。Cl1 サイトを経由する経路は、Mn クラスターから Lumenal 側まで、連続した水素結合ネットワーク(Cl1 経路)が見られ、そのため、その H⁺ 輸送メカニズムがこれまで精力的に研究されてきた。他方で Cl2 経路については、Mn クラスターから Lumenal 側に至る途中の Cl2 サイト近傍において、タンパク質骨格のペプチド結合が水素結合ネットワークをブロックしており、そのため Cl2 経路による H⁺ 輸送メカニズムは、そのはたらきの有無を含め、これまでほとんど研究されていなかった。

水素/重水素置換や変異体を用いた速度論的実験によれば、Cl 依存性を有する H⁺ 輸送経路には、異なる時間スケールを有するふたつの経路の存在が示唆されている。そのため Cl1 経路のみでは、PSII による H⁺ 輸送メカニズムを説明することはできない。そこで本研究では、これまで解析されたことの無い Cl2 経路による H⁺ 輸送の可能性を明らかにするために、前述のペプチド基(活性部位から連続する水素結合ネットワークを切断

している)が、 H^+ を通過させられるか否かを、*ab initio* QM/MM 分子動力学計算を用いて理論的に解析した。

その結果、 Cl^- イオンやペプチド基(骨格部位)、および側鎖のカルボニル基などの協奏的な作用により、上記のペプチド基を介して H^+ が輸送され得る、新たなメカニズムが明らかになった。まず、輸送された H^+ と Cl^- とは共有結合を形成し(HCl)、その H 原子が D1-Asn338 骨格のアミド N 原子に接近する。このとき Cl^- 原子は、H 原子に電子を供与することで、その正電荷を減少させ、アミド H 原子との静電的な反発を抑える。このようにして両者が接近すると、 Cl^- は次に、前述の H 原子(Cl^- 原子と結合)の電子を今度は吸引し、その求電子性を高め、H 原子による攻撃性を誘導する。その結果、D1-Asn338 のアミド N 原子を中心とした sp^3 様構造が形成される。これにより元のアミド H 原子は、D1-Asn338 側鎖のカルボニル基(O 原子)に接近し、水素結合を形成する。このようにして、D1-Asn338 骨格のアミド H 原子が、その側鎖のカルボニル基へ転移することにより、ペプチド基を介した H^+ 輸送が実現された。

遷移状態は、上述の sp^3 様構造にあり、D1-Asn338 側鎖のカルボニル基が、ペプチド骨格のアミド H 原子と残基内・水素結合を形成することによって、高エネルギー状態を回避する仕組みが明らかになった。さらに、本研究によって得られた活性化エネルギーは、速度論に基づく実験により推定された結果と、よく一致することが明らかになった。この反応メカニズムは、前述のような特異的な立体構造の形成が可能な領域においてのみ起こり得るものであり、 Cl^- イオンと D1-Asn338 の骨格および側鎖などにより高度に制御された、PSII における H^+ 輸送メカニズムの一端が明らかになった。

掲載論文：Atsusi Nakamura, Jiyoung Kang, Ryu-ichiro, Terada, Hiori Kino, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen, Nobuo Kamiya, Masaru Tateno

“Novel Mechanism of Cl^- -Dependent Proton Dislocation in Photosystem II (PSII): Hybrid *Ab initio* Quantum Mechanics Molecular Dynamics Simulation”

J. Phys. Soc. Jpn. **88** (2019) 084802, 10.7566/JPSJ.88.084802

2. 論文審査結果

本研究は、PSII の活性部位である Mn クラスターの近傍に結合している Cl^- イオンが、 H^+ 輸送のはたらきを有するか否かを解析した最初の報告であり、実験および理論を通じて初めての直接的な成果といえるものである。一般に、タンパク質骨格のペプチド基を介した H^+ 輸送については、セルラーゼにおけるメカニズムが提案されているが、これは両方向輸送(bi-directional)である。生体高分子におけるペプチド結合を介した一方向性(uni-directional)の H^+ 輸送メカニズムを、タンパク質構造全体に対して、熱振動(温度)の存在下で解析した理論研究は、これまでに見られない。

その結果、本研究は、 Cl^- や D1-Asn338 の骨格および側鎖等々が形成する、特異的な立体構造の制御の元、ペプチド結合を介する一方向性の H^+ 輸送が生じる、新たなメカニズムを明らかにした。これは、PSII における水分子の酸化反応自体の研究にも、新しい視点を供するものである。例えば、基質の水分子はいまだ確定されていないが、 H^+ の放

出される部位およびその輸送経路は、基質水分子(位置)を同定するために手掛かりとなり得る。このように本研究は、タンパク質内部の新規の H^+ 輸送メカニズムを明らかにしたと同時に、PSII における水分子の酸化反応メカニズムの解析にも、実験および理論解析の双方において、今後、重要な寄与を成し得る成果であると評価できる。

よって、本論文は博士(理学)の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和元年 7 月 11 日、論文内容及びこれに関連する事項についての試問を行った結果、合格と判定した。

博士論文審査報告書

論文題目: Theoretical analysis of Cl-dependent H⁺ transfer mechanisms in water
oxidation reaction of photosystem II
「PSIIによる水の酸化反応におけるCl依存性プロトン移動メカニズム
の理論解析」

申請者: 中村 淳志

1. 論文内容の要旨

光化学系 II (PSII) は、葉緑体のチラコイド膜に存在する膜貫通タンパク質であり、光合成の明反応における最も重要な、水の酸化反応を触媒する酵素である。PSII の活性中心である Mn クラスター (Mn₄CaO₅) における水の酸化反応によって遊離された電子は、NADPH に取り込まれ、Stroma 側に輸送される。他方、同様に遊離されたプロトン (H⁺) は、Lumenal 側に排出され、H⁺ の濃度勾配の形成をもたらす。これによって生じた化学ポテンシャルが、ATP 合成に用いられることから、水の酸化反応によって生じた H⁺ を適確に Lumenal 側に輸送するはたらきは、生体のエネルギー変換そのものであるといえる。さらに PSII の反応で特徴的な点は、反応サイクルにおける 4 つの状態 (S0-S3) のそれぞれで生じる4回の H⁺ 輸送のうち、3 つが Cl 依存性を示すことが、1970 年代より既に明らかにされている。

近年の X 線結晶構造解析によって明らかになった PSII の立体構造においては、活性部位である Mn クラスター近傍に、実際に 2 個の Cl⁻ イオンの結合サイトが同定された (Cl1 および Cl2 サイトと呼ばれる)。Cl1 サイトを経由する経路は、Mn クラスターから Lumenal 側まで、連続した水素結合のネットワーク (Cl1 経路) が見られるため、その H⁺ 輸送メカニズムがこれまで精力的に研究されてきた。他方で Cl2 経路については、Mn クラスターから Lumenal 側に至る途中の Cl2 サイト近傍において、タンパク質骨格のペプチド基が水素結合ネットワークをブロックしており、そのため Cl2 経路による H⁺ 輸送メカニズムは、そのはたらきの有無を含め、これまでほとんど研究されていなかった。

水素/重水素置換や変異体 (WT/A61N) を用いた速度論的実験によれば、Cl 依存性を有する H⁺ 輸送経路には、異なる時間スケールを有するふたつの経路の存在が示唆されている。そのため Cl1 経路のみでは、PSII による H⁺ 輸送メカニズムを説明することはできない。そこで本研究では、これまで解析されたことの無い Cl2 経路による H⁺ 輸送の可能性を明らかにするために、前述のペプチド基 (活性部位から連続する水素結合ネットワークを切断している) が、H⁺ を通過させられるか否かを、*ab initio* QM/MM 分子動力学計算を用いて理論的に解析した。

その結果、Cl⁻ イオンやペプチド基 (骨格部位)、および側鎖のカルボニル基などの協奏的な作用により、上記のペプチド基を介して H⁺ が輸送され得る、新たなメカニズムが明らかになった。まず輸送された H⁺ と Cl2 とは共有結合を形成し (HCl)、その H 原子が D1-Asn338 骨格のアミド N 原子に接近する。このとき Cl2 原子は、H 原子に電子を供与することで、その正電荷を減少させ、アミド H 原子との静電的な反発を抑える。このようにし

て両者が接近すると、Cl2 は次に前述の H 原子の電子を今度は吸引し、その求電子性を高めて攻撃を誘導する。その結果、D1-Asn338 のアミド N 原子を中心とした sp^3 様構造が形成され、すると元々のアミド H 原子は、D1-Asn338 側鎖のカルボニル基 (O 原子) に接近し、水素結合を形成する。このようにして、D1-Asn338 骨格のアミド H 原子が、その側鎖のカルボニル基へ転移することにより、ペプチド基を介した H^+ 輸送が実現された。

遷移状態は、上述の sp^3 様構造にあり、D1-Asn338 側鎖のカルボニル基が、ペプチド骨格のアミド H 原子と残基内・水素結合を形成することによって、高エネルギー状態を回避する仕組みが明らかになった。さらに、本研究によって得られた活性化エネルギーは、速度論に基づく実験により推定された結果と、よく一致することが明らかになった。この反応メカニズムは、前述のような特異的な立体構造の形成が可能な領域においてのみ起こり得るものであり、Cl イオンと D1-Asn338 の骨格および側鎖などにより高度に制御された、PSII における H^+ 輸送メカニズムの一端が明らかになった。

2. 論文審査結果

本研究は、PSII の活性部位である Mn クラスターの近傍に結合している Cl2 イオンが、 H^+ 輸送のはたらきを有するか否かを研究した最初の報告であり、実験および理論を通じて初めての成果といえるものである。一般に、タンパク質骨格のペプチド結合を介した H^+ 輸送については、セルラーゼにおけるメカニズムが提案されているが、これは両方向輸送 (bi-directional) である。生体高分子におけるペプチド結合を介した一方向性 (uni-directional) の H^+ 輸送メカニズムを、タンパク質構造全体に対して、熱振動 (温度) の存在下で解析した研究は、理論的にもこれまでに見られない。

その結果、本研究は、Cl2 や D1-Asn338 の骨格および側鎖等々が形成する、特異的な立体構造の制御の元、ペプチド結合を介する一方向性の H^+ 輸送が生じる、新たなメカニズムを明らかにした。これは、PSII における水分子の酸化反応自体の研究にも、新しい視点を供するものである。例えば、基質の水分子はいまだ確定されていないが、 H^+ の放出される部位およびその輸送経路は、基質水分子 (位置) を同定するために重要な手掛かりとなり得る。このように本研究は、タンパク質内部の新規の H^+ 輸送メカニズムを明らかにしたと同時に、PSII における水分子の酸化反応メカニズムの解析にも、実験および理論解析の双方において、今後、重要な寄与を成し得る成果であると評価できる。

よって、本論文は博士 (理学) の学位論文として価値のあるものと認める。

また、令和元年7月11日、論文内容及びこれに関連する事項についての試問を行った結果、合格と判定した。

主査: 城 宜嗣

副査: 峰雪 芳宣

舘野 賢

木野 日織



(国立研究開発法人・物質材料研究機構・統合型材料開発情報基盤部門)

申請者：中村 淳志

掲載論文：

Atsusi Nakamura, Jiyoung Kang, Ryu-ichiro, Terada, Hiori Kino, Yasufumi Umena,
Keisuke Kawakami, Jian-Ren Shen, Nobuo Kamiya, Masaru Tateno

“Novel Mechanism of Cl-Dependent Proton Dislocation in Photosystem II (PSII):
Hybrid Ab initio Quantum Mechanics Molecular Dynamics Simulation”

J. Phys. Soc. Jpn. **88** (2019) 084802, 10.7566/JPSJ.88.084802