

研究終了報告書

「(光合成反応中心における初期電荷分離過程の分子論的機構解明)」

研究期間: 2018年9月~2022年3月

研究者: 東 雅大

1. 研究のねらい

緑色植物の光化学系 II (PSII) は、生物界で唯一水分解・酸素発生を行う色素・タンパク質超複合体である。そのモデル系として、酸素非発生型である紅色細菌の反応中心が調べられてきた。その結果、紅色細菌の反応中心では、最初にスペシャルペアと呼ばれる2つの重なったバクテリオクロロフィルから隣のバクテリオクロロフィルへ、数ピコ秒で電子移動が起きることが明らかになった。一方、緑色植物の PSII でも同様の機構が考えられてきたが、最近の実験により、最初にスペシャルペアの隣のクロロフィルからフィオフィチンへの電子移動が起きることが明らかになりつつある。この反応速度は1ピコ秒以下と紅色細菌での反応より高速であり、緑色植物は初期電荷分離過程を反応開始場所と速度の両方をより最適化していると言える。この最適化は、タンパク質の構造や揺らぎの違いによると考えられているが、具体的な機構は全く明らかではない。さらに近年、緑色植物の初期電荷分離過程で長時間のコヒーレンスが観測されているが、その起源や役割もよく分かっていない。

このような初期電荷分離過程におけるタンパク質の役割やコヒーレンスの起源や役割を分子レベルで解明するためには、各色素の励起状態や電荷分離状態のエネルギーの大きさと揺らぎを解析する必要がある。しかし、各色素の電子状態が近接しているため、実験データからの解析は非常に困難である。したがって、分子シミュレーションによる解析が期待されているが、色素のエネルギーの大きさや揺らぎを従来法で高精度に解析するためには、サンプリング計算に膨大な数の高精度・高コストな量子化学計算を要求されるため、最先端のスーパーコンピュータを用いても事実上計算不可能である。

この現状を打開すべく、我々は分子シミュレーションと量子化学計算を効率的に結びつける独自の手法を開発し、今まで手の届かなかった凝縮相の化学反応ダイナミクスの解明に取り組んできた。近年は、光捕集アンテナにおける励起エネルギー移動を解析し、分子シミュレーションにより世界で初めて色素の励起エネルギーの大きさと揺らぎを定量的に再現することに成功した。

そこで本研究課題では、我々が独自に開発してきた手法を発展させ、緑色植物の光合成反応中心における初期電荷分離過程とタンパク質の構造および揺らぎの相関を分子論的に明らかにする。さらに、コヒーレンスの起源と役割も明らかにすることを目指す。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究課題では、緑色植物の光合成反応中心における初期電荷分離過程の機構解明を目指して、色素の励起状態間のカップリングを高精度に解析可能な計算手法の開発や緑色植物と紅色細菌の反応中心に含まれる色素の電子状態の解析を行った。

これまで、色素の励起状態間のカップリングの解析には TrESP 法がよく用いられてきたが、我々の解析により遷移双極子モーメントの揺らぎを過小評価することが判明した。そこで、

TrESP 法を拡張して構造や外場に対する揺らぎを考慮可能な TrCRK 法を開発した。この TrCRK 法をテスト計算に適用し、TrESP 法よりもカップリングの揺らぎを適切に記述できることを明らかにした。

また、緑色植物の反応中心に含まれる6つのクロロフィル色素の電子状態を量子化学計算の結果から効率的にポテンシャル関数を生成可能なMMSIC法を用いて解析した。まず、色素の側鎖のビニル基のねじれ度合いが励起エネルギーに影響を与えるため、その方向に色素のポテンシャル関数を高精度化した。しかし、高精度化したポテンシャル関数を用いても、得られた励起エネルギーの分布は実験から予測されるものと大きく異なったため、参照とする量子化学計算手法を検討した。その結果、計算手法により得られる励起エネルギーは大きく異なることが分かった。その中で最適なもので励起エネルギーを計算したところ、最低の励起エネルギーを示す色素が実験結果と一致した。さらに、緑色植物の反応中心では、色素に大きな電場がかかっていることが明らかになった。紅色細菌の反応中心では同様の電場は見られなかったため、緑色植物の機能と関連している可能性がある。

また、比較対象として、紅色細菌の反応中心に含まれる6つのバクテリオクロロフィル色素の励起エネルギーも解析した。両者の構造は非常によく似ているものの、吸収スペクトルや初期電荷分離過程は大きく異なっており、その詳細はよく分かっていない。MMSIC法により得られた各色素の励起エネルギーは、色素ごとに大きく異なったものが得られ、実験結果とよく一致した。また、異なる環境に置かれた色素の励起エネルギーの揺らぎが大きく異なることも明らかになった。

さらに、光捕集複合体における高効率なエネルギー伝達機構を解析し、タンパク質が揺らぎを制御して高速なエネルギー伝達を達成していることを明らかにした。さらに、光捕集複合体は室温でエネルギー伝達を最適化していることも明らかになった。

(2) 詳細

研究テーマ A「色素の励起状態間のカップリングを高精度に解析可能な計算手法の開発」

初期電荷分離過程におけるタンパク質の構造や揺らぎの役割を分子レベルで解明するためには、反応中心に含まれる色素の基底状態と励起状態、電子移動が起こった後のカチオン・アニオン状態のエネルギーと各状態間のカップリングを計算し、それぞれの揺らぎを解析する必要がある。このうち、各状態のエネルギーについては、我々が開発した MMSIC 法 (Higashi and Saito, J. Chem. Theory Comput. 2016, 60, 4128) により、効率的に大きさや揺らぎを解析可能となっている。そこで、各状態間のカップリングの大きさと揺らぎを解析可能な手法の開発を行った。励起状態間のカップリングは、遷移密度の間の相互作用として記述され、これまで局在化した遷移電荷間の相互作用として近似する TrESP 法 (Madjet et al. J. Phys. Chem. B 2006, 110, 7268) がよく用いられてきた。しかし、我々の解析により従来の TrESP 法では、構造や外場によ

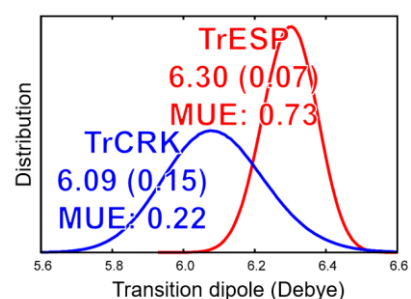


図 1. TrCRK 法での遷移双極子モーメント計算は、TrESP 法で計算したものより大幅に改善した。

り遷移電荷は変化しないと近似するため、遷移双極子モーメントの揺らぎを過小評価することが判明した。そこで、構造や外場に対しての電荷の揺らぎを記述可能な CRK 法(Morita and Kato, J. Am. Chem. Soc. 1997, 119, 4021; Lu and Yang, J. Chem. Phys. 2004, 121, 89)を応用し、遷移密度の揺らぎを適切に記述可能な TrCRK 法を開発した。この TrCRK 法をテスト計算として、光捕集複合体 FMO タンパク中のバクテリオクロフィル色素の遷移双極子モーメント計算に適用したところ、分子動力学(MD)シミュレーション中の平均誤差は、TrESP で 0.73 Debye だったところを 0.22 Debye と大幅に改善した(図1)。また、遷移双極子モーメントの揺らぎ(標準偏差)も 0.07 Debye から 0.15 Debye と適切に記述できるようになった。

研究テーマ B「緑色植物の反応中心に含まれる色素の電子状態の解析」

緑色植物の反応中心に含まれる6つのクロロフィル色素(図2)の電子状態をMMSIC法を用いて解析した。我々が独自に開発したMMSIC法は、分子力場と修正Shepard法を組み合わせることで、量子化学(QM/MM)計算の情報から高精度なポテンシャル関数を効率的に生成する。参照とする量子化学計算手法として、当初は溶液中のクロロフィル色素の励起エネルギーを再現するようにパラメータを調整されたCAM-B3LYP($\mu=0.14$)密度汎関数(Saito et al., J. Photochem. Photobiol. A 2018, 358, 422)を用いた。

まず、先行研究と同様の精度(誤差 1 kcal/mol 程度)のポテンシャル関数を生成することに成功した。しかし、MDシミュレーション中の色素の側鎖のビニル基のねじれの大きさがX線結晶構造と大きく異なることが明らかになった。このビニル基のねじれにより色素のクロリン環との共役が切れるため、ねじれの大きさが励起エネルギーに大きな影響も与えることが明らかになった。そこで、ビニル基に着目してポテンシャル関数の高精度化を行った。ビニル基のねじれに対して様々な構造でQM/MM計算を行い、ポテンシャル関数の作成に用いた。その結果、MDシミュレーション中のビニル基のねじれの大きさは結晶構造と概ね一致し、ポテンシャル関数の平均誤差も 0.2 kcal/mol 程度改善した。ねじれに対してポテンシャル面は浅いため、誤差の改善はわずかではあるが、より高精度なポテンシャル関数を作ることに成功した。

この高精度のポテンシャル関数を用いて、緑色植物の反応中心に含まれる6つのクロロフィル色素の励起エネルギーを計算した。しかし、最低の励起エネルギーを持つ色素はP_{D2}となり、実験結果から最低と予測されるChl_{D1}の励起エネルギーは大幅に高くなった(図3)。解析の結果、緑色植物の反応中心では、色素に非常に大きな電場がかかっていること

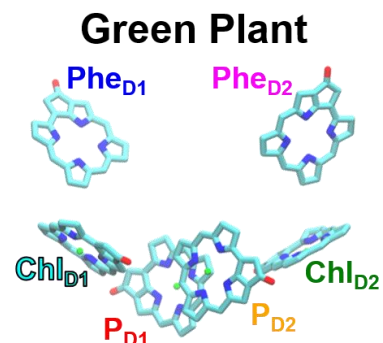


図2. 緑色植物の反応中心に含まれる6つのクロロフィル色素。

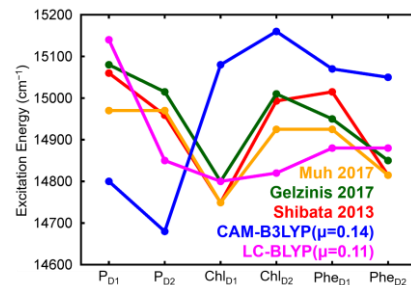


図3. 緑色植物の反応中心に含まれる色素の励起エネルギーの計算結果と実験値との比較。

が明らかになった。紅色細菌の反応中心では同様の電場は見られなかったため、緑色植物の機能と関連している可能性がある。この大きな電場のため、色素の電気双極子モーメントは気相中や溶液中のものと大きく異なっており、溶液中の結果を再現するように調整された汎関数では不十分である可能性が考えられた。そこで、用いる汎関数について検討を行った。P_{D1}とChl_{D1}の励起エネルギーの差に着目して、様々な汎関数で計算した結果、LC-BLYP ($\mu=0.11$)汎関数で実験結果と最も良い一致が見られた。また、Hartree-Fock 交換積分とDFT 交換汎関数の距離依存の混合比を決めるパラメータ μ に対して計算結果が大きく依存することも明らかになった。

LC-BLYP($\mu=0.11$)汎関数での計算結果に基づいてMMSIC法により各色素のポテンシャル関数を作成し、MDシミュレーションにより各色素の励起エネルギーの分布を得た(図4)。ほとんどの色素の分布が重なり合い、密集していることが分かった。最低の励起エネルギーを持つ色素はChl_{D1}となり、CAM-B3LYP($\mu=0.14$)汎関数を用いた場合よりも改善が見られた(図3)。なお、ここでの実験値は、実験スペクトルから様々な近似を用いて導出されたものであり、必ずしも我々の計算結果と一致する必要はない。しかし、量子化学計算のパラメータで計算結果が大きく変化することが明らかになったため、今後も引き続き吸収スペクトル等の比較を行いながら慎重に検討する予定である。

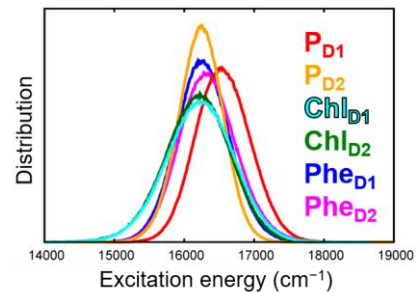


図4. LC-BLYP($\mu=0.11$)汎関数で計算した緑色植物の反応中心内の色素の励起エネルギーの分布。

研究テーマC「紅色細菌の反応中心に含まれる色素の電子状態の解析」

緑色植物の反応中心との比較対象として、紅色細菌の反応中心に含まれるバクテリオクロロフィル色素(図5)の励起エネルギーの解析を行った。両者の構造は非常によく似ているものの、吸収スペクトルや初期電荷分離過程は大きく異なっており、その詳細はよく分かっていない。

緑色植物の反応中心と同様に、MMSIC法で各色素のポテンシャル関数を作成し、MDシミュレーションで各色素の励起エネルギーの分布を得た(図6)。なお、この計算では量子化学計算手法として、溶液中のバクテリオクロロフィル色素の励起エネルギーを再現するようにパラメータを調整したCAM-B3LYP($\mu=0.20$)密度汎関数を用いている(Higashi et al., J. Phys. Chem. B 2014, 118, 10906)。また、スペシャルペア二量体を形成するP_LとP_Mの色素については、二量体の励起エネルギーの計算結果を基に補正を加えた。緑色植物の反応中心と異なり、紅色細菌の反応中心では励起エネルギーの分布は色素により大きく異なった。P、BChl、BPheの励起エネルギーの値

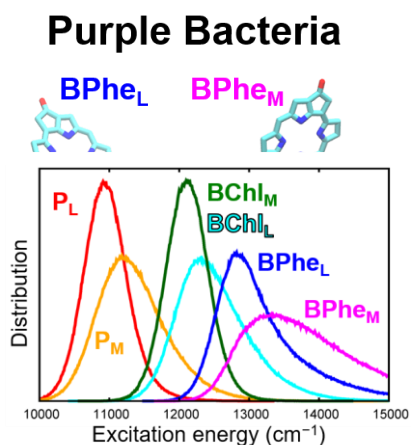


図6. 紅色細菌の反応中心内の色素の励起エネルギーの分布。

は実験結果とよく一致した。さらに、BChl_MとBChl_L、BPh_{eM}とBPh_{eL}のように類似の環境に置かれた色素の励起エネルギーの関係も実験結果と一致している。また、色素により励起エネルギーの揺らぎが大きく異なることも明らかになった。これらの励起エネルギーの大きさや揺らぎの違いの要因について詳細な解析を進めている。

研究テーマD「光捕集複合体における高効率なエネルギー伝達機構の解析」

光捕集複合体のエネルギー伝達は非常に高速かつ高収率であり、光捕集複合体は、内部に含まれる色素の励起エネルギーの大きさと揺らぎを適切に制御することで、それを達成していると考えられている。これまでの我々の研究で、光捕集複合体 Fenna-Matthews-Olson (FMO)タンパクの異なる環境に置かれた色素の励起エネルギーの揺らぎが大きく異なることが明らかになった。この揺らぎの違いがエネルギー伝達に与える影響を階層方程式を用いて解析したところ、励起エネルギーの揺らぎが一定の場合と比較して、揺らぎが異なる場合の方がエネルギー移動の速度が増加し、タンパク質が揺らぎを制御して高速なエネルギー伝達を達成していることが明らかになった(図7)。さらに、極低温と室温の結果を比較して、光捕集複合体は室温でエネルギー伝達を最適化していることも明らかになった。

また、光捕集複合体のモデル系として、色素会合体におけるエネルギー伝達の解析を近藤徹講師(東工大)や大畠悟郎准教授(大阪府立大)と共同で進めており、今後も引き続き協力して進める。

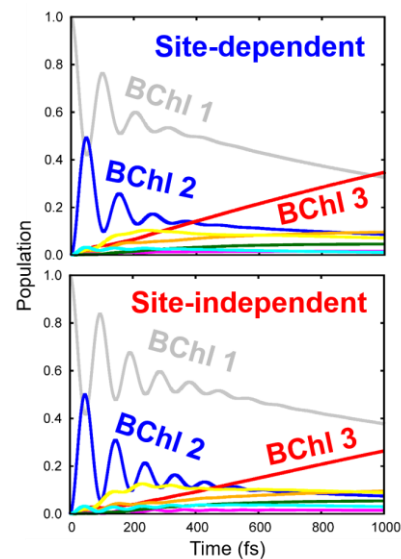


図7. 色素間でエネルギー揺らぎが異なる場合(上)と同じ場合(下)との比較。エネルギー移動は揺らぎが異なる方が早い。

3. 今後の展開

今後は、反応中心内の各色素がカチオン・アニオン状態になった電荷分離状態のエネルギーや各状態間のカップリングの解析を進め、緑色植物と紅色細菌の反応中心の類似点や相違点を明らかにする。また、これらの計算結果を基に初期電荷分離過程の解析へとつなげる。これまでの研究で、緑色植物の反応中心は想定したものより複雑であり、分子シミュレーションによる解析が非常に困難であることが分かったが、初期電荷分離を解析するための手法は整いつつあるので、近いうちに何らかの成果は得られるのではないかと期待している。

また、本研究では我々の独自の分子シミュレーション手法を用いており、類似の研究は世界に存在しない。現在、プログラムの汎用化や他の光捕集系など様々な系への適用を目指しており、今後も引き続き進め、今までにない高精度生体分子理論解析手法の確立を目指す。

さらに、学術変革領域研究(A)「動的エキシトン」の計画研究で、本さがけ領域の研究者であ

る藤橋裕太氏を特定助教として迎え、人工系の光誘起電荷分離過程の解析に共同で取り組むことになった。今後は、天然系と人工系を比較しながら解析し、より優れた分子設計につなげていきたい。また、本さがけ領域で出会った齊藤諒介助教(山口大)と地圏中に含まれるコレステロール変性体の解析を、馬越貴之講師(大阪大)と生理活性物質の分子振動の解析を共同で取り組むことになった。このような異分野の研究者との共同研究は貴重かつ重要なものであり、今後も本さがけ領域で得られたつながりを大切にしていきたい。

4. 自己評価

残念ながら当初の研究目的は達成できなかった。さがけ期間中に、京都大学への異動、文部科学省学術調査官への就任、新型コロナウイルス感染症への対応等、予想もしなかったことが次々と起こり、研究に注力できる時間が削減されたことも原因だが、想定したよりも緑色植物の反応中心が複雑で、これまで光捕集複合体で上手くいったやり方が通用せず、1つ1つの計算手法を再度検討する必要に迫られたことが大きな原因と考えられる。しかし、これまでの研究で、光捕集複合体と反応中心は大きく異なることが明らかになり、緑色植物の反応中心では大きな電場がかかっていることも明らかになったので、緑色植物の高効率な初期電荷分離過程を理解するためのきっかけはつかめたように思う。今後も試行錯誤で時間はかかるかもしれないが、少しずつでも研究を進めていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 2件

1. Shinji Saito, Masahiro Higashi, and Graham R. Fleming, "Site-dependent fluctuations optimize electronic energy transfer in the Fenna-Matthews-Olson protein," *Journal of Physical Chemistry B*, 2019, 123, 9762-9772, 11055 (correction).

光合成系でエネルギー伝達の役割を担う光捕集複合体 FMO タンパク質中の色素の励起エネルギーと励起状態間のカップリングの大きさと揺らぎを独自の高精度解析手法である MMSIC 法と TrCRK 法で解析した。吸収スペクトル等の実験結果を再現すると共に、異なる環境に置かれた色素の励起エネルギーの揺らぎが大きく異なることを明らかにした。さらに、その揺らぎの違いによりエネルギー伝達が最適化されていることも明らかにした。

2. Zhe Zhu, Masahiro Higashi, and Shinji Saito, "Excited states of chlorophyll *a* and *b* in solution by time-dependent density functional theory," *Journal of Chemical Physics*, 2022, 156, 124111 (13 pages).

緑色植物の光合成系に含まれる色素であるクロロフィル *a* と *b* の溶液中における励起状態を QM/MM RWFE-SCF 法を用いて解析した。QM 領域の計算には TDDFT 法を用い、実験結果を再現するように汎関数に含まれるパラメータを最適化した。得られたパラメータは、我々の先行研究のバクテリオクロロフィル *a* のものと異なり、電子がより非局在化していることが明らかになった。また、クロロフィル *a* と *b* で励起した際の電荷分布変化を解析した結果、クロロフィル *b* のみに存在する側鎖のホルミル基付近で大きく異なることが分かった。

(2)特許出願:0件(特許公開前のものも含む)

(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)

主要な学会発表

1. Masahiro Higashi, "Toward a molecular understanding of excitation energy transfer in light-harvesting complexes," The 4th China-Japan-Korea Workshop on Theoretical and Computational Chemistry, Nanjing, China, January 2019, 招待講演.
2. Masahiro Higashi, "Theoretical study on excitation energy transfer in photosynthetic proteins," The 10th Conference of the Asian Consortium on Computational Materials Science, Hong Kong, China, July 2019, 招待講演.
3. 東 雅大, 「光合成タンパク質複合体の機能解明を目指して」, QIQB セミナー「量子化学と量子情報・量子生命の接点」, 豊中, 大阪, 2019年12月, 招待講演.
4. 東 雅大, 「凝縮系における光反応ダイナミクスの理論解析」, 第24回光科学若手研究会, オンライン開催, 2020年11月, 招待講演..
5. Masahiro Higashi, "Toward a molecular understanding of photosynthetic proteins," The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies 2021 (Pacifichem 2021), Online, December 2021, 招待講演.