共同利用研究ハイライト

光捕集複合体と光合成反応中心の理論解析

東雅大 京都大学 大学院工学研究科 分子工学専攻 分子理論化学講座 准教授

1.はじめに

本稿では、分子科学研究所の共同利 用研究制度を利用して、斉藤真司教授・ 石崎章仁教授と実施した共同研究の成 果について紹介する。斉藤教授とは光 捕集複合体における励起エネルギー移 動の分子論的機構を解析し、石崎教授 と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解析に取り組ん だ。

2.光捕集複合体における励起エネル ギー移動の分子論的機構の理論解析

光合成系における最初のステップ は、光捕集複合体と呼ばれるタンパク 質による光エネルギーの吸収および反 応中心への伝達である。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、高効率なエネルギー移動を 達成していると考えられている。しか し、各色素の励起状態が近接し、また 強く相互作用しているため、各色素の 励起エネルギーの大きさと揺らぎを実 験データから求めることは難しい。特 に、タンパク質の揺らぎに起因する各 色素の励起エネルギーの揺らぎを実験 データから得るのは非常に困難である。 そのため、分子シミュレーションによ る解析が必要とされているが、これま での研究では励起エネルギーの揺らぎ どころか大きさも再現出来ていなかっ た。その理由として、量子化学計算の 精度不足と不適切なサンプリング手法 が挙げられる。しかし現状、高精度・ 高コストな量子化学計算を用いて適切 なサンプリング計算を行うには、途方 もない計算時間を必要とするため、事 実上不可能である。

そこで、まず我々は、量子化学計算 の精度を上げるために、光捕集複合体 FMOタンパクに含まれる色素であるバ クテリオクロロフィルaの溶液中の励 起状態を解析した^[1]。既存の汎用的な 量子化学計算手法では様々な溶媒中に おける吸収エネルギーや再配向エネル ギーを全く再現できなかったため、そ れらを再現可能な量子化学計算手法を 開発した。また、吸収エネルギーが溶 媒依存性をほとんど示さない理由も明 らかにしている。

次に、適切なサンプリング計算を 可能にするために、凝縮系中の分子の ポテンシャル関数を効率的に生成する MMSIC法を開発した^[2]。MMSIC法に より色素の励起エネルギーの大きさと 揺らぎを効率的に解析可能としている。 さらに、これらの手法を組み合わせる ことで、FMOタンパク中の色素の励起 エネルギーの大きさを定量的に再現す ることに成功した。また、同じ色素で も周囲の環境によって励起エネルギー の揺らぎが大きく異なることも明らか にしている。

さらに、各色素の励起エネルギーの 揺らぎの違いが励起エネルギー移動に 与える影響を解析した^[3]。揺らぎが一 定の場合と比較して、揺らぎが異なる 方がエネルギー伝達は速く、色素によ る励起エネルギーの揺らぎの違いが効 率的なエネルギー移動に重要であるこ とを明らかにした(図1)。また、色素・ 温度によって最適な揺らぎの大きさは 異なり、FMOタンパクは室温付近でエ ネルギー伝達を最適化していることも



図1 (a) FMO タンパクにおける励起エネルギー移動。円の大きさが揺らぎの大きさを表す。(b,c) 色素8からの励起エネルギー移動。各色素 でシミュレーションから得た異なる揺らぎを用いた場合(b)は、一定の揺らぎを用いた場合(c)と比較してエネルギー伝達が高速であるこ とが分かる。 明らかになった。

3.光合成反応中心における初期電荷分 離過程の理論解析

光捕集複合体により伝達される光エ ネルギーは、反応中心での電子移動反 応(初期電荷分離)に用いられる。酸 素発生型光合成の緑色植物の光化学系 IIの反応中心は、酸素非発生型の紅色 細菌の反応中心と構造がよく似ている。 近年の研究により、緑色植物の反応中 心の方が初期電荷分離過程をより最適 化していると考えられているが、その 詳細はよく分かっていない。

そこでまず、二量体モデルを用い て、色素の分子内振動が初期電荷分離 に与える影響を解析した^[4]。その結果、 1つ1つの振動の寄与は小さいものの、

メージング^[4]などのバイオイメージン

グへ応用されつつある。例えば、蛍光

寿命イメージングによる FRET (Förster

Resonance Energy Transfer) 検出で

は、ドナーの蛍光のみを計測に用いる

ため、蛍光性を持たない色素タンパク

質をアクセプターとして利用すること

全体として反応速度の恒常性(ロバス トネス)に重要な役割を果たすことを 明らかにした。現在も引き続き、より 詳細な解析に取り組んでいる。

4. おわりに

分子シミュレーションによる光合 成タンパク質の解析は、最近ようやく 軌道に乗り始めたところである。今後、 光合成タンパク質だけでなく、様々な 複雑系への解析にも発展させたいと考 えている。

最後に、共同研究者の斉藤真司教授・ 石崎章仁教授と分子研の共同利用研究 制度に厚く御礼申し上げます。私が共 同利用研究制度を利用していた時期は、 琉球大学に着任した直後で研究費の確 保に苦労していたため、大変助かりま した。周囲に同分野の研究者もいなかったため、定期的に分子研を訪れて議論できるのも刺激になりました。今後もこの制度が続くことを強く望みます。



ひがし・まさひろ 2007年に京都大学大学院理学研究科にて博士 (理学)取得後、同年ミネソタ大学博士研究員、 2009年分子科学研究所IMSフェロー、2011年 日本学術振興会特別研究員(PD)、2013年琉球 大学理学部助教を経て2019年より現職。専門 は凝縮系の理論化学。

参考文献

[1] M. Higashi, T. Kosugi, S. Hayashi, S. Saito, J. Phys. Chem. B 118, 10906 (2014).

[2] M. Higashi, S. Saito, J. Chem. Theory Comput. 12, 4128 (2016).

[3] S. Saito, M. Higashi, G.R. Fleming, J. Phys. Chem. B 123, 9762 (2019).

[4] Y. Fujihashi, M. Higashi, A. Ishizaki, J. Phys. Chem. Lett. 9, 4921 (2018).

共同利用研究ハイライト	表面を親水性化した色素タンパク質の開発と 蛍光寿命イメージングへの応用 ^{村越 秀治 生理学研究所 進教校}	
1 はじめに	ができる。大きな利占としては、アク	2 蛍光タンパク質をベースとした毎
近年、蛍光タンパク質をベースとし	セプターからの蛍光がないため、この	蛍光の色素タンパク質
て作製された無蛍光色素タンパク質が、	波長域を別のプローブのイメージング	色素タンパク質とは、ある特定の色
蛍光寿命イメージング ^[1-3] や光音響イ	に利用できることである ^[2] 。最近私達	素と結合したタンパク質のことである。

波長域を別のプローブのイメージング
に利用できることである^[2]。最近私達
は、分子研の小杉貴洋助教(古賀グルー
例:
プ)らと共同で、赤色蛍光タンパク質
な改変することにより新規の無蛍光色
素タンパク質を開発したので紹介させ
れて頂く^[5]。

色素タンパク質とは、ある特定の色 素と結合したタンパク質のことである。 例えば、ヘムタンパク質やフラビンタ ンパク質がこれにあたる。また、バイ オイメージング分野で日常的に利用さ れているGFP (Green fluorescent protein)をはじめとした蛍光タンパク 質も色素タンパク質の一種である。蛍 光タンパク質は生体内でポリペプチド として合成された後、フォールディン グと内部に位置するトリペプチド (GFP の場合はスレオニン、チロシン、グリ シン)の発色団への変換を経て蛍光性 になる。このとき変異導入によって、 発色団の近くに芳香族アミノ酸側鎖(ト リプトファンやチロシン)をうまく配 置することで、光吸収性をほぼ保った まま量子収率を大きく下げることがで きる^[1-3]。つまり、蛍光タンパク質を 無蛍光の色素タンパク質に改変するこ とができる。このような色素タンパク 質はヘムタンパク質などのように、自 身の他に補欠分子族の結合を必要とし ないので、バイオイメージングへの応 用が容易である。

3. オレンジ光吸収無蛍光色素タンパ ク質の開発

本研究で私達は、赤色蛍光タンパ ク質(FRETドナー)と組み合わせて 利用することが可能なFRETアクセプ ター分子として、オレンジ色の光を吸 収(最大吸収波長585 nm)のタイ プの色素タンパク質の開発を行うこと にした。既にこのような色素タンパク 質(Ultramarine)の開発はなされて

いたが^[2]、培養細胞での発現効率が著 しく低いことや、細胞内で凝集する傾 向があることが弱点であった。そこで、 Ultramarineの表面アミノ酸を親水性 化することでこれらの弱点が改善され るかどうか試みた。方法としては、大 腸菌によるSaturation mutagenesis により、Ultramarineの表面の疎水性 アミノ酸を逐次的に親水性のものに置 換してみることにした。Ultramarine のアミノ酸配列と結晶構造を見ると、 赤色蛍光タンパク質であるmCherry と比較的相同性(64%)が高く、 mCherryの方が表面アミノ酸の親水性 が高かったため、まず、Ultramarine とmCherryのキメラ分子を作製し、こ れに逐次的に変異を導入することにし た。 最終的 に Ultramarine と 比較 し て、表面のアミノ酸の内、29ヶ所をよ り親水性に置換した新規色素タンパク 質 (ShadowR) の開発に成功した (図、 古賀グループの小杉助教が作製したホ モロジーモデルと静電ポテンシャル像)。

ShadowRを培養細胞(HeLa細胞) に発現させたところ、ShadowR はUltramarineよりも2.5倍程度多く 発現することが分かった。ただし、こ

れが表面を親水化したことによるもの なのかどうかは今のところ不明である。 また、細胞質タンパク質との非特異的 結合を調べたところ、ShadowRへの非 特異的結合はUltramarineと比較して、 大きく減少していることが分かった。 この結果はShadowRの表面アミノ酸 の親水性によるものであろうと考えて いる。さらに、mScarletとShadowR をFRETのペアとして、LOVTRAPシス テム(青色光に応答して構造が可逆的 に変化するLOV2ドメインと、暗状態 のLOV2に結合するZdkドメインで構 成される2分子型の光操作ツール^[6]) を用いてFRET計測を行ったところ mScarletとUltramarineをFRETペア としたときよりもFRET変化量が50% 程大きくなった。すなわち、表面を親 水性にすることによって発現量の改善 と非特異的結合の減少に成功し、さら にShadowRがFRETアクセプターとし て優れていることが分かった^[5]。

本研究は分子研古賀グループと生理 研鍋倉研究室との共同研究になります。 この場を借りてお礼申し上げます。



UltramarineとShadowRの静電ポテンシャル(表面電荷)。親水性アミノ酸の導入により、 Ultramarineと比較して、ShadowRでは白い領域が減り、正電荷(赤)と負電荷(青)が 占める領域が多くなっている。UltramarineとShadowRの構造をPDB ID 3NEDとPDB ID 2ARLを利用してホモロジーモデリングにより作製した。文献[5]より許可を得て転載。

参考文献

- [1] Pettikiriarachchi A, Gong L, Perugini Ma, Devenish Rj, Prescott M. PLoS ONE, 7, e41028 (2012).
- [2] Murakoshi H, Shibata AC, Nakahata Y, and Nabekura J. Scientific Reports 5, 15334 (2015).
- [3] Murakoshi H, Shibata AC. Scientific Reports 7, 6791 (2017).
- [4] Yan Li, Alex Forbrich, Jiahui Wu, Peng Shao, Robert E Campbell, Roger Zemp. Scientific Reports 6, 22129 (2016).
- [5] Murakoshi H, Horiuchi H, Kosugi T, Onda M, Sato A, Koga N, and Nabekura J. Scientific Reports 9, 12072 (2019).
- [6] Hui Wang, Marco Vilela, Andreas Winkler, Miroslaw Tarnawski, Ilme Schlichting, Hayretin Yumerefendi, Brian Kuhlman, Rihe

Liu, Gaudenz Danuser, Klaus M Hahn. Nature Methods 13, 755-8 (2016).



むらこし・ひでじ 自然科学研究機構生理学研究所准教授 2005年に名古屋大学理学研究科にて博士(理学)取得後、日本学術振興会特別研究員、Duke大学博士 研究員を経て、2011年より現職。2011年から2014年JSTさきがけ研究者兼任。研究内容は分子プローブ 開発による神経細胞内シグナル分子の可視化と操作。

共同利用研究ハイライト

第1級芳香族アミンとアルコールを用いた 含窒素環骨格の直接的触媒合成法の開発

皆川 真規 山形大学大学院理工学研究科 助教

1. はじめに

含窒素環化合物は、生体活性物質や 機能性材料として重要な基礎骨格であ る^[1]。従来の含窒素環化合物の合成方 法は、(1)通常多段階を要する。(2) 有毒性のハロゲン試薬を使用する。(3) 環化反応の前駆体となるアルキン試薬 やアルケン試薬の調製が必要である^[2]。 一方、アミンを用いた触媒的直接環化 反応は、含窒素化合物を合成するため の有望な合成方法である^[3]。当研究室 では、Fe触媒による芳香族アミンのア



図1. 第1級芳香族アミン類1a-gと1,3-プロパンジオール(2a)の直接的環化反応。

ルコールを用いたアルキル化反応^[4]や、 Ru触媒による芳香族アミンのカルボン 酸を用いたアルキル化反応^[5]など、窒 素原子の環境調和型アルキル化反応を 達成してきた.本研究では、幅広い基 質適用性が期待できる芳香族アミン類 とジオール類を原料とし、副生成物が 水のみの金属触媒反応による含窒素環 骨格の一段階直接合成を目的とした^[6]。

2. 触媒的直接環化反応の検討

今回、モデル反応としてN-メチルア ニリンと1、3-プロパンジオールの反 応を用い、触媒反応条件の検討を行っ た。その結果、触媒としてIrCl3、配位 子としてBINAP存在下、メシチレン中 165℃で加熱攪拌することにより、含 窒素環化合物1-メチル-1、2、3、4-テトラヒドロキノリンを73%の収率 で得た。以下この反応条件を最適反応 条件とし、実験を進めた。第1級芳香 族アミン類、アニリン1a-gと1、3-プロパンジオール(2a)の直接環化反応 について、結果を図1に示した。アニ リン(1a: 1.0 mmol) と1、3-プロパ ンジオール(2a: 1.3 mmol)をIrCl3触 媒(5.0 mol%)とBINAP配位子(7.5 mol%)存在下、テトラヒドロベンゾキ ノリジン3aを73%の収率で得た。ま た、芳香環上に電子供与基を有するア ミン類、p-アニシジン(1b)や4-メチ ルアニリン(1c)を用いた場合も対応 する含窒素環化物3bおよび3cをそれ ぞれ67%と76%で得た。同様に、電 子求引基を有する4-フルオロアニリン (1d)や3-フルオロアニリン(1e)、4-クロロアニリン(1f)、4-トリフルオロ メチルアニリン(1g)を用いた場合も、 対応する含窒素環化合物3d-gをそれ ぞれ26-75%の収率で得た。

3. 環化反応経路の検討

この反応経路に関する知見を得るため、中間体と想定される3-(フェニル アミノ)プロパン-1-オール(1')を出発 原料として触媒的環化反応条件の検討 を行った。その結果、前述の触媒条件 下、テトラヒドロベンゾキノリジン3a が26%収率で得られ、アニリン(1a)の 生成も確認した(式1)。また、3-(フェ ニルアミノ)プロパン-1-オール(1') と4-メチルアニリン(1b)の反応で は、3aが9%収率で生成すると同時 に3bが26%収率で生成した(式2)。 3-(フェニルアミノ)プロパン-1-オー ル(1')とN-メチルアニリン(1h)の反 応では、3a(12%)と4a(52%)および 1a(21%)の生成を確認した(式3)。こ れらの結果より、この窒素環形成は、Ir 触媒下、アルコールによるアミンのアル キル化から中間体1'が形成、その後残 りのOH基がアミンと反応し、C-H活性 化を経て環化反応が起こると示唆された。

4. まとめ

イリジウム触媒を用いた第1級芳香 族アミン類と1,3-プロパンジオールの 反応により、新規含窒素環骨格合成法 の開発に成功した。今後の課題として は、窒素環以外のヘテロ環化合物への展 開や7員環以上の環状化合物への適応、 および未だ不明な点もある反応機構の 解明が必要であると考えている。最後 に本研究を遂行するにあたり、設備・ 機器を使用させて頂くと共に様々なご 助言いただきました魚住康広教授に心 から御礼申し上げます.また、研究室 の皆様にも重ねて御礼申し上げます。



- [1] Corma, A.; Navas, J.; Sabater, M. J. Chem. Rev. 2018, 118, 1410.
- [2] Kitayama, H.; Abe, E.; Kaneko, K. J. Heterocyclic Chem. 1982, 19, 925.
- [3] Amamoto, H.; Obora, Y.; Ishii, Y. J. Org. Chem. 2009, 74, 628.
- [4] Minakawa, M.; Okubo, M.; Kawatsura, M. Bull. Chem. Soc. Jpn. 2015, 88, 1680.
- [5] Minakawa, M.; Okubo, M.; Kawatsura, M. Tetrahedron Lett. 2016, 57, 4187.
- [6] Minakawa, M.; Watanabe, K.; Toyoda, S.; Uozumi, Y. Synlett. 2018, 29, 2385.



みなかわ・まき 2006年に総合研究大学院大学(魚住研究室)で学位を取得(理学博士)。 2006年4-9月、分子科学研究所博士研究員、同年10月-2008年8月、 スクリプス研究所でポスドク、その後2008年9月-2013年3月まで理化学 研究所特別研究員、2013年4月-2016年4月日本大学助手、2016年5月 から現職。専門は有機化学、触媒反応。