

6th Mini-Symposium on Liquids

— Life and Surface —

開催日：2012年6月23日（土）

場所：九州大学箱崎地区創立五十周年記念講堂大会議室

前回の第5回目（2011年）は、本シンポジウムを International Symposium として開催したが[1]、2012年は Domestic Symposium として開催した。これまでと同様に[2-4]、液体論に関わる表面および生物に関連する講演を中心に集めた6件のシンポジウム講演者と12件のポスター発表が行われた。参加者数は36名であった。

古石氏と大西氏には、界面の関わる液体の振る舞いについて講演をしていただいた。古石氏は大規模な計算に基づいた理論研究について講演された。特に液滴と構造のある表面の衝突とその濡れ性に関して議論した。大西氏の研究は、従来は気相—固体界面に用いられて来た AFM の技術を液体—固体界面へ適用するというものであった。液相中という事を考慮すると、解釈が容易ではないが、その一方で極めて興味深い結果が示され、議論された。いずれも、これからが期待される方法論、技術であった。

生物関連で4件の講演をしていただいた。久保田氏にはアクチン等の荷電蛋白質表面で観測されている水の速い誘電緩和の分子動力学シミュレーションについて講演をしていただいた。観測量と従来の描像の再考がポイントであった。角五氏には、チューブリンの系が作り出す動的な構造について実験結果を話していただいた。エネルギーを消費しながら作り出される能動的自己組織化の理解は未だ十分ではない。しかし、興味深い対象である事が提示され、今後の理解の深化とミクロな機械としての応用が期待される。原田氏には分子混み合いのシミュレーション結果について発表していただいた。10年程前には細胞内の分子混み合いの議論がプリミティブなモデルに基づいて行われていたが、かなり詳細なモデルを用いる事が出来る様になりつつある事が分かる。

最後に、沈氏には光合成系の光化学系 II (PSII) の構造について発表していただいた。この系は水を酸素、水素イオン、電子に分解する膜タンパク質の複合体であり、光合成系の要所の一つである。特にマンガン4量体の構造が X 線回折によって明らかになった事は、主催者らが大学院生の頃から考えると隔世の感を感じる。この解明が今後の蛋白質の水和の研究の方向に及ぼす影響は小さいものではないであろう。

謝辞

シンポジウム講演者の方々には講演を引き受けていただき、専門的な内容や用語についても分かりやすい説明を行う為の工夫をしていただいた。この事に感謝したい。これまで

と同様にポスター発表も非常に興味深いものが多くあった。発表者の方々に感謝したい。
多くの方が参加し議論を盛り上げてくれた。全ての参加者の方々に感謝したい。

世話人

甲賀研一郎

秋山良

参考文献

- [1] “Proceedings of the 5th Mini-Symposium on Liquids – Fundamental Problems on Liquids and Related Topics”, Journal of the Physical Society of Japan, 81 (2012) Supplement A.
- [2] 秋山良、甲賀研一郎、物性研究 95(2010), 301.
- [3] 甲賀研一郎、秋山良、物性研究 93(2009), 284.
- [4] 秋山良、甲賀研一郎、物性研究 91(2009), 700.

プログラム

10:00~11:30 Poster Session 1 with Coffee and Cookies

11:30~12:50 Lunch

12:50~13:00 秋山良（九州大学）

Opening Remarks

13:00~13:30 古石貴裕（福井大学）

Molecular Dynamics Simulation of Droplets on Nanopillared Surface

13:30~14:00 大西洋（神戸大学）

Interfacial Liquids Visualized by Frequency-Modulation AFM

14:00~14:30 久保田陽二（九州大学）

Fast Dielectric Relaxation of Water around an Ion

14:30~15:00 Poster Preview

15:00~16:30 Poster Session 2 with Coffee and Cookies

16:30~17:00 角五彰（北海道大学）

Dynamic Self-Organization and Polymorphism of Microtubule Assembly Through Active Interactions with Kinesin

17:00~17:30 原田隆平（理化学研究所）

Hydration and Protein Stability under Molecular Crowding Environments

17:30~18:00 沈建仁（岡山大学）

Crystallization and Crystal Structure of Photosystem II, a Membrane-Protein Complex Catalyzing Light-Induced Water-Splitting in Photosynthesis

ポスターセッション

P1: T. Ekimoto (Kyoto Univ., Japan)

Solvation free energy analysis of β subunit of F1-motor protein

P2: T. Kaneko, K. Yasuoka, A. Mitsutake and X. C. Zeng (Keio Univ., Japan)

Multibaric-multithermal ensemble simulation of water confined in slit pores

P3: Y. Kawabata (Kyushu Univ., Japan)

A New Approach to Calculation of Partial Molar Volume Based on Molecular Simulation with Kirkwood-Buff Theory and an Application to Association of Methane Molecules in Water

P4: T. Sumi (Toyohashi Univ. of Tech., Japan)

Hop Diffusion Process of Transmembrane Protein in Compartmentalized Plasma Membrane

P5: Y. Nakamura (Kyushu Univ., Japan)

Slip and Stick Boundary Conditions for Diffusion Coefficient and Radial Distribution Function

P6: K. Nishiyama (Shimane Univ., Japan)

Full color-tuning by rare-earth emitting devices embedded in organogels

P7: R. Hara (Kyushu Univ., Japan)

A solvent effect on insertion path of a solute particle into a cylindrical vessel

P8: S. Fujihara (Kyushu Univ., Japan)

Exchange Effects of Strongly Bound Counterions on Effective Interaction between Like-Charged Macroions

P9: K. Tokunaga (Kougakuin Univ., Japan)

Conditions for Large Displacement of a Solvation Motor

P10: K. Koga (Okayama Univ., Japan)

Do methane molecules attract each other in water?

P11: N. Miyamoto (Fukuoka Inst. of Tech., Japan)

Liquid crystal phases of colloidal inorganic nanosheets

P12: N. Yamamoto and K. Koga (Okayama Univ., Japan)

Density of interfacial water around hydrophobic and hydrophilic regions of globular actin

ナノスケールの凹凸表面における 水滴の分子動力学シミュレーション

福井大学 大学院工学研究科 古石貴裕¹

1 はじめに

界面は我々の身の周りの至る所に存在し、中でも水と固体の界面は日常的にもよく見られる。そのため、表面に機能持たせたものが多く存在し、例えば、水を弾く撥水性界面はガラスの曇り止めや表面自己洗浄等に利用されている。このような表面の機能は、表面を構成する分子の化学的性質だけではなく、表面のマイクロ構造を物理的に制御することによっても作り出すことができる。自然界においても撥水作用を持つハスの葉の表面やアメンボの足などは、それ自身が疎水性物質から出来ており、更にミクロスケールの凹凸を表面に作ることで、撥水機能を実現していることが分かっている。[1, 2, 3]。

本研究では凹凸構造を持つ表面上に水滴を配置した系で分子動力学 (MD) シミュレーションを行い、ミクロなレベルで凹凸表面や水滴の性質を調べた。

2 ナノ構造をもつ固体表面の濡れ性

ミクロスケールの凹凸構造を持つ表面に水滴を配置したとき、水滴は二つの状態を取ることが知られている。一つは、水滴が凹凸の上面に接し、底面との間に空隙がある状態であり、これは Cassie 状態 (図 1(b)) と呼ばれる。もう一つは、水滴が凹凸の間に浸入し、表面が完全に濡れる状態であり、これは Wenzel 状態 (図 1(c)) と呼ばれる。凹凸の高さがある程度高い場合、水滴はこれらの 2 つの平衡状態を取ることができるため、2 状態

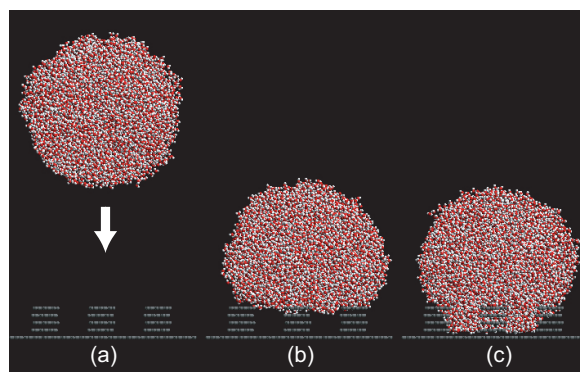


図 1: 水滴衝突のシミュレーション

間には自由エネルギー障壁があると考えられる。そこで、MD シミュレーションを用い、図 1 に示すように、水滴を凹凸面に衝突させることで、自由エネルギー障壁の高さを求めた [4]。衝突速度

¹E-mail: koishi@u-fukui.ac.jp

が適当な範囲内にあるとき、衝突速度が同じであってもある一定の確率で Cassie 状態と Wenzel 状態となる。そこで、同じ衝突速度でのシミュレーションを約 100 回行い、それぞれの状態になる確率から自由エネルギー障壁の大きさを求めた。ここで用いた凹凸面は、1 層のグラファイトに 1 辺約 12Å の 4 層のグラファイト（高さ 13.4Å）から成る柱を、柱の大きさと同じ間隔で格子状に配置して作成した。

水滴を衝突させる表面の柱の高さは 2 つの平衡状態が併存する最低の高さである 13.4Å とした。水滴の初期位置は凹凸表面から 60Å 上方とし。その位置で水滴を 200 ps 平衡化した。その後、水滴に対し下向きに速度を与え、凹凸表面と衝突させた。下向きの速度を与えるときには、その直前に速度付加による温度上昇を見越して、予めその温度分を差し引き、速度付加後も水滴の温度は一定となるようにした。9 つの速度条件でそれぞれ 102（条件によっては 103）回、合計 926 の水滴衝突のシミュレーションを行い、その結果を

$$P_w = P_0 \exp\left(-\frac{\Delta G_{cw}}{e_k}\right) \quad (1)$$

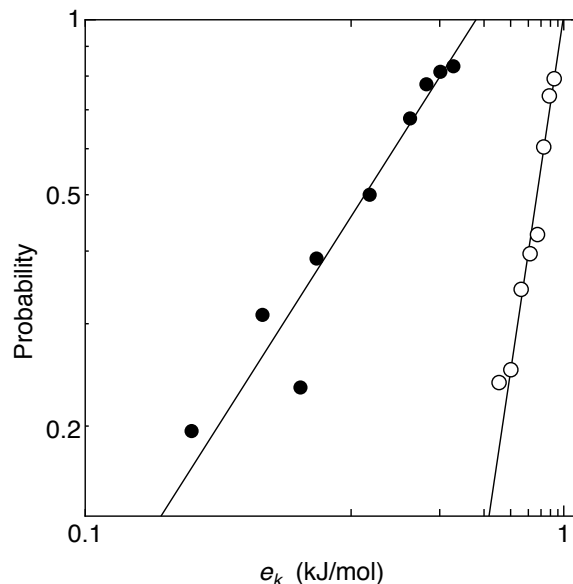


図 2: フィッティング結果

でフィッティングすることで、自由エネルギー障壁の大きさ ΔG_{cw} を計算した。上記の式で、 P_w は Wenzel 状態となる確率、 P_0 は定数、 e_k は水滴の衝突速度の運動エネルギーである。フィッティングの結果、 ΔG_{cw} は 0.334 kJ/mol となることが分かった（図 2 の黒丸）。さらに、水分子数を 1,728 にして、3 つの凹凸表面の条件で同様なシミュレーションを行った。これらの条件は (1) 5,832 分子と同じ凹凸表面、(2) 柱の間隔を広げて x, y 方向にそれぞれ 14.8, 14.9Å にした凹凸表面、(3) 表面を作る LJ 粒子のパラメータ ϵ を 0.9ϵ としたときの凹凸表面、である。(3) の LJ 粒子で平滑面を作ったときの水滴の接触角は 99° であり、元の表面（接触角 92° ）より疎水性が強くなっている。(1) の条件では $\Delta G_{cw} = 0.328$ kJ/mol となり、5,832 分子のときとほぼ同じ結果となった。(2) の条件では $\Delta G_{cw} = 0.00286$ kJ/mol となり、柱の間隔を広めた結果、 ΔG_{cw} は大幅に減少することが分かった。(3) の条件では $\Delta G_{cw} = 1.41$ kJ/mol となり（図 2 の白丸）、平滑面での接触角が 92° の凹凸表面に比べ、 ΔG_{cw} が大きくなることが分かった。これらの結果から、 ΔG_{cw} は水滴の大きさにはほとんど依存せず、表面の性質に大きく依存することが分かった。柱の間隔が広がった場合には、 ΔG_{cw} が小さくなるため、水滴は Wenzel 状態になりやすく、疎水性を強めた場合には ΔG_{cw} が大きくなるため、Wenzel 状態にはなりにくくなることが分かった。

3 衝突水滴の内部圧力

次に、水滴の衝突現象を詳しく調べるため、衝突時の水滴の内部圧力を求めた。実験 [5, 6] によると水滴が表面に衝突するとき、水滴内の圧力が鋭く上昇する言われている。MD シミュレーションでは系の圧力を、ビリアル定理を用いて計算するため、シミュレーションセルを更に細かいセルで区切り、それぞれのセルでの圧力を求めることで、水滴の内部圧力分布を計算できる。今回の計算では、各セルでの圧力テンソルを求め、その対角成分を x, y, z 方向それぞれの圧力 P_x, P_y, P_z とした。また、水滴下部の上向き (z の正方向) の圧力を調べるため衝突面から z 方向に $16.7\text{\AA}$ の範囲の圧力 P_{lz} も求めた。衝突させる表面は以下の 3 種類である：(1) 平滑面、(2) グラファイト 3 層 ($10.0\text{\AA}$) の柱から成る凹凸面、(3) グラファイト 4 層 ($13.4\text{\AA}$) の柱から成る凹凸面。水滴は始めに 200 ps 間平衡化し、その後下向きの速度を与え表面に衝突させた。衝突速度は 150 m/s と 470 m/s の 2 種類を用いた。

平滑面に速度 470 m/s で衝突させたときのスナップショットを図 3、圧力の時間変化を図 4 に示す。図 3(a) は衝突直後、図 3(b) は衝突後水滴が最も横方向に広がったときのスナップショットである。図 3 の (a), (b) の時刻を、図 4 の上向き矢印のある箇所の時刻に対応させた。図 4 において、 P_x と P_y はどちらも衝突面と平行でありほぼ等しい値を取るため平均値で示されている。これら図から、水滴が表面に衝突した直後の水滴内の上向き (z の正方向) の圧力が非常に高くなっており、特に水滴下部の圧力 P_{lz} が高くなっていることがわかる。この圧力が高い状態は 10 ps 程度続き、その後圧力はほぼ一定値と成る。これらの結果から、衝突による圧力上昇は、水滴が表面に衝突した直後のみで起こり、図 3(b) のように水滴が大きく変形しているときの圧力は高くないことが分かった。衝突速度が 150 m/s の場合は、衝突速度が 470 m/s のときほど明瞭な圧力のピークが現れなかったが、衝突直後に圧力が増加しその後急速に減少するという衝突速度 470 m/s の場合と同様な傾向が見られた。

グラファイト 3 層の柱から成る凹凸面に水滴を衝突させた場合は、衝突速度が 150 m/s のときと 470 m/s のときの両方で水滴は水滴は Wenzel 状態となった。衝突時の圧力変化も平滑面とほぼ等しいが、圧力ピークの高さは衝突速度が 150 m/s のとき平滑面のほぼ 50% 程度に減少し、470

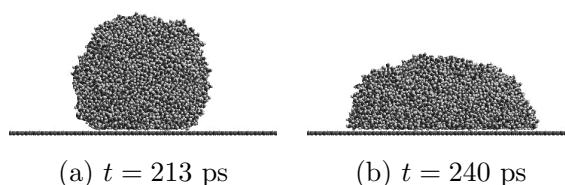


図 3: 衝突時のスナップショット

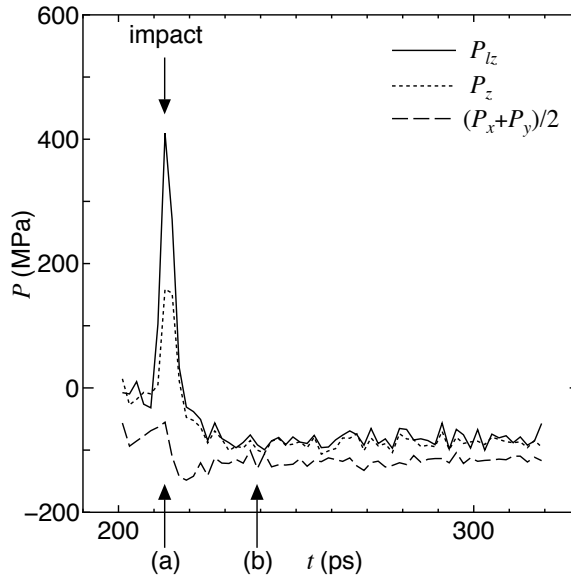


図 4: 内部圧力の時間変化

m/s のときは平滑面のほぼ 80% の値に減少した。グラファイト 4 層の柱から成る凹凸面に水滴を衝突させた場合は、衝突速度が 150 m/s のときは水滴は Cassie 状態となり、圧力は平滑面のときとほぼ等しい値となった。衝突速度が 470 m/s のとき水滴は Wenzel 状態となり、圧力は平滑面のときの 60% 程度に減少した。これらの結果から、凹凸面に水滴が衝突した場合は、衝突後水滴が Cassie 状態となるときの圧力上昇は平滑面に衝突したときとほぼ等しくなるが、Wenzel 状態となるときの圧力上昇は平滑面に衝突したときに比べ減少することが分かった。つまり、水滴の衝突による Cassie-Wenzel 転移により圧力上昇が抑制されることが分かった。このことは Cassie 状態と Wenzel 状態との間の自由エネルギー障壁と密接に関連していると思われるので、今後はこの圧力抑制と自由エネルギー障壁との関係について調べていきたい。

謝辞

ここで紹介した研究は慶應義塾大学の泰岡顕治教授、米国ネブラスカ大学の X. C. Zeng 教授と共同で行ったものである。両教授の貴重な助言と有益な議論に感謝申し上げる。

参考文献

- [1] C. Neinhuis and W. Barthlott, *Ann. Bot.*, **79** (1997), 667.
- [2] X. Gao and L. Jiang, *Nature*, **432** (2004), 36.
- [3] J. Genzer and A. Marmur, *Mat. Res. Soc. Bull.*, textbf33 (2008), 742.
- [4] T. Koishi, K. Yasuoka, S. Fujikawa, T. Ebisuzaki, and X. C. Zeng, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106** (2009), 8435.
- [5] Tao Deng, Kripa K. Varanasi, Ming Hsu, Nitin Bhate, Chris Keimel, Judith Stein, and Margaret Blohm, *Appl. Phys. Lett.*, **94** (2009), 133109.
- [6] Hyuk-Min Kwon, Adam T. Paxson, Kripa K. Varanasi, and Neelesh A. Patankar, *Phys. Rev. Lett.*, **106** (2011), 036102.

固液界面液体の周波数変調原子間力顕微鏡 (FM-AFM) を用いた研究

神戸大学理学研究科 大西 洋¹

1 背景

表面という特殊な環境においた物質を対象とする科学が表面科学である。1960年代から発達した真空工学に支えられて、固体触媒表面の組成と構造を精密に制御し、そこでおきる化学変化を追跡する研究が大いに進歩した。以来50年にわたって多くの先達が推し進めてきた研究が結実して Gerhard Ertl が2007年にノーベル化学賞を受賞した。次の半世紀を方向づける研究ベクトルはどこへ向かうだろうか？ 表面という特殊環境の研究を越えて、物質科学にとって新しいコンセプトをどこに求めることができるだろうか？

表面を研究することで、同じ物質であっても表面と内部にあるときで構造・物性・機能が異なることを我々は学んだ。テラス・ステップ・キンクで起きる化学反応が異なることを知った。分子の性質が位置によって変化することを期待し、それを実証する実験手法を編み出してきた。次のフロンティアは、場所ごとに異なる性質をもつ分子が互いに影響を及ぼしあって全体として機能を発現するメカニズムを明らかにする「有限の厚さをもつ界面」のサイエンスであろう。

2 固液界面の液体構造

化学的に重要な機能を有する「有限の厚さをもつ界面」として触媒・電極・潤滑剤・界面活性剤・生体膜などをあげることができる。いずれも固体が液体と接する界面である。これらの界面における液体構造を知ることは、界面反応メカニズムの解明に不可欠である。しかし、液体と固体に挟まれた界面の、しかも液体側の構造を実験的に計測することは簡単ではない。現在有力な手法は、エックス線回折や中性子反射率をもとに界面垂直方向の電子密度分布や核密度分布を決定することである[1]。これらの方法は面内方向で平均した構造情報をもたらすが、化学変化を起こしつつある界面は面内方向に均一な構造をとるとは限らない。組成や構造が不均一な固体に接する液体の構造をどうやって計測できるだろうか？

3 FM-AFM による液体構造計測

原子間力顕微鏡 (AFM) を使って液体分子が探針におよぼす力の分布図を作成すれば、分子数密度の濃淡が現れるかもしれない (図1)。カンチレバーの共振周波数変化を検出する方式の AFM (FM-AFM) を用いると、顕微鏡探針にはたらく力を 10 pN より良い分解能で計測できる。

木村建次郎ら[2]はこのような FM-AFM を用いて世界で初めて固液界面の液体構造を画像化した。雲母に接する KCl 水溶液 (濃度 1 M) 中で探針がうけた力の強弱を図2上に図示する。力の強い (弱い) 部分を白く (黒く) あらわした。図の縦軸は雲母表面

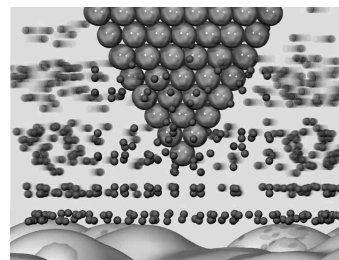


図1 固液界面を走査する原子間力顕微鏡探針

¹ E-mail: oni@kobe-u.ac.jp

に垂直な方位（幅 0.5 nm）、横軸は表面に平行な方位（幅 3.6 nm）であり、図下端の規則的な白い凹凸が雲母表面の断面形状に相当する。Reference Interaction Site Model（RISM）を用いてシミュレートした純水-雲母界面の水分子存在確率密度分布を同じ縮尺で図 2 下に示した。探針にはたらく力の強弱分布が、RISM 予測した密度と対応する形状であったことから「AFM で液体構造を観た」といえる。

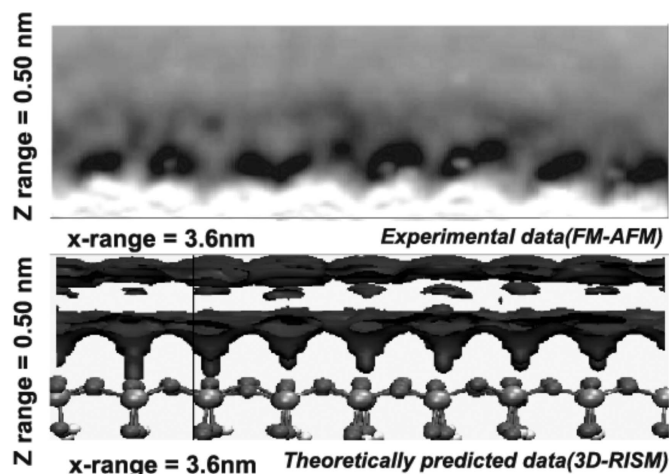


図 2 雲母に接する水溶液の液体構造. 上図：FM-AFM で計測した探針にかかる力分布. 下図：RISM 法でシミュレーションした水分子の密度分布.

4 水溶液-金属酸化物界面の水溶液構造

日浅巧らは二酸化チタン[3]とサファイア[4]に接する KCl 水溶液の構造を雲母の場合と同様にして調べた。顕微鏡探針にかかる力を探針-表面距離の関数として計測した結果をフォースカーブとよぶ。異なる面内座標で多数のフォースカーブを測定し平均することによって、構造化した水分子による層状構造を検出した。層間隔は 0.2-0.3 nm で水分子の大きさと整合している。雲母・サファイア・二酸化チタンで得た平均フォースカーブを比較したところ、親水性の高い界面ほどフォースカーブにあらわれる強弱の幅が大きかった。これは、親水性の高い界面ほど水が強く構造化することを示している（図 3）。

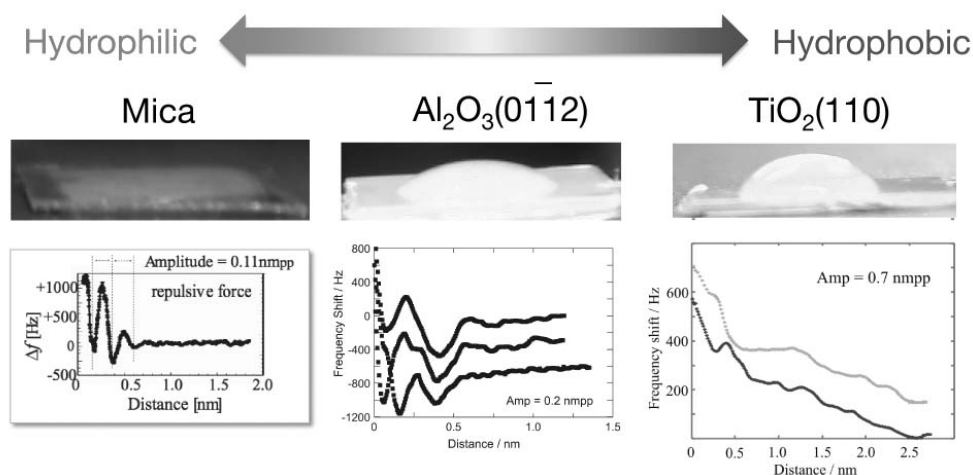


図 3 雲母・サファイア・二酸化チタンに接した水溶液中で計測したフォースカーブ. フォースカーブの縦軸はカンチレバー共振周波数のシフト量であり探針にかかる力の強弱（正のシフトで斥力）をあらわす. 各結晶に滴下した水滴の形状をあわせて示した.

5 有機溶媒-単分子膜界面の液体構造

液体化合物の分子構造と、界面液体構造との関連を探るために、日浅らはドデカンチオール自己組織化単分子膜に接する *n*-ドデカン・*n*-ヘキサデカン・フェニルオクタンのフォースカーブを計測した[5]。構造化した液体層の層間間隔は、末端にフェニル基をもつフェニルオクタンが 0.63 nm、*n*-ドデカンと *n*-ヘキサデカンで 0.57 nm であった (図 4)。FM-AFM の測定精度からみてこの差は有意であり、メチル基終端した SAM 上で (1) 直鎖アルカンが分子軸を分子膜に並行にして構造化すること (2) 末端フェニル基が疎な分子パッキングをもたらすことを示している。

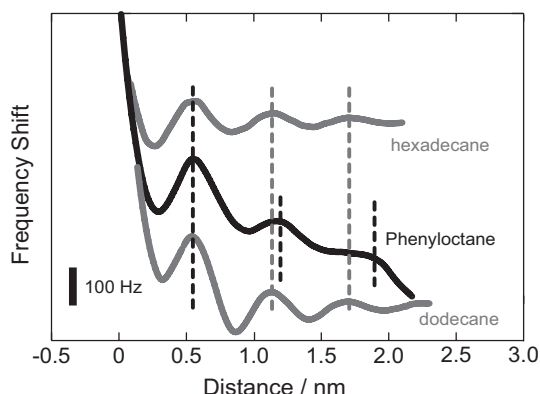


図 4 ドデカンチオール単分子膜に接する *n*-ヘキサデカン・フェニルオクタン・*n*-ドデカン中で計測したフォースカーブ。

6 表面の化学組成と液体構造

固体と接する液体の構造は固体表面の化学組成 (官能基) に敏感であると期待できる。日浅ら[6]はこれを実証するために OH または COOH で終端した単分子膜に接する KCl 水溶液を計測した。前者では、末端 OH 基にブリッジ型に水素結合する水分子に起因する力分布を検出し (図 5)、後者では末端カルボン酸に一对一で水素結合する水分子をとらえた。二つの単分子膜上で観測した力分布が異なる形状であったことから、水素結合部位の有無ばかりでなく、その組成や配向が界面液体構造におよぼす影響を FM-AFM で検知できることを示した。

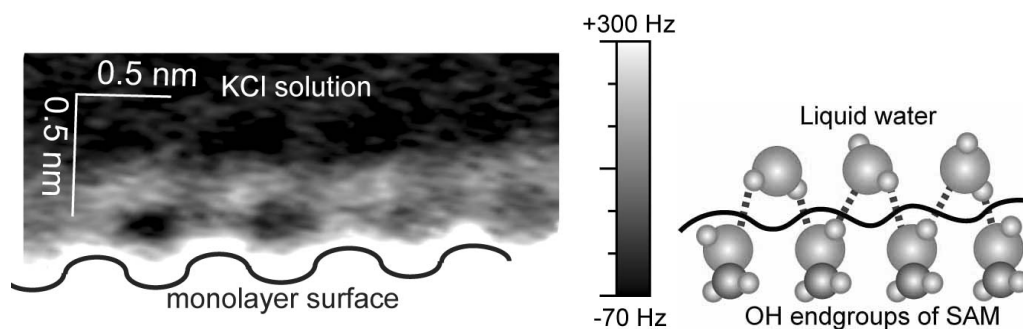


図 5 OH 基で終端した単分子膜に接する KCl 水溶液中で計測した探針にかかる力の二次元分布。力分布から推測した界面水構造を右図に示す。

7 これからの発展

本稿で紹介した例に加えてバクテリオロドプシン膜[2]・脂質二重膜[7]・グラファイト[8]などでも界面で構造化した液体に起因する力の二次元分布が検出されており、FM-AFM による力学計測が固液界面の液体構造計測法として一般性をもつことは間違いない。

固体の凹凸を計測するツールであった AFM を構造化液体の検出に転用する最初の試みは 20 年前に遡る[9]。AFM の力検出感度は年々向上し、粘性のある液体中でもカンチレバーの共振周波数変化を高感度検出する方法[10]が発明されるにおよんで pN オーダーの力検出が可能になり、構造化液体の二次元分布を画像化するに至った。水-雲母界面では三次元分布計測も可能になっている[11]。

次の目標は、界面反応にともなう液体構造変化を検出することである。界面電位を電気化学的に制御した実験が可能になり、さまざまな電極反応を追跡する有力なツールとなることを期待したい。液体中で作動する FM-AFM の開発において日本は抜kindでた技術力と実績を有しており、液体構造を計測しうる国産顕微鏡装置がすでに複数商品化されている。

一方で、AFM による測定結果を定量的に解釈する方法の確立が急務である。二枚の平板に挟まれて構造化した液体を対象とする表面力計測や、マイクロメーターサイズの球体と平板に挟んだ液体を計測するコロイドプローブにおいては、液体分子の密度に比例した力が測定子に加わる[12]。これに対して、二次元分布を画像化する先鋭な探針にかかる力は密度の空間勾配に比例するとの提案がある[2]。探針の存在が測定結果におよぼす影響の評価も必要である[13]。実験技術の進歩に触発されて、液体中で探針に加わる力の計算機シミュレーションが試行されつつある[14, 15]。実験・理論ともこれから数年のあいだに大いに発展すると期待できる研究分野である。

謝辞

図 3-5 に示した成果は、産学イノベーション加速事業【先端計測分析技術・機器開発】粉川良平チームが開発した顕微鏡を用いて科研費特定領域研究「高次系分子科学」のなかで得た。

参考文献

- [1] たとえばトライボロジスト **55** (2010) 228, 特集「固液界面の物理」.
- [2] K. Kimura, S. Ido, N. Oyabu, K. Kobayashi, Y. Hirata, T. Imai, H. Yamada, J. Chem. Phys. **132** (2010) 194705.
- [3] T. Hiasa, K. Kimura, H. Onishi, M. Ohta, K. Watanabe, R. Kokawa, N. Oyabu, K. Kobayashi, H. Yamada, Jpn. J. Appl. Phys **48** (2009) 08JB19.
- [4] T. Hiasa, K. Kimura, H. Onishi, M. Ohta, K. Watanabe, R. Kokawa, N. Oyabu, K. Kobayashi, H. Yamada, J. Phys. Chem. C **114** (2010) 21423.
- [5] T. Hiasa, K. Kimura, H. Onishi, Coll. Surf. A **396** (2012) 203.
- [6] T. Hiasa, K. Kimura, H. Onishi, Phys. Chem. Chem. Phys. **14** (2012) 8419.
- [7] T. Fukuma, M. J. Higgins, S. P. Jarvis, Biophys. J. **92** (2007) 3603.
- [8] K. Suzuki, N. Oyabu, K. Kobayashi, K. Matsushige, H. Yamada, Appl. Phys. Express **4** (2011) 125102.
- [9] S. J. O'Shea, M. E. Welland, T. Rayment, Appl. Phys. Lett. **60** (1992) 2356.
- [10] T. Fukuma, M. Kimura, K. Kobayashi, K. Matsushige, H. Yamada, Rev. Sci. Instrum. **76** (2005) 053704.
- [11] T. Fukuma, Y. Ueda, S. Yoshioka, H. Asakawa, Phys. Rev. Lett. **104** (2010) 016101.
- [12] H.-J. Butt, M. Kappl, Surface and Interfacial Forces, Wiley-VCH, 2010.
- [13] T. Hiasa, K. Kimura, H. Onishi, Jpn. J. Appl. Phys **51** (2012) 025703.
- [14] M. Harada, M. Tsukada, Phys. Rev. B **82** (2010) 035414.
- [15] M. Watkins, A. L. Shluger, Phys. Rev. Lett. **105** (2010) 196101.

イオン周りで見られる水の速い誘電緩和

— 分子動力学シミュレーション —

九大理 久保田 陽二¹

マイクロ波を用いた誘電緩和スペクトルの測定において、イオン付近の水に速い緩和成分が見られる事が知られている。一方で、これまでの分子動力学シミュレーションではイオン付近の水に遅い緩和が見られると報告されてきた。本研究では、計算する物理量を再検討し分子動力学シミュレーションにより、実験で見られる水の速い誘電緩和を再現した。

1 序論

アクチンなどのタンパク質や電解質の水溶液におけるマイクロ波を用いた誘電緩和スペクトルの実験により、速い緩和成分をもつ水（ハイパーモバイルウォーター、以下 HMW）が溶質周りに存在する事が知られている [1, 2, 3]。ATP エネルギー変換において水が重要な役割を担っている事がわかってきており、例えば筋肉繊維が動く際の分子モーターの動作において HMW が関与しているのではないかと考えられている。しかし、HMW の実体に関する理解は進んでいない。

実験データの解析結果として HMW が溶質の近傍に存在すると報告されている。従来の分子動力学シミュレーションにおける解析では系全体の誘電的な量だけが調べられており、溶質近傍の局所的な情報を拾い出していない。一方で溶質近傍の局所的な性質の解析として同一水分子の運動緩和を調べる試みはなされていたが速い緩和の成分は見いだされていない [4, 5]。それらの計算では局所的な性質を評価しているものの、誘電緩和を評価するものではなかった。HMW はアルカリハライド水溶液における実験でも存在が報告されている [1, 2]。本研究では、分子動力学シミュレーションを行ない、単一イオン周りの水の動的な性質を調べた。まず、誘電緩和スペクトルを与える物理量を再検討し、これまでのシミュレーションで評価されていたいわゆる配向緩和とは異なる時間相関関数の形で、計算すべき物理量を定式化した。

¹E-mail: ykubota @ chem.kyushu-univ.jp

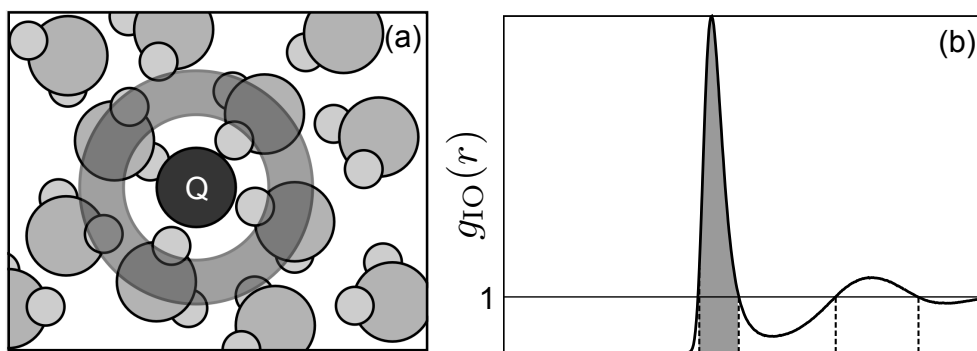


図 1: (a) イオン周りに設定した球殻領域を表わす模式図. (b) イオン-水分子間の動径分布関数の第 1 ピーク辺りを球殻として選んだ. 球殻の境界は $g_{IO}(r) = 1$ の条件から定めた.

2 計算

摂動的な外部電場 E_z に対する溶媒の局所的な応答について考える. 線形応答理論を用いると誘電分極 $P_z(\mathbf{r}, t)$ の非平衡緩和過程は次のように表わせる.

$$\int_{[1]} d\mathbf{r} \Delta \bar{P}_z(\mathbf{r}, t) = \beta E_z c_z(t), \quad (1)$$

$$c_z(t) = \left\langle \int d\mathbf{r}' \delta P_z(\mathbf{r}', 0) \int_{[1]} d\mathbf{r} \delta P_z(\mathbf{r}, t) \right\rangle. \quad (2)$$

(2) 式の右辺のブラケットは外部電場の無い平衡状態におけるアンサンブル平均を意味する. また, 積分記号付近に書かれた記号 [1] は適当に定めた“領域 [1]”についての積分を意味する. イオン近傍の水の性質を調べるために, 第一水和殻辺りの球殻領域を領域 [1] として計算した (図 1 参照). もし, 系全体を領域 [1] として計算すると, (2) 式は誘電応答の計算でよく用いられる式となりフーリエ変換によって誘電率が得られる.

ところで水分子の双極子モーメント μ を用いて $c_z(t)$ を書き換えると, self 項 $s_z(t)$ と cross 項とに分離した形に表わせる. また, 系の対称性を想定すると $s_z(t)$ は

$$s_z(t) = \frac{1}{3} \mu^2 \sum_k^{[1]} \langle \cos \theta^{(k)}(t) \rangle, \quad (3)$$

と書き換えられる. ここで $\theta^{(k)}(t)$ は t の時間に水分子 k の向きが変化した角度を表わしており, $s_z(t)$ は配向緩和と対応している事がわかる.

3 結果

常温常圧の希薄電解質水溶液を想定した分子動力学シミュレーションを行なった. 溶質は単一イオン分子とし, 水分子として SPC/E モデルを用いた. 温度を $T = 298 \text{ K}$ として NVT 一定の条件で実行したシミュレーションから初期条件を選び, NVE 一定の条件で時間相関関数を計算した. 粒子数密度は 298 K における常圧の水の密度 (33.33 g/cm^3) とした. 粒子数は $N = 512$ 個とし,

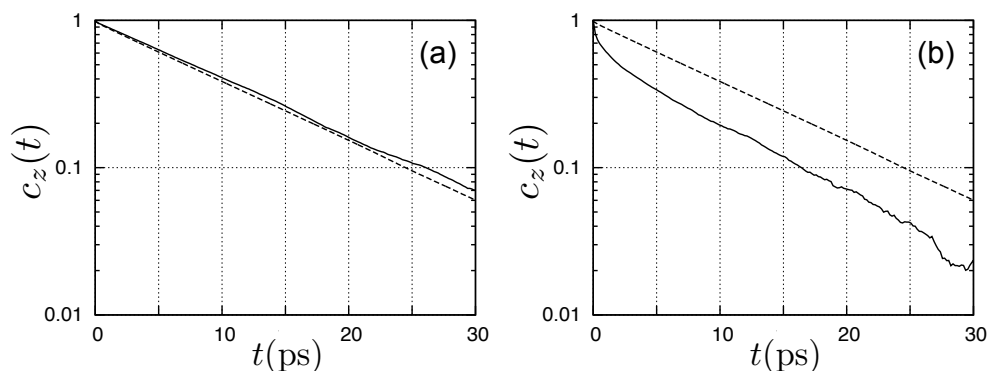


図 2: 時間相関関数 $c_z(t)$. 実線は (a) $Q = 0$, (b) $Q = 2e$ での溶質近傍の球殻領域, 点線は bulk 系の計算結果を表わす. どのデータも $c_z(0) = 1$ となるようにスケールしている.

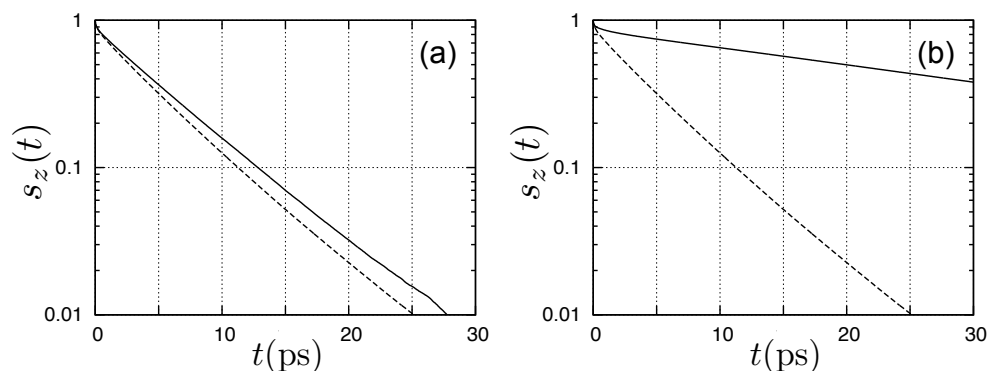


図 3: 時間相関関数の self 項 $s_z(t)$. 実線は (a) $Q = 0$, (b) $Q = 2e$ での溶質近傍の球殻領域, 点線は bulk 系の計算結果を表わす. どのデータも $s_z(0) = 1$ となるようにスケールしている.

1 個のイオン分子と $(N - 1)$ 個の水分子から成る. また, bulk 系における誘電緩和を調べる為にイオンを含まない水分子のみの系でシミュレーションを行なった. この場合, $c_z(t)$ や $s_z(t)$ の計算で系全体を領域 [1] とした.

図 2 に溶質の電荷が $Q = 0, 2e$, 及び bulk 系で計算した $c_z(t)$ を示す. 溶質の電荷が中性の場合, $c_z(t)$ は bulk 系とほぼ同じ時間スケールで緩和する [図 2 の (a)]. 一方, 溶質の電荷が $Q = 2e$ の場合には bulk 系よりも速く緩和する成分が見られる [図 2 の (b)]. これらの緩和の時間スケールや bulk 系と比較した緩和の時定数の割合は, 実験結果とおおよそ近い値であった. よって, これらの計算結果が HMW と対応していると考えられる.

図 3 に $s_z(t)$ の計算結果を示す. 溶質の電荷が中性の場合は $s_z(t)$ の緩和は bulk 系よりも多少遅いが, ほぼ同じように緩和する [図 3 の (a)]. 一方, $Q = 2e$ では明らかに遅い緩和が見られる.

このようにイオン近傍の水において, $s_z(t)$ では遅い緩和が見られ, $c_z(t)$ では速い緩和が見られる.

4 まとめ

分子動力学シミュレーションの結果、イオン周りの水は bulk 系の水と比べて速い緩和成分を持っている事がわかった。緩和の時間スケールは実験による測定値とよく一致している。本研究により、(1) 同一水分子の緩和運動ではイオン近傍に遅い運動が見られ、(2) 粒子間の協調的な運動を調べる事で速い緩和成分が見られる事がわかった。即ち HMW を理解する上では誘電緩和の cross 項を含めて解析を進める事が重要である。

謝辞

本研究は、吉森明氏、秋山良氏、松林伸幸氏、鈴木誠氏との共同研究である。また、新学術領域研究「水を主役とした ATP エネルギー変換」の助成を受けたものである。分子科学研究所の共同研究として行なわれ、計算の一部に岡崎国立共同研究機構計算科学研究センターの電子計算機を利用した。

参考文献

- [1] S. Kabir, K. Yokoyama, K. Mihashi, T. Kodama, and M. Suzuki, *Biophys. J.* **85** (2003), 3154.
- [2] T. Miyazaki, G. Mogami, T. Wazawa, T. Kodama, and M. Suzuki, *J. Phys. Chem. A* **112** (2008), 10801.
- [3] R. Buchner and G. Heftner, *Phys. Chem. Chem. Phys.* **11** (2009), 8984.
- [4] I. Kurisaki and T. Takahashi, *Comput. Theor. Chem.* **966** (2011), 26.
- [5] M. Maroncelli and G. Fleming, *J. Chem. Phys.* **89** (1988), 5044.

生体分子モーターキネシン上で動的に自己組織化する微小管集合体の多形構造

Dynamic self-organization and polymorphism of microtubule assembly through active interactions with kinesin

北大院理 角五 彰

〔緒言〕

生体分子モーター（アクチン/ミオシンや微小管/キネシン系など）は ATP の化学エネルギーを効率よく並進運動エネルギーに変換するソフトな分子機械である。これらの分子機械を利用したナノバイオマシンやバイオアクチュエーター開発が各国で盛んに行われている。近年、マイクロ流路と組み合わせた分子デバイスのプロトタイプ [Dekker et al. Science 2006]なども開発され、その重要性・有用性も示されている。しかし、その多くは一次元並進運動という生体分子モーターの分子的機能を利用するに留まり、集積により力や速度の増幅を目指すという研究報告例はほとんどなかった。例えば、筋肉の力強くダイナミックな運動は、アクチン/ミオシンが繊維→筋節→筋繊維→筋原繊維と高次の階層構造を有することで初めて実現される。構成要素の単なる総和とは異なるこのような機能特性は「創発」と呼ばれ、生命機能最大の特徴でもある。

このような生体システムに見られる高度な機能創発の実現には、生体分子モーターの極性・空間配置を考慮した階層的集積法の確立が必要不可欠である。生体の秩序構造は構成要素が熱力学的原理に従い平衡系、非平衡系の枠を横断しながら自ら組み上がるものである。こうした視点から、我々はこれまで生体分子モーターの受動的自己組織化法—エネルギー供給のない平衡系における要素集積法を確立し、ナノからミリメートルオーダーまでのサイズのスケールアップを実現した（文献 1）。さらに、能動的自己組織化法—エネルギー(ATP)供給のある非平衡系での要素集積法も確立し、バンドル、リング、フラクタルのネットワークなど、多彩な集合体の創製にも成功した（文献 2-5）。特に回転運動をするリング状の微小管集合体は、直径が数 μm ～数十 μm でありその回転方向は左回り優勢であることが知られている。この回転方向の優劣性は、生体分子モーターか微小管いずれかの性質によるものであると考えられる。微小管はチューブリンの重合体であるプロトフィラメント(PF)が 11-16 本程度集まった円筒状の構造をしている。生体内では PF 数が制御されているが *in vitro* で再構成した場合条件によりフィラメント数が変化してくる。13 本の PF からなる微小管では PF は微小管の軸方向に平行にならんでいるが 14 本では左巻きのらせん構造、12 本では右巻きのらせん構造を取りやすいということが報告されている。左回転が優先的に観察された系では 14 本の PF からなる微小管が多く含まれていることがわかっている。本稿では、微小管のプロトフィラメント数(PF)に注目しリング状の微小管集合体の回転方向制御法について紹介する。

〔実験〕

Tubulin は、豚脳より重合・脱重合を繰り返し抽出・精製した。微小管は、Tubulin 42 μM : Biotin 修飾-Tubulin 42 μM : Rhodamine 標識-Tubulin 4.2 μM となるよう混合し、これを 37 度で 30min.～48 h.間インキュベートすることで得た。kinesin は、C 末端を緑色蛍光タンパク質(GFP)と融合させたプラスミドを大腸菌にて発現・精製することで得た。観察用 Flow cell はスライドガラス状にスパーサーを張りカバーガラスを溶着することで作成した。この Flow cell 内に抗 GFP 抗体を介して kinesin を固定し、さらにその kinesin 上に ATP 非存在下で微小管を吸着させた。Streptavidin を微小管表面に結合後、ATP 5mM の添加で微小管の滑り運動を開始させた。

〔結果・考察〕

微小管を Tubulin 濃度 33.6 μM , DMSO 濃度 5%、温度 37 度で 30min.～48 h キンキュベーションすることで調整した。それらの微小管を能動的に自己組織化することでリング状の微小管集合体を作成した。顕微鏡下で撮影された動画からそれらの回転方向（右回り、左回り）を評価した。その結果を Figure1 に示した。インキュベーション時間の増加とともに右回りが優勢になることがわかった。また、24h インキュベーションした微小管を氷上で脱重合し、再度 30min インキュベーションすることで回転方向が左回り優勢に戻ることもわかった。このように回転方向がインキュベーション時間により

制御可能である事を示した。

これらの回転方向の変化は微小管の性質の変化によってもたらされていると考えられる。インキュベーション過程で微小管構造の組変わりが起きていることが二重染色実験により確認されている。そこで 30min と 24h 間インキュベーションした微小管の断面を透過型電子顕微鏡を用い観察した。得られた画像よりプロトフィラメント(PF)数を解析しその出現頻度を評価した (Figure2)。インキュベーション時間が増すことでプロトフィラメント数が増加することが分かった。微小管は PF 数の増加とともに右巻きの割合が増加することが知られている。さらにキネシンはプロトフィラメントのらせん構造に沿って移動することも明らかにされている[B, Nitzsche. *Nature Nanotechnology* 2008]。これらの知見よりらせん構造の変化がリング状集合体の回転方向に影響を与えていると考えられる。

以上、微小管調整時におけるインキュベーション時間よりリング状微小管集合体の回転方向を制御可能であることを示した(文献 6)。

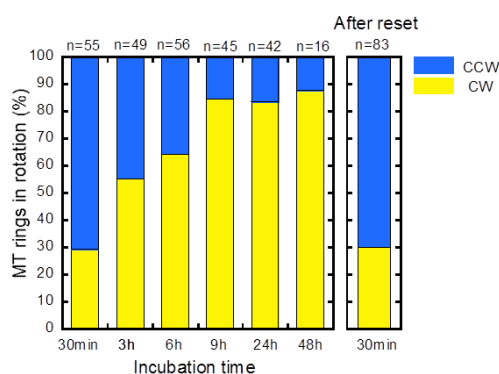


Figure 1. Effect of incubation time of MTs formation on the preferential rotation of MTs ring formed by Active Self-Organization (AcSO) on kinesin-fixed surface.

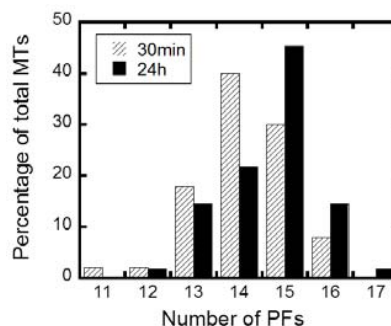


Figure2. Distribution of PFs number of MTs prepared by 30 minutes (shadow) (n=50) and 24 hours (dark) (n=55) incubation at 37 °C without taxol in the presence of 0.64 M DMSO.

[謝辞]

本研究は長田義仁先生（理研）、Gong JianPing 先生（北大院先端生命）敷中一洋博士（東京農工大）、川村隆三博士（理研）、その他多くの方々のご協力を賜った。本研究の一部は独立行政法人科学技術振興機構（PRESTO, JST）の助成により行われた。ここに謝意を表する。

[参考文献]

- 1) A. Kakugo et al *Adv. Mater.*, 2002, 14, 1124.
- 2) R. Kawamura et al, *Biomacromolecules*, 2008, 9, 2277.
- 3) A. Kakugo et al *JACS*, 2009 131, 18089.
- 4) R. Kawamura et al, *Langmuir*, 2010, 26 (1), 533.
- 5) Y Tamura et al, *Soft Mater*, 2011, 7, 5654
- 6) A. Kakugo et al *Biomacromolecules*, 2011. 12, 3394.

分子混雑環境における水和構造と蛋白質の構造安定性

Hydration and Protein Stability under Molecular Crowding Environments

理化学研究所 計算科学研究機構 原田 隆平¹

1 序論

細胞の内部は非常に混み合っており、隣り合う蛋白質間の距離は蛋白質自身の大きさとさほど変わりはない。細胞環境は、混雑したあわただしい生化学的大都市であり、ほとんどの生化学実験や生体分子シミュレーションが仮定してきた希薄溶液の環境とは異なる。これらのことは、周囲の蛋白質および溶媒分子との相互作用(混み合い効果)について、これまでほとんど考慮されてこなかったことを意味しており、現在において未だ細胞内の正確な描像を得ることは困難である。

混み合い効果は、当初より単純な剛体球モデルを用いて調べられてきた。[1]このモデルによれば、混み合い環境では排除体積効果により、蛋白質間にある小さな分子が排除され、エントロピーを介して蛋白質同士が接近するため、折りたたまれたコンパクトな構造がより安定となる。

しかしながら近年、in-cell NMR により細胞環境における蛋白質のダイナミクスや構造安定性を観察することが可能となり、排除体積効果による理解に反し、変性した構造が安定化することが報告された。[2]この事実は、自由エネルギーにおいてエントロピーの寄与に加え、蛋白質間相互作用に起因するエンタルピーの寄与も重要であることを意味している。また動力学的には、蛋白質はたえず周囲の溶媒との流体力学相互作用にさらされているが、剛体球モデルではこの流体力学効果を考慮することが難しく、モデルの限界を示唆している。

このような事実から、本研究では排除体積効果に加えて蛋白質間相互作用および流体力学効果を詳細に考慮すべきであると考え、蛋白質・溶媒を露わに含んだ混み合い環境を全原子モデリングし、相互作用を詳細な分子力場で取り込んだ分子動力学計算を実行した。これにより混み合いが、①熱力学的観点から、蛋白質間相互作用が構造安定性に与える影響を、②動力学的観点から、流体力学効果が拡散に与える影響を解析した。上記により、希薄溶液における熱力学的平衡およびダイナミクスがどのように補正されるべきかを考察し、細胞内における蛋白質の物理化学的性質を議論した。[3][4]

2 方法

これまでの希薄溶液では、①注目する蛋白質溶液が十分希薄であり、蛋白質同士が直接コンタクトを形成したり、長距離ポテンシャルで相互作用したりしないという「理想的条件」、②1つの場所における環境は他の全ての場所と同様であるという「一様性」の2つを仮定していた。本研究では、これら2つの仮定を緩和し細胞環境に近づけるために、複数の蛋白質で分子混雑環境を全原子モデルで表現し、分子力場により詳細に相互作用を取り込んだ分子動力学計算を用いて、細胞環境における混み合い効果を解析した。

¹ E-mail: rharada@riken.jp

3 結果と考察

細胞環境を模したシステムとして、蛋白質 (Protein G および Villin head-piece subdomain) を用いて、分子混雑を再現した。(図 1 : 上段は、Protein G×8 個、下段は Protein G×4 個+Villin head-piece subdomain×8 個のシステム) ボックスサイズを変化させることにより、混み合い度合の異なる複数のシステムを作成し、分子混雑環境における水分子および蛋白質の物理化学的性質を解析した。

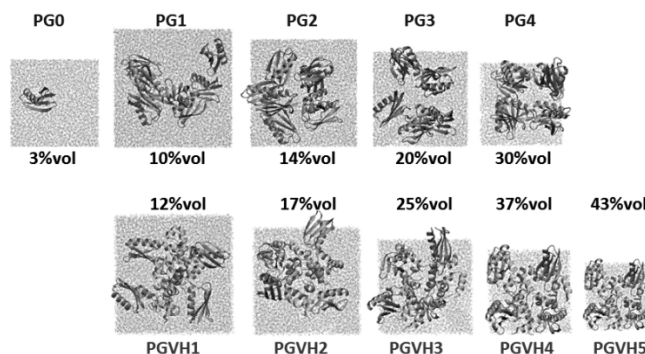


図 1. 複数の蛋白質により構成された分子混雑のシステム
(混み合いの強さは、全体の体積に対する蛋白質の体積比で表されている)

3. 1 混み合いが水和構造に与える影響

混み合いが水分子の水和構造に与える影響を、拡散係数および誘電率を計算することにより解析した。(図 2)

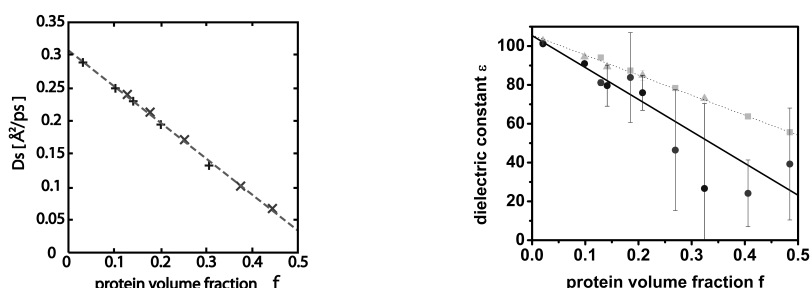


図 2. 分子混雑環境における水分子の拡散係数(左)と誘電率(右)

拡散係数は、

$$D = \lim_{t \rightarrow \infty} \frac{1}{6t} \left\langle |r(t'+t) - r(t')|^2 \right\rangle_{t'} \quad (1)$$

誘電率は、双極子モーメント、体積、蛋白質の体積比、ボルツマン係数、絶対温度より、

$$\varepsilon = 1 + 4\pi \frac{\left\langle \vec{M}_{\text{water}}^2 \right\rangle - \left\langle \vec{M}_{\text{water}} \right\rangle^2 + \left(\left\langle \vec{M}_{\text{water}} \vec{M}_{\text{protein+ions}} \right\rangle - \left\langle \vec{M}_{\text{water}} \right\rangle \left\langle \vec{M}_{\text{protein+ions}} \right\rangle \right)}{3V(1-f)k_B T} \quad (2)$$

の関係式を用いて計算した。拡散係数および誘電率は、ともに混み合いの強さに対して線形に減少するという、興味深いユニバーサリティが示された。この関係式は、混み合いの強さが水分子の動力的および熱動的性質を決定していることを示唆しているとともに、細胞環境モデリン

グに対するモデリング指針を与えている。例えば、混み合いの強さに応じて水分子の誘電率を決定できるので、蛋白質周囲の水分子を誘電率一定として、平均場近似することができる。

3. 2 混み合いが蛋白質の安定性に与える影響

Protein G と比較して、Villin head-piece subdomain の構造が大きく不安定化した。天然構造からの構造のずれ(Root Mean Square Deviation, RMSD)の時間変化を図 3 に示す。

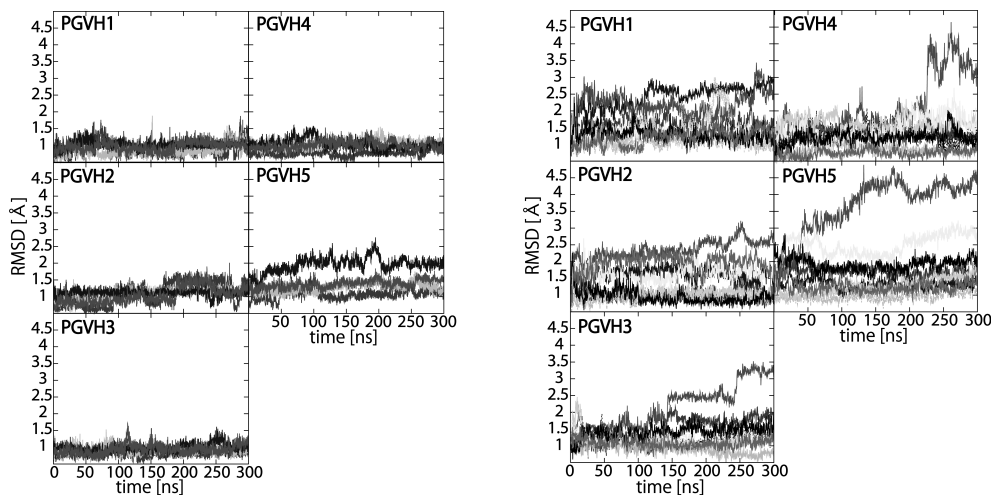


図 3 RMSD の時間変化 : Protien G(左)と Villin head-piece subdomain(右)

Villin head-piece subdomain は全てのシステムにおいて、天然構造からの構造のずれが大きくなっていることがわかる。これに対し、Protein G は混み合いが最も強いシステム(PGVH5)を除いては、RMSD の値は小さく天然構造に近い構造付近で安定性を保っていることがわかる。このように、蛋白質の種類に依存して構造が安定化したり、不安定化したりすることが観測され、蛋白質間相互作用に起因するエンタルピーの寄与が重要であることが示唆された。実際に、蛋白質間相互作用について調べた 2 量体構造を図 4 に示す。

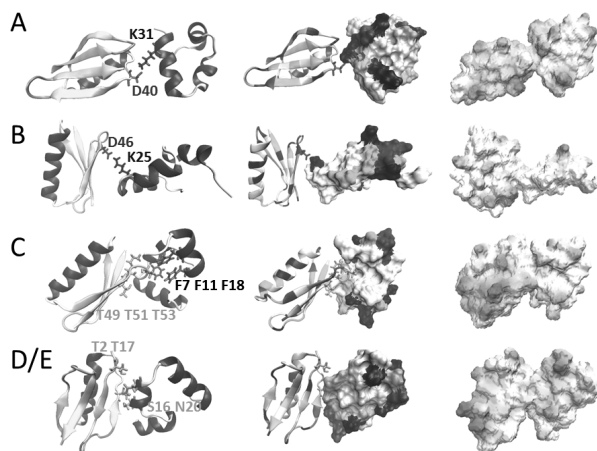


図 4 Protein G と Villin head-piece subdomain 間の特徴的な蛋白質間相互作用

Protein G と Villin head-piece subdomain 間には、4つの特徴的な相互作用が存在しており、混み合いが弱い場合では、静電相互作用が支配的であり(A, B)、混み合いが強くなるにつれて疎水・極性残基間の相互作用(C)、極性・極性残基間の相互作用(D/E)が支配的になるように、蛋白質間相互作用がシフトしていく過程が観測された。混み合い環境における蛋白質間相互作用をどのように特徴づけていくかは、今後のクラウドディング研究における重要な課題である。蛋白質の種類を考慮し、混み合い環境をモデリングしていく過程で、どのような相互作用が現れてくるのか、また混み合いの強さと相互作用がどのように関連しているのかについて、系統的に解析していく予定である。

謝辞

この研究は、理化学研究所・杉田有治主任研究員および米国ミシガン州立大学・Michael Feig 教授との共同研究であり、研究全般においてご指導いただいたことに深く感謝致します。

参考文献

- [1] S.B. Zimmerman and A.P. Minton, *Annual Review of Biophysics and Biomolecular Structure* **22** (1993) 27
- [2] K.Inomata, A.Ohno, H.Tochio, S.Isogai, T.Tenno, I.Nakase, T.Takeuchi, S.Futaki, Y.Ito, H.Hiroaki and M.Shirakawa, *Nature* **458** (2009) 106
- [3] R.Harada, Y.Sugita and M.Feig, *Journal of the American Chemical Society* **134** (2012) 4842
- [4] R.Harada, Y.Sugita and M.Feig, in preparation

Crystallization and crystal structure of photosystem II, a membrane-protein complex catalyzing light-induced water-splitting in photosynthesis

岡山大学大学院自然科学研究科 沈 建仁

1. はじめに

酸素発生型光合成において、光化学系 II (Photosystem II, 以下 PSII とする) は光エネルギーを利用して水を酸素、水素イオン、電子に分解する膜タンパク質複合体である。水の分解によって生じる水素イオンと電子は、エネルギーや還元力として二酸化炭素を有機物に変換するのに利用され、また、酸素は地球上の好氣的生物の生存を支え、オゾン層の形成・維持を可能にした。従って、PSII は地球上生物の生存にとって極めて重要なタンパク質複合体であると言える。

PSII における水分解・酸素発生反応の機構を解明するため、これまで多くの生化学、生物物理学、分子生物学的手法を用いた研究が展開され、膨大な知見が蓄積されてきた。しかし、この複合体の詳細な構造が不明であったため、水分解反応の詳細な機構が長い間不明であった。筆者らは 2011 年に好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus vulcanus* 由来 PSII の結晶構造を 1.9 Å 分解能で解析し、PSII における水分解の触媒中心である Mn_4Ca クラスターの詳細な構造を明らかにした[1]。この構造から、水分解の反応機構に関する新しい知見を得たので、本稿では、PSII の高分解能構造とそれに基づく水分解の反応機構について紹介する。

2. PSII の結晶化と全体構造

PSII は 17 個の膜貫通サブユニットと 3 個の膜表在性サブユニットによって構成され、総分子量が 350 kDa の単量体が 2 つ集まった二量体として存在するので、その高分解能結晶化は困難と思われていたが、筆者らの長年の研究によって[2-4]、1.9 Å 分解能を与える結晶の析出に成功した[1, 5]。この分解能で解析された PSII 構造の最大の特徴の一つは、多くの水分子が見つかったことである (図 1)。最終的に決定された構造では、PSII 二量体あたりに 2795 個の水分子が確認された。同じ結晶を用いて、1.75 Å の X 線波長で収集したデータを用いて解析された 2.5 Å 分解能の構造では、二量体あたり 862 分子の水しか見つからなかった[1]、水分子の同定に高い分解能がいかに重要かが分かる。

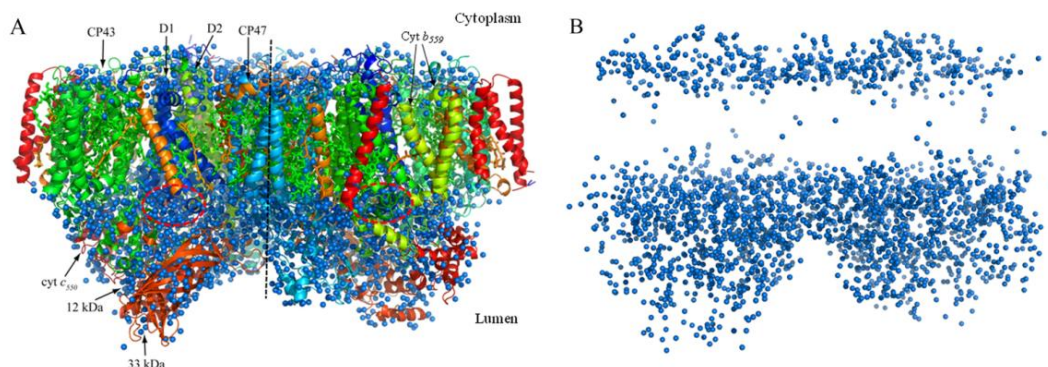


図 1. A. チラコイド膜の側面から見た 1.9 Å 分解能における PSII 二量体の全体構造。真ん中の線は 2 回対称軸で、2 つの単量体を分けている。赤い丸は Mn_4CaO_5 クラスターの位置を、青色のボールは水分子を示している。B. タンパク質を除いた水分子の分布。

PSII に結合している水のほとんどは、チラコイド膜のストロマ表面とルーメン表面という 2 つの層に分布しており、膜貫通領域にはわずかな水しか結合していない(図 1B)。これは膜タンパク質の一般的な特徴ともいえるが、PSII ではルーメン側により大きな親水性領域があり、より多くの水分子が分布している。これらの水分子のうちには、 Mn_4Ca クラスターの配位子や水素結合ネットワークの形成に参加しているものもあり、PSII にとって重要な機能の一部を担っている。

3. Mn_4CaO_5 クラスターの構造

PSII において、水分解を直接触媒しているのは図 2 に示した、4 つの Mn, 1 つの Ca、5 つの酸素原子によって構成された Mn_4CaO_5 クラスターである。このクラスター構造はゆがんだ椅子の形をしており、3 つの Mn, 1 つの Ca, 4 つのオキソ酸素が歪んだキューバン型のイスの座部を作り、4 つ目の Mn はキューバンの外側にあり、オキソ酸素を通してキューバンとつながっている。このようなゆがんだ形を作り出している要因は 2 つあり、1 つは Mn—O 間と Ca—O 間の結合距離の違い、もうひとつは 5 つのオキソ酸素の間で、金属イオンとの結合距離に違いがあることである。Mn—O の典型的な結合距離は 1.8—2.1 Å であるが、それに対して、Ca—O 間の結合距離は 2.3—2.5 Å と明らかに長い。キューバンの中で、金属イオンは 3 つの Mn と 1 つの Ca であるため、オキソ酸素との結合距離に違いが生じていた。また、5 つのオキソ酸素のうち、O1—O4 に比べて、O5 と Mn の結合距離が明らかに長くなっていた。このことは、O5 は周りの金属イオンとの結合が弱くて切れやすい、言い換えれば、O5 が高い反応性を有していることを示唆している。

Mn_4CaO_5 クラスターには、4 つの水分子が配位しており、そのうち、2 つはキューバンの外側にある Mn4 に(W1, W2)、残りの 2 つは Ca に結合している。このことは、これら水分

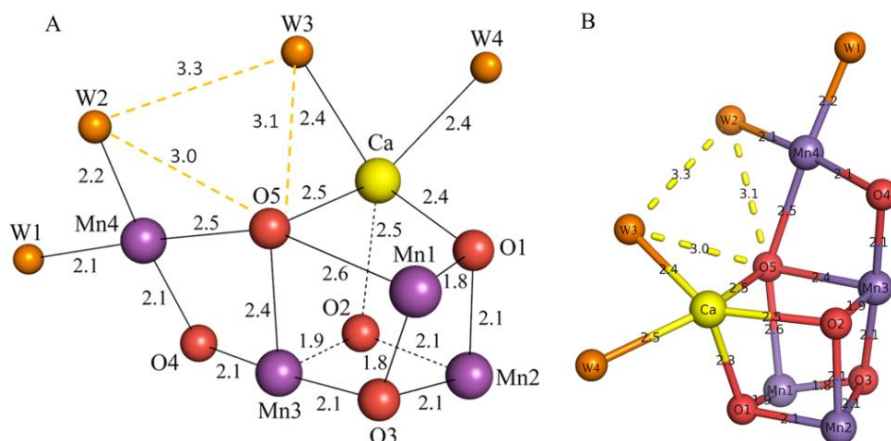


図 2. A. Mn_4CaO_5 クラスターの構造と各原子間の距離(Å)。W1—W4 は水分子。B. ゆがんだ椅子型の形がはっきり見えるように A の構造を回転したもの。

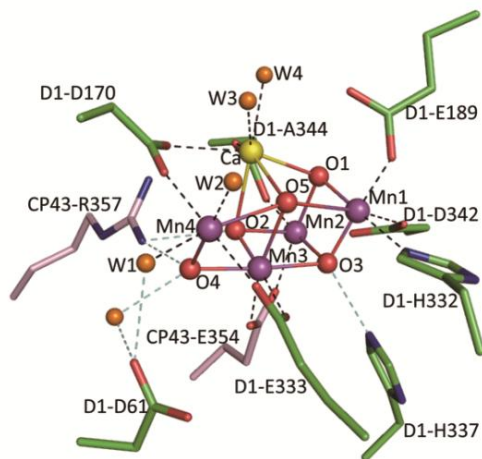


図 3. Mn_4CaO_5 クラスターの配位構造。

子のうちの 1 つまたは 2 つは水分解の基質として働いていることを示唆している。上に述べたように、O5 が反応部位の一部を形成している可能性が高いことを考えると、O—O 結合が形成されるのは、O5 付近である可能性が高い。4 つの配位水のうち、Mn4 に結合している W2 と Ca に結合している W3 は O5 と最も近く、それぞれ O5 と水素結合距離内にあるので、O5, W2, W3 のうちのどれか 2 つの分子が水分解の基質として働き、O—O 結合を作っていることが考えられる。

Mn_4CaO_5 クラスターのアミノ酸配位子は 7 つあり (図 3)、そのうち、6 つがカルボキシル基で、1 つのみが His 残基であった。これらの配位子のうち、一つのみが CP43 由来の Glu354 で、他はすべて D1 サブユニットのものであった (D1-Asp170, Glu189, Glu333, Asp342, D1-His332, 及び C 末端である Ala344)。His 残基は Mn と 1 本の結合を作っているが、カルボキシル基のうち、D1-Asp189 以外はすべてそれぞれ 2 つの金属イオンにブリッジする形で 2 本の結合(bi-dendate 結合)を作っている。その結果、すべての Mn には 6 つの配位子、そして Ca には 7 つの配位子が存在していることになる。

4. 水素結合ネットワーク

水分解反応において、2分子の水が分解される時、4つのプロトンが放出されることになる。 Mn_4CaO_5 クラスターはチラコイド膜の表面に存在し、大きな親水性タンパク質領域に覆われているので、放出されたプロトンは素早く複合体表面の水溶液に排出される必要がある。また、基質である水分子もタンパク質の外から反応部位に迅速に供給される必要がある。高分解能の結晶構造において、 Mn_4CaO_5 クラスターから複合体のルーメン側表面までをつなぐ水素結合ネットワークが複数個見つかり、それらがプロトンの排出経路、あるいは水分子の供給経路として機能していることが示唆された[1, 5]。これら水素結合ネットワークの詳細は省略するが、典型的なネットワークとして、1つは Y_Z と呼ばれる、D1-Tyr161残基を経由したものがある。もう1つは、D1-Asp61, Cl-1、及びいくつかの荷電/親水性アミノ酸、水分子によって構成されたもので、その維持には D1-Asp61 や Cl-1 が重要な役割を持っていることが示唆されている。

5. 今後の展望

PSII の水分解反応は S 状態遷移と呼ばれる、4ステップ反応によって進行するが、現在までに解析された PSII の構造は主に暗黒で安定な S_1 状態のものであり、この構造のみから水分解の反応機構を決定することは困難である。今後は S 状態遷移に伴う中間状態の構造を解明する必要がある。また、プロトンチャンネル、水チャンネルを明確に同定するには、各水素結合ネットワークを構成しているアミノ酸残基を改変し、得られた変異株の構造・機能解析を行う必要がある。さらに PSII の多くの構成サブユニットの機能を解明するため、それぞれの欠失変異体の構造・機能解析を行い、サブユニットの欠失により引き起こされる構造変化を明らかにする必要がある。

なお、本稿で紹介した研究内容は、神谷信夫、梅名泰史、川上恵典諸博士との共同研究である。

参考文献

1. Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, (2011) *Nature* 473, 55 (2011).
2. J.-R. Shen, N. Kamiya, *Biochemistry* 39, 14739 (2000).
3. N. Kamiya and J.-R. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98 (2003).
4. K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya, J.-R. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8567 (2009).
5. K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya, J.-R. Shen, *J. Photochem. Photobiol. B* 104, 9 (2011).