

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21181

研究課題名(和文) シリアルフェムト秒結晶学による光化学系II複合体の水分解・酸素発生機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of the water splitting and oxygen evolving mechanism of Photosystem II complexes using serial femto-second crystallography

研究代表者

秋田 総理 (Akita, Fusamichi)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・准教授

研究者番号：50751418

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：光化学系IIは太陽の光を利用して、水をプロトン、電子、酸素へと分解する超分子複合体である。しかしながら、その反応中間体の構造が解明されていないので、その反応機構は未だ解明されていない。

反応中間体の構造を解明するために、PSIIの微結晶を調製し、SACLAのX線自由電子レーザーで自分割シリアルフェムト秒結晶構造解析を行い、回折イメージを収集した。その結果、レーザー2回照射後と暗順応状態のS1状態の2.35オングストローム分解能の構造を得た。両者の構造解析を比較した結果、反応中心であるマンガングラスタに基質の水が結合している状態を捉えることに成功した。

研究成果の概要(英文)：Photosystem II is a supercomplex, and catalyzes water-splitting, leading to the generation of electrons, protons and oxygen. Since no intermediate structures of the S-state has been solved, the mechanism of water-splitting is still not clear. To analyze the structures of the intermediate S-states, we prepared PSII microcrystals and collected their diffraction images using time-resolved serial femtosecond crystallography with X-ray free electron laser at SACLA. We obtained two-flashes illuminated PSII structure at 2.35 angstrom resolution. By comparing with the S1-state structure, it was revealed that a new oxygen atom was inserted into a position close to one of the oxo-bridges (O5) within Mn cluster.

研究分野：構造生物学

キーワード：光合成

## 1. 研究開始当初の背景

光合成の明反応では、最初に、太陽の光エネルギーを利用して、光化学系 II (Photosystem II: PSII) が水をプロトン、電子、酸素へと分解する。PSII は 20 種類のタンパク質サブユニットとクロロフィルやカロテノイドなどの色素が結合した、分子質量 350 kDa の超分子複合体である。その中心には 4 つのマンガン原子と 5 つの酸素原子と 1 つのカルシウム原子からなる、マンガングラスターと呼ばれる反応中心が存在している。

2011 年に PSII の 1.9 オングストローム分解能の構造が解析され、マンガングラスターの詳細な構造が解明されたが、これは X 線によって損傷を受けた構造であると、海外の研究者達から指摘を受けた。そのため、我々は X 線自由電子レーザー施設 SACLA の極めて短いパルス幅で、損傷を受ける前のデータを収集し、1.95 オングストローム分解能の無損傷構造を解明した。しかし、これは PSII の反応サイクル (Kok サイクル) の内、暗順応された、開始の  $S_1$  状態である。そのため、水が分解されるメカニズムを完全に解明するためには、残りの 4 つの状態 ( $S_0$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ) の構造を明らかにする必要がある。

## 2. 研究の目的

PSII の反応サイクルには ( $S_0$ ,  $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ,  $S_4$ ) の 5 つが存在し、一回の閃光照射で次の状態へと遷移する。PSII を暗順応させると、開始状態である  $S_1$  状態にほぼ揃える事ができる。我々は、1.95 オングストローム分解能の  $S_1$  状態の無損傷構造を解明している。この  $S_1$  状態に加えて、PSII の残りの 4 つの反応サイクル中間体の構造を解析し、水分解のメカニズムを解明する事が本研究の目的である。

そのために、PSII を大量に調製する方法、微結晶を大量且つ簡単に調製する方法、体積を減らした微結晶から高分解能のデータを得るため

の溶液条件の検討、シリアルフェムト秒結晶構造解析の際に、安定した流速を保つためのグリース担体の検討、微結晶化からのデータ収集およびその構造解析の手法の確立を行なう。

## 3. 研究の方法

およそ 600 L の培養液でシアノバクテリアを大量に培養し、遠心分離によって、菌体を回収した。凍結融解法で細胞を破碎し、回収したチラコイド膜を界面活性剤で可溶化し、イオン交換カラムでの精製を経て、高純度化した PSII をポリエチレングリコールで沈殿させて、高濃度に濃縮し、最終的に 1 g を超える PSII を調製した。この精製サンプルを酸素電極で測定した結果、高い酸素発生活性を保っており、Clear-Native-PAGE で調べた結果、純度も申し分なかった。

次に、PSII の微結晶を大量に調製し、分解能の改善を行なった。PSII と沈殿剤をマイクロチューブに等量加えて、ボルテクスミキサーで攪拌し、20 分で数時間インキュベートする簡便な方法で、微結晶化させる事に成功した。回収には 7% のポリエチレングリコールを使用し、この状態で 3 日保存する事が可能になった。また、回収した微結晶にポリエチレングリコールを段階的に加えて濃度を上昇させる事で分解能が大幅に向上し、最大で 2.1 オングストロームを超える回折点が観測されるようになった。

また、フーリエ変換赤外分光法を用いて、微結晶中の PSII の S 状態がどれくらいの効率で進んでいるかを測定した。その結果、PSII を結晶化することによって反応効率は低下し、高分解能を与える溶液条件では、およそ 70% の効率で状態遷移が起こることがわかった。

調製した微結晶をグリースと混ぜ、一定流速で流しながら、X 線自由電子レーザーを照射し、回折イメージを収集した。このデータを  $S_1$  状態とした。408,071 枚の回折イメージが得られ、精査の結果、最終的に 6.7% の

27,497 枚のイメージから構造解析を行なった。また、上流に波長 532 nm の YAG レーザーを 2 回照射して励起し、下流に X 線自由電子レーザーを照射し、回折イメージを収集した。273,550 枚の回折イメージが得られ、精査の結果、最終的に 7.9 % の 21,680 枚のイメージから構造解析を行なった。このデータを 2 回閃光状態とした。S<sub>3</sub> 状態と叫ばない理由として、フーリエ変換赤外分光法を用いた反応効率の試算によって、2 回閃光で S<sub>3</sub> 状態は 46 % にとどまり、S<sub>1</sub>, S<sub>2</sub> が含まれているためである。2 回閃光と S<sub>1</sub> 状態、それぞれの構造解析を行ない、両者ともに 2.3 オングストローム分解能の構造が得られた。

#### 4. 研究成果

S<sub>3</sub> 状態を多く含む 2 回閃光状態と S<sub>1</sub> 状態の構造をそれぞれ解析した。2 回閃光状態の変化が軽微なため、S<sub>1</sub> 状態との差フーリエ解析を行なった。

その結果、電子を伝達する成分であるプラストキノン周辺に構造変化が観察された。プラストキノンのキノン頭部が約 10 度回転し、His215, Ser264 との距離が短くなった事で水素結合が強化された。そのため、キノン頭部の温度因子が減少して安定化した。さらに、これらの変化がフィトール基とその周辺の疎水性アミノ酸残基の変化を引き起こし、プラストキノンを外側から遮蔽しているループ部分を一部開かせることになった。

また、反応中心のマンガク clusters の O5 と呼ばれる酸素原子付近に、新たな電子密度 O6 が観察された。つまり、Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> から Mn<sub>4</sub>CaO<sub>6</sub> への構造変化を観察することに成功した。O5 と O6 の結合距離は 1.5 オングストロームであり、O=O 結合を形成しうる距離である事がわかった。マンガク clusters に基質の水分子が結合している様子を捉えたこの成果は、2017 年の Nature 誌に掲載された。

#### 5. 主な発表論文等 (研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計 5 件)

Fourier transform infrared analysis of the S-state cycle of water oxidation in the microcrystals of Photosystem II. Kato Y., Akita F., Nakajima Y., Suga M., Umena Y., Shen J.-R., Noguchi T. The Journal of Physical Chemistry Letters, 9 (9): 2121-2126 (2018)  
(査読有) DOI:  
10.1021/acs.jpcclett.8b00638

Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL. Suga M.\*, Akita F.\*, Sugahara M.\*, Kubo M.\*, Nakajima Y.\*, (以下33名省略) (\*equal contributions) Nature, **543**:131-135 (2017) (査読有) DOI:  
10.1038/nature21400

Structured near-infrared Magnetic Circular Dichroism spectra of the Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> cluster of PSII in T. vulcanus are dominated by Mn(IV) d-d 'spin-flip' transitions. Morton J., Chrysina M., Craig V.S.J., Akita F., Nakajima Y., Lubitz W., Cox N., Shen J.-R., Krausz E. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, **1859**:88-98 (2017)  
(査読有) DOI:  
10.1016/j.bbabi.2017.10.004.

Large-scale QM/MM calculations of the  $\text{CaMn}_4\text{O}_5$  cluster in the  $\text{S}_3$  state of the oxygen evolving complex of photosystem II. Comparison between water-inserted and no water-inserted structures. Shoji M., Isobe H., Nakajima T., Shigeta Y., Suga M., Akita F., Shen J.-R., Yamazaki K. Faraday Discussions, **198**:83-106 (2017) (査読有) DOI: 10.1039/c6fd00230g

秋田 総理、菅 倫寛、沈 建仁  
光合成水分解・酸素発生反応  
の構造基盤 生化学 89(5),  
699-709 (2017) (査読有)  
DOI:10.14952/SEIKAGAKU.20  
17.890699

[学会発表] (計 3 件)

1. 秋田総理 X線自由電子レーザーによる光化学系II複合体の酸素発生機構の解明 第10回文部科学省「最先端の光の創成を目指したネットワーク研究拠点プログラム シンポジウム、京都大学 京都府京都市、2018年1月23日
2. 秋田総理 X線自由電子レーザーを用いた光化学系II水分解反応の機構解明、第8回日本光合成学会年会及びシンポジウム、龍谷大学 瀬田キャンパス滋賀県大津市、2017年5月27 - 28日(招待講演)

3. 秋田総理 Structural analysis of photosystem II to reveal the mechanism of light-induced water-splitting 第54回日本生物物理学会年会、つくば国際会議場 茨城県つくば市、2016年11月25 - 27日(招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋田 総理(AKITA, Fusamichi)

岡山大学異分野基礎科学研究所・准教授 研究者番号:50751418

(2) 研究分担者  
( )

研究者番号:

(3) 連携研究者  
( )

研究者番号:

(4)研究協力者 ( )