

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06158

研究課題名(和文) 光化学系IIにおける塩素イオンの構造化学的な機能解明

研究課題名(英文) Structural study on the function of chloride ion in photosystem II

研究代表者

梅名 泰史 (Umena, Yasufumi)

自治医科大学・医学部・ポスト・ドクター

研究者番号：10468267

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：光合成で働く光化学系II蛋白質(PSII)に必須の塩素イオンの役割を解明するため、活性を低下させる分子アニオンが結合したPSIIの結晶構造解析から阻害機構を解明し、本来の塩素イオンの役割を理解することを目指す。本研究の結果、分子アニオンのアジ化物イオン、硝酸イオン、亜硝酸イオンの置換体PSII結晶を2-2.1 Å分解能で解析することに成功した。置換に伴う共通の構造変化から阻害様式を明らかにし、本来の構造と比較することで、塩素イオンが担っているプロトン排出機構と活性中心の構造を支える役割を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PSIIの水分解反応は金属触媒のMnクラスターを中心に議論がされているが、補欠因子としての塩素イオンの構造化学的な役割については、はっきりしていなかった。本研究により、PSIIにおける水分解反応をより包括的に議論できる構造情報を示すことができた。この知見は、Mnクラスターを模倣したMn触媒の周辺構造が重要性を提示することで、新たな人工光合成触媒への設計指針を提供できたものと思われる。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the role of chloride ion, which is an essential cofactor for water splitting in photosystem II (PSII) in photosynthesis reaction, we studied the inhibition mechanism from the crystal structure of PSII bound with molecular anions, which reduced PSII activity and to understand the original role of chloride ion from structural chemistry. This study succeeded in analyzing PSII crystals substituted with molecular anions azide, nitrate, and nitrite ions at 2-2.1 Å resolution. The inhibition mechanism was clarified from the common structural changes associated with these substitutions compared with the original structure. We concluded that the role of the chlorine ion in PSII is for supporting the proton transfer mechanism and for sustaining the structure of the active center of the Mn-cluster.

研究分野：構造生物化学

キーワード：光合成 結晶構造解析 分子アニオン 塩素イオン 水分解反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物や藻類に存在する光化学系 II 膜蛋白質(Photosystem II:以下 PSII)は光エネルギーを使って水分解反応を行い、光合成における炭水化物の生合成に必要な電子源を作り出している。この PSII による水分解反応の中心に金属クラスターMn₄CaO₅ クラスター(Mn クラスター)が触媒として存在している。2011年に好熱性シアノバクテリア由来 PSII の 1.9 Å分解能の結晶構造から、初めて Mn クラスターの分子構造が解明され、基質となる多数の水分子が PSII 内部に同定された⁽¹⁾。

PSII の水分解反応には塩素イオンが必須であることが知られていた⁽²⁾。塩素イオンは Mn クラスターの酸化還元電位の制御、水素結合ネットの維持、基質の水の活性化などが考えられていた⁽³⁾。塩素イオンの結合場所は、同族元素の臭素およびヨウ素イオンに置換した PSII の結晶構造から、Mn クラスターからおよそ 7 Åの範囲に 2ヶ所あることが議論された⁽⁴⁾。また、高分解能な PSII の結晶構造解析から塩素イオンが直接同定され、2つの塩素イオン結合部位(CL-1 と CL-2)の詳細な構造が明らかになった⁽⁵⁾。しかし、水分解反応における塩素イオンの構造化学的な役割は未解明であった。

PSII の塩素イオンは様々な一価の分子アニオン(N₃⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, CH₃COO⁻)やハロゲン(Br⁻, I⁻)に置き換わる事が知られており、置換種によって活性の低下の程度が異なることが報告されていた⁽⁶⁾。分子アニオンによる置換は、Mn クラスターへの直接的な影響ではなく反応産物のプロトンの移動に影響があると報告されていた⁽⁶⁾。しかし、塩素イオンを分子アニオンに置換した PSII の結晶構造が報告されていないため、具体的な阻害機構はわかっていない。分子アニオンの阻害機構を構造化学的に解明する事は、PSII の水分解反応における塩素イオンの役割を理解する上で重要な知見をもたらすものと思われる。

2. 研究の目的

本研究は、PSII の水分解反応を化学的に理解するために、塩素イオン置換の阻害様式を構造的に解明し、塩素イオンの役割を明らかにすることを目的とする。そのため、PSII の水分解活性の抑制や阻害作用が報告されている 3種類の分子アニオンの、硝酸イオン(NO₃⁻)、亜硝酸イオン(NO₂⁻)及び擬ハロゲンでもあるアジ化物イオン(N₃⁻)の 3種類の分子アニオンに置き換えた PSII の構造解析を行い、その PSII 内部の原子レベルの構造変化を検証して、分子アニオンによる水分解反応を抑制する仕組みを構造的に解明する。また、水分解の阻害を構造化学的に理解することで、PSII が本来持っている塩素イオンの役割を明らかにすることを最終の目指とする。

3. 研究の方法

PSII は好熱性らん藻 *Thermosynechococcus vulcanus*(T.V.) より抽出し、精製・結晶化を行う。培養した T.V.細胞から界面活性剤を用いてチラコイド膜を可溶化し、イオン交換クロマトグラフィーで精製から結晶化用の PSII 試料を調製した。塩素イオン存在下では競合阻害となるため、PEG 沈殿及び再結晶化による溶液交換により塩素イオンを溶液試料から除いた PSII を調製した。0.5-100 mM の範囲で分子アニオンとの共結晶化の PSII 結晶を作成した。結晶化には MgSO₄ 及び CaSO₄ を添加塩として加え、PEG1450 を沈殿剤に pH6 の条件で結晶化を行った。また、分子アニオンによる PSII の水分解活性への阻害を確認するため、酸素電極を使った酸素発生量と分子アニオン濃度の関係を測定した。

置換体 PSII の結晶構造解析は、放射光施設 SPring-8 で測定された。塩素イオンの置換を確認するため、塩素イオンの異常分散効果による電子密度マップを波長 1.9 Å の低エネルギー X 線にて行い、構造解析の高分解能データは、波長 1.0 Å の高エネルギー X 線を使い回折強度を測定した。得られた回折強度データから、電子密度マップを解析し、分子アニオンの結合様式と PSII の構造変化を検証した。

4. 研究成果

本研究の成果として、塩素イオンを 3種類の分子アニオンへ置換した PSII の結晶を調製することに成功し、Native の結晶と同程度のおよそ 2 Å 分解能で構造解析することに成功した(表 1)。2つの塩素イオン結合サイトはそれぞれ 5 mM 以上の分子アニオン濃度で置換される

表 1 分子アニオン(5mM)へ置換した PSII 結晶の結晶学的統計

substituted anion	アジ化物イオン(N ₃ ⁻)	亜硝酸イオン(NO ₂ ⁻)	硝酸イオン(NO ₃ ⁻)
Resolution(Å)	2.0 (2.05-2.00)	20-2.05 (2.10-2.05)	20-2.1 (2.15-2.10)
Redundancy	13.51 (13.68)	6.7 (6.7)	5.0 (5.1)
Completeness (%)	99.7 (99.8)	99.2 (98.7)	99.5 (100)
R-merge (%)	7.5 (148.8)	7.4 (108.8)	9.1 (74.4)
<I/sigma>	22.60 (2.11)	14.46 (1.95)	9.88 (2.17)

ことが塩素イオンの異常分散項差電子密度マップの消失で確認された。また、およそ 2 Å 分解能の結晶構造解析による各分子アニオン置換体 PSII の電子密度マップを分析した結果、塩素イオン結合部位にはそれぞれの分子アニオンに対応する電子密度マップが確認された (図 1)。

酸素電極を使った分子アニオンの水分解活性阻害の分析では、それぞれの分子アニオン N_3^- , NO_2^- , NO_3^- の半数阻害濃度 (IC50) は、0.08 mM, 0.1 mM, 1 mM であった。これらの結果から、調製した置換体 PSII 結晶の塩素イオンは分子アニオンに置き換わっていることを確認された。

置換体 PSII の高分解能な構造解析の結果、2つの塩素イオン結合部位の内、CL-1 サイトに配位している Lys317-D2 (K317) 残基に大きな構造変化が確認された。また、K317 と塩橋結合を形成している Asp61-D1 (D61) 残基に結合した水分子が消失していることも明らかになった。分子アニオン置換によって、K317 は CL-1 から遠ざかる方向に変化しており、IC50 の小さい NO_3^- では C ϵ 位が動く程度であったが、IC50 の大きい N_3^- では、C δ 位からフリップするほどの大きな構造変化が確認された (図 2)。一方、CL-2 も CL-1 と同様にどの分子アニオンでも置換されていたが、CL-1 と異なり周辺構造には大きな変化が起きていなかった。

CL-2 は Mn クラスターの配位子である Glu354-CP43 と His337-D1 の主鎖骨格の間に位置していることから、Mn クラスターの構造を維持する役割を担っていると考えられている。また、塩素イオンの置換は再添加によって活性が回復することが報告されている⁽⁴⁾。このことから、CL-2 サイトに入った分子アニオンが塩素イオンの代替として Mn クラスターの構造保持を担っていると考えられる。

本研究から、分子アニオン置換による阻害機構は、CL-1 サイトのこの構造変化により、K317 と D61 はより近づくため Native 構造よりも塩橋作用が強くなっており、D61 のマイナスの電荷が中和されることで、D61 と水分子の相互作用が弱くなったと思われる。D61 に結合するこの水分子は Mn クラスターから外部まで連なっている水素結合ネットワークを中継する重要な部位であったことから、ネットワークが断絶されることによって、水分解で発生するプロトンの排出が制限されることが活性低下に及ぼすと考えられる (図 3)。

この研究によって PSII の塩素イオンは、水分解反応を円滑に進めるためのプロトン排出機構と Mn クラスターを保持する構造的な役割を担っていることが明らかになった。この成果は PSII を模倣した水分解触媒の人工光合成を設計するためには、反応触媒を取り巻く構造体のデザインを想起させる知見になると期待される。

<引用文献>

- (1) Y. Umena, et al, *Nature*, 2011
- (2) H. Wincencjusz, et al. *Biochemistry*, 1999
- (3) K. Olesen, et al, *Biochemistry*, 2003
- (4) K. Kawakmai, Y. Umena, et al, *PNAS*, 2009
- (5) A. Haddy, et al, *Photosynthesis research*, 1999

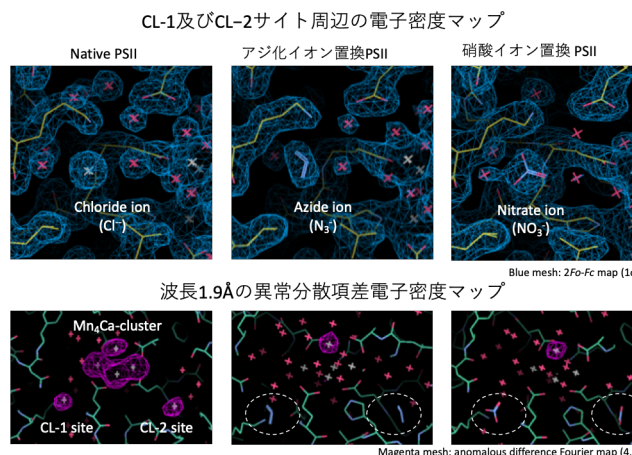


図 1 分子アニオン置換 PSII 結晶の電子密度マップ

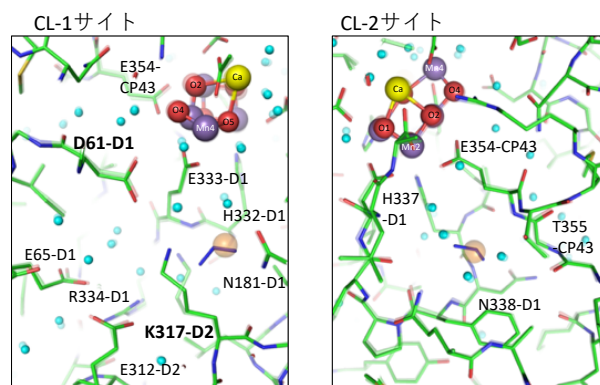


図 2 アジ化物イオン置換 PSII の CL-1 及び CL-2 サイト

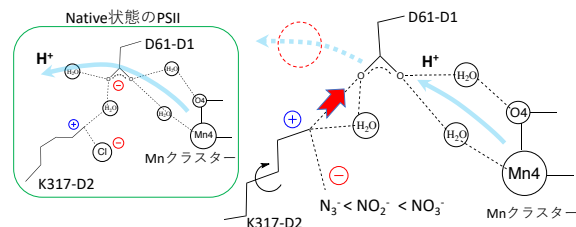


図 3 分子アニオン置換によるプロトン排出の抑制

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Suga M, Akita F, Yamashita K, Nakajima Y, Ueno G, Li H, Yamane T, Hirata K, Umena Y, Yonekura S, Yu L-J, Murakami H, Nomura T, Kimura T, Kubo M, Baba S, Kumasaka T, Tono K, Yabashi M, Isobe H, Yamaguchi K, Yamamoto M, Ago H, Shen J-R	4. 巻 366
2. 論文標題 An oxyI/oxo mechanism for oxygen-oxygen coupling in PSII revealed by an x-ray free-electron laser	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 334 ~ 338
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/science.aax6998	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Katayama Tetsuo, Nozawa Shunsuke, Umena Yasufumi, Lee SungHee, Togashi Tadashi, Owada Shigeki, Yabashi Makina	4. 巻 6
2. 論文標題 A versatile experimental system for tracking ultrafast chemical reactions with X-ray free-electron lasers	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Structural Dynamics	6. 最初と最後の頁 054302 ~ 054302
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1063/1.5111795	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Motomura Taiki, Zuccarello Lidia, S?tif Pierre, Boussac Alain, Umena Yasufumi, Lemaire David, Tripathy Jatindra N., Sugiura Miwa, Hienerwadel Rainer, Shen Jian-Ren, Berthomieu Catherine	4. 巻 1860
2. 論文標題 An alternative plant-like cyanobacterial ferredoxin with unprecedented structural and functional properties	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics	6. 最初と最後の頁 148084 ~ 148084
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bbabi.2019.148084	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Yoneda Yusuke, Nagasawa Yutaka, Umena Yasufumi, Miyasaka Hiroshi	4. 巻 10
2. 論文標題 -Carotene Probes the Energy Transfer Pathway in the Photosystem II Core Complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry Letters	6. 最初と最後の頁 3710 ~ 3714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpcllett.9b01072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 梅名泰史
2. 発表標題 光合成で働く光化学系II複合体の結晶構造解析に基づく機能解明
3. 学会等名 2019年度日本生化学会九州支部例会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Nobuo Kamiya, Yoshiaki Kawano, Keitaro Yamashita, Hideo Ago, Masaki Yamamoto, Jian-Ren Shen
2. 発表標題 Crystallographic study on estimation of the valence of each of the four Mn atoms in Photosystem II using anomalous diffraction techniques
3. 学会等名 69th American Crystallography Association Annual meeting（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasufumi Umena, Mayuho Adachi, Jian-Ren Shen
2. 発表標題 Study of functional structures in photosystem II revealed by pH dependent structural changes
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 梅名泰史, 田丸翔也, 沈建仁
2. 発表標題 補欠因子の塩素イオンを分子陰イオンへ置換した光化学系IIの結晶構造解析によるプロトンの排出阻害機構の構造化学的研究
3. 学会等名 第18回 日本蛋白質科学会年会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasufumi Umena, Shouya Tamaru, Jian-Ren Shen
2. 発表標題 Proton transfer inhibition by molecular anion substitutions in Photosystem II
3. 学会等名 International Symposium on Photosynthesis and Chloroplast Biogenesis 2018 (ISPCB2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関