

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2020

課題番号：19K22396

研究課題名（和文）クライオ電子顕微鏡を用いた光化学系II複合体の反応中間体の構造解析

研究課題名（英文）Structural analysis of intermediate of Photosystem II using Cryo-EM

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） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本課題では、シアノバクテリアからPSIIを精製し、クライオ電子顕微鏡CryoARM300で約2,000イメージを撮影し、X線結晶構造解析の1.9に匹敵する1.95オングストロームのクライオ電顕マップが得られた。このマップには、PSIIの両端のPsbYサブユニットが完全な形で現れていた。そのため、クライオ電顕マップはより生体内に近い状態を示していると考えられた。しかし、測定に使用した電子線量ではPSIIの一部に損傷が見られた。そこで、イメージのフレーム数を変え、電子線量を減らして再計算したところ、2.08オングストロームという高分解能を保ったまま、損傷の少ないマップを得ることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では、当初予定していたマンガンクラスター中の原子の判別が可能な2.5オングストロームを超える1.95オングストロームのデータを収集することができた。PSIIに対して光照射を行ない、水分解・酸素発生中間体の構造変化を解析することはできなかったが、中間体の構造を解明するために必要な技術や損傷の少ないデータを得るなど、基盤となる結果が得られた。シアノバクテリアや植物などの光合成生物による光合成のメカニズムを解明することは、人工光合成などのエネルギー供給基盤を構築するために非常に重要である。本研究成果は、太陽光エネルギーを有効活用するための技術開発に重要な知見を与えると期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this project, PSII was purified from cyanobacteria and about 2,000 images were collected using CryoARM300 cryo-electron microscope. We analyzed the structure of PSII in solution by cryo-EM at a resolution of 1.95 angstrom. The resolution is almost same as the structure at a 1.9 angstrom by X-ray crystallography. In this map, the PsbY subunits at both sides of PSII appeared in complete form. Therefore, the cryo-EM map was considered to be closer to the in vivo state. However, PSII was damaged at the electron dose used for the measurement. Therefore, we recalculated the map by changing the number of image frames and reducing the electron dose, and succeeded in obtaining a map with less damage while maintaining the high resolution.

研究分野：構造生物学

キーワード：光合成

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成のメカニズムを解明することは、エネルギーの供給や環境問題への対応など、持続可能な社会を形成する上で最も重要なことの1つである。本研究で用いる光化学系 II (PSII) は光合成反応において、太陽からの光エネルギーを利用して水を分解し、分子状酸素を放出すると同時に、光エネルギーを化学エネルギーへ変換する、重要な膜タンパク質複合体である。この PSII は照射に応じて、 S_0 から S_1 , S_2 , S_3 , (S_4) へと遷移し、 S_0 へと戻る。我々は X 線自由電子レーザー (XFEL) 実験施設・SACLA を利用し、X 線損傷の無い PSII の反応開始状態である S_1 状態の構造を正確に解析した。また、YAG レーザーで励起した PSII の微結晶へ XFEL を照射してデータを収集し、反応中心のマンガングラスタに水分子が結合した S_3 状態の構造を捉え、両成果は *Nature* 誌に発表された (Suga, Akita et al. *Nature* 2015, 2017)。しかしながら、PSII の実験には、一度のデータ収集のために、大量のタンパク質 (1 g 以上) を必要とする。また、PSII を結晶化することによって、3 回照射以降の反応効率が低下し、 $S_3 \rightarrow S_0$ への反応はほとんど進まない事がフーリエ変換赤外分光法で確認されている。そのため、少量の試料で結晶化の必要がなく溶液状態で構造を解析できるクライオ電顕構造解析法は PSII の中間体構造の解明に適していると考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、クライオ電子顕微鏡の単粒子構造解析法を用いて、光合成において水をプロトン、電子、酸素分子へと分解する PSII の反応中間体の構造を解明する事である。この目的を達成するため、まず、PSII の X 線結晶構造解析の最高分解能である 1.9 \AA 分解能に匹敵するデータを収集し、構造解析を行なう。次に、クライオグリッド作成装置である Vitrobot と YAG レーザーを同期させることを試み、グリッド上にのせた PSII 試料へレーザー照射した後に、瞬時にサンプルを凍結することで反応中間体を捕捉し、PSII 反応中間体の構造を解析する。膜タンパク質の Apo 型から Holo 型への構造変化の単粒子構造解析は報告されているが、クライオ電顕による光励起したタンパク質の構造変化を捕えた例はない。更に、このシステムの構築は、光照射によって励起されるタンパク質の時分割単粒子構造解析のモデルと成り得る。クライオ電子顕微鏡と時分割技術を融合した研究は世界的にも初の試みであり、今後の時分割解析のさきがけになると考えている。

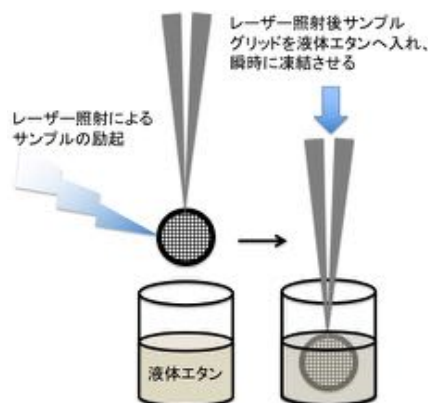
3. 研究の方法

(1) PSII 複合体の調製

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* から PSII を精製する。PSII を精製する条件は本研究室で既に確立しており、高分解能が得られる結晶ができる程の純度と高い酸素発生活性を兼ね備える PSII が得られている。100 リットルの培養スケールから得られた菌体から数 100 mg のサンプルが得られる。

(2) クライオグリッド作成装置と YAG レーザーの融合による励起システムの構築

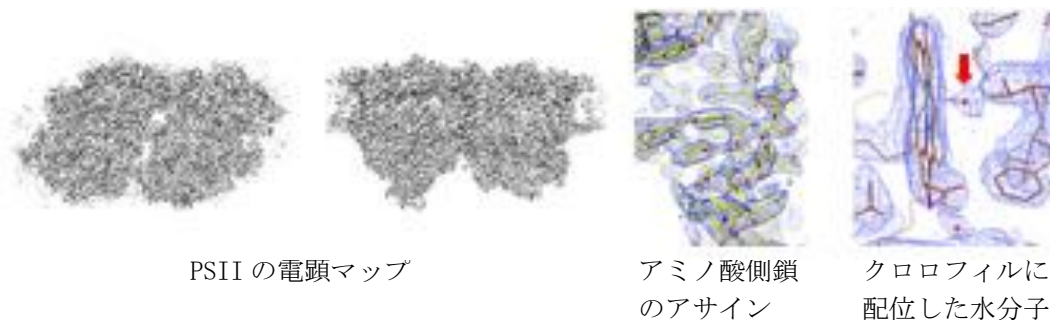
Vitrobot は温度と湿度を一定に保つように制御されたチャンバーを持ち、その中でピンセットで挟んだメッシュグリッド上にサンプルを乗せ、余剰の溶液をろ紙で吸い取った後、瞬時に液体エタン層へ移して凍結する事で、非晶質のクライオグリッドを作成している。グリッドを液体エタン層へ移す瞬間に YAG レーザーを照射して PSII の励起を行なう。



(3) クライオ電子顕微鏡を用いた単粒子構造解析

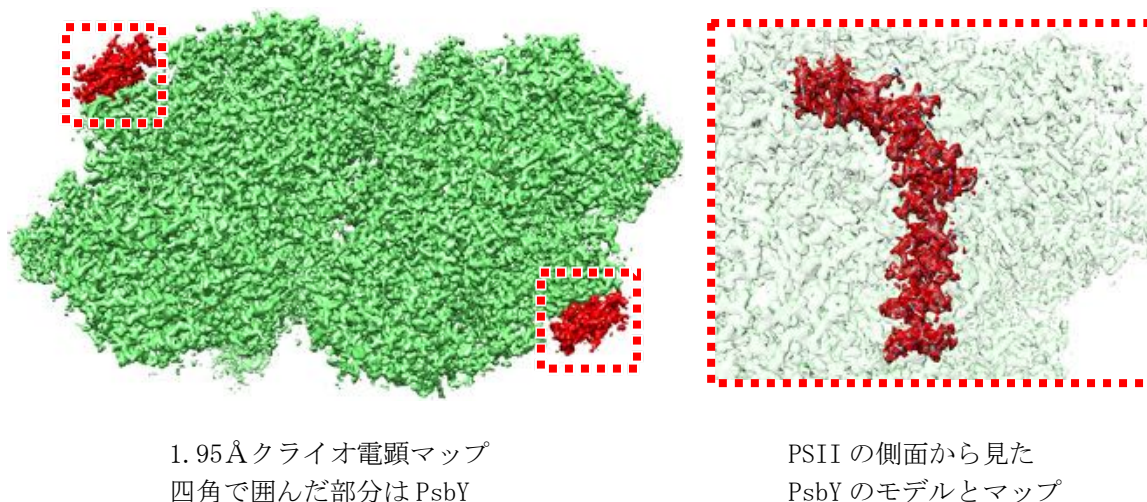
大阪大学蛋白質研究所にある最先端透過型クライオ電子顕微鏡 FEI Titan Krios および理化学研究所播磨研究所にある CryoARM300 でイメージを撮影する。特に CryoARM300 は冷陰極電界放射型電子銃から発生する干渉性の高い電子ビームを活用するため、高分解能が期待できる。収集したイメージからタンパク質粒子像をピックアップし、3次元再構築を行なう。得られた3次

元密度分布図に対して、既知の原子構造を当てはめ、原子モデルの精密化を行なう。既に予備実験において、59,000倍率で2,596枚のイメージを収集し、190,838粒子を用いてRelion3.0で解析を行なった結果、分解能2.5Åのクライオ電子顕微鏡マップが得られている。PSIIのほぼ全ての側鎖のアサインが可能であり、各種色素分子のモデル構築が可能であった。1.9Å分解能の結晶構造と同じ場所に水分子のマップが現れている。

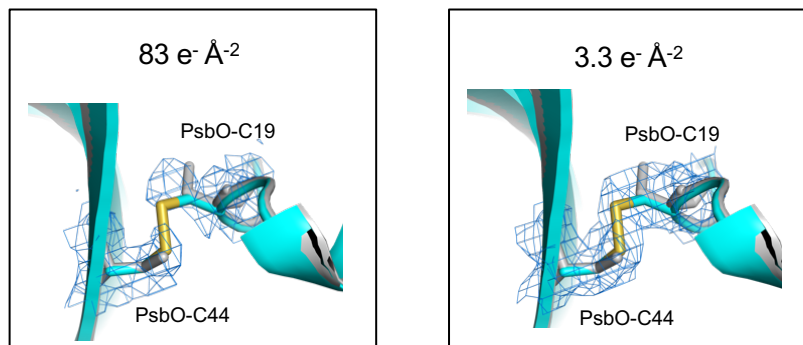


4. 研究成果

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* から高純度のPSIIを精製し、クライオ電子顕微鏡の試料とした。クライオグリッドの作成はVitrobotを用いた。Quantifoilのメッシュグリッドをvitrobotにセットし、クロロフィル濃度換算で約2 mg/mlに調製したPSIIをメッシュグリッドに乗せ、余剰の溶液をろ紙で吸い取った後、瞬時に液体エタン層へ移して凍結した。データの収集は大阪大学蛋白質研究所のFEI Titan Kriosおよび理化学研究所播磨研究所のCryoARM300でそれぞれ2,000~4,000イメージを撮影した。イメージの処理はRelion3.0を用いて行ない、2.20Å (FEI Titan Krios) と1.95Å (CryoARM300) のクライオ電顕マップが得られた。それぞれのマップから原子モデルを構築し精密化した。冷陰極電界放射型電子銃を備えたCryoARM300から得られたクライオ電顕マップはX線結晶構造解析に匹敵する1.95Å分解能となり、このデータを用いてマップとモデルを評価した。PSII分子の両端に存在するPsbYサブユニットが完全な形で現れていた。このサブユニットはX線結晶構造解析から得られた電子密度には存在しなかったため、クライオ電顕マップは結晶中よりもより生体内に近い状態を示していると考えられた。



次に、電子線によるPSIIへのダメージについて評価した。PSIIへ照射された電子線量は最大で83 e⁻Å⁻²であり、この電子線量ではPSIIの一部に損傷が見られた。特に水分解・酸素発生の中心部であるマンガンクラスターの変化と表在性サブユニットであるPsb0の2つのシステインC19, C44から形成されているジスルフィド結合が還元されて切断されていることが挙げられる。そこで、収集したイメージのフレーム枚数を変えてマップを再計算し、どの程度の電子線量で、損傷の少ない構造が得られるか検討した。その結果、フレーム数を少なくするとジスルフィド結合が回復していき、2フレーム (3.3 e⁻Å⁻²) から再計算したマップでは、2.08Åという高分解能を保ったまま、結合が完全に回復していた。



電子線量とジスルフィド結合の切断

83 e⁻Å⁻²では結合が切断されているが、3.3 e⁻Å⁻²では形成されている。

また、このマップでは、マンガンクラスターの原子間距離は XFEL のデータに近づいており、どの程度の電子線量で、損傷の少ない構造が得られるかの指標となった。

本課題では、当初予定していたマンガンクラスター中の原子の判別が可能な 2.5Å を超えるデータを収集することができた。PSII に対して光照射を行ない、その構造変化を解析することはできなかったが、水分解・酸素発生中間体の構造を解明する基盤となる結果が得られた。シアノバクテリアや植物などの光合成生物による光合成のメカニズムを解明することは、人工光合成などのエネルギー供給基盤を構築するために非常に重要である。本研究成果は、太陽光エネルギーを有効活用するための技術開発に重要な知見を与えると期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Koji Kato, Naoyuki Miyazaki, Tasuku Hamaguchi, Yoshiki Nakajima, Fusamichi Akita, Koji Yonekura, Jian-Ren Shen	4. 巻 4
2. 論文標題 High-resolution cryo-EM structure of photosystem II reveals damage from high-dose electron beams	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Communications Biology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01919-3	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 Yuki Kato, Satoshi Haniu, Yoshiki Nakajima, Fusamichi Akita, Jian-Ren Shen, Takumi Noguchi	4. 巻 124
2. 論文標題 FTIR Microspectroscopic Analysis of the Water Oxidation Reaction in a Single Photosystem II Microcrystal	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Phys. Chem. B	6. 最初と最後の頁 121-127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.jpcc.9b10154	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 Kato K., Shinoda T., Nagao R., Akimoto S., Suzuki T., Dohmae N., Chen M., Allakhverdiev S.I., Shen J.-R., Akita F., Miyazaki N., Tomo T.	4. 巻 11
2. 論文標題 Structure basis for the adaptation and function of chlorophyll f in photosystem I.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41467-019-13898-5	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 該当する

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 秋田総理, 長尾遼, 加藤公児, 中島芳樹, 宮崎直幸, 沈 建仁
2. 発表標題 光化学系IIのクライオ電子顕微鏡単粒子構造解析
3. 学会等名 第10回日本光合成学会年会及びシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Fusamichi Akita, Ryo Nagao, Koji Kato, Naoyuki Miyazaki, Jian-Ren Shen
2. 発表標題 Cryo-EM structures of photosystem II-antenna supercomplexes
3. 学会等名 第57回日本生物物理学会年会
4. 発表年 2019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
研究 分担者	宮崎 直幸 (Miyazaki Naoyuki) (00634677)	筑波大学・生存ダイナミクス研究センター・助教 (12102)	
研究 分担者	加藤 公児 (Kato Koji) (30452428)	岡山大学・異分野基礎科学研究所・特任准教授 (15301)	

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
---------	---------