

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 4 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840023

研究課題名(和文) 超高輝度極端パルスXFEL光を用いた光化学系II複合体の無損傷結晶構造解析

研究課題名(英文) Radiation damage free structure of photosystem II revealed by X-ray free electron laser.

研究代表者

菅 倫寛 (Suga, Michi)

岡山大学・自然科学研究科・助教

研究者番号：60634920

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の結晶構造は放射線損傷を受けていることが指摘されていた。そこでSACLAのX線自由電子レーザー(XFEL)と何百の巨大で同様な結晶を用いてS1状態における無損傷構造を1.95Å分解能で解析した。XFELによって決定したOECではMn-Mn原子間の距離がこれまでの結晶構造よりも0.1-0.2Å短くなっていた。構造にもとづき、水分解反応の開始状態では酸素発生中心を構成するMnの価数はMn1が+3, Mn2が+4, Mn3が+4, Mn4が+3であることを明らかにした。これらの結果は水分解の反応機構を解明するための構造基盤を提供し、水分解の人工触媒合成のための設計図ともなり得ると期待される。

研究成果の概要(英文)：The initial reaction of photosynthesis takes place in photosystem II (PSII), a 700 kDa membrane protein complex that catalyzes water-splitting reaction through an S-state cycle of the oxygen evolving complex (OEC). The structure of PSII has been solved by XRD at 1.9 Å resolution, which revealed that the OEC is a Mn₄CaO₅ cluster. However, the manganese atoms in the OEC are easily reduced by X-ray irradiation.

Recently, it was demonstrated that radiation damage free structure can be obtainable using X-ray free electron lasers (XFEL). We determined a radiation damage free structure of PSII in the S1 state at a resolution of 1.95 Å using XFEL pulses. Compared with the structure from XRD, the OEC in the XFEL structure has Mn-Mn distances that are shorter by 0.1-0.2 Å. Based on the XFEL structure, the valences of each manganese atom were assigned as Mn1(+3), Mn2(+4), Mn3(+4) and Mn4(+3) in the S1 state. These findings provide a structural basis for the mechanism of oxygen evolution.

研究分野：構造生物化学

キーワード：光化学系II 膜タンパク質 光合成 結晶構造解析 X線自由電子レーザー 無損傷

1. 研究開始当初の背景

光化学系 II 複合体(PSII)は分子量 700 kD にも及ぶ巨大膜蛋白質複合体で、光エネルギーを利用して水分子を電子とプロトンと酸素分子へと分解する機能を持つ唯一の酵素である。この水分解反応の詳細なメカニズムの理解は再生可能でクリーンなエネルギーを作り出す人工光合成研究への応用に繋がると期待されている。この PSII の結晶構造はこれまでに 1.9 Å 分解能で構造解析され、その触媒部分がゆがんだイス型の Mn_4CaO_5 クラスターの構造であることが分かっている。しかし X 線結晶構造解析された触媒部分の構造はこれまで報告されていた EXAFS を用いて決定された Mn-Mn の距離と比べると 0.1~0.2 Å 長くなっており、放射光の X 線を用いて決定した結晶構造は放射線による損傷の影響を受けている可能性を否定できなかった。特に Mn_4CaO_5 クラスターの 5 つの酸素原子のうち、O5 とよばれる酸素原子はそのまわりの Mn との結合距離がきわめて長く、このような長い結合距離が放射線による損傷に由来するのか、あるいはこの酵素の本来の特徴を示しているのかが不明で、水分解反応の機構を考える上で大きな問題となっていた。

2. 研究の目的

結晶構造決定には強力な X 線の照射が必須であり、程度の差こそあれ根本的に放射線損傷を回避する事はできない。しかし近年、X 線自由電子レーザー(XFEL)の出現により放射線損傷を解消することが可能となった。XFEL では従来のシンクロトロンでの 10 億倍もの明るい X 線を 1 パルスとして試料に照射するので、照射位置の試料は破壊されてしまうが、1 パルスの持続時間が数十フェムト秒であるため、ピコ秒単位で起こる放射線損傷による構造変化が起こるまえに X 線回折データを収集することが可能となり、損傷を受けていない天然状態の構造を決定することができる。この方法はその特徴から“壊れる前に回折を記録する”と呼ばれている。そこで本研究では XFEL の超高輝度極端パルスを利用して放射線損傷の無い PSII の結晶構造を原子分解能で決定することを目的とした。

3. 研究の方法

PSII の高分解能の結晶構造を得ることを目的として、数百個にもおよぶ PSII の大型かつ同様な結晶を調製し、SACLA を用いてクライオループ内に固定された凍結結晶による、フェムト秒回転結晶構造解析 (Serial Femtosecond Rotational Crystallography, SF-ROX) を行った。XFEL の特性を活かした無損傷構造解析の例としてはナノメートルからマイクロメートルサイズの微結晶を用いるシリアルフェムト秒結晶構造解析法 (Serial Femtosecond Crystallography, SFX) がよく知られているが、使用する結晶のサイズが小さいため、結晶格子のサイズが 8 MÅ^3 に

およぶ PSII のような巨大な膜タンパク質では、SFX を適用した場合の回折分解能に限界がある。また、特に膜タンパク質やその複合体について多くの場合、微結晶の析出条件が最適ではなく、大きい結晶に比べ回折分解能が低いという問題がある。今回我々が採用した、大型の結晶 ($1.2 \times 0.5 \times 0.2 \text{ mm}$) を用いた SF-ROX の最大の特長は、高分解能を与える PSII の大型結晶を使用し、かつ回折に寄与する結晶の体積を大きくすることにより回折分解能を確保し、さらに振動領域の連続した一連の静止回折写真を取得することにより既存の構造解析の手法の適用が可能などところにある。回折データが無損傷であることを担保するため、XFEL パルスを照射することに照射位置を $50 \mu\text{m}$ 以上離して放射線損傷の及んでいない場所へ結晶を移動させながら、 0.2° ずつ回転させて連続静止回折写真を取得することにより、回折データを収集した。

4. 研究成果

PSII の反応開始状態における無損傷構造を 1.95 Å 分解能で決定する事に成功した。全ての Mn-Mn の距離が放射光で決定された構造と比べて 0.1~0.2 Å ずつ短くなっており、OEC 内の Mn-Mn, Mn-O の距離は EPR や理論計算で報告されていた結果とも良く一致していたため、正確に触媒部分の構造を決定することができたことが示唆された(図 1)。

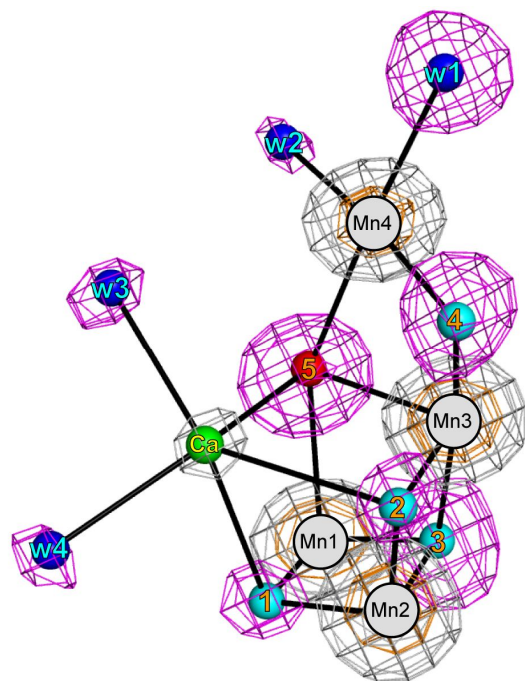


図 1 XFEL により決定した放射線損傷の無い PSII の結晶構造

この構造に基づいて水分解反応の開始状態では酸素発生中心を構成する Mn の価数は Mn1 が +3, Mn2 が +4, Mn3 が +4, Mn4 が +3 であること、水分解反応における基質分子 O5 の化学種は OH^- である可能性が高いことがわかった。

O5 原子が特殊な位置にあり, その化学種が OH⁻ である可能性が高いことが示唆されたので, O5 が酸素分子の形成に必要な基質の一つを提供していることが考えられた。これらの知見から水分解反応の機構を提唱した(図 2)。これらの成果は水分解反応機構の一端を明らかにしただけでなく, 水分解反応が可能な人工触媒をデザインするための重要な一歩にもなりうると考えられる。

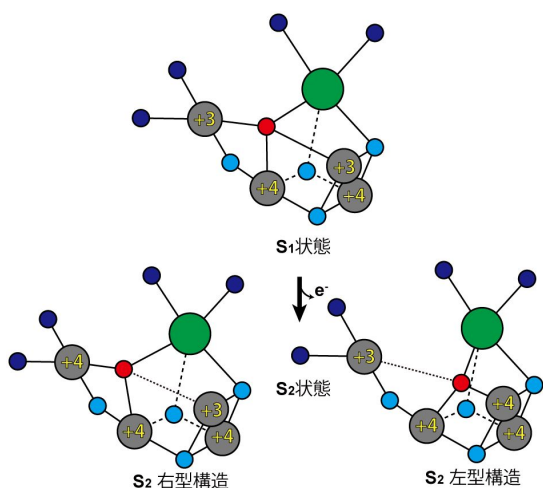


図 2 放射線損傷の無い PSII の結晶構造に基づいた S₁ 状態から S₂ 状態への構造変化

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) 全て査読有。

Suga M, Qin X, Kuang T and Shen JR. Structure and energy transfer pathways of the plant photosystem I-LHCI supercomplex. *Current Opinion in Structural Biology*, in press (2016).

Qin X, Suga M, Kuang T and Shen JR. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI super-complex. *Science*, 348(6238): 989-995 (2015).

Shoji M, Isobe H, Yamanaka S, Suga M, Akita F, Shen JR and Yamaguchi K. On the guiding principles for lucid understanding of the damage-free S1 structure of the CaMn4O5 cluster in the oxygen evolving complex of photosystem II. *Chem Phys Lett*, 627: 44-52 (2015).

Suga M, Akita F, Hirata K, Ueno G, Murakami H, Nakajima Y, Shimizu T, Yamashita K, Yamamoto M, Ago H and Shen JR. Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature*, 517(7532): 99-103 (2015).

Shoji M, Isobe H, Yamanaka S, Suga M, Akita F, Shen JR and Yamaguchi K. Theoretical studies of the damage-free S1 structure of the CaMn4O5 cluster in oxygen-evolving complex of photosystem II. *Chem Phys Lett*, 623: 1-7 (2015).

[学会発表](計 11 件) 全て招待講演。

菅倫寛. X 線結晶構造解析による光化学系の構造機能研究のこれまでとこれから. 大阪大学蛋白質研究所セミナー 構造を基盤とする蛋白質科学における未解決問題, 2016 年 3 月 1 日, 東京都.

Suga M. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. Bridging the gap: from structure to functional dynamics of photosynthesis related protein complexes, 2016 年 2 月 2 日, 大阪府.

Suga M. Keynote Lecter: Radiation damage free structure of photosystem II at 1.95 Å resolution revealed by XFEL pulses. The 13th Conference of the Asican Crystallographic Association (AsCA2015), 2015 年 12 月 5 日, Kolkata, India.

Suga M, Qin X, Kuang T and Shen JR. Structural basis for energy transfer pathways in the plant PSI-LHCI supercomplex. The 13th Conference of the Asican Crystallographic Association (AsCA2015), 2015 年 12 月 5 日, Kolkata, India.

Suga M. Radiation damage free structure of photosystem II at 1.95 Å resolution revealed

by XFEL pulses. Japan-Korea joint workshop on XFEL sciences, 2015年10月22日, Gyeongju, Korea.

菅倫寛. 酸素発生型光合成を司る光化学系II複合体と光化学系I複合体の結晶学的研究. 日本結晶学会進歩賞受賞講演, 2015年10月17日, 大阪府.

菅倫寛. 他共著10名. X線自由電子レーザーによって明らかにされた光化学系II複合体の1.95Å分解能での無損傷構造. 日本生物物理学会若手招待講演, 2015年9月13日, 石川県.

Suga M. 他共著10名. Radiation damage free structure of photosystem II at 1.95 Å resolution. 37th International Free Electron Laser Conference (FEL2015), 2015年8月23日, Daejeon, Korea.

菅倫寛. 他共著10名. フェムト秒X線レーザーを用いた光化学系II複合体の1.95Å分解能での無損傷結晶構造解析. 日本蛋白質科学会若手奨励賞シンポジウム, 2015年6月24日, 徳島県.

Suga M. Radiation damage free structure of photosystem II at 1.95Å resolution. The 1st SACLA Workshop on Femtosecond Crystallography, 2015年3月26日, 兵庫県.

菅倫寛. 光合成で酸素が発生する仕組み. テニユアトラック推進機構医学系物質科学分野セミナー「蛋白質立体構造解析の最前線」, 2015年3月23日, 宮崎県.

〔図書〕(計6件) 全て査読有

沈建仁, 秋田総理, 菅倫寛. 光合成の構造生物学. **生物物理**, 56(2): 79-86 (2016).

沈建仁, 菅倫寛, 秋田総理, 吾郷日出夫, 山本雅貴. SACLA が解き明かす光合成の仕組み. **OPTRONICS**, 1: 31-35 (2016).

菅倫寛, 秋田総理, 沈建仁. X線自由電子レーザーで決定した光化学系II複合体の無損傷結晶構造と水分解反応機構. **放**

射光学会誌, 28: 177-181 (2015).

鵜飼奈津美, 菅倫寛, 杉浦美羽, 岩井雅子, 池内昌彦, 沈建仁. PsbA3-D1 タンパク質を発現する光化学系II複合体の結晶構造. **光合成研究**, 25: 22-27 (2015).

菅倫寛, 沈建仁. 高等植物の光化学系I-光捕集アンテナI超複合体におけるエネルギー伝達経路の構造基盤. **新着論文レビュー**,

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/10310> (2015).

菅倫寛, 秋田総理, 沈建仁. フェムト秒X線レーザーにより明らかにされた1.95Å分解能における光化学系II複合体の天然状態の構造. **新着論文レビュー**,

<http://first.lifesciencedb.jp/archives/957425> (2015).

〔産業財産権〕
出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕
<ホームページ>
光化学系複合体の正確な三次元原子構造を解明 ~ 人工光合成開発への糸口に ~
http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id251.html

光合成光化学系I複合体の構造を解明 ~ 光エネルギーの高效率利用に前進 ~
http://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id303.html

<新聞掲載>

2014年11月27日掲載, 日刊工業新聞(科学技術・大学面), 「水分解機構を解明, 岡山大理工光化学系II構造解析」

2014年11月27日掲載, 山陽新聞(社会面), 「『人工光合成』に期待, 岡山大タンパク質構造解明」

2014年11月27日掲載, 神戸新聞(社会面), 「人工光合成実現に道筋, 岡山大『SACLA』で解析」

2014年12月5日掲載, 科学新聞(科学

技術総合面), 「人工光合成開発への端緒に, 岡山大・理研光化学系 II 複合体の正確な原子構造を解明」

2014年12月15日掲載, 神戸新聞(社会面), 「『人工光合成』研究に熱視線」

2015年5月28日掲載, ワシントンポスト社, 「Scientists are closing in on the ultimate secrets of plant photosynthesis」

2015年5月29日掲載, 山陽新聞(社会面), 「タンパク質構造解明, 太陽光発電応用に期待, 岡山大沈教授ら」

2015年5月29日掲載, 読売新聞(地域面), 「還元剤物質の構造解明, 人工光合成に応用, 光エネルギー効率化へ」

2015年5月30日掲載, 毎日新聞(岡山面), 「光合成のたんぱく質構造解明, 岡山大が解明, 太陽光発電効率化に期待」

2015年5月30日掲載, 中国新聞(社会面), 「光合成のタンパク構造解明, 岡山大太陽光発電応用も」

2015年6月8日掲載, 日刊工業新聞(科学技術・大学面), 「光合成担うたんぱく質, 複合体構造を解明, 岡山大」

2015年6月8日掲載, 産経新聞(岡山面), 「光合成のタンパク質構造解明, 岡山大太陽光発電応用も」

2015年6月18日掲載, 朝日新聞(科学面), 「光合成たんぱく質構造解明, 岡山大アップに期待」

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菅倫寛 (Michi Suga)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・大学院自然科学研究科・助教

研究者番号: 60634920