

令和元年6月7日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H06162

研究課題名(和文) X線自由電子レーザーを用いた光化学系IIの反応中間体の構造解析

研究課題名(英文) Structural analysis for photosystem II in the intermediate S_i-state by using X-ray free electron laser pulses

研究代表者

菅 倫寛 (Suga, Michihiro)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・准教授

研究者番号：60634920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,900,000円

研究成果の概要(和文)：光化学系II(PSII)の酸素発生複合体(OEC)の構造は高分解能で解析されている。しかし、水分解反応の中間体状態に相当する構造は原子分解能では解析されておらず、反応機構への理解は限定的である。研究代表者らはPSIIの微小結晶を用いて、二閃光照射により励起させたPSIIの反応中間体S₃状態を調製し、XFELを用いて構造を2.35Å分解能で決定した。S₁状態との差の電子密度より光励起によって起こる構造変化を確認した。OECの周辺では、これまで基質の候補とされていたオキソ酸素の一つであるO₅近辺への新しい水分子O₆の挿入が確認されたことからO₅とO₆がO=O結合を形成する反応機構を提唱した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光化学系IIは可視光による水分子の酸化反応を触媒することのできる唯一の天然触媒である。今回X線自由電子レーザーを利用した反応中間体の構造解析によりO₆とよばれる水分子が触媒部分に取り入れられることで水分解反応が起こるということを実験的に観察し、触媒反応の基本原則を世界で初めて実証した。この知見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も期待できる。

研究成果の概要(英文)：Photosystem II (PSII) catalyzes photo-oxidation of water into dioxygen through an S-state cycle of the oxygen evolving complex (OEC). The structure of PSII has been analyzed at resolutions higher than 2.0Å by using X-ray as well as XFEL. The mechanism of O=O bond formation, however, remains obscure owing to the lack of intermediate-state structures determined at atomic resolution. We prepared PSII in the S₃ state by providing two-flash illumination into micro-sized crystals at room temperature and determined the structure at 2.35Å resolution by using an XFEL. An isomorphous difference Fourier map between the two-flash-illuminated and dark-adapted states revealed apparent structural changes. Among them, the insertion of a new oxygen atom O₆ close to the putative substrate oxo-bridge O₅ was observed. We proposed the mechanism of O=O bond formation between O₅ and O₆. The findings provide a structural basis for the mechanism of oxygen evolution.

研究分野：動的構造生物学

キーワード：光化学系 光合成 X線自由電子レーザー 動的構造 ダイナミクス 膜タンパク質 人工光合成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

光合成は植物や各種の藻類が行う、太陽光を利用してCO₂と水から有機物をつくる化学反応である。光合成は太陽の光エネルギーを有機物として化学エネルギーの形に変換し、地球上の生物に必要なエネルギーを供給するとともに副産物である酸素分子は好気性生物の生存をささえている。光合成で最初に起こるのは光エネルギーの吸収、一連の電子伝達、水分解反応であり、これらは光化学系 II(PSII)により触媒される。PSII の酸素発生中心(OEC)では水分子が酸素、プロトン、電子へと分解され、分子状酸素が放出される水分解反応が、S₁-状態と呼ばれる5つの酸化状態を経て触媒されている。S₁-状態の i ($i = 0 \sim 4$) は OEC に蓄積された酸化数を表しており、PSII 内で光励起した反応中心クロロフィルの電子が電子授与体である Q_B キノンまで伝達されたことにより生じる正孔を OEC が補う事により増加する。OEC は暗下で安定な S₁ 状態から S₄ 状態まで酸化されると、水分子を酸化して分子状酸素を発生させ S₀ 状態にターンオーバーする。OEC の触媒機能とその作動原理を詳細に理解することで光合成水分解反応のメカニズムが明らかになるし、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も期待できる。

研究代表者らは光合成水分解反応の詳細を明らかにすることを目的として、これまでに OEC の S₁ 状態に相当する結晶構造を X 線自由電子レーザー (XFEL) によって解析して、Mn₄CaO₅ の組成を持つ歪んだイスのような形と触媒部分の原子間の距離やマンガンの価数を明らかにした。しかし、水分解反応の機構への考察はこれら反応開始 S₁ 状態の立体構造およびそれらに関連した理論計算や分光学的知見などから導き出されたものに過ぎず、不確かな点が幾つかあった。特に OEC 内の O5 と呼ばれるオキソ酸素原子は周囲の Mn との結合距離が他のオキソ酸素原子と比べて長く、ゆえに反応性に富む環境にあると推定されることから、O5 が酸素発生の基質のひとつとなる反応機構が提唱されていたが、そのような反応機構が実際に存在するのかが不明であった。もし仮に存在したとしても O5 近くには酸素発生に必要なもうひとつの基質水分子を許容できるだけの空間がないため、S₁ 状態の立体構造のみからでは反応機構をうまく説明できない。このため、O5 とは異なる部位で分子状酸素が形成される反応機構も複数提案され、多くの議論がなされていた。さらに、水分解反応では水分子から引き抜かれたプロトンを放出しなければならないが、そのための経路がどこであるか、また、どうして放出されたプロトンは逆流しないのか、といった疑問に対する実験的な証拠はほとんど存在してなかった。

2. 研究の目的

近年、XFEL の技術により PSII の機能を理解するために重要なシリアルフェムト秒結晶構造解析法が可能となった。XFEL は従来の放射光の 10 億倍もの高いピーク輝度をもつ X 線を 1 パルスとして試料に照射することのできる量子ビームの技術であり、XFEL 照射により照射位置の試料は破壊されてしまうが、1 パルスはわずか十フェムト秒という短い持続時間のため、ピコ秒単位で起こるといわれている放射線損傷による構造変化が開始するよりもまえに X 線回折データ収集が可能となる。従ってシリアルフェムト秒結晶構造解析法を用いれば、タンパク質を損傷させることなく駆動する酵素反応をフェムト秒の時間分解能で捕らえることが可能である。PSII は反応開始 S₁ 状態に相当する構造が 2 Å 以上の高分解能で解析されたのみであり、反応中間体に相当する構造の高分解能の構造解析は報告されていなかった。PSII は光照射によって S 状態が遷移するため、レーザー照射による光励起とシリアルフェムト秒結晶構造解析法を組み合わせたポンププローブ実験によって反応中間体の回折データを取得することで解析することが可能である。そこで本研究では光合成水分解の反応機構を明らかにすることを目指して XFEL による PSII の反応中間体 S₃ 状態の高分解能での構造解析に取り組んだ。

3. 研究の方法

好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus vulcanus* から単離した PSII を結晶化し、XFEL 施設 SACLA にて時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析を行った。光励起効率を良くするため、100 μm 以下のサイズの微小結晶を実験に用いた。小さなサイズの結晶は溶液組成や温度などの変化による品質劣化が容易に起こり易く、結晶が小さくなる事で X 線回折に寄与する結晶体積も減るため、高い分解能の回折斑点を与える結晶を調製する必要があった。結晶化方法、結晶化の後に用いる溶液の組成と処理方法、などの検討に加え、シリアルフェムト秒結晶解析法に使用する結晶輸送媒体の種類を検討した。条件探索は調製した結晶を用いて放射光で回折実験を行い、回折能で判断した。その結果、2 Å 分解能まで回折し、かつ、直径 240 μm サイズのレーザー照射 (532 nm, 42 mJcm⁻²) によって S₃ 状態までの励起が半分程度起こる微小サイズの結晶を与える条件が見つかった。なお、D2 タンパク質の Tyr160 を酸化させるためにレーザー光 (直径 7 mm サイズ, 532 nm, 52 mJ cm⁻²) を実験の約 1 時間前に 2 発照射した。レーザー照射による S₃ 状態への遷移はフーリエ変換赤外分光法で確認した (Kato et. al. *J. Phys. Chem. Lett.* 2018)。600 L の細胞培養から得られた、1 g の PSII タンパク質を用いて作成した PSII 結晶を用いて光励起していない S₁ 状態の PSII と 2 回閃光照射によって励起された S₃ 状態の PSII からそれぞれ 40 万枚と 27 万枚の回折イメージを集め、最終的に両データセットとも 2.35 Å 分解能で構造解析した (Suga et. al. *Nature*, 2017)。また、実験結果の再現性を見るために同様の実験を繰り返した。

4. 研究成果

上述した二回の閃光照射により励起した微小結晶はフーリエ変換赤外分光法により約半分の PSII が S_3 状態を占めていることなどから、観測された構造は水分子を分解する直前の S_3 状態を反映していると考えられた。ただし、励起効率は完全ではないので S_2 状態や S_1 状態の混入があることを踏まえ、ここでは二回閃光照射した 2F 状態と呼ぶ。2F 状態の PSII の全体構造は S_1 状態とほとんど同じであり、構造全体の RMSD は僅か 0.10 \AA であった。2F 状態と S_1 状態の回折データを用いて計算した同型差フーリエ電子密度マップに注目すると、 S_1 -状態遷移による構造変化が OEC の周囲に局在していることがわかった。すなわち、期待したとおりに光励起による S_3 状態への遷移が起こり、その結果、電子供与側と授与側で起きた酸化還元反応とプロトン移動を構造変化として観察することに成功したと考えられた (図 1)。

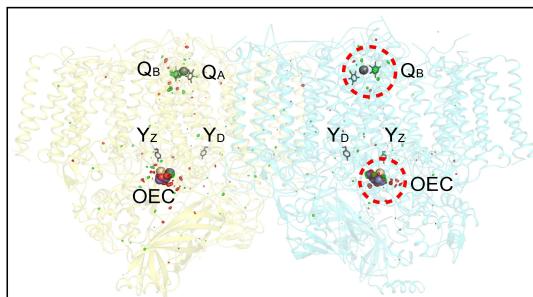


図 1 PSII 全体での差の電子密度の分布

電子密度の変化が顕著に現れた PSII 二量体のうち片方のプロトマー中の OEC と Q_B キノン周囲を点線で囲んだ。

2F 状態と S_1 状態の差の電子密度マップおよびそれぞれ原子構造を比較すると少なくとも以下の 6 つの顕著な構造変化が OEC 周囲に見られ、それらは水分解の反応機構をうまく説明するものであった (図 2)。1) Mn_4 がわずかに OEC のキューバン部分から離れるよう外側に動き、 Mn_4 と Mn_1 との距離はわずかに ($0.1 - 0.2 \text{ \AA}$) 長くなった。2) キューバン部分を構成する Ca^{2+} が Mn_4 から離れるように動いた。3) 水分子に相当する O6 の強い電子密度が O5 近くに現れた。4) Glu189 が OEC のキューバンから遠ざかり、O5 と Mn_1 の間に O6 を収容できるスペースが現れた。5) W665 と呼ばれる水分子の移動性が増すことで、オキソ酸素 O4 を基点とする 15 \AA にも及ぶ長い水素結合ネットワークが遮断された。6) 以上 5 点の構造変化にともない、OEC の配位子である D1 タンパク質の Asp61, Asp170, His332, Ala344 がわずかに動いた。これらの構造変化のうち、特に W665 の移動性の増加および O6 の挿入は水分解反応機構に重要な知見を与えるものであった。W665 の移動性の増加により W665 と W567 の間の水素結合が無くなる。W665 の移動性の増加による水素結合ネットワークの分断により放出されたプロトンの逆流を防いでいると考えられた。新しい水 O6 は、基質の候補とされている O5 近傍の位置に挿入され、 $O=O$ 結合を作るのに適した位置に挿入されることから O5 と O6 が酸素発生のサイトであることを強く印象付けるものである。これらの構造解析から S_1 状態から S_3 状態への遷移に伴い、O6 が挿入して OEC は Mn_4CaO_5 から Mn_4CaO_6 へ構造が変化して酸素が発生すると結論した。

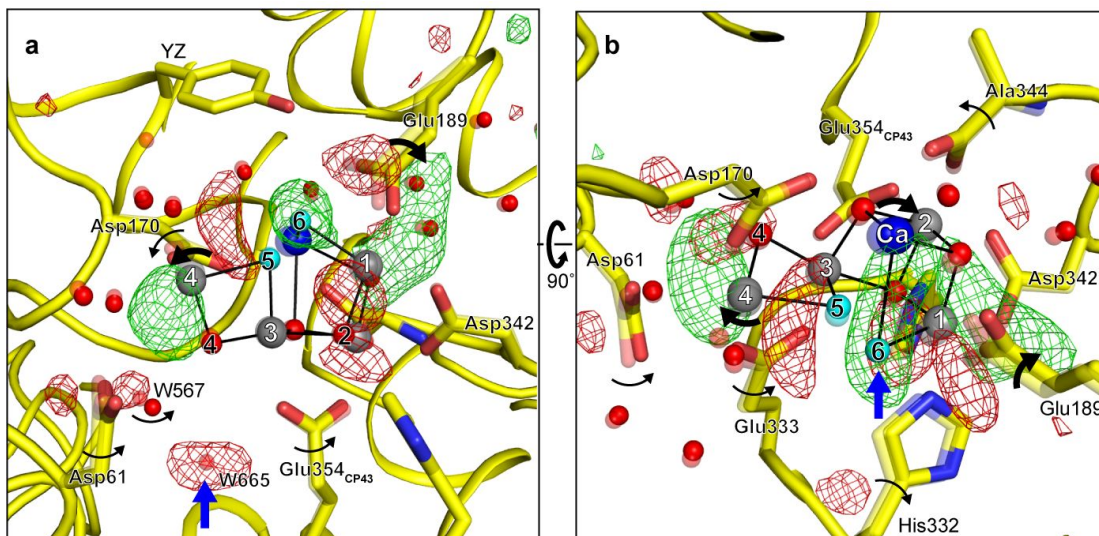


図 2 OEC 周辺における閃光二発による光励起に伴う電子密度と立体構造の変化

その他の成果 光合成タンパク質の構造生物学的研究

上記の PSII の S₃ 状態の構造解析に加え、光合成膜タンパク質である LH1-RC 超複合体 (Yu et al. *Nature*, 2018), FCP タンパク質 (Wang et al. *Science*, 2019), 緑藻 PSI-LHCI 超複合体 (Suga et al. in press), また光合成に関連するタンパク質である Tli0287 についても構造解析した (Motomura et al. *JBC*, 2017)

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件) 全て査読有。

Wang W, Yu L-J, Xu C, Tomizaki T, Zhao S, Umena Y, Chen X, Qin X, Xin Y, Suga M, Han G, *Kuang T and *Shen J-R. Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms. *Science*. 363, 598 (2019). 10.1126/science.aav0365

Nakajima Y, Umena Y, Nagao R, Endo K, Kobayashi K, Akita F, Suga M, Wada H, Noguchi T, and *Shen J-R. Thylakoid membrane lipid sulfoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG) is required for full functioning of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*. *J. Biol. Chem.* 293, 14786-14797 (2018). 10.1074/jbc.RA118.004304

Kato Y, Akita F, Nakajima Y, Suga M, Umena Y, Shen J-R, and *Noguchi T. Fourier transform infrared analysis of the S-state cycle of water oxidation in the microcrystals of photosystem II. *J. Phys. Chem. Lett.*, 9, 2121-2126 (2018). <https://doi.org/10.1021/acs.jpcclett.8b00638>

Yu L-J, Suga M, Wang-Otomo Z-Y, *Shen J-R. Structure of photosynthetic LH1-RC supercomplex at 1.9 Å resolution. *Nature*, 556, 209-213 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0002-9>

Motomura T, Suga M, Hienerwadel R, Nakagawa A, Lai TL, Nitschke W, Kuma T, Sugiura M, Boussac A, *Shen J-R. Crystal structure and redox properties of a novel cyanobacterial heme-protein with a His/Cys heme axial ligation and a per-arnt-sim (PAS)-like domain. *J. Biol. Chem.* 292, 9959-9612 (2017). 10.1074/jbc.M116.746263.

Suga M, Akita F, Sugahara M, Kubo M, Nakajima Y, Nakane T, Yamashita K, Nakabayashi M, Umena Y, Yamane T, Nakano T, Suzuki M, Masuda T, Inoue S, Kimura T, Nomura T, Yonekura S, Yu L-J, Sakamoto T, Motomura T, Chen J-H, Kato Y, Noguchi T, Tono K, Joti Y, Kameshima T, Hatsui T, Nango E, Tanaka R, Naitow H, Matsuura Y, Yamashita A, Yamamoto M, Nureki O, Yabashi M, Ishikawa T, *Iwata S and *Shen J-R. Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL. *Nature*, 543, 131-135 (2017). <https://doi.org/10.1038/nature21400>

Shoji M, Isobe H, Nakajima T, Shigeta Y, Suga M, Akita F, Shen JR and *Yamazaki K. Large-scale QM/MM calculations of the CaMn₄O₅ cluster in the S₃ state of the oxygen evolving complex of photosystem II. Comparison between water-inserted and no water-inserted structures. *Faraday Discussions*, (2017). 10.1039/C6FD00230G

[学会発表] (計 10 件) 全て招待講演。

Suga M, Shen J-R, Structure of oxygen evolving photosystem II and possible mechanism for the O=O bond formation. The 56th annual meeting of the biophysical society of Japan. Sep 16th, 2018, Okayama.

Suga M, Structure of oxygen evolving photosystem II and possible mechanism for the O=O bond formation. SACLA Users' meeting 2018. Sep 7th, 2018, Hyogo.

菅倫寛, 沈建仁, X 線自由電子レーザーにより明らかにされた光学系 II の水分解・酸素発生の反応機構. 日本生体エネルギー研究会第 43 回討論会. 2017 年 12 月 20 日, 京都.

菅倫寛, 秋田総理, 菅原道泰, 久保稔, 中島芳樹, 岩田想, 沈建仁, X 線自由電子レーザーにより明らかにされた光学系 II の水分解・酸素発生の反応機構. ConBio2017. 2017 年 12 月 6 日, 神戸.

菅倫寛, 秋田総理, 菅原道泰, 久保稔, 中島芳樹, 岩田想, 沈建仁, X 線自由電子レーザーにより明らかにされた光学系 II の光励起した反応中間体構造および水分解・酸素発生の反応機構. 第 17 回日本蛋白質科学会. 2017 年 6 月 22 日, 仙台.

菅倫寛, X 線自由電子レーザーにより明らかにされた光学系 II の水分解・酸素発生の反応機構. 分子研研究会. 2017 年 6 月 14 日, 岡崎.

菅倫寛, 光合成蛋白質の構造と機能に関する結晶学的研究. 第 58 回日本植物生理学会授賞記念講演. 2017 年 3 月 17 日, 鹿児島.

Suga M, Structure of an intermediate S-state of photosystem II revealed by XFELs. The 54th annual meeting of the biophysical society of Japan. Nov 26th, 2016, Tsukuba.

Suga M, Structural studies of photosystems. Finnish-Japanese symposium 2016 Integration of photosynthesis with cellular metabolism: towards suitable biochemistry. Sep 5th, 2016, Saariselkä, Finland.

菅倫寛, Qin X, Kuang T, 沈建仁. 高等植物光化学系 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. 第 7 回日本光合成学会年会およびシンポジウム. 2016 年 5 月 27 日, 東京.

〔図書〕(計 1 件)

菅倫寛. 光化学系 II の構造生物学的研究が解き明かす光合成で酸素が発生する仕組み. **日本の科学者**. 53, 25-30 (2018).査読有

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

プレスリリース

光化学系 II の構造解析についてプレス発表。プレス内容の URL (https://www.okayama-u.ac.jp/tp/release/release_id448.html)

2017 年 2 月 21 日掲載, 毎日新聞(地域面)「光合成 O₂ 発生部を特定」
2017 年 2 月 21 日掲載, 読売新聞(地域面)「光合成の“始まり” 解明」
2017 年 2 月 21 日掲載, 山陽新聞(地域面)「人工光合成研究進む」
2017 年 2 月 27 日掲載, 日経新聞「光合成の最初の反応 水分解の仕組み判明」
2018 年 3 月 4 日掲載, 朝日新聞(科学面)「光合成 水の分解に迫る」
2018 年 3 月 2 日掲載, 朝日新聞(科学面)「光合成始まる場所分子レベルで特定」

プレスリリース

反応中心 LH1-RC 超複合体の構造解析についてプレス発表を行い, 日刊工業新聞, 読売新聞, 山陽新聞などで紹介 (2018 年 4 月 2 日)

プレス内容の URL (https://www.okayama-u.ac.jp/up_load_files/press30/press-180405.pdf)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）:

(2)研究協力者

研究協力者氏名：沈建仁

ローマ字氏名：Jian-Ren Shen

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。