

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H05588

研究課題名(和文)光化学系II膜蛋白質のpHトラップによるS2反応中間体の結晶構造解析

研究課題名(英文)Crystal structural analysis of photosystem II in pH dependence for trapping S2 intermediate state

研究代表者

梅名 泰史(Umena, Yasufumi)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・特別契約職員(准教授)

研究者番号：10468267

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 18,100,000円

研究成果の概要(和文):光合成の水分解・酸素発生を担う光化学系II膜蛋白質(PSII)のpH4とpH9の結晶構造解析に混合緩衝液を使うことで2.0Å分解能で成功した。酸性と塩基性条件では、それぞれ異なる部位のプロトン輸送に関係する構造が変化しており、pHにより活性が低下する構造上の要因が明らかになった。一方、反応中間S2状態のPSIIの結晶構造解析はこのpH条件では困難なため、結晶の凍結温度を変える方法を試みた。PSII結晶をフィルム状になる粘性液体で保護することで、100Kから200Kに温度を上げてても結晶性は劣化せず、また結晶に光を照射するとX線吸収分光分析から、励起状態を保ったPSII結晶であることが確認された。

研究成果の概要(英文):Crystal structures of cyanobacterium Photosystem II (PSII) in pH4 or pH9 condition were solved at 2.0-angstrom resolution. These acidic or basic PSII crystals changed from the neutral state were obtained by using the mixture solution of three kinds of buffers for the linear pH gradient without changing the composition of crystal mother liquid. Whole structures were no differences among neutral, acidic and basic structure. However, the pH-dependant structure changes were observed on the proton pathways from the active site of water-oxidation. The each of structural change was in the different locations between acidic and basic structure, respectively. We concluded that these parts were essential for proton transfer from the water-splitting reaction in PSII.

研究分野：構造生物学

キーワード：結晶構造解析 光合成 光化学系II蛋白質 pH 反応中間状態

1. 研究開始当初の背景

光合成における水分解・酸素発生反応を担う光化学系 II 膜蛋白質(photosystem II; PSII)は植物や藻類のチラコイド膜に存在する 20 個のサブユニットから成る分子量 350 kDa の膜蛋白質複合体である。PSII へ光が照射されると、色素分子クロロフィルが電荷分離し、様々な生体内の反応に必要な還元力の源となる電子が発生する、光化学反応を行っている。電子を失ったクロロフィルには水を分解して電子を補充しており、その副産物として水素イオン(プロトン)と酸素分子が放出される。水分解の反応中心には金属錯体の Mn_4CaO_5 クラスタ(Mn クラスタ)が存在し、高価数の Mn 原子が水分解の触媒として機能している。水分解反応は5段階の反応中間状態(S1,S2,S3,S4,S0)を経て進行することが知られている(B. Kok, et al, 1970)。PSII 全体の立体構造は 2001 年に好熱性シアノバクテリア由来の結晶構造が初めて報告された(A. Zouni, et al, 2001)。しかし、水分解反応中心の詳細は分解能が低いために当時はまだ未解明であった。2011 年に申請書からのグループが同種のシアノバクテリアより高品質な PSII 結晶の作製に成功し、1.9 Å 分解能の結晶構造を発表した。その結晶構造により、初めて Mn クラスタの分子構造と反応基質となる多数の水分子の存在が明らかになった(Y. Umena, et al, 2011)。PSII の原子レベル分解能の立体構造が明らかになったことで、PSII における光合成反応の様々な現象を構造化学的に研究できるようになった。

一般に蛋白質には反応がもっとも効率よく働く至適 pH があり、PSII の場合は pH6 付近が最も水分解活性が高いとされている。先行研究から、酸性・塩基性条件下で水分解活性が低下するのは、次段階の S2 状態から先に進行できないためと考える報告が、電子スピン共鳴(EPR)による研究(G. Bernat, et al, 2002)と赤外振動分光(FT-IR)による研究(H. Suzuki, et al, 2005)によって示されている。これらの報告では、S2 状態以降の水分解で発生するプロトンの排出が阻害されるためと考えられているが、PSII 内部における変化の詳細は分かっていない。そこで、酸性および塩基性条件下における PSII の結晶構造解析ができれば、プロトン排出に必要な構造が明らかになり、また一方で、S2 状態に止めた反応中間体結晶が調製できると考え、本研究を着想した。それまでの研究から、PSII は pH4 から pH9 の緩衝液を含む溶液からでも結晶が析出しており、広い pH 範囲で変性すること無く安定に立体構造が保たれていることが確認されていたことから、本研究が実現できると考えた。

2. 研究の目的

PSII は光化学反応で失った電子を水分解反応で補充し続けるため、発生するプロトンを外部に放出する必要がある。水分解反応中心の Mn クラスタは複数のサブユニット蛋白質で囲まれた PSII 内部に結合しているため、産物のプロトンを効率良く排出するためには水分子を介した経路だけでなく、アミノ酸残基を使った構造化学的な

メカニズムがあると考えられる。pH 環境によって水分解に伴うプロトン排出が抑制されることを示した先行研究に着想を得て、様々な pH 環境における結晶構造を解析することで、プロトン排出に必須の構造化学的特徴を、立体構造の変化から特定することを目指した。また、結晶構造だけでは捉えることができない、微細な構造変化も予想されるため、連携研究者の分子科学研究所の古谷祐詞准教授と連携して、FT-IR による局所微細構造情報と結晶構造を組み合わせた研究も同時に計画した。

また、S2 状態以降が pH 環境によって進行が阻害されることから、酸・塩基環境の PSII 結晶に光を照射して光化学反応を誘発し、S2 状態をトラップした結晶構造解析を目指した。一方で、光が十分に透過できるように深紫外レーザーによる結晶の加工技術および湿度制御装置を使った結晶の改良技術の検討も行った。

3. 研究の方法

光化学系 II 結晶試料の pH 可変調製

PSII の結晶試料は、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* を 50 °C で大量培養し、凍結破砕法と遠心分離により PSII が含まれるチラコイド膜を分画した。次にチラコイド膜から2種類の界面活性剤を用いて PSII を可溶化し、陰イオンカラムクロマトグラフィーによる精製を行い、PSII 二量体の結晶化試料を調製した。PSII の結晶化は MES 緩衝液 pH6 の条件でポリエチレングリコール(PEG)1450 と界面活性剤を用いて 12°C で行い、およそ2日で 1 ミリ程度の PSII の結晶が析出した。析出した結晶をグリセロール、ジメチルスルホキシド(DMSO)および 2 種類の高分子量 PEG と3種類の混合緩衝液を含む抗凍結溶液に移し、PEG 濃度の高い溶液に段階的に置き換えると同時に、混合緩衝液の pH を徐々に変化させた。pH6 の中性環境で析出した PSII 結晶を最終段階において、pH4 と pH9 の酸性と塩基性の環境にそれぞれ置き換え、低温窒素ガスを使って凍結固定し、回折 X 線強度測定を行った。

複数の緩衝液を混ぜることで広い範囲に緩衝能を持つ混合緩衝液になることが知られていた(J. Newman, et al, 2004)。この報告を参考に酸性条件では、マロン酸、イミダゾール、ほう酸を含む MIB 混合緩衝液の pH6 と pH4 を、塩基性条件では、マロン酸、イミダゾール、CHES グッド緩衝液を含む MIC 混合緩衝液の pH6 と pH9 を調製した。それぞれの混合比を変えることで、組成を変えること無く pH を段階的に変化させた混合緩衝液を用いた。pH4 と pH9 に調製した PSII 結晶は放射光施設 SPring-8 のアンジュレータービームライン BL41XU および BL44XU にて、回折 X 線強度測定を行った。結晶構造解析は、分子置換法にて初期位相を決定し、構造精密化にはプログラム REFMAC5 および PHENIX を用いて解析し、プログラム COOT を使って立体構造の修正を行った。

pH を可変した PSII の FT-IR 測定

当初の計画では pH の可変に伴う微細な構造

変化を検出するため、連携研究者の古谷博士の開発した回転セルを使った測定を想定していた。回転セルは微弱な PSII からの信号を効率よく積算できることが期待されていた。しかし、初年度に起こったシアノバクテリアの培養条件の問題により、PSII 試料の調製が難航したため、混合緩衝液を使った pH を可変させる手法の確立が遅れた。また、予定していた回転セルがまだ開発途上のため、本研究に必要な精密な測定を期間内に達成することができなかった。そのため、当初の FT-IR 測定の計画は研究期間中に遂行することができなかった。

4. 研究成果

混合緩衝液を使った PSII 結晶の pH 可変

PSII の pH 依存に関する実験として、酢酸やクエン酸、グルタミン酸などが使われる報告があるが、これらの条件では PSII 結晶が溶解してしまった。また、急激な pH 変化は、結晶に亀裂が入り、十分な回折強度データを得ることができなかった。前述の Newman らが報告していた様々な混合緩衝液を試したところ、MIB 混合緩衝液と MIC 混合緩衝液では結晶の溶解が起こらなかった。また、溶液組成を変えずに段階的に pH を変化させることで、結晶を壊さずに pH 条件を変えることができた。広い pH 緩衝域を持つ混合緩衝液により、酸性・塩基性条件下の PSII 結晶を良好に調製することができた。一方で、抗凍結溶液に含まれる PEG、グリセロール、DMSO は、緩衝液成分よりも大量に存在するため、酸性・塩基性条件下では pH を変動させる作用があった。そのため、最終濃度の抗凍結溶液は MIB および MIC 緩衝液の pH を微調整する必要があった。

酸性条件の結晶構造解析

MIB 緩衝液の pH を段階的に変化させて、最終的に pH4 の抗凍結液に PSII 結晶を浸漬することで、結晶を劣化させずに酸性条件に調製することができた。放射光施設 SPring-8 で得られた回折強度データを解析し、2.0 Å 分解能の結晶構造解析を行った。結晶構造の PSII 二量体の全体構造と、19 個の各サブユニットの主な構造には大きな変化はなかった。また、多くのアミノ酸残基や補欠分子および水分子の配置も中性の構造にほぼ類似していた。しかし、水分解反応中心の近傍に存在する、活性チロシン残基(Tyr161:Yz)と水素結合ネットワークを形成するヒスチジン 190 残基(His190)とアスパラギン 298 残基(Asn298)との水素結合の距離が伸びていることが分かった。Mn クラスタには 2 つのヒスチジン残基(His332 と His337)が配位しているが、これらの構造には大きな変化は起こっていなかった。

一方、電子受容体のプラストキン分子が結合する部位に存在する非ヘム鉄イオンに重炭酸イオンが二座配位で結合しているが、片側が解離した単座配位に変化していた。この構造変化に伴って近傍の 2 つのチロシン残基およびグルタミン酸残基も非ヘム鉄イオンから離れるように構造が変化していた。前述の Yz-His190-Asn298 の水素結合ネットワークは Mn クラスタからの電子移

動と連動してプロトンの排出を行う Proton Coupled Electron Transfer (PCET パス)であることが知られている(P. Faller, et al, 2001)。pKa が 6.0 のヒスチジン残基は、pH4 の酸性条件ではプロトン化していると思われる。このことにより、余剰なプロトンが PCET パスに挿入されたことにより構造が冗長になるため、本来のネットワーク機能が抑制されていると考えられる(図 1)。

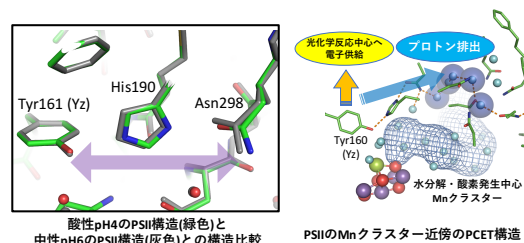


図1 酸性条件の構造変化

また、後述の非ヘム鉄イオンは中性では II 価であると考えられており、プラストキン間の電子移動を補助している。しかし酸性条件では価数が変化して、配位子が遊離し、周辺の構造を歪ませる要因となっていると考えられる。

これらの事から酸性条件では、電子のドナー側の水素結合ネットワーク構造の冗長化による機能低下、およびアクセプター側の金属イオンの保持構造の歪みが、活性低下の原因であることが明らかになった。これまで報告されていた機能低下が極めて局所的な構造変化によって引き起こされていたことが初めて明らかになった。

塩基性条件の結晶構造解析

酸性条件と同様に塩基性条件では MIC 混合緩衝液の pH を段階的に変化させて pH9 の塩基性条件の PSII 結晶を調製した。回折強度データも同様に SPring-8 にて収集し、構造解析の結果、こちらでも 2.0 Å 分解能で解析する事ができた。塩基性の構造も全体構造およびサブユニット構造に大きな変化はなく、ほとんどのアミノ酸残基、補欠分子および水分子の位置まで中性の構造と類似であった。しかし、Mn クラスタからのプロトン排出経路の一つとして考えられている経路に位置するグルタミン酸残基(Glu65)が本来の位置から、外部に突き出した構造に大きく変化していた(図 2)。

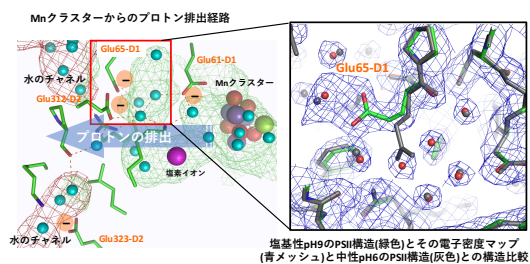


図2. 塩基性条件の構造変化

この構造変化は酸性構造では起こっておらず、逆に PCET パスの冗長化の構造変化はこの塩基

性構造では起こっていなかった。また、アクセプター側の重炭酸イオンは解離していなかった。これらのことから、塩基性における活性の低下は、プロトン排出経路に存在する Glu65 が本来の位置から解離したため、Mn クラスターからのプロトンを受容する機能が失われたことに起因すると考えられる。

先行研究の Bernat らの EPR による分析と、Suzuki らの FT-IR による分析では、酸性条件では評価が一致しているが、塩基性側の活性への影響の評価は異なっている。今回の pH4 と pH9 の結晶構造から、酸性と塩基性ではそれぞれ別の部位の構造変化が要因であるためと考えられる。

本研究により、PCET パスが微細な構造変化で影響を受けることがわかり、またプロトン排出に必須のグルタミン酸残基を特定することができた。

ただし、現段階では、回折X線強度測定時のX線照射線量が多いため、Mn クラスターのX線損傷が生じている可能性が高い。そのため、水分解反応中心の pH による影響については、さらに低線量のデータ収集を行い、より精密な構造解析が必要と思われる。

反応中間体 S2 状態の低温固定

当初の計画では、S2 状態の固定には、酸性・塩基性条件下で反応進行が抑制されている PSII 結晶に光を照射してトラップする方法を予定していた。前述の Bernat や Suzuki らの報告から酸性側 pKa は 3.5-4.0、塩基性側 pKa は 9.5 であると報告されていた。しかし、これら以降の pH では PSII 結晶が急激に劣化することがわかり、回折X線強度測定に適した結晶に保つことができなかった。

そのため、温度によって S2 状態に留める方法に計画を変更した。EPR による先行研究では、200K の低温にした PSII 試料に光を照射すると、S2 状態が捉えられることが報告されている(A. Boussac, et al, 2000)。しかし、一般には 200K では氷の結晶が成長して蛋白質結晶を壊すため、回折X線強度測定を行うことが困難である。そこで、結晶をポリビニルアルコール(PVA)の粘性剤でコーティングし、一定湿度のガスを吹き付けて結晶を固着する Humid Air and Glue-coating (HAG)法を用いた(S. Baba, et al, 2013)。HAG 法により、相対湿度 89%の窒素ガスを吹き付けて穏やかに結晶表面から水分を除いてフィルム状に固着した PSII 結晶を 100K で凍結し、200K まで温度を上昇させた。通常の結晶では 175K 付近から氷の結晶由来のアイスリングが出現し、PSII 結晶の回折強度が急激に減衰する。しかし、HAG 法で調製した結晶は 200K に上昇させてもアイスリングは現れず、回折強度も減衰しなかった。PVA フィルムで覆われて 200K でも安定に留まっている PSII 結晶に、強力な白色 LED 光を1分間照射し、再び 100K で凍結固定し、回折X線強度測定と X 線吸収分光測定(XAFS)を行った。回折 X 線強度データは昇温前の 100K と同じ 2.4 Å 分解能で解析する事ができた。また、S2 状態への遷移については、XAFS 分析による Mn の

K-吸収端のシフトから Mn の価数上昇の検証を行った。その結果、吸収端位置が高エネルギー側に 0.8 eV シフトしていた。

100K では励起せず常温では数秒で緩和する S2 状態が、本手法により PSII 結晶内でトラップできる可能性が確認された。ただし、この実験による手法は遷移効率の問題や十分な分解能のデータがまだ得られていない状況のため、課題研究終了後も引き続き研究を行う予定である。今後はこれらの成果をまとめて学術論文を発表する予定である。この研究によって、光合成の水分解反応に必要なエッセンスが解明されることで、光合成を人工的に模倣する人工光合成の開発指針に繋がると期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 6 件)

1: Suga M, Umena Y, (38 名中 9 番目). Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL. *Nature*, 査読有, 543, 131-135, (2017)

2: Uto S, Umena Y(7 人中 3 番). Mutual relationships between structural and functional changes in a PsbM-deletion mutant of photosystem II. *Faraday Discuss*, 査読有, 199, 107-120, (2017)

3: Ago H, Umena Y, (15 名中 3 番目). Novel Features of Eukaryotic Photosystem II Revealed by Its Crystal Structure Analysis from a Red Alga. *J. Biol. Chem.*, 査読有, 291, 5676-5687, (2016)

[学会発表](計 8 件)

1: Umena Y, Tamaru S, Shen JR. Proton transfer inhibition by molecular anion substitutions in Photosystem II. 24th Congress of the International Union of Crystallography (IUCr 2017), 2017.8.21, Hyderabad, India

2: Umena Y, Kawakami K, Shen JR, Kamiya N. Crystallographic study for estimation of the valence of four Mn atoms in oxygen-evolving Photosystem II using anomalous absorption techniques. American Crystallography Association 65th Annual Meeting, 2015.7.29, Philadelphia America.

6. 研究組織

(1)研究代表者

梅名 泰史(Umena, Yasufumi)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・

特別契約職員准教授

研究者番号:10468267

(2)連携研究者

古谷 祐詞(Furutani, Yuji)

分子科学研究所・生体分子情報研究部門・

准教授

研究者番号:80432285