

平成22年 6月 20日現在

研究種目：特定領域研究
 研究期間：2004～2009
 課題番号：16087102
 研究課題名（和文） X線結晶構造解析法による光合成系II膜蛋白質複合体の機能制御機構の研究
 研究課題名（英文） X-ray Crystallographic Studies on Mechanism of Photosystem II Membrane Protein Complex
 研究代表者
 神谷 信夫 (KAMIYA NOBUO)
 大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
 研究者番号：60152865

研究成果の概要（和文）：

光化学系II膜蛋白質複合体(PSII)は、光合成で、太陽光エネルギーを利用して水から酸素を発生させている。我々はPSIIの全体構造はもとより、酸素発生中心となるMn₄Caクラスターの詳細な構造を世界で初めて決定することに成功した。PSIIは酸素発生と同時に、炭酸同化に利用される化学エネルギーも発生させており、本研究は、それを有効利用するグリーンケミストリーに確固たる構造的基盤を提供するものである。

研究成果の概要（英文）：

Photosystem II (PSII) catalyzes the oxygen evolution from water in the photosynthesis utilizing solar light energy. We succeeded to determine, first in the world, the three-dimensional structure of the oxygen-evolving Mn₄Ca cluster at atomic resolution, including the whole structure of PSII. Because PSII also provides chemical energy for CO₂ condensation, our results serve structural strict-bases for efficient use of solar energy in the green chemistry.

交付決定

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2004年度	13,500,000	0	13,500,000
2005年度	14,900,000	0	14,900,000
2006年度	14,100,000	0	14,100,000
2007年度	12,700,000	0	12,700,000
2008年度	14,000,000	0	14,000,000
2009年度	13,600,000	0	13,600,000
総計	82,800,000	0	82,800,000

研究分野：構造生物学

科研費の分科・細目：生物科学・構造生物化学

キーワード：光合成, X線結晶構造解析, 膜蛋白質, 超分子, 光エネルギー変換, 酸素発生

1. 研究開始当初の背景

光化学系II膜蛋白質複合体(PSII)は葉緑体のチラコイド膜にあって、太陽の光エネルギーを生物化学エネルギーに変換すると同時に、水を分解して地球生命体にとって特に

重要な分子状酸素を供給する生体超分子である(分子量320kDa)。PSIIは補欠分子族として32-36分子のクロロフィル、4つのマンガン原子からなるクラスター、2個のヘム鉄、1個の非ヘム鉄、5-10個のカロチノイド等を

含み、これらの間で調和のとれた電子伝達反応が進行する。すべての補欠分子族は 13-14 種類の膜貫通サブユニットと膜の片側に極在する 3 種類の膜表在性サブユニットによって取り囲まれている。膜貫通サブユニットには反応中心コアを形成する D1, D2, 及び Cyt b-559, アンテナとして光を集める CP47 と CP43, これらを取り巻いて分子全体を安定化する 10 種類程度の低分子量サブユニット群がある。PSII の全体的な立体構造はまず好熱性ラン藻 *T. elongatus* の PSII に対して、分解能 3.8Å の結晶構造が Zouni らにより報告された (Nature 409, 739-743 (2001))。我々はこれとは独立に、類縁の *T. vulcanus* から PSII を単離してその結晶化に成功し、3.7Å 分解能の解析結果を報告した (PNAS 100, 98-103 (2003))。Zouni らは主に膜貫通部分の α 炭素のみの座標を報告したが、我々は膜貫通部分に加えて反応中心コアとアンテナ蛋白質の親水性ループ部分、すべての膜表在性サブユニットの主鎖構造を決定し、PSII の機能制御機構の解明に向けて大きく道を拓くことができた。しかしながら我々の解析においてもなおかなりの不確定部分が残されており、特に PSII の外周を取り巻く低分子量サブユニット群についてはほとんど同定できていない。

2. 研究の目的

本研究では、結晶の回折分解能を少なくとも 3.0Å を切る原子分解能にまで改善するとともに、特定の低分子量サブユニットを欠失した変異株を利用して低分子量サブユニット群を同定する。また D1 に特異的に結合するモノクローナル抗体と PSII の複合体、緑藻クラミドモナスやホウレンソウからの PSII について新規の結晶化を試みる。結晶化に際しては、新しく開発したマイクロ透析結晶化装置を利用して PSII の溶解度曲線を決定し、蛋白質の結晶成長理論に基づいて結晶を改良する。このように本研究では、対象となる生物種、結晶化および構造解析に関わる方法論を可能な限り網羅的に検討して PSII の原子分解能における立体構造を明らかにすることで、多数のサブユニットと補欠分子族の構造構築、電子伝達・酸素発生反応の機構を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

本申請の研究計画は、(1) 好熱性ラン藻 PSII の結晶化と回折分解能の改善、(2) 低分子量サブユニットを欠失した変異型 PSII の結晶化、(3) 抗 D1 抗体 Fv フラグメントの発現系構築と大量調製、(4) ミクロ透析結晶化装置を利用した PSII の結晶化の 4 部からなる。

本申請の研究期間は 6 年間とし、初年度からすべて立ち上げて平行して研究を進める。結晶化に成功すればただちに SPring-8 のアンジュレータビームラインまたは実験室系 X 線回折装置 (理化学研究所、岡山大学に既存) を利用して評価を行う。既存の構造モデルの精密化はこれらに平行して進める。

(1) 研究組織を構成する全ての拠点で好熱性ラン藻の野生型 PSII を調製し結晶化を行う。この過程において従来からの試料調製法と結晶化法を再検討する (結晶化用恒温庫を購入して使用)。得られた結晶について SPring-8 における X 線回折実験を行い回折分解能を評価する。分解能の改善が確認されればただちに回折強度測定を行い、より高分解能の電子密度図を計算して構造モデルの改良を進める。

(2) PsbI, PsbM, PsbT, PsbX を欠失した既存の PSII 変異体について、大量調製法を確認の上結晶化を試みる。結晶が得られれば (1) と同様にして回折実験を行う。新たに PsbJ, PsbY, PsbZ を欠失した変異体の発現系を構築して結晶化を目指す。

(3) 研究協力者が保存しているハイブリドマを理化学研究所において復元した後、抗 D1 抗体の Fv 遺伝子をクローニングして大腸菌による発現系を構築する。その後 Fv フラグメントを大量調製する (クロマトチェンバーを購入して使用)。

(4) ミクロ透析結晶化装置を利用して、まず好熱性ラン藻の野生型 PSII について溶解度曲線を測定し、その情報に基づいて結晶化を進める。結晶が得られれば (1) と同様にして回折実験を行う。緑藻クラミドモナスとホウレンソウの PSII について新規の結晶化条件を探索する (稼動ステージを購入して使用)。抗 D1 抗体 Fv フラグメントは、由来の異なる PSII との複合体形成能を確認した後その結晶化条件の検索を開始する。

本申請では研究支援者を 1 名雇用する予定である。この支援者は好熱性ラン藻の培養と PSII の生成、結晶化、SPring-8 における回折実験と結晶構造解析を支援する。

また大腸菌の大量培養、Fv 遺伝子のクローニングには、大阪市立大学の機器を利用する。また DNA 組み換え実験はすべて大阪市立大学の規定に従う。

PSII の結晶構造解析は最近ようやく目のみるところとなったが、初めて回折点を確認できる結晶化に成功するまでには、それ以前に 10 年にも及ぶ試行錯誤の期間があった。本研究で目標とする回折分解能の改善や、特に新規の結晶化条件を検索するには長い時間を要すると予想される。本研究では平成 17 年度以降も研究期間が終了するまで、結晶の回折分解能の改善と、その都度得られる最良の回折強度データに基づく構造解析を平

行して行う。

4. 研究成果

(1) 好熱性ラン藻の培養, PSII の精製と結晶化, 得られた結晶の後処理 (脱水), X線回折強度測定条件について最適化し, 結晶の解析分解能を, 最近, 1.9Å分解能まで改善することに成功した. 研究期間の終了した現時点でも, そのデータを用いた結晶構造解析を継続しており, 1.9Å分解能の精密化を完了させつつある. その結果を近々論文として報告する予定であり, PSIIの構造を原子分解能で決定するとして本研究の目標をはるかに上回る成果を得ることができた.

(2) PSIIの酸素発生反応に塩素イオンが不可欠であることはよく知られていたが, これまで, その結合部位や詳細な機能は明らかにされていなかった. 我々は, 塩素イオンを臭素イオンまたはヨウ素イオンで置換したPSIIの結晶構造解析を行い, Mn₄Caクラスターの両側に2つの塩素イオンの結合部位を見いだした. これらの塩素イオンはいずれもMn₄Caクラスターの構造安定化に寄与し, また酸素発生に伴って出入りする水やプロトンが通過するチャンネル構造の維持に寄与している.

(3) PSIIの全体構造は既に報告されているものの, 10種類を越える低分子量の膜貫通サブユニットの内3種類についてはその位置が同定されていなかった. Ycf12 (Psb30)を欠失させた変異体の結晶構造解析から, その位置を同定することができた. またPsbZの欠失により, PsbKとYcf12がPSIIに結合できなくなることが明らかとなり, PSIIの構造構築過程では, PsbZがPsbKとYcf12をPSIIへ誘導して結合させることが示唆された.

(4) 好熱性・好酸性紅藻 *Cyanidium caldarium* からPSIIを精製し, 結晶化と脱水処理の条件を改善することにより分解能3.5 Åの回折強度データを収集して, そのX線結晶学的解析を進めた. その結果, 結晶の空間群はラン藻のPSIIの場合と同様 $P2_12_12_1$ でありながら, その非対称単位にはPSIIのテトラマーが含まれていることが判明した.

(5) PSIIに内包されるマンガンクラスターは, 水を分解して空气中に分子状酸素を放出している. その詳細構造は世界中の光合成研究者から注目されているが, 激しいX線損傷のためにその構造は確定されていなかった. 我々はこの問題を, 長さで1mm, 厚さで0.3mmを越える大型の良質結晶を用いるX線損傷低減法を新たに開発して, X線損傷前の構造に対応する1.9Å分解能の回折強度データ測定に成功した.

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 22 件)

① Takasaka, K., Iwai, M., Umena, Y., Kawakami, K., Ikeuchi, M., Kamiya, N., Shen, J.-R., Structural and functional studies on Ycf12 (Psb30) and PsbZ deletion mutants from a thermophilic cyanobacterium, BBA, 査読有, 1797 (2010), 278-284.

② Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., Shen, J.-R., Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography, PNAS, 査読有, 106 (2009), 8567-8572.

③ Adachi, H., Umena, Y., Enami, I., Henmi, T., Kamiya, N., Shen, J.-R., Towards structural elucidation of eukaryotic photosystem II: Purification, crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of photosystem II from a red alga, BBA, 査読有, 1787 (2009), 121-128.

④ Watanabe, M., Iwai, M., Narikawa, R. and Ikeuchi, M., Is the photosystem II complex a monomer or a dimer?, Plant Cell Physiol., 査読有, 50 (2009), 1674-1680.

⑤ T. Henmi, M. Iwai, M. Ikeuchi, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, X-ray crystallographic and biochemical characterizations of a mutant Photosystem II complex from *Thermosynechococcus vulcanus* with the *psbTc* gene inactivated by an insertion mutation, J. Synchrotron Rad., 査読有, 15 (2008), 304-307.

⑥ Iwai, M., Maoka, T., Ikeuchi, M. and Takaichi, S., 2,2'-b-hydroxylase is involved in carotenogenesis of both nostoxanthin and 2'-hydroxymyxol 2'-fucoside in *Thermosynechococcus elongatus* strain BP-1., Plant Cell Physiol., 査読有, 49 (2008), 1678-1687.

⑦ A. Okumura, R. Nagao, T. Suzuki, S. Yamagoe, M. Iwai, K. Nakazato, I. Enami, Crystal structural analysis of photosystem II complex with the novel method to reduce X-ray radiation damage, BBA, 査読有, 1777 (2008), 1545-1551.

⑧ Keisuke Kawakami, Masako Iwai, Masahiko Ikeuchi, Nobuo Kamiya, Jian-Ren Shen, Location of PsbY in oxygen-evolving photosystem II revealed by mutagenesis and X-ray crystallography, FEBS Lett., 査読有, 581 (2007), 4983-4987.

- ⑨ Akinori Okumura, Masanori Sano, Takehiro Suzuki, Hiroyasu Tanaka, Ryo Nagao, Katsuyoshi Nakazato, Masako Iwai, Hideyuki Adachi, Jian-Ren Shen and Isao Enami, Aromatic structure of Tyrosine-92 in the extrinsic PsbU protein of red algal Photosystem II is important for its functioning, *FEBS Lett.*, 査読有, 581 (2007), 5255-5258.
- ⑩ Matsuoka H., Furukawa K., Kato T., Mino H., Shen J.-R., and Kawamori A., g-Anisotropy of the S₂-state manganese cluster in single crystals of cyanobacterial photosystem II studied by W-band electron paramagnetic resonance spectroscopy, *J. Phys. Chem. B.*, 査読有, 110 (2006), 13242-13247.
- ⑪ Sakurai I., Shen J.-R., Leng J., Ohashi S., Kobayashi M., and Wada H., Lipids in Oxygen-Evolving Photosystem II Complexes of Cyanobacteria and Higher Plants, *J. Biochem. (Tokyo)*, 査読有, 140 (2006), 201-209.
- ⑫ Iwai, M., Katayama, M., and Ikeuchi, M., Absence of the *psbH* gene product destabilizes Photosystem II complex: the lack of PSII-X protein in the thermophilic cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Photosynth. Res.*, 査読有, 87 (2006), 313-322.
- ⑬ Kobayashi, M., Katoh, H., and Ikeuchi, M., Mutations in a putative chloride efflux transporter gene suppress the chloride requirement of the photosystem II in *psbV*-disruptant (or cytochrome *c550* deficient mutant), *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 47 (2006), 799-804.
- ⑭ Tan C.-Y., Xu C.-H., Wong J., Shen J.-R., Sakuma S., Yamamoto Y., Lange R., Balny C., and Ruan K.-C., Pressure Equilibrium and Jump Study on Unfolding of 23kDa Protein from Spinach Photosystem II, *Biophys J.*, 査読有, 88 (2005), 1264-1275.
- ⑮ Årsköld S. P., Smith P. J., Shen J.-R., Pace R. J. and Krausz E., Key cofactors of photosystem II cores from four organisms identified by 1.7-K absorption, CD and MCD, *Photosynthesis Res.*, 査読有, 84 (2005), 309-316.
- ⑯ Enami I., Suzuki T., Tada O., Nakada Y., Nakamura K., Tohri A., Ohta H., Inoue I. and Shen J.-R., Distribution of the extrinsic proteins as a potential marker for the evolution of photosynthetic oxygen-evolving photosystem II, *FEBS Journal*, 査読有, 272 (2005), 983-990.
- ⑰ Kamata T., Hiramoto H., Morita N.,

Shen J.-R., Mann N. H. and Yamamoto Y., Quality control of photosystem II: An FtsH protease plays an essential role in the turnover of the reaction center D1 protein in *Synechocystis* PCC 6803 under heat stress as well as light stress conditions, *Photochemical & Photobiological Sciences*, 査読有, 4 (2005), 83-990.

⑱ Tomo T., Hirano E., Nagata J. & Nakazato K., Pigment exchange of Photosystem II reaction center by chlorophyll d, *Photosynthesis Research*, 査読有, 84 (2005), 77-83.

⑲ 神谷信夫, 沈建仁, 光化学系 II 複合体の構造と機能, 蛋白質核酸酵素, 査読無, 50 (2005), 1174-1179.

⑳ Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. and Ikeuchi, M., Improved genetic transformation of the thermophilic cyanobacterium, *Thermosynechococcus elongatus* BP-1, *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 45 (2004), 171-175.

㉑ Kobayashi, M., Ishizuka, T., Katayama, M., Kanehisa, M., Bhattacharyya-Pakrasi, M., Pakrasi, H.B. and Ikeuchi, M., Response to oxidative stress involves a novel peroxiredoxin gene in the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803, *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 50 (2004), 290-299.

㉒ Iwai, M., Katoh, H., Katayama, M. and Ikeuchi, M., PSII-Tc protein plays an important role in dimerization of Photosystem II., *Plant Cell Physiol.*, 査読有, 45 (2004), 1809-1816.

[学会発表] (計 22 件)

① N. Kamiya, Structure around Oxygen-Evolving Mn₄OxCa-Cluster of Photosystem II Complex from *Thermosynechococcus vulcanus*, 2010 OCU International Symposium on the Foundation of Environmental Research, 2010, 3, 8-9, Awaji, Japan.

② 川上恵典、梅名泰史、田代隆慶、神谷信夫、沈建仁, 光化学系 II 複合体結晶の分解能向上, 第 51 回日本植物生理学会年会, 平成 22 年 3 月 18-21 日, 熊本.

③ 足立秀行、梅名泰史、田代隆慶、榎並勲、神谷信夫、沈建仁, 紅藻由来光化学系 II 複合体の精製と結晶の分解能の改善, 第 51 回日本植物生理学会年会, 平成 22 年 3 月 18-21 日, 熊本.

④ 梅名泰史, 川上恵典, 大熊章郎, 西条慎也, 内藤久志, 沈建仁, 神谷信夫, 光化学系 II 膜蛋白質複合体の酸素発生中心の構造研

究, 日本結晶学会, 平成 21 年 1 2 月 5-6 日, 大坂.

⑤ Y. Umena, K. Kawakami, A. Ohkuma, S. Saijyou, H. Naitow, J.-R. Shen, N. Kamiya, Crystal structural analysis of photosystem II complex with the novel method to reduce X-ray radiation damage, XXI Congress of the International Union of Crystallography, 2008, 8, 23-31, Osaka, Japan.

⑥ K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya, J.-R. Shen, Coordination structure and functional implications of two Cl⁻-binding sites in oxygen-evolving photosystem II, XXI Congress of the International Union of Crystallography, 2008, 8, 23-31, Osaka, Japan.

⑦ H. Adachi, Y. Umena, I. Enami, N. Kamiya, J.-R. Shen, Purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of photosystem II dimer from a red alga *Cyanidium caldarium*, XXI Congress of the International Union of Crystallography, 2008, 8, 23-31, Osaka, Japan.

⑧ 梅名泰史・川上恵典・大熊章郎・西条慎也・内藤久志・沈建仁・神谷信夫, X線損傷低減データに基づく光化学系 II 複合体の酸素発生中心の構造研究, 第 9 回日本蛋白質科学会年会, 平成 21 年 5 月 20-22 日, 熊本.

⑨ 川上恵典, 岩井雅子, 川端洋輔, 逸見隆博, 池内昌彦, 神谷信夫, 沈建仁, 光化学系 II 二量体の形成・安定化における PsbM, PsbI サブユニットの役割, 第 50 回日本植物生理学会年会, 平成 21 年 3 月 21-24 日.

⑩ 足立秀行・梅名泰史・榎並勲・神谷信夫・沈建仁, 紅藻 *Cyanidium caldarium* 光化学系 II 結晶分解能の改善と X 線による分析, 第 50 回日本植物生理学会年会, 3 月 21-24 日.

⑪ 高坂賢之・岩井雅子・梅名泰史・神谷信夫・川上恵典・沈建仁, Ycf12、PsbZ 欠失変異体由来光化学系 II の X 線結晶構造解析, 第 50 回日本植物生理学会年会, 平成 21 年 3 月 21-24 日.

⑫ 梅名泰史, 川上恵典, 大熊章郎, 西条慎也, 内藤久志, 沈建仁, 神谷信夫, X 線損傷低減データに基づく酸素発生光化学系 II 粒子の構造精密化. 日本結晶学会 2007 年度年会, 平成 20 年 1 2 月 1-2 日.

⑬ T. Henmi, M. Iwai, M. Ikeuchi, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, Crystal Structure Analysis of a Mutant Photosystem II Complex from *Thermosynechococcus vulcanus* with the *psbTc* Gene Inactivated by an Insertion Mutation, The second International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, 2007, 9, 10-13,

Tokyo, Japan.

⑭ K. Kawakami, Y. Kawabata, T. Henmi, M. Iwai, M. Ikeuchi, N. Kamiya, and J.-R. Shen, Structural analysis of mutant Photosystem II complexes from *Thermosynechococcus vulcanus*, The second International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, 2007, 9, 10-13, Tokyo, Japan.

⑮ H. Adachi, I. Enami, T. Henmi, N. Kamiya, J.-R. Shen, Purification and crystallization of photosystem II complex from a red alga *Cyanidium caldarium*, The second International Symposium on Diffraction Structural Biology 2007, 2007, 9, 10-13, Tokyo, Japan.

⑯ 逸見隆博・岩井雅子・池内昌彦・沈建仁・神谷信夫, *psbTc* 遺伝子を破壊した好熱性ラン藻変異株光化学系 II 複合体の結晶構造解析, 植物生理学会年会, 平成 20 年 3 月 28-30 日, 札幌.

⑰ 足立秀行・榎並勲・逸見隆博・神谷信夫・沈建仁, 紅藻 *Cyanidium caldarium* 由来光化学系 II 複合体の精製・結晶化, 植物生理学会年会, 平成 20 年 3 月 28-30 日, 札幌.

⑱ 川端洋輔・逸見隆博・岩井雅子・末益卓・川上恵典・青山智佳・池内昌彦・神谷信夫・沈建仁, PsbM サブユニットを欠失した光化学系 II 複合体の結晶構造解析, 植物生理学会年会, 平成 20 年 3 月 28-30 日, 札幌.

〔図書〕(計 2 件)

① Shen J.-R., Henmi T. and Kamiya N., WILEY-VCH, Photosynthetic Protein Complexes, A Structural Approach, 2008, 24.

② Shen J.-R. and Kamiya N., Springer, Photosystem II: The Light-Driven Water:Plastoquinone Oxidoreductase, 2005, 29.

〔産業財産権〕

○取得状況 (計 2 件)

①名称: タンパク質溶解度測定方法、結晶製造方法、及びそのための装置

発明者: 中里勝芳

権利者: 中里勝芳

種類: 特許

番号: 第 4 1 1 0 2 2 4 号

取得年月日: 2008 年 4 月 18 日

国内外の別: 国内

②名称: 非イオン性界面活性剤自動除去装置

発明者: 中里勝芳

権利者: 中里勝芳

種類：特許
番号：第3565683号
取得年月日：平成16年6月18日
国内外の別：国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神谷 信夫 (KAMIYA NOBUO)
大阪市立大学・大学院理学研究科・教授
研究者番号：60152865

(2) 研究分担者

沈 建仁 (SHIN KENJIN)
岡山大学・理学部・教授
研究者番号：60261161

池内 昌彦 (IKEUCHI AKIHIKO)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：20159601

中里 勝芳 (NAKAZATO KATSUYOSHI)
日本大学・文理学部・准教授
研究者番号：50172292

(3) 連携研究者

梅名 泰史 (UMENA YASUFUMI)
大阪市立大学・大学院理学研究科・博士研
究員
研究者番号：10468267