

平成23年5月12日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20570038

研究課題名 (和文) 変異体構造解析による光化学系 II 複合体の構造制御機構の解明

研究課題名 (英文) Elucidation of the mechanism controlling the formation of photosystem II complex by means of structural analysis of various mutants

研究代表者

沈 建仁 (SHIN KENJIN)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号：60261161

研究成果の概要 (和文)：光化学系 II 複合体(PSII)の構造制御機構を解明するため、各種低分子量サブユニット欠損株由来 PSII の構造・機能解析を行った。Ycf12(Psb30)欠損株由来 PSII の結晶構造解析によりその存在位置を確認し、PsbZ 欠損株を用いた研究では、PsbZ が PsbK と Ycf12 の PSII への結合に必要であることを示した。また、PsbM は PSII 二量体の安定性を維持するのに必要であるが、PsbI は二量体の形成に必要であることを示した。

研究成果の概要 (英文)： In order to elucidate the mechanism controlling the formation of the photosystem II complex, studies on the structures and functions of various low molecular weight subunit-deletion mutants of PSII were carried out. The crystal structure of Ycf12 (Psb30)-deletion mutant confirmed the location of Ycf12, and PSII isolated from a PsbZ-deletion mutant lacked both Ycf12 and PsbK, suggesting the requirement of PsbZ for the stable binding of these two subunits to PSII. In addition, PsbM was shown to be required for maintaining the stability of PSII dimer, while PsbI was required for the formation of PSII dimer but not required for the stability of the dimer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,800,000	1,140,000	4,940,000

研究分野：植物生理学、光生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物分子生物・生理学

キーワード：光合成、光化学系 II、酸素発生、電子伝達、膜タンパク質、結晶化、構造解析、変異体

1. 研究開始当初の背景

光化学系 II(以下 PSII とする)は 16-17 種の膜タンパク質と 3 種の膜表在性 (親水性) タンパク質を含む分子量 350 kDa の超分子複合体であり、光エネルギーを吸収し一連の電子伝達反応を通して生物利用可能な化学エネルギーに変換すると同時に、水分子を分解し酸素を放出する反応を触媒している。ラン藻由来の PSII については、これまで申請者らのグループを含め 3.0-3.8 Å 分解能の結晶構造が報告され、PSII の主要なサブユニットの配置・構造、及びクロロフィルやカロテノイド、Mn クラスター、ヘム鉄、非ヘム鉄など多くの補欠因子の配置・構造が明らかにされた。さらに結晶の分解能を向上させ、より高分解能で PSII の構造を解明するため、世界で激しい競争が繰り広げられていた。

PSII には多くの低分子量サブユニットが存在し、それらの機能はほとんど分かっておらず、また、そのうちの 2 個、Ycf12 と PsbX は当時の結晶構造において同定されていなかった。申請者らはそれまで、PsbY 遺伝子を欠失させた変異株から PSII を精製・結晶化し、結晶構造解析を行なった結果、PsbY の存在位置を同定したと同時に、変異体 PSII は結晶化可能であり、その構造解析から、構造未知のサブユニットを同定することが可能であり、さらに変異体の構造変化から PSII 複合体の構造形成に果たす欠失サブユニットの役割を明らかにすることが可能であることを示した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus vulcanus* 及び *T. elongatus* を用いて、PSII の各種低分子量サブユニットを欠失させた変異株から PSII を精製・結晶化し、結晶構造解析を行い、それぞれのサブユニットの存在位置を確認するとともに、機能解析を行い、PSII 複合体の構造形成、機能制御におけるそれぞれのサブ

ユニットの役割を明らかにすることである。当初対象を予定していたサブユニット欠失変異株は PsbI, PsbK, PsbM, PsbX, PsbZ の各変異株であったが、Ycf12 (Psb30) の存在位置が未定であったため、PsbK, PsbX の欠失変異株の代わりに Ycf12 欠失変異株を用いることにした。

3. 研究の方法

本研究で用いる各種変異株は、研究協力者である東京理科大学の岩井雅子博士及び東京大学の池内昌彦教授が好熱性ラン藻 *T. vulcanus* 及び *T. elongatus* を用いて作成し、供給する。本研究では、各種低分子量サブユニットの変異株を大量培養し、得られた細胞を破碎し、チラコイド膜を調製する。得られたチラコイド膜について、界面活性剤である Lauryl demethyl amineoxide で可溶化し、遠心分画により粗 PSII 粒子を調製した後、さらに Dodecyl maltoside で可溶化し、イオン交換カラムで PSII 二量体を精製する。得られた PSII 二量体について、野生株由来 PSII で用いられている結晶化条件を参考に、結晶化条件のスクリーニングを行い、良質な結晶を析出させる。得られた結晶は SPring-8 の放射光を利用して構造解析する。同時に、変異株の酸素発生活性、PSII 二量体/単量体の量比、二量体の安定性などについて、各種生化学、生物物理学的手法を用いて測定し、当該サブユニットの欠失による PSII 機能への影響を調べる。

4. 研究成果

(1) Ycf12 (Psb30) 欠損変異株 : Ycf12 は PSII の低分子量サブユニットの一つであるが、本研究が開始した時点では PSII における Ycf12 の存在位置が明らかになっていなかった。本研究では、Ycf12 欠損変異株から PSII を精製、結晶化し、X線による構造解析を行い、PSII における Ycf12 の存在位置を特定した。この位置は、ほぼ同時期に報告された 2.9 Å 分解能、

さらにその後の1.9 Å分解能のPSII構造において特定された位置と一致していた。

(2) PsbZ欠損変異株：PsbZは2回膜貫通ヘリックスを持つ低分子量サブユニットであり、その欠損変異株からPSIIを精製・結晶化した。得られた結晶は野生株PSIIと異なった格子定数を示し、PsbZが結晶中のPSII二量体同士の相互作用にかかわっていることを示した。さらにPsbZ欠損株より精製したPSIIには、PsbKとYcf12が脱落し、これら2つのサブユニットのPSIIへの結合にPsbZが必要であることを示した。

(3) PsbMとPsbI欠損変異株：PsbMはPSII二量体の中心に位置し、2つのPSII単量体を結び付けるのに必要であることが示唆されていたが、PsbIはPSII二量体の外縁部に存在し、二量体の形成に必要ないことが予想された。

PsbM欠損株から精製されたPSIIは、単量体の量が増加し、二量体が不安定になっていたことが示された。さらにPsbI欠損株においても二量体の量が減少していた。そこで両変異株からのPSII二量体の安定性を調べるため、精製した二量体を高温(40°C)で界面活性剤処理し、単量体への分解の有無を調べた。その結果、PsbM欠損株から精製した二量体は単量体へ分解し、不安定であることが示されたが、PsbI欠損株から精製したPSII二量体は単量体への分解は見られなかった。これらの結果は、PsbMはPSII二量体の安定的な構造を維持するのに必要であるが、PsbIを欠いても一旦形成されたPSII二量体は安定であり、従ってPsbIは*in vivo*でPSII二量体が形成されるのに必要であることが示唆された。

以上の結果は、PSII複合体中の各サブユニットの機能を解明するための重要な一歩で、本研究グループが独自に取得したものであり、世界の他のグループの追隨を許していない。

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16件)

(1) Kawakami K., Umena Y., Kamiya N., Shen J.-R. (2011) Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution. *J. Photochem. Photobiol. B*, 104, 9-18.

(2) Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution. *Nature*, 473, 55-60.

(3) Kanda K., Yamanaka S., Saito T., Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N., Okumura M., Nakamura H., Yamaguchi K. (2011) Labile electronic and spin states of the CaMn₄O₅ cluster in the PSII system refined to the 1.9 Å X-ray resolution. UB3LYP computational results. *Chem. Phys. Lett.* 506, 98-103.

(4) Kawakami K., Umena Y., Iwai M., Kawabata Y., Ikeuchi M., Kamiya N., Shen J.-R. (2011) Roles of PsbI and PsbM in photosystem II dimer formation and stability studied by deletion mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 319-325.

(5) Matsuoka H., Shen J.-R., Kawamori A., Nishiyama K., Ohba Y., Yamauchi S. (2011) Proton-Coupled Electron-Transfer Processes in Photosystem II Probed by Highly Resolved g-Anisotropy of Redox-Active Tyrosine Y(Z). *J. Am. Chem. Soc.* 133, 4655-4660.

(6) Noji T., Kamidaki C., Kawakami K., Shen J.-R., Kajino T., Fukushima Y., Sekitoh T., Itoh S. (2011) Photosynthetic oxygen evolution in mesoporous silica material: Adsorption of photosystem II reaction center complex into 23-nm nanopores in SBA. *Langmuir*, 27, 705-713.

(7) Takasaka K., Iwai M., Umena Y., Kawakami K., Ohmori Y., Ikeuchi M., Takahashi Y., Kamiya N., Shen J.-R. (2010) Structural and functional studies on Ycf12 (Psb30) and PsbZ deletion

mutants from a thermophilic cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta*, 1797, 278-284.

(8) Nagao R., Moriguchi A., Tomo T., Niikura A., Nakajima S., Suzuki T., Okumura A., Iwai M., Shen J.-R., Ikeuchi M., Enami I. (2010) Binding and functional properties of five extrinsic proteins in oxygen-evolving Photosystem II from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *J. Biol. Chem.* 285, 29191-29199.

(9) Nagao R., Suzuki T., Okumura A., Niikura A., Iwai M., Dohmae N., Tomo T., Shen J.-R., Ikeuchi M., Enami I. (2010) Topological analysis of the extrinsic PsbO, PsbP and PsbQ proteins in a green algal PSII complex by cross-linking with a water-soluble carbodiimide. *Plant Cell Physiol.* 51, 718- 727.

(10) Kawakami K., Umena Y., Kamiya N., Shen J.-R. (2009) Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-ray crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 8567-8572.

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

(12) Ren Y., Zhang C., Bao H., Shen J.-R., Zhao J. (2009) Probing tyrosine Z oxidation in photosystem II core complex isolated from spinach by EPR at liquid helium temperatures. *Photosynthesis Research*, 99, 127-138.

(13) Leng J., Sakurai I., Wada H., Shen J.-R. (2008) Effects of phospholipase and lipase treatments on photosystem II core dimer from a thermophilic cyanobacterium. *Photosynthesis Research*, 98, 469-478.

(14) Henmi T., Iwai M., Ikeuchi M., Kawakami K., Shen J.-R., Kamiya N. (2008) 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.* 15, 304-307.

(15) Bao H., Zhang C., Kawakami K., Ren Y., Shen J.-R., Zhao J. (2008) Acceptor side effects on the electron transfer at cryogenic temperatures in intact photosystem II. *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 1109-1115.

(16) Enami I., Okumura A., Nagao R., Iwai I., Suzuki T., Shen J.-R. (2008) Structures and functions of the extrinsic proteins of photosystem II from different species. *Photosynthesis Research*, 98, 349-363.

[学会発表] (計40件)

(1) 沈 建仁: 光合成酸素発生を可能にする Mn クラスターの原子構造、理研シンポジウム「生物を律する揺らぎのメカニズムを追い求めてー光合成と生体信号ー」、2011年4月19-20日、埼玉。

(2) Shen J.-R.: Atomic structure of photosystem II that enables photosynthetic water-splitting, The Annual Review Conference of the Global COE program of University of Hyogo, "Picobiology: Life Science at the Atomic Level" for the fiscal year of 2010, March 28-30, 2011, Hyogo.

(3) 沈 建仁・梅名泰史・川上恵典・神谷信夫 1.9 Å 分解能の光化学系 II 構造から見た光合成酸素発生の分子基盤、第52回日本植物生理学会年会、2011年3月20日-22日、仙台。

(4) Shen J.-R.: Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution, Umeå Renewable Energy Meeting 2011, March 17-18, 2011, Umeå, Sweden.

(5) Shen J.-R., Umena Y., Kawakami K., Kamiya N.: Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at an atomic resolution, JAPANESE-FINNISH Information-exchange Seminar 2011 "Future prospects of

photosynthetic organisms: from genomes to environment", March 1-5, 2011, Okayama.

(6) Shen J.-R., Umena Y., Kawakami K., Kamiya N.: Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at an atomic resolution, The 70th Okazaki International Conference on Molecular mechanism of photosynthetic energy conversion: the present research and future prospects, December 4-6, 2010, Okazaki, Japan.

(7) Shen J.-R.: Mechanism of photosynthetic solar energy-conversion and water-splitting in biological systems, 4th International Symposium on Commemoration of Exchange Agreement between National Taiwan University and Okayama University, September 9, 2010, Okayama.

(8) Shen J.-R., Umena Y., Kawakami K., Kamiya N.: Crystal structure of oxygen evolving Photosystem II at an atomic resolution, 15th International Congress Of Photosynthesis (PS2010), August 22-28, 2010, Beijing, China.

(9) Ohmori Y., Iwai M., Ikeuchi M., Shen J.-R.: Characterization of photosystem II from extrinsic protein-deleted mutants of a thermophilic cyanobacterium, 15th International Congress Of Photosynthesis (PS2010), August 22-28, 2010, Beijing, China

(10) Shen J.-R.: Mechanism of photosynthetic water-splitting based on the structural analysis of photosystem II, Inaugural Conference on Molecular & Functional Catalysis (ICMFC-1), July 11-15, 2010, Singapore.

(11) Shen J.-R.: Structural and functional studies on native and various mutant photosystem II complexes, GCOE Program: Picobiology: Life Sciences at the Atomic Level; Annual Review Conference for the Fiscal Year of 2009, March 28-30, 2010, Harima.

(12) 川上恵典、梅名康文、神谷信夫、沈建仁: 光化学系 II 複合体の酸素発生反応に関する Cl の結合部位の同定、第 15 回日本光

生物学協会年会、2009 年 8 月 19-20 日、岡崎。

(13) Shen J.-R.: Structure and function of oxygen-evolving photosystem II, Pre-RCE Workshop on Catalysis for Efficient and Sustainable Energy, May 28, 2009, Singapore.

(14) 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、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋。

(15) 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、2009 年 3 月 21-24 日、名古屋。

(16) 川上恵典、川端洋輔、逸見隆博、岩井雅子、池内昌彦、神谷信夫、沈建仁: PsbM, PsbI 欠失変異株における光化学系 II 複合体の構造・機能解析、特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回公開シンポジウム、2008 年 12 月 18-19 日、つくば。

(17) 高坂賢之、岩井雅子、川上恵典、沈建仁、梅名泰史、神谷信夫: 変異株を用いた光化学系 II 低分子量サブユニット Ycf12 の位置決定、特定領域研究「生体超分子の構造形成と機能制御の原子機構」第 5 回公開シンポジウム、2008 年 12 月 18-19 日、つくば。

(18) 沈建仁: 立体構造から探る光化学系 II 酸素発生反応の機構、日本生物物理学会 2008 年度年会、2008 年 12 月 3-5 日、博多。

(19) Shen J.-R.: Roles of chloride and small subunits in PSII function and assembly studied by X-ray crystal structural analysis, Japan-Finland Seminar: Genomics and Molecular Mechanisms of Regulation in Photosynthetic Organisms, Oct. 28, 2008-Nov. 1, 2008, Helsinki.

(20) 沈建仁: 膜タンパク質を見る、日本

植物学会第72回大会、2008年9月24日—27日、高知。

〔図書〕(計8件)

- (1) Shen J.-R., Kawakami K., Koike H. (2010) Purification and crystallization of oxygen-evolving photosystem II core complex from thermophilic cyanobacteria. In *Methods in Molecular Biology: Photosynthesis Protocols*, Edited by R. Carpentier, Springer NewYork Dordrecht Heidelberg London, pp. 41-51.
- (2) Yamamoto Y., Leng J. and Shen J.-R. (2010) Isolation of photosystem II-enriched membranes and the oxygen-evolving complex (OEC) subunit proteins from higher plants. In R. Carpentier (ed.) *Methods in Molecular Biology: Photosynthesis Protocols*, Humana Press, Springer NewYork Dordrecht Heidelberg London, pp. 1-10.
- (3) Shen J.-R. (2010) Location and function of chloride ions in oxygen-evolving photosystem II revealed by X-Ray crystallography, *Spring-8 Research Frontiers* 2009, 22-23.
- (4) Enami I., Adachi H. and Shen J.-R. (2010) Mechanisms of acido-tolerance and characteristics of photosynthesis in an acido- and thermophilic aed alga, *Cyanidium caldarium*. In *Red Algae in The Genomics Age*, Edited by J. Seckbach and D. J. Chapman, pp. 373-389, Springer, Dordrecht.
- (5) 沈建仁、川上恵典 (2009) 「光化学系IIの例から見る膜タンパク質複合体の結晶化と構造解析」*光合成研究*, 19(1), 19-25.
- (6) 沈建仁・榎並 勲 (2009) 「系II複合体の精製法」*低温科学*, 67, 275-283.
- (7) 沈建仁 (2009) 「電子伝達活性」*低温科学*, 67, 551-560.
- (8) Shen J.-R., Henmi T., Kamiya N. (2008) Structure and Function of Photosystem II. In *Photosynthetic Protein Complexes, A Structural*

Approach, Edited by F. Fromme, pp. 83-106, WILEY-VCH, Germany.

〔その他〕

2011年4月18日日本経済新聞朝刊、産経新聞朝刊、日刊工業新聞、山陽新聞朝刊、中国新聞、朝日新聞夕刊等各紙や時事通信、共同通信がPSIIの原子レベルの構造解明という研究成果について報道した。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

沈 建仁 (SIN KENJIN)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授
研究者番号：60261161

(2) 研究協力者

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

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

川上 恵典 (KAWAKAMI KEISUKE)

岡山大学・大学院自然科学研究科・大学院生

高坂 賢之 (TAKASAKA KENJI)

岡山大学・大学院自然科学研究科・大学院生

岩井(小黒) 雅子 (IWAI(OGURO) MASAKO)

東京理科大学・理工学部・助教

研究者番号：90385526

池内 昌彦 (IKEUCHI MASAHIKO)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号：20159601