

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03226

研究課題名(和文) ゆがんだイス型の触媒の立体構造が紐解く光化学系IIの水分解反応

研究課題名(英文) Structural analysis of the oxygen evolving center of photosystem II to gain insights into the water splitting reaction

研究代表者

菅 倫寛 (Suga, Michihiro)

岡山大学・異分野基礎科学研究所・教授

研究者番号：60634920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,870,000円

研究成果の概要(和文)：psbA遺伝子から発現するD1タンパク質の機能的な違いを明らかにするため、それぞれ1つのpsbA遺伝子(psbA2またはpsbA3)のみを発現する2株のPSII二量体を結晶化し、これまで研究されてきたPsbA1-PSIIと同等の分解能で構造解析した。その結果、PsbA2-およびPsbA3-PSIIでは、GlnからGluへの変化により、pheophytin/D1(PheoD1)とD1-130間の水素結合が強くなり、PsbA3で観測されたPheoD1の酸化還元電位の上昇を一部説明できることがわかった。この成果はJBC誌に論文発表した。また、高スピン状態のS2状態のデータは現在解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光化学系IIはタンパク質複合体であり、触媒部分のMn4CaO5のクラスター(酸素発生中心)はD1タンパク質に保持されている。D1タンパク質はpsbA遺伝子によってコードされているが、通常の条件ではPsbA1遺伝子が発現する。一方、乾燥条件などの特殊な条件ではPsbA2遺伝子またはPsbA3遺伝子が発現する。PsbA2およびPsbA3を発現した光化学系IIを結晶構造解析することで、これらPsbAタンパク質の役割を明らかにすることを目指したものである。本研究で得られた立体構造は、3つのPsbAバリエーションの機能的な検証のための構造的な基礎を提供するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：To determine the functional differences in D1 proteins expressed from psbA genes, PSII dimers from two strains expressing only one psbA gene (psbA2 or psbA3, respectively) were crystallized and structurally analyzed at a resolution comparable to that of PsbA1-PSII, which has been studied previously. We found that in PsbA2- and PsbA3-PSII, the change from Gln to Glu strengthens the hydrogen bond between pheophytin/D1 (PheoD1) and D1-130, partially explaining the increased redox potential of PheoD1 observed in PsbA3. These results were published in JBC.

Data for the high-spin S2 state are also currently being analyzed.

研究分野：構造生命科学

キーワード：光合成 膜タンパク質 光化学系II 水分解反応

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

光合成は植物や藻類が太陽の光エネルギーを利用して水と大気中の二酸化炭素から糖を合成して酸素分子を放出する反応であり、ほぼ全ての生物の生存を支えている。光化学系 II は約 20 個のタンパク質とクロロフィル、カロテノイドなどの集光色素からなる膜タンパク質複合体であり、光エネルギーを効率よく利用して、水分子から電子と水素イオンを取り出して酸素分子を形成する反応を触媒する。光化学系 II が触媒する水を分解する反応の仕組みを解明し、人工的に利用することができれば、光エネルギーを利用して、水から電子と水素イオンを取り出して有用な化学物質を作り出す「人工光合成」の技術開発にもつながると期待されている。

光合成の水分解反応は光化学系 II の膜表面の近くに位置する“ゆがんだイス”の形をした  $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$  のクラスター (酸素発生中心) によって触媒される。この触媒は反応中心クロロフィルの光励起によって酸化され、 $\text{S}_i$ -状態 ( $i=0\sim 4$ ) と呼ばれる周期的な 5 つの状態を遷移して水素イオンの放出や基質となる水分子の取り込みを行う。そして、最も酸化力の蓄積された  $\text{S}_4$  状態に達すると酸素分子が形成され、 $\text{S}_0$  に戻る。研究代表者らはこれまでに  $\text{S}_1$  状態、 $\text{S}_2$  状態、 $\text{S}_3$  状態の光化学系 II の立体構造を X 線自由電子レーザー (X-ray electron laser, XFEL) を用いて解析してきた。

研究代表者のこれまでの研究、国内海外の研究グループによる理論計算や分光学の研究などによって  $\text{S}_3$  状態の詳細な立体構造について明らかになっている。しかし  $\text{S}_2$  状態から  $\text{S}_3$  状態へと遷移する経路について不明な点が残されている。 $\text{S}_2$  状態では EPR 法で区別される  $g=2, S=1/2$  と  $g=5.1, S=5/2$  の 2 つのスピンの状態があることが知られているが、理論計算によってこれらの 2 つはそれぞれがオープンキュバン構造とクローズキュバン構造であり、平衡状態にあると提案されている。EPR 法により、この 2 つのスピンの状態は  $\text{S}_2$  状態から  $\text{S}_3$  状態に遷移する経路として使われるという提案がなされた (Chrysina, *PNAS*, 2019) が、そのようなクローズキュバン構造が存在するか不明である。もし存在していたとして「どうして直接オープンキュバンに  $\text{O}_6$  が挿入されずにわざわざクローズキュバンを経由する必要があるのか」という疑問に答えるには高分解能の立体構造を解析する必要がある。

### 2. 研究の目的

光合成水分解反応の  $\text{S}_2$  状態の結晶構造解析はすべてが低スピン状態のものである。 $\text{S}_2$  状態の高スピン状態の触媒部分の立体構造は不明である。本研究では研究代表者らが *Science* 誌に発表した固定ターゲットによる無損傷結晶構造の解析技術により、光化学系 II の  $\text{S}_2$  状態オープンキュバンおよびクローズキュバン構造 ( $S=5/2, S=1/2$  に相当する構造) を解析して、クローズキュバンが本当に存在するかを検証することを目指した。得られた構造を  $\text{S}_1$  および  $\text{S}_3$  状態の構造と比較することにより、水分解反応の経路を明らかにする。また構造に基づき量子化学的計算を行い、オープンキュバンとクローズキュバンの両方の構造が反応機構において必要な理由を検証することを計画した。

### 3. 研究の方法

本研究に用いる好熱性シアノバクテリア由来の光化学系 II は室温で光照射すると  $g=2, S=1/2$  の  $\text{S}_2$  状態しか得られないことが知られている。そこで、以下に述べるような工夫をして、水分解反応の至適条件から外れた条件で解析することによりオープンキュバンの構造 ( $S=5/2$  に相当する構造) を得ることを目指した。

最近の研究により、pH の高い溶液条件では  $g=5.1, S=5/2$  の  $\text{S}_2$  状態が多く存在すると報告されている (Boussac, *BBA*, 2018)。そこで光化学系 II の結晶を pH の高い溶液を浸したのちに固定ターゲット法によって結晶を固定し、励起光の照射により中間体状態を調製した後に冷却窒素により凍結した。反応中間体は液体窒素温度下であれば安定なので凍結試料に XFEL を照射して無損傷結晶構造解析を行った。室温にて実施されるシリアルフェムト結晶構造解析と比べて固定ターゲット法の技術は実験に必要な試料を 1/10 に軽減できることがわかっている。また回折写真のバックグラウンド軽減により分解能の改善が期待された。

実験では、大きさが一辺 100 - 200  $\mu\text{m}$  程度の結晶を多数収容した結晶ホルダーへと閃光を照射することにより反応中間体に遷移させた PSII 結晶を 100 K の窒素気流下でクライオトラップして試料を準備した。100 K の窒素気流下で結晶ホルダーから 50  $\mu\text{m}$  間隔で XFEL パルスを一回照射し回折像を記録した。固定ターゲット用回折計に検出器として Rayonix 社の MX300-HS を組み合わせ 10 Hz でイメージの読み出しを行なった。また結晶交換ロボット SPACE、自動センタリングプログラムと連動する自動測定システムによりクライオルーブ型の結晶ホルダー 16 個を一組とする連続自動測定を行なった。測定時の X 線エネルギーは 10 keV にした。

約 600 個の結晶ホルダーから総計 1,000,000 枚程度のイメージを記録した。これらのイメージの内、結晶に X 線が照射され回折像が記録されたものうち、結晶格子の指数が付いたイメージ枚数は、それぞれの条件でおおよそ 62,000 枚~116,000 枚であり、合計 5 データセットについて、 $\text{CC}1/2$  が 0.5 を下回らない分解能が 2.41 から 2.56  $\text{\AA}$  となる回折データを収集できた。解析に用いるプログラムを変えたところ、分解能が 2.2  $\text{\AA}$  程度まで改善され、期待した通りに  $\text{S}_1$  か

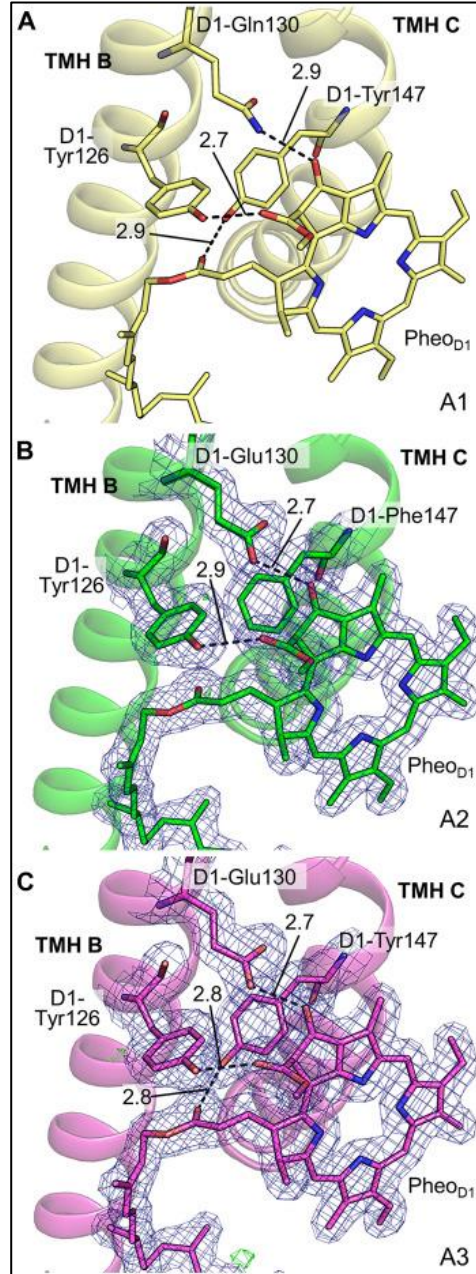
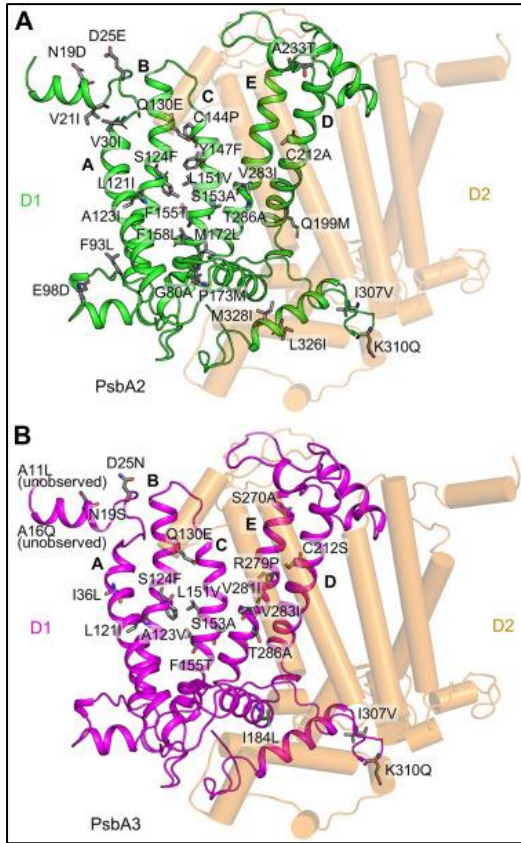
ら  $S_2$  への変化のシグナルが確認できた。現在は高酸化状態の  $S$  状態の解析を進めているが、複数の状態が混在した状態を解析するため当初の予定よりも時間がかかっている。

なお、実験当初には pH の変化によって結晶の回折分解能が低下することが懸念されたので、マンガンクラスターの Ca 原子を Sr 原子で置換した Sr 置換型の光化学系 II のサンプルを調製して固定ターゲット法による構造解析を実施することを進めていた。しかし、高 pH 条件で結晶を安定に保つことのできる溶液条件を見出したので Sr 置換型の光化学系 II は実験に用いなかった。

また、光化学系 II はタンパク質複合体であり、触媒部分の  $Mn_4CaO_5$  のクラスター（酸素発生中心）は D1 タンパク質に保持されている。D1 タンパク質は PsbA 遺伝子によってコードされているが、通常条件では PsbA1 遺伝子が発現する。一方、乾燥条件などの特殊な条件では PsbA2 遺伝子または PsbA3 遺伝子が発現する。PsbA2 および PsbA3 を発現した光化学系 II を結晶構造解析することで、これら PsbA タンパク質の役割を明らかにすることを目指した。

#### 4. 研究成果

psbA 遺伝子から発現する D1 タンパク質の機能的な違いを明らかにするため、それぞれ 1 つの psbA 遺伝子 (psbA2 または psbA3) のみを発現する 2 株の PSII 二量体を結晶化し、これまで研究されてきた PsbA1-PSII と同等の分解能で構造解析した(左図)。その結果、PsbA2-および PsbA3-PSII では、Gln から Glu への変化により、pheophytin/D1 (PheoD1) と D1-130 間の水素結合が強くなり、PsbA3 で観測された PheoD1 の酸化還元電位の上昇を一部説明できることがわかった(右図)。PsbA2 では、D1-Y147F の変化により PheoD1 の水素結合が 1 つ失われ、PsbA2 における PheoD1 の安定性が低下したことを説明することができた。PsbA2-PSII では、D1-P173M の変化により Cl-1 チャネルの水分子が 2 つ失われ、チャネルが狭くなっていた。PsbA3-PSII では、PsbA1 および PsbA2 の D1-Ser270 が D1-Ala270 に変化したことにより、QB 付近のスルホキノボシル-ジアシルグリセロール分子との間の水素結合が消失していることがわかった。この結果、PsbA3-PSII では、結合した QB と遊離のプラストキノンの交換が容易になり、QB 交換効率が高いため、酸素発生が促進されると考えられた。これらの結果は、3 つの PsbA バリエントの機能的な検証のための構造的な基礎を提供するものと考えられる。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakajima Yoshiki, Ugai-Amo Natsumi, Tone Naoki, Nakagawa Akiko, Iwai Masako, Ikeuchi Masahiko, Sugiura Miwa, Suga Michihiro, Shen Jian-Ren	4. 巻 298
2. 論文標題 Crystal structures of photosystem II from a cyanobacterium expressing psbA in comparison to psbA reveal differences in the D1 subunit	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102668 ~ 102668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Nakajima Yoshiki, Ugai-Amo Natsumi, Tone Naoki, Nakagawa Akiko, Iwai Masako, Ikeuchi Masahiko, Sugiura Miwa, Suga Michihiro, Shen Jian-Ren	4. 巻 298
2. 論文標題 Crystal structures of photosystem II from a cyanobacterium expressing psbA2 in comparison to psbA3 reveal differences in the D1 subunit	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 102668 ~ 102668
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2022.102668	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yamaguchi Kizashi, Shoji Mitsuo, Isobe Hiroshi, Kawakami Takashi, Miyagawa Koichi, Suga Michihiro, Akita Fusamichi, Shen Jian-Ren	4. 巻 471
2. 論文標題 Geometric, electronic and spin structures of the CaMn4O5 catalyst for water oxidation in oxygen-evolving photosystem II. Interplay between experiments and theoretical computations	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Coordination Chemistry Reviews	6. 最初と最後の頁 214742 ~ 214742
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ccr.2022.214742	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Li Hongjie, Nakajima Yoshiki, Nomura Takashi, Iwata So, Shen Jian-Ren, Suga Michihiro et al.	4. 巻 8
2. 論文標題 Capturing structural changes of the S <sub>1</sub> to S <sub>2</sub> transition of photosystem II using time-resolved serial femtosecond crystallography	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 IUCrJ	6. 最初と最後の頁 431 ~ 443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1107/S2052252521002177	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 M Suga
2. 発表標題 Structural dynamics and substrate binding to the oxygen-evolving complex studied by time-resolved X-ray crystallography of PSII
3. 学会等名 10th Asian Biological Inorganic Chemistry Conference (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅 倫寛, 中島芳樹, リホンジェ, 沈 建仁
2. 発表標題 X線自由電子レーザーを用いた解析における光化学系IIの基質水分子の取り込みと水分子の酸化に関する構造的知見
3. 学会等名 第60回 生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 菅 倫寛
2. 発表標題 Studies on the molecular mechanism for water oxidation in photosystem II
3. 学会等名 The 22nd annual meeting of the photobiology association of Japan (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M Suga
2. 発表標題 Time-resolved structural studies on photosystem II provide insights into the mechanism of water oxidation and substrate delivery
3. 学会等名 Satellite Meeting to 18th international congress on photosynthesis research 2022: Mechanism of water oxidation (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 M Suga
2. 発表標題 X-ray free electron lasers reveal the molecular mechanism for water oxidation in photosystem II.
3. 学会等名 International congress on photosynthesis research 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Nakajima Y., Ugai-Amo N., Tone N., Nakagawa A., Iwai M., Sugiura M., Ikeuchi M., Suga M. and Shen J. -R.
2. 発表標題 Crystal structure analyses of photosystem II isolated from Thermosynechococcus elongatus mutants expressing only psbA2 or psbA3 genes as the D1 protein.
3. 学会等名 18th International Congress on Photosynthesis Research, Dunedin, New Zealand. (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hongjie Li, Yoshiki Nakajima, Jian-Ren Shen and Michihiro Suga
2. 発表標題 Capturing structural changes of photosystem II using time-resolved serial femtosecond crystallography
3. 学会等名 PDB50 Anniversary Symposium in Asia (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Michi Suga, Yoshiki Nakajima, Hongjie Li, Jian-Ren Shen
2. 発表標題 X-ray free electron lasers reveal the molecular mechanism for water oxidation in photosystem II
3. 学会等名 第59回日本生物物理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 中島芳樹、菅倫寛、沈建仁
2. 発表標題 光化学系IIのS状態遷移及び結晶品質における界面活性剤の影響
3. 学会等名 第63回植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Jian-Ren Shen, Yoshiki Nakajima, Fusamichi Akita & Michihiro Suga	4. 発行年 2021年
2. 出版社 Springer Cham	5. 総ページ数 622
3. 書名 Photosynthesis: Molecular Approaches to Solar Energy Conversion	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	中島 芳樹  (Nakajima Yoshiki)  (60847052)	岡山大学・異分野基礎科学研究所・特任助教   (15301)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------