

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：24402

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2012～2015

課題番号：24687006

研究課題名(和文)光化学系2複合体の構造生物学

研究課題名(英文)Structural biology of oxygen-evolving photosystem II

## 研究代表者

川上 恵典(Kawakami, Keisuke)

大阪市立大学・複合先端研究機構・特任准教授

研究者番号：40619904

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物やラン藻は、地球上の多くの生命が生きていく上で必要な分子状酸素を形成する。これは、太陽の光エネルギーを光化学系II(PSII)が吸収して電子伝達反応を行うに伴って酸素発生中心であるMn4CaO5クラスターで水を分解することによって行われる。PSIIの酸素発生反応には塩素イオンが寄与し、PSII内の塩素イオンは同族元素であるヨウ素イオンと置換可能であるが、ヨウ素イオンに置換するとPSIIは酸素発生反応を阻害され、この阻害機構の詳細は不明であった。本研究により、ヨウ素イオン置換によって起こるPSII内の構造変化を明らかにし、ヨウ素イオンがMn4CaO5クラスターを還元していることを突き止めた。

研究成果の概要(英文)：Plants and cyanobacteria form oxygen molecules required for life on the earth. This reaction is performed by light-induced electron transfer and water-splitting reaction of oxygen-evolving center, the so-called Mn4CaO5-cluster in photosystem II (PSII). The chloride ion (Cl-) in PSII is known to be an essential co-factor in the water-splitting reaction, however, the reaction is inhibited when Cl- is replaced with iodine ion (I-). We analyzed the crystal structure of iodine-substituted PSII (I-PSII) to elucidate the inhibition mechanism of the water-splitting reaction by I- and the associated structural changes of the Mn4CaO5-cluster. In this study, we confirmed the dynamic structural changes in the Mn4CaO5-cluster and reduction reaction of the cluster upon I- substitution.

研究分野：植物生理学, 構造生物化学

キーワード：光化学系II 酸素発生反応 酸素発生中心 ヨウ素イオン 還元反応

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物やシアノバクテリアのチラコイド膜内に存在する光化学系 II 複合体 (PSII) は、太陽光エネルギーを吸収して生物が利用可能な化学エネルギーに変換するとともに、4 個の Mn と 1 個の Ca が 5 個の O によって結び付けられた「酸素発生中心  $Mn_4CaO_5$  クラスタ

ター」水を分解して分子状酸素を形成する。 $Mn_4CaO_5$  クラスタは、PSII が光子を吸収するごとに 4 個の Mn の価数とその構造を変化させ、5 つの中間状態 ( $S_i$  状態,  $i = 0 - 4$ ) を経て 2 個の水分子から 1 個の分子状酸素と 4 個のプロトン、そして 4 個の電子を放出する。

(2)  $I^-$  置換によって引き起こされる  $Mn_4CaO_5$  クラスタ及びその周辺構造の配置変化を明らかにするためには、高分解能 X 線結晶構造解析が必須である。そして、 $I^-$  は還元試薬の 1 つとして知られ、 $I^-$  置換によって  $Mn_4CaO_5$  クラスタが還元されていることが示唆された。

### 2. 研究の目的

(1) 地球上に生息する好気性生物の生命維持活動に必須の分子である酸素は、PSII の光エネルギー吸収に伴って起こる酸素発生反応によって形成されている。現在、 $Mn_4CaO_5$  クラスタの構造を模倣した人工錯体研究が精力的に行われ、植物やシアノバクテリアのもつ  $Mn_4CaO_5$  クラスタのより詳細な構造とその構造変化の知見が必要となっている。また、植物やシアノバクテリアが行っている光合成の仕組みを理解するという学術的意義においても、PSII の酸素発生機構の解明は重要な課題である。

(2) 本研究は、 $I^-$  置換によって引き起こされる  $Mn_4CaO_5$  クラスタ及びその周辺構造の配置変化を明らかにし、PSII の酸素発生反応の原理解明を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) 好熱性シアノバクテリア由来 PSII を精製し、結晶化の際に  $Cl^-$  を  $I^-$  または  $Br^-$  に置換する共結晶化法によって  $I^-$  置換 PSII 結晶 ( $I^-$ -PSII) と  $Br^-$  置換 PSII 結晶 ( $Br^-$ -PSII) を作製した。高分解能 PSII 結晶の作製法と

して当該研究者が 2011 年に考案した手法を用い (Y Umena, K Kawakami, JR Shen, and N Kamiya, Nature, 2011)、その結果、2.1 Å 分解能の  $I^-$ -PSII と  $Br^-$ -PSII の X 線回折強度データをそれぞれ 1 個の結晶から収集、それらの構造解析を行なった。 $Br^-$ -PSII 構造は Native-PSII 構造 (PDB code: 3WU2(3ARC)) と比べて大きな構造変化は起こっておらず、一方で  $I^-$ -PSII 構造は Native-PSII 構造と比べて僅かな変化が見られた。その一方で、量子化学計算や広域 X 線吸収微細構造 (EXAFS) 測定によって 2011 年に報告した Native-PSII の  $Mn_4CaO_5$  クラスタの構造は X 線照射によって還元され、構造変化してしまっているという主張が行われた (Galstyan et al., JACS, 2012)。X 線照射による  $Mn_4CaO_5$  クラスタの還元を限りなく低減させてインタクトな  $I^-$ -PSII の  $Mn_4CaO_5$  クラスタ構造を明らかにするため、複数の同型な PSII 結晶を用いて X 線照射量を分散させてそれらのデータをマージさせ、低 X 線損傷データ収集・解析を行なった。

(2)  $I^-$  は還元試薬の 1 つとして知られ、 $I^-$  置換によって  $Mn_4CaO_5$  クラスタが還元されることが示唆されていたが、 $I^-$  置換によって  $Mn_4CaO_5$  クラスタ内の Mn が還元されるかどうかはこれまで明らかにされていなかった。本研究では、 $I^-$  置換した  $Mn_4CaO_5$  クラスタ内の Mn の平均価数を明らかにするため、X 線吸収微細構造 (XAFS) 測定を行い、さらに  $Mn_4CaO_5$  クラスタが 1 電子還元された際に電子常磁性共鳴 (EPR) 測定によって検出されるマルチライニングナルの確認を行なった。

(3)  $I^-$  置換による PSII の酸素発生阻害が  $I^-$  から  $Mn_4CaO_5$  クラスタへの直接的な電子供与であることを明らかにするため、電子受容体の 1 つである 2,6-dichloroindophenol (DCIP) を用いて  $I^-$ -PSII の電子伝達活性を測定した。また、強力な還元試薬であるヒドロキシルアミン ( $NH_2OH$ ) 処理によって  $Mn_4CaO_5$  クラスタを PSII から解離させ、酸素発生反応を阻害させることができ、 $Mn_4CaO_5$  クラスタを解離させた  $I^-$ -PSII の電子伝達活性測定も行なった。

### 4. 研究成果

(1) 良質な  $I^-$ -PSII 結晶を多数作製し、X 線照射量を分散させて X 線回折強度データ収集を行なった。 $I^-$ -PSII 結晶に照射した X 線ドーズ量は約 0.1 MGy であり、この値での  $Mn_4CaO_5$  クラスタの Mn 還元率は約 5%以内である (Yano et al., PNAS, 2005)。X 線結晶構造解析によって得られる構造は、時間的・空間的に平均化された三次元構造であり、約 5% 以内の Mn 還元では  $Mn_4CaO_5$  クラスタ内の配位距離変化を起こらない。実際、当該研究者の所属する研究グループで 0.06 - 0.23 MGy の各 X 線ドーズ量の X 線回折強度データを収

集して構造解析した結果、近年岡山大学グループによって報告されたX線自由電子レーザーを用いた「ダメージフリーなX線結晶構造解析の結果 (Suga and Akita et al., Nature, 2014) とほぼ一致しており、0.2 MGy までのX線ドーズ量では $Mn_4CaO_5$ クラスターの配位距離変化を起こさないことを確認している (論文投稿中)。複数の I-PSII 結晶データを積分処理した後にマージ・スケールした結果、1.88 Å 分解能の良質なX線回折強度データを得ることができ、その構造解析を行なった結果、I-PSII において  $Mn_4CaO_5$  クラスタを構成する Ca の配置が部分的に変化し、さらに Mn4 と Mn1 の間にある酸素原子 (O5) が Mn1 側にシフトし、Mn4-O5, Mn1-O5 の結合距離がそれぞれ 3.0 Å, 2.5 Å となり、2011 年と 2014 年に報告された Native-PSII の  $Mn_4CaO_5$  クラスタ構造とは大きく異なっていることが明らかとなった (図 1)。

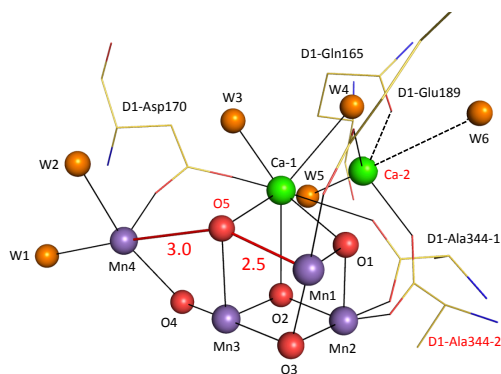


図 1: I-PSII 内の  $Mn_4CaO_5$  クラスタ構造。

(2) I 置換による  $Mn_4CaO_5$  クラスタの大きな構造変化が I による還元反応であることを明らかにするため、 $Mn_4CaO_5$  クラスタを構成する 4 個の Mn の平均化数を XAFS 測定によって確認した (図 2)。

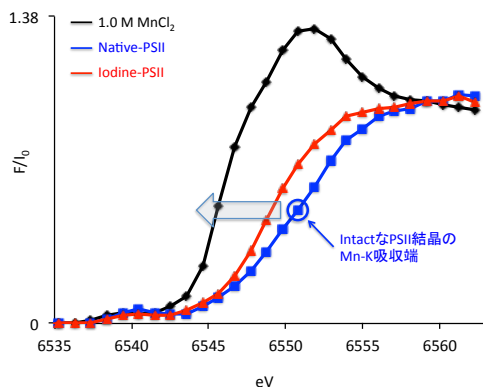


図 2: XAFS 測定による PSII 結晶の Mn 価数変化。

Native-PSII の 4 個の Mn の価数は、暗黒条件下で安定な  $S_1$  状態において、(Mn1, Mn2, Mn3, Mn4) = (III, IV, IV, III) と考えられており、その時の Mn の K 吸収端のエネルギーは約 6,552 eV (図 2 の青線) であった。一方、

I-PSII の Mn の K 吸収端のエネルギーは Native-PSII に比べて約 1.5 eV 低エネルギー側にシフトし (図 2 の赤線)、これは明らかに Mn が還元されていることを意味している。Mn が全て II 価イオンである  $MnCl_2$  溶液 (図 2 の黒線) の Mn の K 吸収端エネルギーはさらに低エネルギー側に検出され、このことから、I-PSII の  $Mn_4CaO_5$  クラスタの Mn は II 価にまで還元されていないことがわかる。そして、低濃度  $NH_2OH$  処理によって  $Mn_4CaO_5$  クラスタを 1 電子還元させた際の Mn の K 吸収端エネルギーのシフトは約 1.6 eV であることから (Guiles et al., Biochemistry, 1990), I 置換によって  $Mn_4CaO_5$  クラスタは 1 または 2 電子還元されていることが判明した ( $S_0$  状態または  $S_{-1}$  状態)。XAFS 測定では  $Mn_4CaO_5$  クラスタが 1 または 2 電子還元されているかを正確に判別することができなかったため、 $Mn_4CaO_5$  クラスタが 1 電子還元された際に電 EPR 測定によって検出されるマルチラインシグナルが観測されるかどうかの確認を行なった (図 3)。

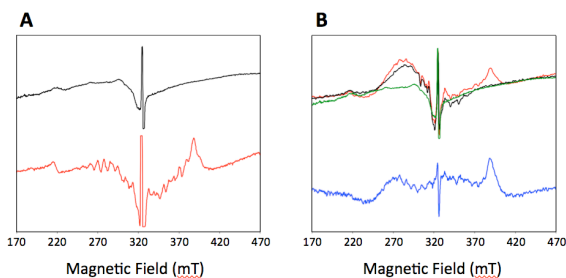
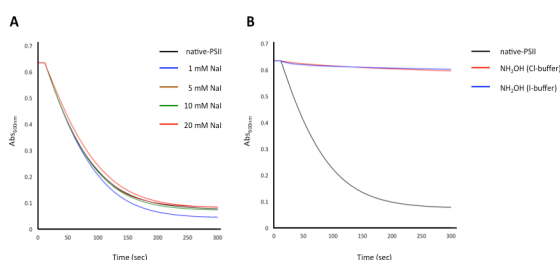


図 3: (A) Native-PSII の EPR 測定。 (B) I-PSII の EPR 測定。

図 3 (A) の黒線は Native-PSII を暗黒下で安定化させた時の EPR 信号を示し、測定温度は 10 K である。320 mT 付近に検出されるシグナルは、PSII 内で安定に存在している Tyr160/D2 の特異的なチロシンラジカルである。Native-PSII の  $S_1$  状態に 195 K 下で照射し、その後 10 K で測定したシグナルが図 3 (A) の赤線になる。270-370 mT の範囲で  $S_2$  状態由来のマルチラインシグナルが観測され、また約 400 mT 付近に  $Q_A^-Fe^{2+}Q_B^-$  シグナルが観測された。一方、図 3 (B) の黒線が暗黒下で安定化させた I-PSII の EPR シグナルであり、比較のため Native-PSII の  $S_1$  状態のシグナルを緑線で示している。Native-PSII の EPR シグナルの形状と比べ、明らかに I-PSII の EPR シグナルが変化していることがわかり、この形状変化は  $S_0$  状態のものに非常に似ている (Boussac et al., Biochemistry, 1999)。また、195 K 下で I-PSII に照射し、その後 10 K で測定したシグナルが赤線になり、青線は Light-minus-dark 差スペクトルを示す。Native-PSII において、Light-minus-dark 差スペクトルによって  $S_2$  状態由来のマルチラインシグナルを明瞭に観測できるのに対し、I-PSII ではシグナル強度が弱く、これは  $S_2$

状態にまで進む  $Mn_4CaO_5$  クラスターがわずかしかならないことを示している。XAFS 測定により、I-置換によって  $Mn_4CaO_5$  クラスターは 1 または 2 電子還元していることが判明し、さらに EPR 測定によって得られた I-PSII の EPR シグナルの形状が Native-PSII の S0 状態由来のシグナルに非常によく似ていることから、I-PSII の  $Mn_4CaO_5$  クラスターの構造は S<sub>0</sub> 状態、または S<sub>0</sub> 状態に似た構造 (S<sub>0</sub>\* 状態) であることが強く示唆できた。

(3) I-が直接  $Mn_4CaO_5$  クラスターに電子を供与して還元しているかどうかを明らかにするため、電子受容体である DCIP を用いた PSII の電子伝達活性測定を行った (図 4)。



酸化型 DCIP は 600 nm に吸収ピークをもち、PSII から電子を供与されて還元型に変化することで 600 nm の吸収ピークが減衰していく。この吸収ピークの減衰速度から PSII の電子伝達速度を測定することができる。図 4(A) は、Native-PSII と 1-20 mM NaI 濃度条件下で測定した PSII の電子伝達活性である。酸素電極を用いた酸素発生活性測定では 5 mM NaI 以上の I 濃度になると酸素発生反応は阻害される (Kawakami et al., 2009, PNAS)。しかし、20 mM NaI 条件下でも I-PSII は電子伝達反応を行なっていることを示しており、このことから、I-PSII は水分子ではなく I<sup>-</sup> から電子を供与して電子伝達反応を行なっていることが明らかとなった。一方で図 4(B) は、NH<sub>2</sub>OH 処理によって  $Mn_4CaO_5$  クラスターを除去し、Native-PSII と I-PSII の電子伝達活性を測定した図である。 $Mn_4CaO_5$  クラスターを除去していない Native-PSII では電子伝達反応が正常に行われるのに対し、 $Mn_4CaO_5$  クラスターを除去した Native-PSII と I-PSII では電子伝達反応がほとんど行われなくなった。この結果から、I<sup>-</sup> は直接  $Mn_4CaO_5$  クラスターに電子供与していることが明らかとなり、XAFS 測定と ERP 測定の結果も踏まえ、I<sup>-</sup> は  $Mn_4CaO_5$  クラスターを直接還元することで水分子の分解反応を阻害し、その結果酸素発生反応を阻害していることが明らかとなった。

(4) X 線結晶構造解析、XAFS 測定、EPR 測定、DCIP を用いた PSII の電子伝達活性測定の結果をまとめると、I<sup>-</sup> は  $Mn_4CaO_5$  クラスターに直接電子を供与し、Mn 還元引き起こす。その際、S<sub>0</sub> 状態または S<sub>0</sub> 状態に似た状態 (S<sub>0</sub>\* 状態) に変化する。この反応によって水分解反応が阻害され、最終的に酸素発生反応が阻害される。

I<sup>-</sup> によって還元された  $Mn_4CaO_5$  クラスターの構造変化は、一般的な触媒の構造変化に比べて極めて大きなものであり、特に Ca の配置変化と、Mn4-O5, Mn1-O5 の結合距離がそれぞれ 3.0 Å, 2.5 Å (Native-PSII ではそれぞれ 2.3 Å, 2.7 Å) に変化したことは、S<sub>1</sub> 状態において O<sup>2-</sup> または OH<sup>-</sup> と考えられている O5 が、H<sub>2</sub>O にまでプロトン化されていることを示している。本研究によって、PSII の  $Mn_4CaO_5$  クラスターのダイナミックな構造変化を世界で初めて捉えることに成功し、PSII の酸素発生反応が一般的な触媒の反応とは大きく異なる反応機構であることが明らかとなった。現在、これらの成果をまとめ、論文投稿準備中である。

#### <引用文献>

- ① Umena Y. \*, Kawakami K. \*, Kamiya N., Shen J.-R., Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature*, 473, 55-60., 2011.
- \*Equally contributed authors
- ② Kawakami K., Umena Y., Kamiya N., Shen J.-R., Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution, *J. Photochem. Photobiol. B*, 104, 9-18, 2011.
- ③ Suga M. and Akita F. et al., Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses. *Nature*. 517, 99-103 (2014).
- ④ Yano J. et al., X-ray damage to the Mn4Ca complex in single crystals of photosystem II: a case study for metalloprotein crystallography. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 12047-52 (2005).
- ⑤ Galstyan A, Oxygen-evolving Mn cluster in photosystem II: The protonation pattern and oxidation state in the high-resolution crystal structure. *J. Am. Chem. Soc.* 134, 7442-7449 (2012).
- ⑥ Guiles R. D, The S0 state of photosystem II induced by hydroxylamine: Differences between the structure of the manganese complex in the S0 and S1 states determined by X-ray absorption spectroscopy. *Biochemistry* 29, 486-496 (1990).
- ⑦ Boussac A, Detection of an electron paramagnetic resonance signal in the S0 state of the manganese complex of photosystem II from *Synechococcus elongatus*. *Biochemistry*. 38, 11942-8 (1999).
- ⑧ 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. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 8567-72 (2009).

\*Equally contributed authors

#### 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 2 件)

- ① Kawakami K., Fujii R., Umena Y., Ozawa S., Takahashi Y., Hashimoto H., Shen J.-R., Kamiya N., Identification of  $\beta$ -cryptoxanthin in oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*, *Carotenoid Science*, 査読あり, 19, 48-51, 2014.

\*Corresponding authors

- ② Koua F.H., Umena Y., Kawakami K., Shen J.-R., Structure of Sr-substituted photosystem II at 2.1 Å resolution and its implications in the mechanism of water oxidation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 査読あり, 10, 3889-3894, 2013. DOI: 10.1073/pnas.1219922110.

[学会発表] (計 15 件)

<招待講演>

- ① 川上恵典, 如何にして良質な蛋白質結晶の X 線回折強度データを得るか, 2015 年度結晶学会若手の会, 大阪, 10 月 16 日, 2015 年。
- ② 川上恵典, 光合成の基盤である PSII の結晶構造解析と展望, 日本植物学会第 79 回大会, 新潟, 9 月 6-8 日, 2015 年。
- ③ 川上恵典・萩原大介・梅名泰史・福島佳優・伊藤亮孝・手木芳男・沈建仁・神谷信夫, 第 87 回日本生化学会大会, ヨウ素イオンによる光化学系 II 複合体の酸素発生阻害機構, 京都, 10 月 15 日, 2014 年。
- ④ 川上恵典, 植物の酸素発生型光化学系 II 研究の過去・現在、そして未来、ナノバイオテクノロジー研究会, 1 月 24 日, 愛知, 2014 年。
- ⑤ 川上恵典, 光合成膜タンパク質光化学系 II の結晶構造とその後の展開, 有機太陽電池シンポジウム, 7 月 12-13 日, 京都。
- ⑥ 川上恵典・萩原大介・梅名泰史・福島佳優・伊藤亮孝・手木芳男・沈建仁・神谷信夫, ヨウ素イオンによる光化学系 II 複合体の酸素発生阻害機構, 蛋白質研究所セミナー, 4 月 20-21 日, 大阪, 2013 年。
- ⑦ 川上恵典, 光化学系 II 複合体結晶の高分解能化, 蛋白質研究所セミナー, 9 月 20-21 日, 大阪, 2012 年。

<学会発表>

- ⑧ 川上恵典・萩原大介・梅名泰史・福島佳

優・伊藤亮孝・手木芳男・沈建仁・神谷信夫, ヨウ素イオンによる光化学系 II 複合体の酸素発生阻害機構, 日本結晶学会年会, 大阪, 10 月 17 日, 2015 年。

- ⑨ 川上恵典・萩原大介・梅名泰史・福島佳優・伊藤亮孝・手木芳男・沈建仁・神谷信夫, ヨウ素イオンによる植物・藻類の酸素発生阻害機構の解明, 第 23 回光合成セミナー2015, 7 月 11-12 日, 2015。
- ⑩ 川上恵典・萩原大介・梅名泰史・福島佳優・伊藤亮孝・手木芳男・沈建仁・神谷信夫, ヨウ素イオンによるシアノバクテリア由来光化学系 II の酸素発生阻害機構, 第 56 回日本植物生理学会年会, 東京, 3 月 16-18 日, 2015 年。
- ⑪ 川上恵典・萩原大介・梅名泰史・福島佳優・伊藤亮孝・手木芳男・沈建仁・神谷信夫, ヨウ素イオンによる光化学系 II 複合体の酸素発生阻害機構, 第 5 回日本光合成学会年会, 大阪, 5 月 30-31 日, 2014 年。
- ⑫ 川上恵典, 藤井律子, 梅名泰史, 小澤真一郎, 高橋裕一郎, 橋本秀樹, 神谷信夫, 沈建仁, 酸素発生光化学系 II 複合体における  $\beta$ -クリプトキサンチンの同定, 第 4 回日本光合成学会年会, 愛知, 5 月 31 日-6 月 1 日, 2013 年。

<国際学会・シンポジウム>

- ⑬ Kawakami K., Hagiwara D., Umena Y., Fukushima Y., Ito A., Teki Y., Shen J.-R., and Kamiya N., Inhibition mechanism of the water-splitting reaction of photosystem II by iodine ions, International Conference on Artificial Photosynthesis, Awaji, Japan, November 24-28, 2014.
- ⑭ Kawakami K., Hagiwara D., Umena Y., Fukushima Y., Shen J.-R., and Kamiya N., How iodine ions inhibit the oxygen evolution of photosystem II?, 16<sup>th</sup> International Congress of Photosynthesis, St. Louis, USA, August 11-16, 2013,
- ⑮ Kawakami K., Hagiwara D., Umena Y., Fukushima Y., Shen J.-R., and Kamiya N., How do iodine ions inhibit the oxygen evolution of photosystem II?, Okayama University International Symposium, Structure and Dynamics of Photosynthetic Systems, October 22-23, Okayama, Japan.

[図書] (計 2 件)

- ① 神谷信夫・川上恵典, 光化学系 II の構造と機能「人工光合成～光エネルギーによる物質変換の化学～」, pp. 55-73, 三共出版, 2015 年 9 月出版。
- ② 川上恵典・神谷信夫, 光化学系 II 反応中心複合体の構造解析「光合成研究と産業応用最前線」, pp. 21-30, NTS 出版,

2014年12月出版。

[その他]

ホームページ等

[http://www.ocarina.osaka-cu.ac.jp/profile/keisuke\\_kawakami\\_j.html](http://www.ocarina.osaka-cu.ac.jp/profile/keisuke_kawakami_j.html)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川上 恵典 (Kawakami, Keisuke)

大阪市立大学・複合先端研究機構・特任  
准教授

研究者番号：40619904

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：