

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分  
平成27年3月25日現在

光合成・光化学系 II 複合体の原子分解能における酸素発生機構の解明

Studies on the oxygen-evolving reaction mechanism of photosystem II at an atomic resolution

課題番号：24227002

神谷 信夫 (KAMIYA NOBUO)

大阪市立大学・複合先端研究機構・教授



研究の概要

光合成は人類の持続可能な社会を実現するためにもっとも重要なもののひとつである。光化学系 II 複合体 (PSII) は、太陽光を吸収して水を分解し、酸素分子とともに電子とプロトンを生産させている。本研究では PSII の反応中間体 (Kok サイクルの S0、S1、S2 状態) の高分解能の結晶構造解析を行い、PSII の酸素発生機構を解明する。

研究分野：生物科学、構造生物化学

キーワード：光合成、光化学系 II、X線結晶構造、水分解・酸素発生機構

1. 研究開始当初の背景

らん藻や植物細胞のチラコイド膜に埋もれている光化学系 II 複合体 (以後 PSII) は、20 種類もの疎水性・親水性サブユニットが会合した膜タンパク質であり、100 個を超える色素や脂質を取り巻いて、その総分子量は 700 kDa にも及ぶ。その複雑さと膜タンパク質としての不安定性のために PSII の X 線結晶構造解析は困難をきわめ、2001 年以來 10 年にわたり世界中で精力的な研究が行われたにもかかわらず、その解析分解能は 3.8 - 2.9 Å の範囲にとどまっていた。この分解能では多くのサブユニットや色素の立体構造を確定させるには至らず、特に、水から酸素を生産させる  $Mn_4Ca$  クラスターの構造は不確かで、クラスターを取り巻いて酸素発生に関与する水や、その水から生じるプロトンの排出経路はまったく不明であった。これらの情報は PSII の酸素発生機構を解明するために不可欠なものであり、PSII の高分解能の結晶構造解析が、光合成研究で「最後に残された最大の課題」とされてきた所以である。我々は 2011 年に PSII の結晶の質を飛躍的に向上させ、SPring-8 の構造生物学関連ビームラインを利用して、結晶への入射 X 線量 0.8 MGy、分解能 1.9 Å で構造解析することに成功した [Umehara, Kawakami, Shen, Kamiya, Nature (2011)、PDB-ID: 当初は 3ARC、後に一部修正して再登録 3WU2]。その結果、 $Mn_4Ca$  クラスターは 5 個の金属原子 (4 個の Mn と 1 個の Ca) が 5 個の酸素原子により結びつけられて「歪んだ椅子」の形をしていることを世界で初めて明らかにした。またこの  $Mn_4Ca$  クラスター

には酸素発生反応の基質の候補となる 4 個の水分子が配位していた。この構造は画期的な新発見として世界的に高い評価を受けたが、発表当初から、0.8 MGy の比較的低い X 線量でもクラスターを構成する Mn 原子が X 線により還元される問題が提起された。また 3ARC (3WU2) の構造は、酸素発生 (Kok) サイクルの中で  $Mn_4Ca$  クラスターがたどる 5 つの反応中間体 (S 状態) の内もっとも安定な S1 状態に対応するもので、この構造のみから酸素発生機構の全容を理解することはできない。

2. 研究の目的

PSII の酸素発生機構を解明するためには、Kok サイクルの反応中間体に関する構造情報が必要不可欠となる。本研究では、S1 状態については、結晶に入射する X 線量を可能な限り低減して X 線還元による影響のない構造を明らかにする。また、Mn 原子の異常分散効果を利用して  $Mn_4Ca$  クラスターに含まれる 4 個の Mn 原子の価数を同定する。S0 状態については、PSII のヨウ素置換体と臭素置換体、4 種類の除草剤複合体、小分子量サブユニットの PsbM を欠失した変異体の合計 7 種類の結晶構造解析を原子分解能で行うことにより、S1 状態から還元されている可能性を検討する。S2 状態については、大強度フェムト秒レーザーの多光子吸収を利用して結晶内の PSII を S2 状態に変化させ、その原子分解能の結晶構造解析を行う。本研究ではこれら S0 状態から S2 状態までの結晶構造解析を行って、PSII の酸素発生機構に関する議論を進めることを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では、まず 2011 年に報告した 3ARC の構造を見直して (3WU2)、 $Mn_4Ca$  クラスターの原子間距離の精度を X 線結晶学の立場から検証した。また構造解析に用いる回折強度データを可能な限り少ない X 線量で収集し、3ARC (3WU2) より高い分解能で新たな構造解析を進めた。これらと平行して以下の 5 項目について研究を進めた。(1) 酸素発生機構に関与する塩素イオンを臭素イオンまたはヨウ素イオンと入れ替えた 2 種類の置換体、(2) 酸素発生に連動する電子移動を停止させる除草剤 4 種類との複合体、(3) 遺伝子操作により PSII の小分子量サブユニットのひとつ PsbM を欠失して電子移動速度が低下した変異体 ( $\Delta$ PsbM-PSII) の合計 7 種類の結晶について、それぞれ 2 Å 前後の分解能で X 線結晶構造解析を行った。(3) では、電子移動速度の低下により変化する熱蛍光発光を合わせて測定し、電子移動の構造・機能相関についても研究を進めている。本研究ではさらに、(4) X 線の異常分散効果が Mn 原子の価数とともに変化することを利用して、S1 状態にある  $Mn_4Ca$  クラスターの 4 個の Mn 原子について、それぞれの価数を同定し、(5) フェムト秒レーザーの多光子吸収を利用して PSII の S2 状態を実現させる技術を開発し、その結晶構造を明らかにする研究を進めてきた。

### 4. これまでの成果

本研究を開始して以来これまでの 3 年間に、前項に述べた方法に従って研究を進め、それぞれの項目について順調に成果を上げているが、今回は紙面の関係から、結晶の同型性を確保して、S1 状態にある 16 個の結晶を用いることにより入射 X 線量を 0.1 MGy まで低減させ、かつ構造解析の分解能を 1.77 Å まで向上させた結果についてのみ報告する。これは 3ARC (3WU2) の分解能 1.9 Å を凌ぎ、現段階で世界最高の精度を持っているが、入射 X 線量を 3ARC (3WU2) の 12.5% にあたる 0.1 MGy まで低減させたにもかかわらず、 $Mn_4Ca$  クラスターには X 線結晶学から予想される結合距離の標準偏差 (誤差) 0.16 Å を大きく越えるような顕著な違いは見られなかった (図 1 左参照)。一方、研究項目 (1) から (3) の構造解析の結果では、それらへの入射 X 線量は 4.5 MGy から 66 MGy と 3ARC (3WU2) の 0.8 MGy に比べて非常に高いにもかかわらず、 $Mn_4Ca$  クラスターには結合距離の誤差を越えるような大きな変化は見られなかった。これらの結果より、X 線還元による  $Mn_4Ca$  クラスターの構造変化は、あったとしても 0.1~0.2 Å の程度で、このように小さな構造変化を確認するためには、PSII 結晶の分解能を少なくとも 1.5 Å 以下まで改善する必要があることが明らかとなった。

今回得られた分解能 1.77 Å の結晶構造で

は、その高い分解能を反映して、 $Mn_4Ca$  クラスターを構成する Ca 原子とそれに配位するアミノ酸残基、水が再配置した構造が新たに見いだされた。 $Mn_4Ca$  クラスターとそれを取り巻く配位環境を、従来構造 (左) と今回の再配置構造 (右) に分けて図 1 に示した。従来構造の Ca 原子は  $Mn_4Ca$  クラスターを構成する 3 個の酸素原子、2 個のアミノ酸残基、2 個の水分子により 7 配位構造をとっていたが、再配置構造ではそれぞれの数が 1 個、3 個、3 個に変化していた。現在この Ca 再配置の生理学的意義を追求するために、この現象が現れる PSII 試料と結晶の調製条件を詳細に検討し、再現性を確認する作業を続けている。この Ca 再配置現象は過去 15 年に及ぶ PSII の結晶構造解析の歴史の中で初めて見いだされたものであり、大きな学術的インパクトをもっている。

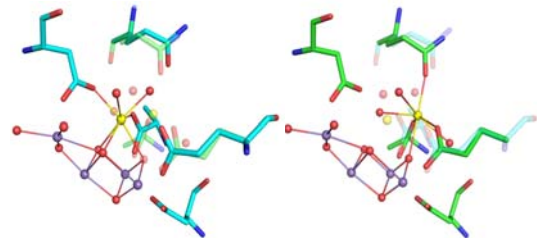


図 1 X 線量 0.1 MGy、分解能 1.77 Å の構造に見られた  $Mn_4Ca$  クラスターの Ca 再配置。Ca:黄、Mn:紫、酸素:赤。

### 5. 今後の計画

これまでの 3 年間に新たに見いだされた Ca 再配置現象を究明するとともに、当初からの 5 つの研究項目を遂行する。本研究から得られたすべての構造情報に基づいて、 $Mn_4Ca$  クラスターの水分解・酸素発生機構に関する議論を進める。

### 6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

M. Sugiura, K. Koyama, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya and A. Boussac, *Biochemistry*, **52**, 9426-9431 (2013).

H. Isobe, M. Shoji, S. Yamanaka, Y. Umena, K. Kawakami, N. Kamiya, J.-R. Shen and K. Yamaguchi, *Dalton Trans.*, **41**, 13727-13740 (2012).

K. Saito, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, and H. Ishikita, *Biochem.*, **51**, 4290-4299 (2012).

2012 年度朝日賞 (神谷信夫・沈建仁共同受賞)  
2012 年度日本光合成学会特別賞「光と緑の賞」(梅名泰史・川上恵典・沈建仁・神谷信夫共同受賞)

ホームページ等

特になし。