

科学研究費助成事業（特別推進研究）公表用資料  
〔研究進捗評価用〕

平成24年度採択分

平成27年5月25日現在

研究課題名（和文） **光合成系 II における水分解反応の学理解明**

研究課題名（英文） **Elucidation of the mechanisms of water-splitting in photosystem II**

課題番号：24000018

研究代表者

**沈 建仁** (JIAN-REN SHEN)

岡山大学・大学院自然科学研究科・教授



研究の概要：植物や藻類が行う酸素発生型光合成において、最大で最後の謎である太陽光を利用した水分解・酸素発生反応の機構を構造生物学、赤外分光や電子スピン共鳴などの各種物理測定法、変異株の作成と構造・機能解析、及び理論計算により電子・原子レベルで解明する。特に水分解反応の中間状態を、高分解能結晶を用いて解析し、反応に伴う構造変化を明らかにすることで、基質である水分子の位置、酸素分子の形成部位等を明らかにする。本研究によって水分解の反応機構を解明するだけでなく、人工光合成系の設計に重要な指針を提供する。

研究分野：生物学、生物物理学

キーワード：光合成、膜タンパク質、光エネルギー変換、水分解反応

#### 1. 研究開始当初の背景

光化学系 II (PSII) は 20 個のサブユニットを含み、分子量 350 kDa の巨大膜タンパク質複合体であるが、その結晶構造は代表者らにより 2011 年に 1.9 Å 分解能で解析され、その中に含まれる水分解の触媒である  $Mn_4CaO_5$  クラスターの構造が初めて明らかになった (Umena et al. Nature, 2011, 473, 55-60)。しかし、PSII の水分解反応は 4 電子反応であり、4 つのステップを経て進むので、その機構を解明するには一連の反応中間体の構造を解析する必要がある。さらに Mn イオンが還元を受けやすく、当初解析された構造は放射光 X 線により Mn の一部が還元され、構造がわずかに変化した可能性があった。また、水分解に伴うプロトンの排出経路、水の進入経路、PSII の各構成サブユニット、 $Mn_4CaO_5$  クラスター周辺の多くのアミノ酸残基、及び各水素結合ネットワークに係るアミノ酸残基の役割はほとんど不明であった。

#### 2. 研究の目的

本研究の目的は、酸素発生型光合成において、最大で最後の謎である太陽光を利用した水分解・酸素発生反応の機構を構造生物学、赤外分光や電子スピン共鳴などの各種物理測定法、変異株の作成と構造・機能解析、及び理論計算により電子・原子レベルで解明することである。最先端の実験技術と理論計算の手法を組み合わせることにより、各中間状態の構造、反応に伴う構造・エネルギー変化を明らかにし、さらに変異体の構造・機能解析により PSII の各構成サブユニットや重要

アミノ酸の機能を明らかにする。これによって自然界で行われる水分解・酸素発生反応の機構を解明し、人工光合成による太陽光エネルギーの高効率利用に貢献する。

#### 3. 研究の方法

(1) 高分解能を与える PSII 結晶を用いて、光照射により水分解反応の中間体を作成し、X 線結晶構造解析法を用いて構造解析する。また、各種変異体の構造・機能を、結晶構造解析、分光・蛍光測定等により明らかにする。  
(2) 赤外分光や電子スピン共鳴等の測定法を用いて、水分解の基質である水分子や S-state 遷移に伴う配位アミノ酸の微小構造変化、 $Mn_4CaO_5$  クラスター中の各 Mn 原子の酸化状態を明らかにする。また、これらの手法を各アミノ酸変異体に適用し、プロトンパス、水パスや各アミノ酸の役割を明らかにする。  
(3) 理論化学の計算手法を用いて、 $Mn_4CaO_5$  クラスターの電子状態、反応性、実験的に検出困難な  $S_4$  状態や酸素発生の鍵となる酸素-酸素結合形成のエネルギープロファイル、プロトンパス、水の進入経路を明らかにする。

#### 4. これまでの成果

(1) 構造生物学的手法による水分解機構の解析： $Mn_4CaO_5$  クラスターにおける Ca イオンを Sr に置換し、2.1 Å 分解能で結晶構造を解析し、Sr 置換による構造変化と水分解反応活性の低下から Ca の役割を明らかにした。また、フェムト秒の X 線自由電子レーザー XFEL を利用して、 $S_1$  状態の無損傷 PSII 構造を高分解能で解析し、この結果を基に、水 [4. これ

までの成果(続き)  
 分解に伴う酸素分子の形成機構を提案した(図1)。さらに $Mn_4CaO_5$ クラスターに類似のモデル化合物 $Mn_4CaO_4$ クラスターの合成に成功し、また、PSIIから電子を受け取り、 $CO_2$ 固定に必要な還元力を作り出している植物の巨大光化学系I—集光性アンテナI(PSI-LHCI)複合体の結晶構造を2.8 Å分解能で解析することに成功した。

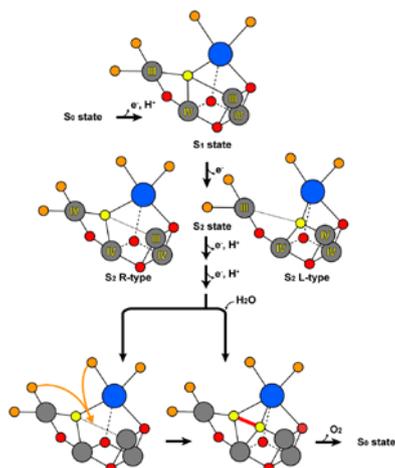


図1. XFELを用いた無損傷構造解析に基づき提案された水分解の反応機構

## (2) 分光学的手法による水分解機構の解明:

水分解反応におけるマンガンクラスターおよびその周辺構造の微小な構造変化を光誘起FTIR差スペクトル法により検出し、量子化学計算との組み合わせにより、 $YZ\cdot$ ラジカルを経由する新規なプロトン放出機構を提案した。また、FTIR法を用いて水分解反応の各中間状態遷移( $S_0 \rightarrow S_1$ ,  $S_1 \rightarrow S_2$ ,  $S_2 \rightarrow S_3$ ,  $S_3 \rightarrow S_0$ )の効率を見積もる全く新規な手法を開発し、異なった植物種由来PSIIに結合する表在性蛋白質が水分解反応を制御するメカニズムを明らかにした。

## (3) 理論化学的手法による水分解機構の解

析: DFT計算により $Mn_4CaO_5$ クラスターが強相関電子系(SCES)であることを明らかにし、 $Mn_4CaO_5$ クラスターで可能な全てのスピン配置(8個)についてJ値を求めた結果、すべてのMnイオンが交換相互作用による協力関係にあることが判明した。 $S_1$ 状態におけるMnの価数の組み合わせに由来する電荷の自由度とスピン自由度のすべての組み合わせ(計48個)について解析し、 $S_1$ 状態での原子価状態とスピン配置を特定した。また、 $Mn_4CaO_5$ クラスター中のO5、W2のプロトン化・脱プロトン化状態を解析し、これらの $S_1$ 状態におけるプロトン化状態を解明した。

## 5. 今後の計画

(1) 構造生物学的手法による解析: 水分解の反応中間体、特に $S_3$ 状態の構造を、微小結晶を用いてXFELで解析し、反応に伴う構造変

化を解明する。D1 遺伝子や各種アミノ酸残基変異体の構造解析を行い、D1 遺伝子間の差異やプロトンパス、水パスを明らかにする。  
 (2) 分光学的手法による解析: 各種アミノ酸変異体についてFTIRやEPR解析を行い、水分解反応におけるマンガンクラスター近傍のアミノ酸残基の役割や、水素結合ネットワークの構造およびプロトン移動反応における各アミノ酸の役割を解明し、各中間状態遷移におけるプロトン移動経路を特定し、プロトン共役電子移動の分子機構を解明する。

(3) 理論化学的手法による解析: XFEL構造をもとに、実在系により近い、大きなQM/MMモデルを構築し、QM/MM計算を実行し、 $S_1$ 構造の最適化と $S_2$ と $S_3$ 状態で取りうる理論的な構造を明らかにする。得られた理論構造をXRD, XFEL, EXAFSの各種実験結果と比較し、最も合理的な構造を導き、水分解の反応機構を理論的に解明する。また、実験から導かれたプロトンパス、水パスについて理論計算を行い、理論的に合理的な各パスを確定する。

## 6. これまでの発表論文等(受賞等も含む)

(研究代表者は二重線、研究分担者は一重下線、連携研究者は点線)

- (1) Qin X., Suga M., Kuang T., Shen J.-R., Structural basis for the energy transfer pathways in plant PSI-LHCI super-complex. **Science**, 348, 989-95 (2015).
- (2) Zhang C., Chen C., Dong H., Shen J.-R., Dau H., Zhao J., A synthetic  $Mn_4Ca$ -cluster mimicking the oxygen-evolving center of photosynthesis, **Science**, 348, 690-693 (2015).
- (3) Suga M., Akita F., Hirata K., Ueno G., Murakami H., Nakajima Y., Shimizu T., Yamashita K., Yamamoto M., Ago H., Shen J.-R., Native structure of photosystem II at 1.95 Å resolution viewed by femtosecond X-ray pulses, **Nature**, 517, 99-103 (2015).
- (4) Hirata K., ... Shen J.-R., ... et al., Determination of damage-free crystal structure of an X-ray-sensitive protein using an XFEL, **Nature methods**, 11, 734-736 (2014).
- (5) 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. Nat. Acad. Sci. U. S. A.**, 110, 3889-3894 (2013).

受賞

2012年度朝日賞(2013年1月、沈建仁)  
 第71回山陽新聞賞(2013年1月、沈建仁)

ホームページ等

<http://www.biol.okayama-u.ac.jp/shen2/%E3%83%88%E3%83%83%E3%83%97.htm>