

光合成水分解・酸素発生反応の構造基盤

秋田 総理, 菅 倫寛, 沈 建仁

光合成において、最初に起こるのは光エネルギーを利用して水を水素イオン、電子、酸素に分解する反応であり、この反応は光化学系II (PSII) という膜タンパク質複合体によって触媒されている。PSIIは20種のサブユニットからなる、分子質量350kDaの超分子複合体である。2011年に発表されたPSIIの1.9 Åの構造は、それまで明らかになっていなかった光合成の心臓部で、水分解の活性中心であるマンガンクラスターの構造を詳細に示したが、放射線の影響を受け天然状態とはわずかに異なった構造をしていることがわかっていて、本稿ではX線自由電子レーザー (XFEL) を用いたPSIIの無損傷X線結晶構造解析やシリアルフェムト秒結晶構造解析の結果について紹介する。

1. はじめに

光合成は酸素発生型と酸素非発生型の二つに分類され、前者は太陽光を利用して電子供与体である水を分解し、酸素を発生させるとともに、二酸化炭素を固定して炭水化物を合成する。一方後者は、硫化水素等を電子供与体として利用することで、酸素を発生させることなく必要な化学エネルギーを得ている。

酸素発生型光合成のうち、光のエネルギーを利用する“明反応”では、水からの電子と水素イオンを用いて最終的にアデノシン三リン酸 (ATP) と還元型のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリジン酸 (NADPH) を作り出すが、それらの反応は葉緑体やシアノバクテリアのチラコイド膜上で行われる。チラコイド膜上には、明反応の重要な反応を担う四つの超分子複合体、光化学系II複合体 (photosystem II: PSII), シトクロム b_6/f 複合体, 光化学系I複合体 (photosystem I: PSI), ATP合成酵素が存在する (図1)。さらにさまざまな波長の光を効率よく吸収し利用するために、シアノバクテリアにおいてはフィコビリソーム、高等植物などの真核光合成生物においては集光性

アンテナ複合体 (light-harvesting complex) LHCI, LHCIIがそれぞれPSI反応中心複合体, PSII反応中心複合体に結合し、酸素非発生型光合成を行う光合成細菌においてもLH1 (light-harvesting 1), LH2などの光捕集アンテナが反応中心に結合し、それぞれの光化学反応中心に捕集した光エネルギーを高い効率で伝達している。

酸素発生型光合成の電子伝達系はPSIIが光エネルギーによって励起され、水をプロトンと電子、酸素に分解する水分解・酸素発生反応から始まり、二つの電子と二つのプロトンを受け取ったプラストキノン (PQ) が還元型のプラストキノール (PQH_2) になりPSIIから遊離したのち、シトクロム b_6/f 複合体へと電子を運ぶ。シトクロム b_6/f に渡された電子は、移動性電子キャリアであるシトクロム c_6 あるいはプラストシアニン (PC) を通してPSIに伝達される。PSIは電子をフェレドキシン (Fd) へ渡し、その電子を利用してフェレドキシンNADP還元酵素 (FNR) が $NADP^+$ を還元し、NADPHを生産する。一方、ATP合成酵素は一連の反応によって生じたチラコイド膜を隔てたプロトン濃度勾配を利用して、アデノシン二リン酸 (ADP) とリン酸からATPを生産する。本稿では、特に筆者らが取り組んでいるPSIIの構造と水分解反応の機構について、最新の研究結果と合わせて紹介する。

2. 光化学系II複合体

PSIIは17個の膜貫通サブユニットと3個の膜表面性サブユニットからなり、光エネルギーを吸収するクロロフィル a 、フェオフィチン、カロテノイドなどの色素分子、電子受容体であるプラストキノン、非ヘム鉄イオン、水分解の活性中心である4個のマンガンと1個のカルシウムからな

岡山大学異分野基礎科学研究所・光合成・構造生物学研究コア
(〒700-8530 岡山市北区津島中3-1-1)

Structural basis for the photosynthetic water-splitting/oxygen-evolving reaction

Fusamichi Akita, Michihiro Suga and Jian-Ren Shen (Research Core for Photosynthesis and Structural Biology, Research Institute for Interdisciplinary Science (RIIS), Okayama University, 3-1-1 Tsushimanaka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2017.890699

© 2017 公益社団法人日本生化学会

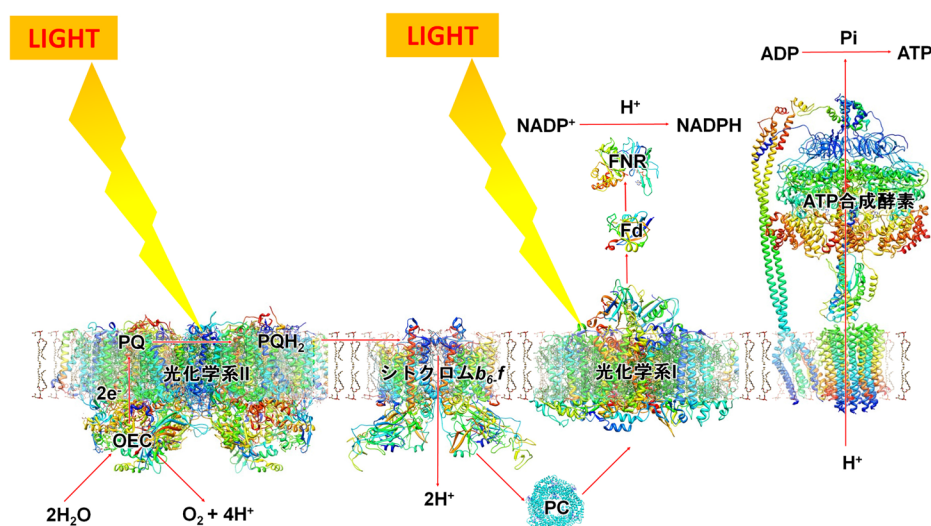


図1 チラコイド膜上に存在する超分子複合体と光エネルギー変換の仕組み

OEC：酸素発生複合体，PQ：プラストキノン，PQH₂：プラストキノール，PC：プラストシアニン，Fd：フェレドキシン，FNR：フェレドキシンNADP還元酵素。

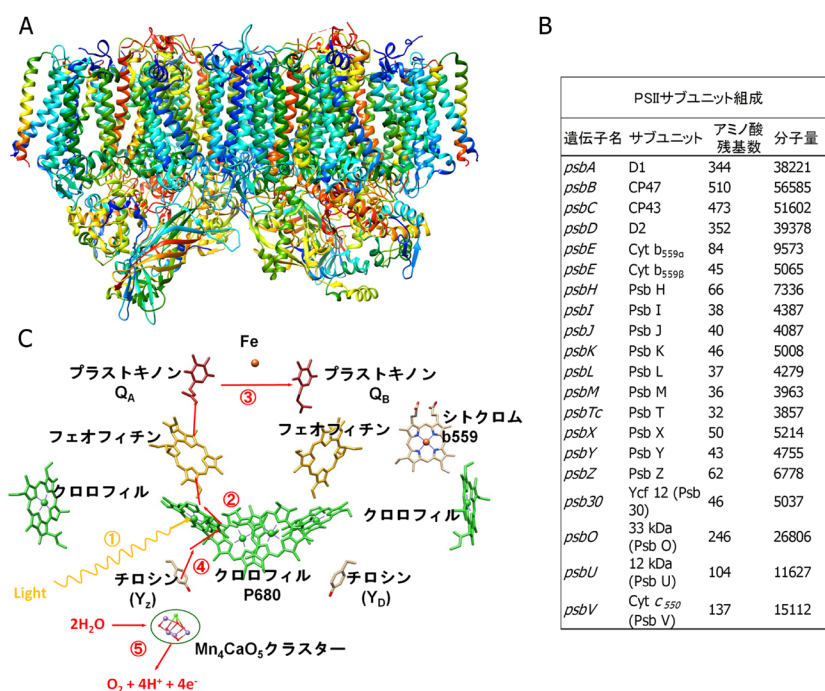


図2 シアノバクテリア由来光化学系II二量体の構造(A)，サブユニット組成(B)と電子伝達成分の配置(C)

るマンガン-カルシウムクラスター (Mn₄Caクラスター)、塩素イオンなどのさまざまな補欠分子が結合している巨大な超分子複合体であり、単量体の分子質量は350kDaになる。シアノバクテリアなどの細胞内では、この単量体が二量体を形成して機能している。PSIIの全体構造とサブユニットの組成をそれぞれ図2A, Bに示した。

PSIIの反応中心を構成するのはD1, D2サブユニットで、それぞれ3分子のクロロフィルa、1分子のフェオフィチン、1分子のプラストキノンが結合しており、擬似2回対称の関係にある。Mn₄CaクラスターはD1にのみ存在し、この二つのサブユニットで電子伝達成分のすべてを結合し

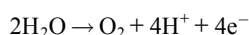
ている。D1, D2サブユニットはすべての酸素発生型生物に保存されている。D1, D2をはさみ込むように結合しているサブユニットCP47, CP43はそれぞれ16分子、13分子のクロロフィルaが結合しており、光を捕集するアンテナの役割を果たしている(図2A)。

上記四つの「大きい」膜貫通サブユニット以外に、PSIIは13個の分子質量10kDa以下の膜貫通サブユニットを持っている。これら低分子量サブユニットはPsbE, PsbF, PsbH, PsbI, PsbJ, PsbK, PsbL, PsbM, PsbT, PsbX, PsbY, PsbZ, Psb30 (Ycf12)であり、それぞれD1/D2, CP47/CP43を取り囲むように存在し、PSIIの全体構造の安定化、およびクロロフィ

ル a などの補欠因子を保持する役割を持っている。しかし、多くの低分子量サブユニットの詳細な機能はわかっていない。さらに膜表面性サブユニットとしてPsbO, PsbU, PsbVがチラコイド膜内部のルーメン側に結合しており、それらはいずれも直接Mn₄Caクラスターと結合していないが、その周辺構造の安定化、および外部溶媒からMn₄Caクラスターを保護する役割を担っていると考えられている。

3. 光化学系IIの電子伝達系

PSIIの電子伝達成分の配置を図2Cに示した。中心には四つのクロロフィルから構成されるクラスターがあり、このクラスター中のクロロフィルP680は680nmの光によって励起された後、電子を失ってカチオンラジカルとなる(図2C, ①)。この電荷分離によって、P680は強力な酸化力を生じる(図2C, ②)。P680は電子を補填するために、Y_Z(D1サブユニットの161番目のチロシン)から電子を引き抜き、Y_Zのカチオンラジカルを生成する(図2C, ④)。ラジカル化したY_Zは、Mn₄Caクラスターから電子を引き抜き、Mn₄Caクラスターは強力な酸化力を得ることになる。これによって、Mn₄Caクラスターは水から電子を引き抜き、プロトンを放出する(図2C, ⑤)。2分子の水から四つの電子が引き抜かれると、四つのプロトンと一つの分子状酸素が放出される。



このように、Mn₄Caクラスターは水分解反応の直接の触媒である。また、この反応は4電子反応であり、四つのステップに分けて進行することが想像できる。実際、閃光照射によって放出される酸素の量を測定すると、4閃光照射ごとに酸素の量が最大になるという「4周期振動」現象が観測され¹⁾、この現象を説明するため、「S状態遷移モデル」が提案された(図3)²⁾。このモデルでは、触媒の状態

がS₀~S₄まであり、光未照射で安定的に存在するS₁状態から、1回閃光照射するごとにS₂, S₃, S₄, S₀へと遷移し、そしてまたS₁へ戻ることになる。このサイクルは1970年にKokらによって提唱されたもので、Kokサイクルとも呼ばれる(図3)²⁾。

一方、電荷分離によってクロロフィルから放出された電子は、一次電子供与体であるフェオフィチンへと移動し、フェオフィチンのアニオンラジカルが生成される。この電子は続いてD2に結合しているプラストキノン(Q_A)へと渡され、さらにD1に結合しているプラストキノン(Q_B)へと渡される(図2C, ③)。Q_Bは2個の電子を受け取るとジアニオンとなり、二つのプロトンをPSIIの外部溶液から受け取り、還元型のプラストキノールになる。プラストキノールはPSIIから遊離したのち、チラコイド膜内を拡散により移動し、シトクロム b_6/f へと電子を運ぶ。空になったQ_B結合部位にはプラストキノンプールから新たなプラストキノンが補充される。

4. シンクロトロン放射光を用いた光化学系IIの高分解能構造解析

PSIIの立体構造解明は、1996年にNakazatoら、1998年にBarbarらによる2次元結晶からの電子線像の解析に始まるが、そのときの分解能は8 Åであり、かなりおおまかな構造しかわからなかった^{3,4)}。最初にPSII二量体の3次元結晶からの立体構造解析に成功したのはZouniらのグループで、2001年に分解能3.8 ÅのPSII構造を報告した⁵⁾。これは、好熱性シアノバクテリアである*Thermosynechococcus elongatus*から安定なPSIIを精製し、結晶化したことが成功の秘訣と考えられる。この発見を皮切りに、2003年に沈・神谷らが分解能3.7 Å⁶⁾、2004年にBarber & Iwataらが分解能3.5 Å⁷⁾、2005年Lollらが分解能3.0 Å⁸⁾、さらに2009年にGuskovらが2.9 Å⁹⁾の構造を立て続けに報告し、分解能の向上とともに各サブユニットや結合している補欠分子族の配置が明らかになっていった。しかし、その時点までの最高分解能2.9 Åでは、水分解の触媒中心の結合部位はわかったが、その詳細な構造を解明するには不十分であった。2011年に沈・神谷らはPSII結晶の質を大幅に改善し、1.9 Åという高分解能で*Thermosynechococcus vulcanus*由来のPSII構造を解析することに成功し、Mn₄Caクラスターの詳細な構造を解明した¹⁰⁾。

この結晶構造では小サブユニットであるPsbYを除く19個のサブユニットの構造を詳細に決定することができ、さらにPSII二量体に結合している268個の補欠分子族を同定することに成功している。また、1.9 Åという高分解能のため、PSII二量体あたり2795個の水分子をアサインすることができ、プロトンを排出する水素結合ネットワークや水分子が流入するチャネル構造についての議論を可能にした。

また、同研究からMn₄Caクラスター中の四つのマンガ

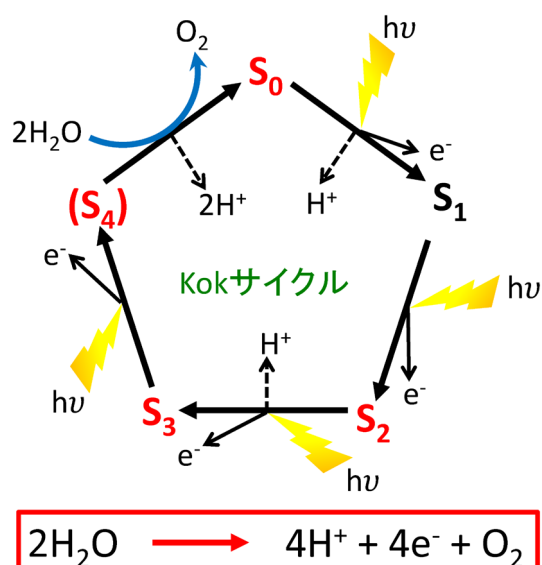


図3 PSII水分解反応のS状態遷移モデル (Kok サイクル)

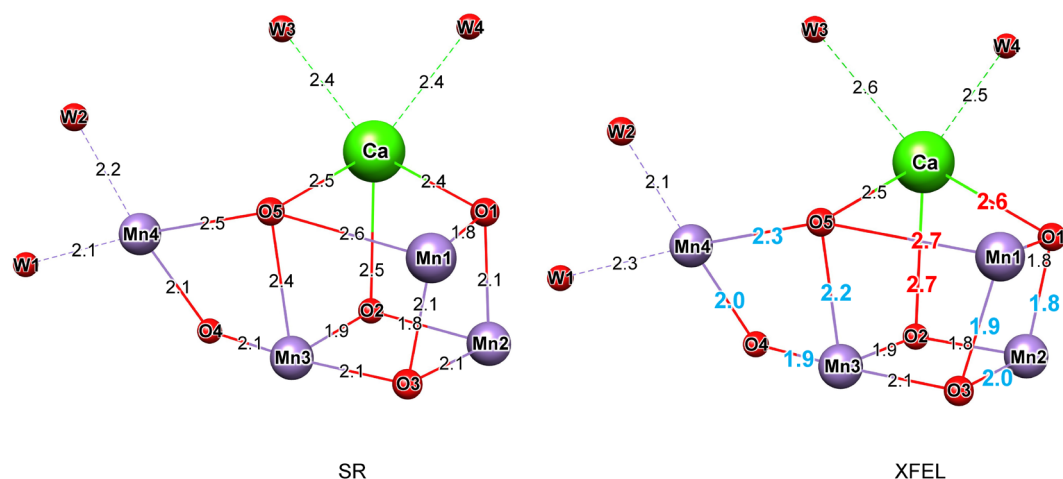


図4 シンクロトロン (SR) と XFEL から得られた Mn_4CaO_5 クラスターの構造

ンイオンと一つのカルシウムイオンは五つのオキソ酸素によってつながった Mn_4CaO_5 クラスターの組成であり，“歪んだ椅子 (distorted chair)”の構造をしていることが明らかになった (図4左)。結晶の作製は暗黒下で行われたため、この構造は暗黒で安定な S_1 状態に対応すると考えられる。Mn1, Mn2, Mn3, Ca, O1, O2, O3, O5はキューバン型の構造を形成し、Mn4, O4がキューバンの外側に結合している。クラスター内の結合距離は、Mn-O間では1.9 Å~2.1 Å, Ca-O間では2.4~2.5 Åとなっており、一つのCa原子が挿入されることにより、歪みが生じたものと考えられる。また、五つのオキソ酸素のうちO5だけは他とは異なり、結合距離がMn1-O5は2.6 Å, Mn4-O5は2.5 Å, Ca-O5は2.7 Åと著しく長く、周囲との結合が特に弱くなっていた。これもキューバン構造の歪みを作り出している重要な要因の一つであるが、このような歪んだ形は、構造上の不安定性を示唆しており、言い換えると柔軟性を持っていると考えられ、水分解の反応サイクルにおいて、 Mn_4CaO_5 クラスターの構造変化を容易にしていると考えられる。さらにO5はMnとの結合距離が長いことから、この酸素原子が水分解・酸素発生における反応部位の一部を担っていることが示唆される。O5に対して、Mn4, Caに配位している水分子 (W2, W3) はそれぞれ3.1 Å, 3.0 Åの距離に存在しているので、これらの水分子が反応基質の一部を提供していることも示唆された。

しかし、 Mn_4CaO_5 クラスター中のMn-Mn結合の距離は強い放射光X線による損傷で還元を受け、これまでに報告されていた広域X線吸収微細構造 (extended X-ray absorption fine structure : EXAFS) や量子力学/分子力学 (QM/MM) 計算の結果よりも0.1~0.2 Å長くなっていたことが指摘された¹¹⁻¹⁵⁾。PSII中の Mn_4CaO_5 クラスターでのMnイオンはIII, IV価であり、X線によって還元を受けやすくII価の状態になったため、Mn-Mn距離が長くなったと考えられている。

5. X線自由電子レーザーを用いた光化学系IIの無損傷構造解析

X線によるタンパク質の損傷は、タンパク質結晶に多量に含まれている水分子から、強力なX線によってヒドロキシラジカル等のフリーラジカルが生じ、金属イオンやアミノ酸を攻撃することで起こると考えられている。これらの反応は、ピコ秒 (10^{-12} 秒) 単位で進行し、1枚あたり0.1~1秒のX線照射が必要な従来の放射線を利用したデータ収集では、損傷を回避することはできない。そのような状況で、渡りに船とばかりに、米国LCLS (Linac Coherent Light Source) に続き、世界で2番目のX線自由電子レーザー (X-ray free electron laser : XFEL) 実験施設SACLA (Spring-8 angstrom compact free-electron laser) が日本に建設され、2012年から供用が開始されることになった。SACLAから供給されるXFELは1パルスあたり数十フェムト秒 (10^{-15} 秒) の照射時間であるため、ピコ秒単位で起こる放射線損傷による構造変化が生じる前に、データを収集することができる。この手法はdiffraction before destructionと呼ばれ、2000年にNeutzeらによって提唱されたものである¹⁶⁾。

SACLAが供用開始されたころ、米国ではすでにYanoらのグループとFrommeらのグループがXFELを用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析法 (serial femtosecond crystallography : SFX) を用いて、PSIIの S_1 状態構造や反応中間体の構造解析を開始していた。SFX法では、数 μm 程度の大きさの微小結晶を含む溶液をインジェクターから一定の速度で連続的に吐出し、結晶のストリームに対してXFELを照射することで、ランダムに配向した多数の結晶からの回折イメージを得て、それらのイメージをモンテカルロ法を含めた手法で処理することで、構造解析が可能なデータを取得する。この方法では、結晶を凍結せずに室温で回折データが得られるため、レーザー照射などと組み合わせたポンプ・プローブ法を用いることで反応中間体のデータを収集することが可能になる。この手法を用いて、Yanoらのグループは光未照射のPSII構造を2012年に6.56 Å, 2013

年に5.7 Å, 2014年に4.9 Å分解能で報告し, また, 2013年に1回閃光照射した中間体の構造を5.9 Å, 2014年に2回照射中間体の構造を4.5 Å, 3回照射して250 μ秒後の構造を4.5 Å, 500 μ秒後の構造を5.2 Å分解能で解析して報告した¹⁷⁻¹⁹⁾. これらに対してFrommeらのグループは2014年に光未照射のS_I構造を5.0 Å, 2回閃光照射後の構造を5.5 Å分解能で解析している²⁰⁾. しかし, 両グループから報告されたPSIIの構造は分解能が4.5 Åにとどまっており, PSII中のMn₄Caクラスターの無損傷構造や反応中間体の詳細の構造を解明するにはきわめて不十分であり, さらに報告された構造で矛盾する部分もあった²¹⁾. SFX法で得られるPSII結晶の分解能が低い原因は, PSII結晶の格子サイズが8 MÅ³にも及ぶので, 微小結晶では回折体積が小さくなり, 分解能が低くなること, さらにPSIIの微小結晶を作成するための結晶化条件が最適化されていなかったことが考えられる.

Mn₄CaO₅クラスターの高分解能無損傷構造を解析するため, 我々は1 mmを超える大型のPSII凍結結晶を用いて, 従来の振動回折法を適用したSF-ROX (serial femtosecond rotational crystallography) 法により放射線損傷のない回折データを取得した. この方法は平田らによるもので, 縦横1~3 μmのビームサイズを持つXFELの照射点から損傷が伝搬する距離は10 μmほどであり, 二つの照射点を50 μm程度離してXFELを照射すれば, 無損傷の回折データを得ることができるというものである²²⁾. しかし, この方法では1個の大型結晶から10枚~数十枚の回折イメージしか収集できないので, フルデータセットを収集するためには多数の結晶を用いる必要があった. このため, 同型性の高いPSII大型結晶を再現性よく大量に調製する必要があった. 筆者らは結晶化方法や抗凍結剤の条件や置換方法を

検討することによって, 同一の精製ロットから高い同型性を持つ結晶を再現性よく析出させる条件を確立し, 最終的に1492個の大型PSII結晶を調製し, そのうちの500個以上の結晶を用いて, 二つの回折データセットを収集した. この二つのデータセットはそれぞれ, 254個の結晶から5,592枚, 82個の結晶から2,058枚のイメージからなり, 両者ともシンクロトロンを用いて解析した結晶構造とほぼ同等の1.95 Å分解能で構造解析できた²³⁾.

上記の方法を用いて, XFELによって得られたMn₄CaO₅クラスターの構造を図4右に示す. この構造は放射光を用いて解析された結晶構造とよく似ているが, Mn-Mn間の距離の多くが0.1~0.2 Å短くなっていた(表1). これらの距離はほとんどの場合EXAFSや理論計算の結果と一致し, XFELによって無損傷のMn₄CaO₅クラスター構造が得られたことが示された. また, Mn-O距離の一部も短くなっていたが, Mn-Ca間の距離は放射光(SR)構造とXFEL構造でほとんど同じであった. これは, Mnイオンは放射光損傷による還元を受けるのに対して, CaイオンはII価であるので, 還元を受けないためであると考えられる.

SR構造で観察されたO5とMnとの特徴的な長い距離は, XFEL構造でも確認された. すなわち, XFEL構造では, Mn1-O5が2.7 Å, Mn3-O5が2.2 Å, Mn4-O5が2.3 Å, Ca-O5が2.5 Åとなっていた. したがって, O5は特徴的な位置にあり, 水分解・酸素発生における反応基質の一つである可能性があらためて示唆された. 言い換えれば, O5を含む領域がO=O結合が形成される反応部位であることになる.

これまでのSR構造を基にした理論計算からO5の化学種をO²⁻とした場合, O5はMn4, Mn1のいずれかに引き寄せられ, 右型構造あるいは左型構造(右型構造・左型構

表1 SR構造とXFEL構造におけるMn₄CaO₅クラスター中の原子間距離の比較

	Mn1-Mn2	Mn1-Mn3	Mn1-Mn4	Mn2-Mn3	Mn2-Mn4	Mn3-Mn4	
SR	2.8	3.3	5.0	2.9	5.4	3.0	
XFEL	2.7	3.2	5.0	2.7	5.2	2.9	
	Mn1-O1	Mn1-O3	Mn1-O5	Mn2-O1	Mn2-O2	Mn2-O3	Mn3-O2
SR	1.9	1.8	2.6	2.1	2.1	2.1	1.9
XFEL	1.8	1.9	2.7	1.8	1.8	2.0	1.9
	Mn3-O3	Mn3-O4	Mn3-O5	Mn4-O4	Mn4-O5	Mn4-W1	Mn4-W2
SR	2.1	2.1	2.4	2.1	2.5	2.2	2.4
XFEL	2.1	1.9	2.2	2.0	2.3	2.3	2.6
	Ca-Mn1	Ca-Mn2	Ca-Mn3	Ca-Mn4			
SR	3.5	3.4	3.4	3.8			
XFEL	3.5	3.3	3.4	3.8			
	Ca-O1	Ca-O2	Ca-O5	Ca-W3	Ca-W4		
SR	2.4	2.5	2.7	2.4	2.5		
XFEL	2.6	2.7	2.5	2.6	2.5		

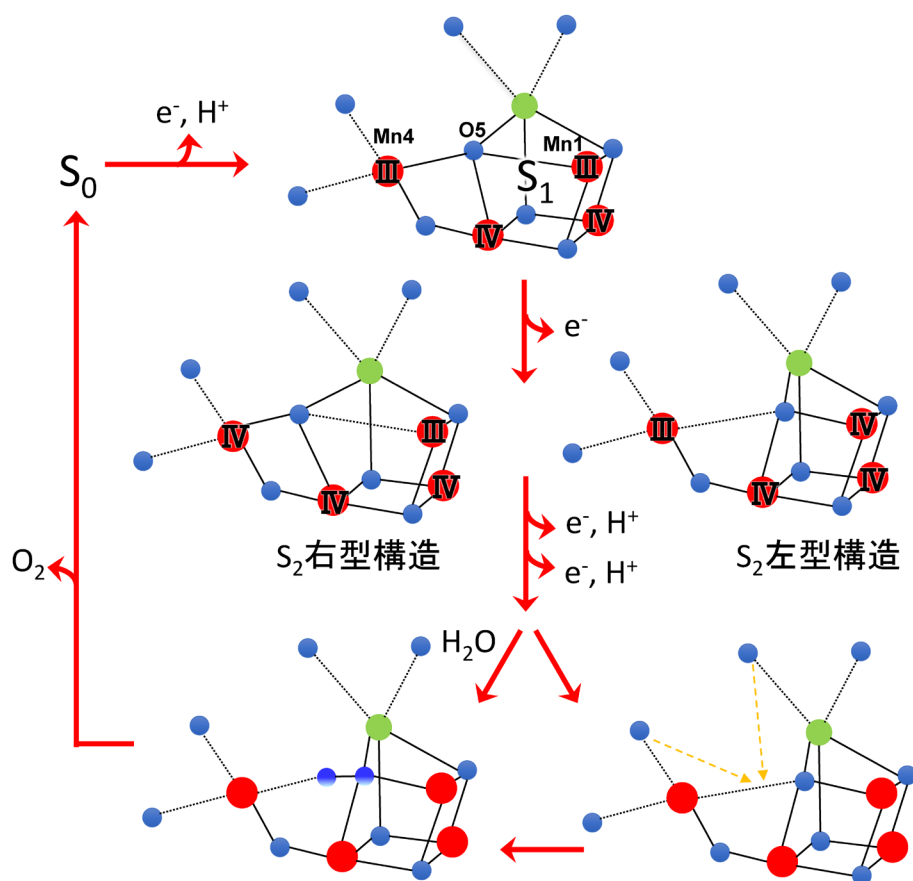


図5 無損傷構造から示唆される光化学系II複合体の反応機構

造については後述)になることがわかっており^{13-15, 24-28)}, XFEL構造でみられたような長いオキシ結合は再現できない。一方, O5の化学種を OH^- とするとオキシ結合は長くなり, XFEL構造でみられた特徴をある程度反映する^{24, 25, 29, 30)}。これらの結果に基づき筆者らは S_1 状態でO5が OH^- であり, なおかつMn1とMn4がそれぞれ+3の価数を持っており, Mn1-O5とMn4-O5の方向にMn(III)のヤーン・テラー軸が存在することでO5の長い結合距離が現れることを提案した^{23, 31)}。この提案は ^{55}Mn -電子核スピン共鳴法³²⁻³⁴⁾と理論計算によって示された, S_2 状態でMn1が+3の価数である結果と一致する^{29, 30, 35)}。

上記で決定した S_1 状態の無損傷構造とO5の化学種が OH^- で基質分子の一つである可能性が高いことから水分解反応機構の提唱を試みた(図5)^{23, 31)}。 S_1 状態でMn1とMn4が同じ+3の価数を持ち, ヤーン・テラー効果によりMn1-O5とMn4-O5の結合距離が長いことから出発して, 電子が引き抜かれ S_2 状態になると, Mn1かMn4のいずれかが+4の価数を持つことになり, O5は一方のMnイオンの正の電荷が高くなったこととヤーン・テラー軸の消失により, +4の価数を持つMn側に引き寄せられるようになる。このときMn4が+4になればO5はMn4側に引き寄せられ Mn_3CaO_4 のキューバン部分は開いた構造をとり, その結果Mn1側にスペースができる(O5の右にスペースができるので右型構造と呼ばれる)^{27, 36)}。逆にMn1が+4にな

ればO5はMn1側に引き寄せられ, キューバンの閉じた左型構造となる。続く S_3 状態, S_4 状態ではこの開いたスペースにもう一つの水分子が入りO5と $O=O$ 結合を作る(この新たに挿入される水分子についてはMn4とCaのリガンドとして存在しているO5の近傍の水分子W2, W3か, それともまったく別の水分子なのかは不明であるので, 図5では両方の可能性を示している)。生成された酸素分子が排出されOECが S_0 状態に戻る過程で, 新たな水分子がO5の位置へ取り込まれる。続く S_0 状態から S_1 状態への遷移に伴い, 水分子からプロトンが抜き取られてO5は OH^- となり, 反応開始状態に戻る。これらの一連の反応機構は一部の理論計算の結果や最近のEPR測定の結果とも大方で一致している^{27, 34, 35, 37-39)}。

6. X線自由電子レーザーを用いた光化学系IIの反応中間体の構造解析

これまでのSRによる高分解能構造解析やXFELを用いた無損傷構造解析の結果から水分解反応の機構を推定したが, この推定は, 反応開始前の S_1 状態に基づいたもので, 実際の反応機構や新たに取り込まれる水分子がどこに挿入されるかなどの詳細は, S 状態遷移の中間体の構造を解析しなければわからない。筆者らは, 2015年にPSIIの無損傷 S_1 状態の結晶構造を発表した前後から反応中間体の構

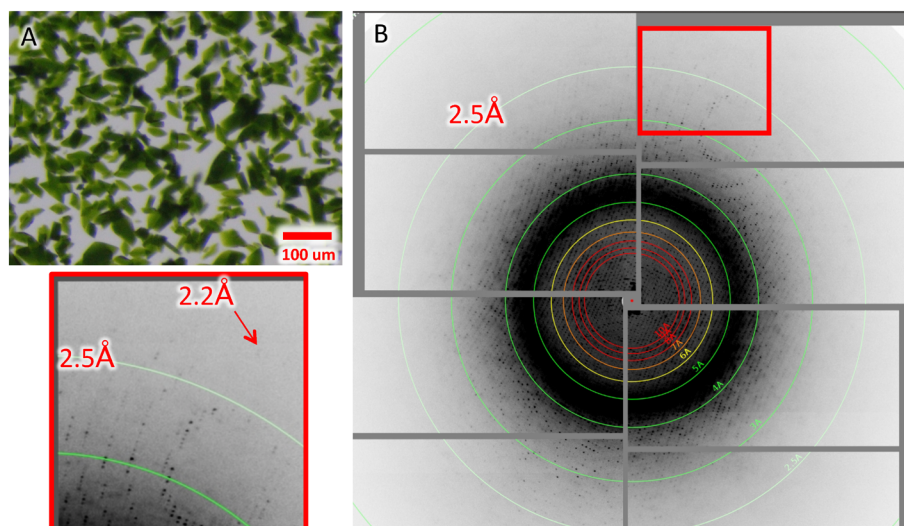


図6 PSIIの微小結晶(A)とXFEL-SFX法による回折イメージ(B)

造解析に取り組んだ。前述したように世界では、米国の二つのグループを中心とするPSIIの反応中間体の構造解析について激しい競争が繰り広げられていたが、これまで報告された構造の最高分解能は4.5 Åにとどまり、反応機構の解明にはきわめて不十分であった。筆者らは当初、大型PSII結晶を用いたSF-ROX法と室温での光照射–低温トラップ法を組み合わせ、反応中間体の構造を解明しようと試みたが、解析した構造で変化はみられなかった。これは、大きな結晶ではクロロフィル由来の吸収が強いために光が十分透過できず、結晶表面でしか励起されず、中間体の生成効率が低かったことに起因すると考えられた。そこで、PSII微小結晶を用いたSFX法による中間体の構造解析を始めた。しかし、結晶を小さくすることで分解能が著しく低下したことや、フルデータセットを収集するのに大量の精製タンパク質が必要になるなど、いくつもの困難を克服する必要があった。

まず、SFX法を用いたポンプ–プローブ実験では1回あたり1gを超える精製タンパク質を必要としたため、細胞の培養スケールを60Lから最終的に180Lまで増やし、一度に得られる精製PSII二量体のタンパク質量を50~100mgから300~400mgに改善した。次に、PSIIの微小結晶を簡便かつ再現性よく得られる方法を検討し、1.5mLのチューブにPSII溶液と沈殿剤を等量混合し、20°Cでインキュベートすることで安定供給ができるシステムを確立した。また、結晶のサイズは、レーザー照射によって結晶中のPSIIが十分に励起されるように100μm以下に調整した(図6A)。結晶の分解能は、結晶化後の溶液組成を詳細に検討し、抗凍結剤への置換処理時間を厳密に制御することで改善した。さらに並行して、微小結晶内のPSIIの反応効率を改善する溶液条件を検討し、S状態の遷移効率が十分得られるような条件を確立した。このように、問題点を一つ一つ解決していき、最終的に2.2 Åを超える回折点を与える微小結晶の調製に成功した(図6B)。

SFXの実験では、暗室でPSII微小結晶の抗凍結剤置換処理と真空グリースとの混合を行い⁴⁰⁾、高粘度キャリアインジェクターへ装着した後、連続X線回折実験プラットフォーム DAPHNIS (diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA) の試料チャンバー⁴¹⁾にセットし、光励起なしでは2.8μL/minの流速で微小結晶を流し、XFELを照射することで回折イメージを収集した。2回閃光照射の場合は、XFELの上流に波長532nmのYAGレーザーを2台配置し、励起効率を向上させるためにそれぞれのレーザーからの光を二つに分け、二つの方向から閃光照射を行った。まず1台目のレーザーから1回閃光照射し、その10ms後に2台目のレーザーから2回目の閃光照射を行い、さらにその10ms後にXFELが照射されるようにシステムを構築した⁴²⁾。PSII微小結晶を混ぜた真空グリースの流速を5.6μL/minに設定し、2回閃光照射によるポンプ–プローブ実験で回折イメージを収集した。その結果、光励起なしのS₁状態では合計408,071枚のイメージが得られ、そのうちの18.6%に相当する76,047枚のイメージに回折点の確認され、15.9%の64,985枚のイメージが指数づけされ、最終的に6.7%にあたる27,497枚のイメージを用いて構造解析を行った。2回閃光照射の2F(S₃)状態(後述)では合計273,550枚のイメージが得られ、そのうちの22.3%にあたる60,885枚に回折点の確認され、18.8%の51,482枚のイメージが指数づけされ、最終的に7.9%にあたる21,680枚のイメージを用いて構造解析した⁴³⁾。光未照射、2F照射のいずれのデータについても分解能2.35 Åで解析した。

PSIIの微小結晶中のS状態遷移効率は、全反射フーリエ変換赤外分光法 (attenuated total reflection Fourier transform infrared spectroscopy : ATR-FTIR) による測定で見積もった^{44, 45)}。閃光なし、1回閃光照射、2回閃光照射の赤外吸収スペクトルを測定し、S₁→S₂遷移およびS₂→S₃遷移に伴う赤外吸収スペクトルの変化を差スペクトルとして評価

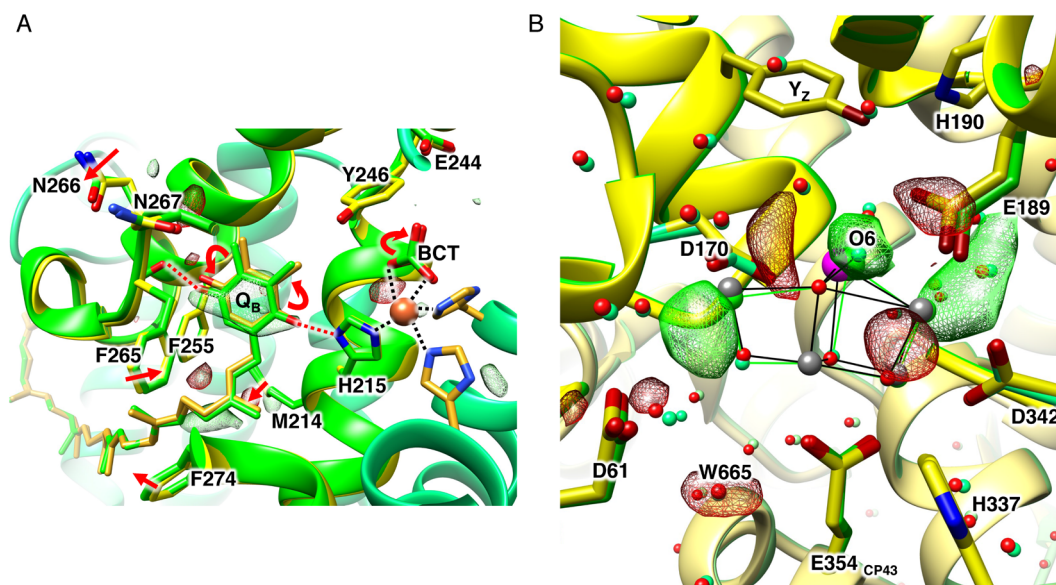


図7 2発閃光照射による光化学系II複合体の構造変化
(A) Q_B とその周辺の構造変化, (B) Mn_4CaO_5 クラスターとその周辺の構造変化.

した. その結果, PSII微結晶から得られた差スペクトルはPSIIの溶液試料から得られたものとほぼ同形状であり, それぞれの遷移に伴う特徴的なスペクトルを示していた. これは, 結晶内でもPSIIが S_3 状態まで遷移していることを示している. この差スペクトルのピーク強度から反応効率を計算し, 2回閃光照射後46%の S_3 状態が生成されることがわかった⁴³⁾. しかし, 同時に S_1 , S_2 が混在していることも示唆されたため, この状態を2F状態と呼ぶことにする.

2F状態のPSIIの結晶構造と S_1 状態を比較したところ, 構造全体のRMSDはわずか0.10 Åであり, よく類似していることがわかった. そこで, 2F状態と S_1 状態の回折データを用いて同型差フーリエ電子密度マップを計算したところ, 酸素発生中心と電子受容体の Q_B の周囲で顕著な差フーリエ電子密度がみられ, これらの領域で明らかな構造変化が起こったことがわかった. これは, 2回閃光照射による S_1 から S_3 状態への遷移において, 電子供与体側と受容体側で起きた酸化還元反応とプロトン移動により構造が変化したことを意味する.

電子受容体である Q_B はパラベンゾキノンジメチル置換体の頭部にイソプレノイド鎖が連結した構造をしており, D1サブユニットのストロマ側に結合している. キノン頭部のC=O基はD1のHis215とSer264と水素結合を形成し, イソプレノイド鎖はD1のPhe211, Met214, Phe255, Phe265, Phe274, D2に結合しているフェオフィチン, 脂質分子などに囲まれた疎水的環境にある. これまでに報告された S_1 状態の結晶構造中の Q_B は熱振動の指標となる温度因子の値が高いことから, プロトン化状態の異なるものが存在している可能性や Q_B が動きやすい環境にあることが推測されていた. 今回得られた2F状態と S_1 状態の差電子密度および結晶構造を比較すると, キノン頭部はベンゼン環に垂直な軸方向に約10度回転し, C=O基とHis215,

Ser264との距離が0.1~0.2 Å短くなり水素結合が強化された(図7A). これにより, キノン頭部の温度因子は116 Å²から91 Å²に減少し, 安定化した. この水素結合の強化とキノン頭部の安定化は, Q_B の還元によりマイナス電荷を帯びようになるためと考えられる. また, キノン頭部の構造変化はイソプレノイド鎖をシフトさせ, それに適應するためにイソプレノイド鎖を取り囲んでいるPhe211, Met214, Phe255, Phe265, Phe274もそれぞれわずかに位置をシフトさせた. そしてこれらの疎水的環境が変化することにより, S_1 状態では Q_B を周囲の溶媒環境から遮蔽しているAsn266, Asn267を含むループ領域部分が0.8 Å程度構造変化し, キノンがPSIIの外部に出ていくためのルートと思われる領域が一部開かれるようになった. 加えて, 非ヘム鉄に配位している重炭酸イオンおよびその近傍でも構造変化が観察され, Q_B をプロトン化するためのプロトンがTyr246やGlu244, D2-Lys264を含めた経路を通ること, 重炭酸イオンもこのプロトン移動に関与していることが示唆された.

Mn_4CaO_5 クラスターとその周辺において, 2F状態と S_1 状態の同型差フーリエ電子密度マップおよびそれぞれの原子構造を比較すると以下の六つの顕著な構造変化がみられ, それらは水分解の反応機構をうまく説明するものである. 1) Mn_4 がわずかに酸素発生中心のキューバン部分から離れるよう外側にシフトし, Mn_4 と Mn_1 との距離は0.1~0.2 Å長くなった. 2) キューバン部分を構成する Ca^{2+} が Mn_4 から離れるように動いた. 3) 差フーリエ電子密度図において, O5の近傍に強い正の電子密度が現れ, 新たな水に対応する酸素原子としてO6がアサインされた. 4) Glu189がキューバン部分から遠ざかり, O5と Mn_1 の間にO6を収容できるスペースが現れた. 5) W665と呼ばれる水分子の位置でマイナスの差フーリエ電子密度が表れ, こ

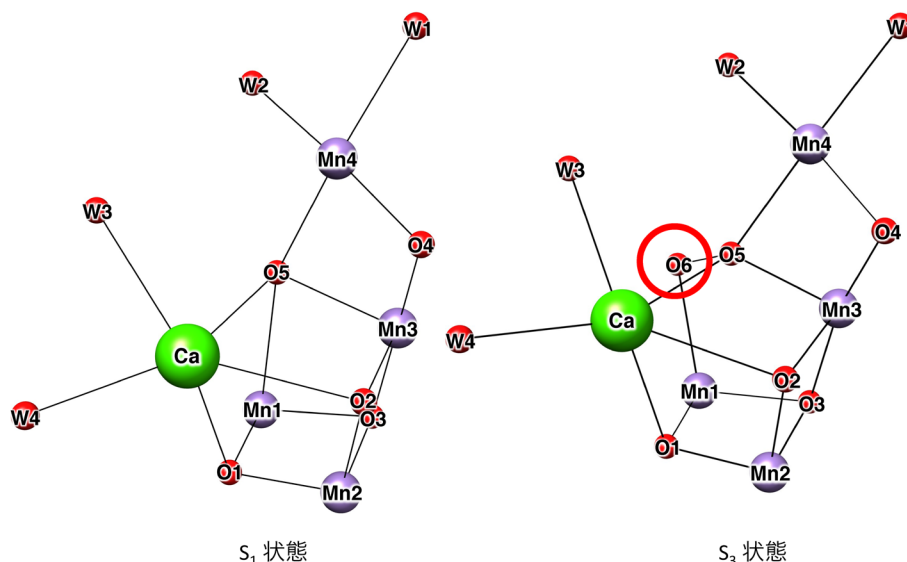


図8 O6が挿入されたMn₄CaO₆クラスターの構造

の水分子の移動性が増え、本来の位置からシフトしたことが示唆された。これにより、オキソ原子O4を基点とし、PSII複合体の表面につながる15 Åにも及ぶ長い水素結合ネットワークが遮断された。6) 以上の構造変化に伴い、Mn₄CaO₅クラスターの配位子であるAsp61, Asp170, His332, Ala344の位置がわずかにシフトした(図7B)。

上記の構造変化のうち、水分解の反応機構に特に重要なのは新しい水分子O6の挿入である。この新たな水分子は基質の候補とされているO5から1.5 Åの位置に挿入され、O5との間でO=O結合を作るのに適した位置にある(図8)。これはO5とO6が酸素発生の部位であることを強く示唆するものであり、S₁状態からS₃状態への遷移に伴い、O6の挿入により酸素発生中心はMn₄CaO₅からMn₄CaO₆クラスターへと構造変化したことを示している。O5とO6による酸素分子の形成という反応機構は、S₁状態の結晶構造や無損傷構造で発見された“歪んだ椅子”内のO5の特異な環境に基づいて提案された反応機構^{23, 29-31)}や、一部の理論計算^{35, 37, 38)}や電子スピン共鳴実験の結果³⁴⁾による提案とも大方で一致している。

7. おわりに

2001年にPSIIの結晶構造が初めて報告されてから16年が経っているが、PSIIの構造解析と水分解反応の機構に関する研究について依然激しい競争が続いている。そのような中、我々は開始状態のS₁と2閃光照射によって遷移したS₃状態の構造を報告し、反応機構の核心に迫る重要な知見を得ることができた。しかし、反応機構の全貌解明のためには他の中間体状態(S₀, S₂, S₄状態)の高分解能構造情報が不可欠である。今後、XFELを利用したポンプ・プローブ実験を継続し、PSIIによる水分解反応の全貌を解明したい。このように解析されたPSIIの水分解反応触媒の構造

と反応機構が、可視光を利用した水分解人工触媒の合成にヒントを与え、クリーンで再生可能なエネルギー源の獲得を目指す人工光合成研究に役立つことができれば本望である。

謝辞

本研究におけるXFELを利用したPSIIの無損傷構造解析は理研・放射光研究センターの吾郷日出夫・山本雅貴博士らのグループとの共同研究であり、SFX法を用いたポンプ・プローブ実験による反応中間体の構造解析は、京都大学岩田想教授グループの菅原道泰博士ら、理研放射光研究センターの久保稔博士らとの共同研究である。また、FTIRによるS状態遷移の効率評価は名古屋大学の野口巧博士、加藤祐樹博士との共同研究である。この場を借りてお礼を申し上げる。本研究は科学研究費(26840023, 16H06162)、特別推進研究、若手(B)、若手(A)、JST さきがけ(JPMJPR16P1)、第27回加藤記念研究助成、2016年度旭硝子財団研究助成およびX線自由電子レーザー重点戦略研究課題等の支援を受けて行われたものである。

文 献

- 1) Joliot, P., Barbieri, G., & Chabaud, R. (1969) *Photochem. Photobiol.*, **10**, 309–331.
- 2) Kok, B., Forbush, B., & McGloin, M. (1970) *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457–475.
- 3) Nakazato, K., Toyoshima, C., Enami, I., & Inoue, Y. (1996) *J. Mol. Biol.*, **257**, 225–232.
- 4) Rhee, K.H., Morris, E.P., Barber, J., & Kuhlbrandt, W. (1998) *Nature*, **396**, 283–286.
- 5) Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., & Orth, P. (2001) *Nature*, **409**, 739–743.
- 6) Kamiya, N. & Shen, J.-R. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 98–103.
- 7) Ferreira, K.N., Iverson, T.M., Maghlaoui, K., Barber, J., & Iwata,

- S. (2004) *Science*, **303**, 1831–1838.
- 8) Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., & Biesiadka, J. (2005) *Nature*, **438**, 1040–1044.
- 9) Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., & Saenger, W. (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 334–342.
- 10) Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R., & Kamiya, N. (2011) *Nature*, **473**, 55–60.
- 11) Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M.J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A., & Yachandra, V.K. (2006) *Science*, **314**, 821–825.
- 12) Dau, H., Grundmeier, A., Loja, P., & Haumann, M. (2008) *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B*, **363**, 1237–1244.
- 13) Ames, W., Pantazis, D.A., Krewald, V., Cox, N., Messinger, J., Lubitz, W., & Neese, F. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 19743–19757.
- 14) Luber, S., Rivalta, I., Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.R., Kamiya, N., Brudvig, G.W., & Batista, V.S. (2011) *Biochemistry*, **50**, 6308–6311.
- 15) Galstyan, A., Robertazzi, A., & Knapp, E.W. (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 7442–7449.
- 16) Neutze, R., Wouts, R., van der Spoel, D., Weckert, E., & Hajdu, J. (2000) *Nature*, **406**, 752–757.
- 17) Kern, J., Alonso-Mori, R., Hellmich, J., Tran, R., Hattne, J., Laksmono, H., Glockner, C., Echols, N., Sierra, R.G., Sellberg, J., Lassalle-Kaiser, B., Gildea, R.J., Glatzel, P., Grosse-Kunstleve, R.W., Latimer, M.J., McQueen, T.A., DiFiore, D., Fry, A.R., Messerschmidt, M., Miahnahri, A., Schafer, D.W., Seibert, M.M., Sokaras, D., Weng, T.C., Zwart, P.H., White, W.E., Adams, P.D., Bogan, M.J., Boutet, S., Williams, G.J., Messinger, J., Sauter, N.K., Zouni, A., Bergmann, U., Yano, J., & Yachandra, V.K. (2012) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 9721–9726.
- 18) Kern, J., Alonso-Mori, R., Tran, R., Hattne, J., Gildea, R.J., Echols, N., Glockner, C., Hellmich, J., Laksmono, H., Sierra, R.G., Lassalle-Kaiser, B., Koroidov, S., Lampe, A., Han, G., Gul, S., DiFiore, D., Milathianaki, D., Fry, A.R., Miahnahri, A., Schafer, D.W., Messerschmidt, M., Seibert, M.M., Koglin, J.E., Sokaras, D., Weng, T.C., Sellberg, J., Latimer, M.J., Grosse-Kunstleve, R.W., Zwart, P.H., White, W.E., Glatzel, P., Adams, P.D., Bogan, M.J., Williams, G.J., Boutet, S., Messinger, J., Zouni, A., Sauter, N.K., Yachandra, V.K., Bergmann, U., & Yano, J. (2013) *Science*, **340**, 491–495.
- 19) Kern, J., Tran, R., Alonso-Mori, R., Koroidov, S., Echols, N., Hattne, J., Ibrahim, M., Gul, S., Laksmono, H., Sierra, R.G., Gildea, R.J., Han, G., Hellmich, J., Lassalle-Kaiser, B., Chatterjee, R., Brewster, A.S., Stan, C.A., Glockner, C., Lampe, A., DiFiore, D., Milathianaki, D., Fry, A.R., Seibert, M.M., Koglin, J.E., Gallo, E., Uhlig, J., Sokaras, D., Weng, T.C., Zwart, P.H., Skinner, D.E., Bogan, M.J., Messerschmidt, M., Glatzel, P., Williams, G.J., Boutet, S., Adams, P.D., Zouni, A., Messinger, J., Sauter, N.K., Bergmann, U., Yano, J., & Yachandra, V.K. (2014) *Nat. Commun.*, **5**, 4371.
- 20) Kupitz, C., Basu, S., Grotjohann, I., Fromme, R., Zatsepin, N.A., Rendek, K.N., Hunter, M.S., Shoeman, R.L., White, T.A., Wang, D., James, D., Yang, J.-H., Cobb, D.E., Reeder, B., Sierra, R.G., Liu, H., Barty, A., Aquila, A.L., Deponte, D., Kirian, R.A., Bari, S., Bergkamp, J.J., Beyerlein, K.R., Bogan, M.J., Coleman, C., Chao, T.-C., Conrad, C.E., Davis, K.M., Fleckenstein, H., Galli, L., Hau-Riege, S.P., Kassemeyer, S., Laksmono, H., Liang, M., Lomb, L., Marchesini, S., Martin, A.V., Messerschmidt, M., Milathianaki, D., Nass, K., Ros, A., Roy-Chowdhury, S., Schmidt, K., Seibert, M., Steinbrener, J., Stellato, F., Yan, L., Yoon, C., Moore, T.A., Moore, A.L., Pushkar, Y., Williams, G.J., Boutet, S., Doak, R.B., Weierstall, U., Frank, M., Chapman, H.N., Spence, J.C.H., & Fromme, P. (2014) *Nature*, **513**, 261–265.
- 21) Sauter, N.K., Echols, N., Adams, P.D., Zwart, P.H., Kern, J., Brewster, A.S., Koroidov, S., Alonso-Mori, R., Zouni, A., Messinger, J., Bergmann, U., Yano, J., & Yachandra, V.K. (2016) *Nature*, **533**, E1–E2.
- 22) Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yano, N., Takemura, S., Kato, K., Hatanaka, M., Muramoto, K., Kawahara, T., Tsukihara, T., Yamashita, E., Tono, K., Ueno, G., Hikima, T., Murakami, H., Inubushi, Y., Yabashi, M., Ishikawa, T., Yamamoto, M., Ogura, T., Sugimoto, H., Shen, J.R., Yoshikawa, S., & Ago, H. (2014) *Nat. Methods*, **11**, 734–746.
- 23) Suga, M., Akita, F., Hirata, K., Ueno, G., Murakami, H., Nakajima, Y., Shimizu, T., Yamashita, K., Yamamoto, M., Ago, H., & Shen, J.-R. (2015) *Nature*, **517**, 99–103.
- 24) Kanda, K., Yamanaka, S., Saito, T., Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., Kamiya, N., Okumura, M., Nakamura, H., & Yamaguchi, K. (2011) *Chem. Phys. Lett.*, **506**, 98–103.
- 25) Yamanaka, S., Isobe, H., Kanda, K., Saito, T., Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., Kamiya, N., Okumura, M., Nakamura, H., & Yamaguchi, K. (2011) *Chem. Phys. Lett.*, **511**, 138–145.
- 26) Yamanaka, S., Kanda, K., Saito, T., Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., Kamiya, N., Okumura, M., Nakamura, H., & Yamaguchi, K. (2012) *Adv. Quantum Chem.*, **64**, 121–187.
- 27) Isobe, H., Shoji, M., Yamanaka, S., Umena, Y., Kawakami, K., Kamiya, N., Shen, J.-R., & Yamaguchi, K. (2012) *Dalton Trans.*, **41**, 13727–13740.
- 28) Kurashige, Y., Chan, G.K.L., & Yanai, T. (2013) *Nat. Chem.*, **5**, 660–666.
- 29) Shoji, M., Isobe, H., Yamanaka, S., Suga, M., Akita, F., Shen, J.-R., & Yamaguchi, K. (2015) *Chem. Phys. Lett.*, **623**, 1–7.
- 30) Shoji, M., Isobe, H., Yamanaka, S., Suga, M., Akita, F., Shen, J.-R., & Yamaguchi, K. (2015) *Chem. Phys. Lett.*, **627**, 44–52.
- 31) Shen, J.-R. (2015) *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 23–48.
- 32) Rapatskiy, L., Cox, N., Savitsky, A., Ames, W.M., Sander, J., Nowaczyk, M.M., Rögner, M., Boussac, A., Neese, F., Messinger, J., & Lubitz, W. (2012) *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 16619–16634.
- 33) Cox, N., Rapatskiy, L., Su, J.H., Pantazis, D.A., Sugiura, M., Kulik, L., Dorlet, P., Rutherford, A.W., Neese, F., Boussac, A., Lubitz, W., & Messinger, J. (2011) *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 3635–3648.
- 34) Cox, N., Retegan, M., Neese, F., Pantazis, D.A., Boussac, A., & Lubitz, W. (2014) *Science*, **345**, 804–808.
- 35) Blomberg, M.R., Borowski, T., Himo, F., Liao, R.Z., & Siegbahn, P.E. (2014) *Chem. Rev.*, **114**, 3601–3658.
- 36) Pantazis, D.A., Ames, W., Cox, N., Lubitz, W., & Neese, F. (2012) *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 9935–9940.
- 37) Siegbahn, P.E. (2008) *Chemistry*, **14**, 8290–8302.
- 38) Siegbahn, P.E. (2009) *Acc. Chem. Res.*, **42**, 1871–1880.
- 39) Najafpour, M.M., Renger, G., Holyńska, M., Moghaddam, A., Aro, E.-M., Carpentier, R., Nishihara, H., Eaton-Rye, J.J., Shen, J.-R., & Allakhverdiev, S.I. (2016) *Chem. Rev.*, **116**, 2886–2936.
- 40) Sugahara, M., Mizohata, E., Nango, E., Suzuki, M., Tanaka, T., Masuda, T., Tanaka, R., Shimamura, T., Tanaka, Y., Suno, C., Ihara, K., Pan, D., Kakinouchi, K., Sugiyama, S., Murata, M., Inoue, T., Tono, K., Song, C., Park, J., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Yabashi, M., & Iwata, S. (2015) *Nat. Methods*, **12**, 61–63.
- 41) Tono, K., Nango, E., Sugahara, M., Song, C., Park, J., Tanaka, T., Tanaka, R., Joti, Y., Kameshima, T., Ono, S., Hatsui, T., Mizohata, E., Suzuki, M., Shimamura, T., Tanaka, Y., Iwata, S., &

- Yabashi, M. (2015) *J. Synchr. Rad.*, **22**, 532–537.
- 42) Kubo, M., Nango, E., Tono, K., Kimura, T., Owada, S., Song, C., Mafuné, F., Miyajima, K., Takeda, Y., Kohno, J., Miyauchi, N., Nakane, T., Tanaka, T., Nomura, T., Davidsson, J., Tanaka, R., Murata, M., Kameshima, T., Hatsui, T., Joti, Y., Neutze, R., Yabashi, M., & Iwata, S. (2017) *J. Synchr. Rad.*, **24**, 1086–1091.
- 43) Suga, M., Akita, F., Sugahara, M., Kubo, M., Nakajima, Y., Nakane, T., Yamashita, K., Umena, Y., Nakabayashi, M., Yamane, T., Nakano, T., Suzuki, M., Masuda, T., Inoue, S., Kimura, T., Nomura, T., Yonekura, S., Yu, L.J., Sakamoto, T., Motomura, T., Chen, J.H., Kato, Y., Noguchi, T., Tono, K., Joti, Y., Kameshima, T., Hatsui, T., Nango, E., Tanaka, R., Naitow, H., Matsuura, Y., Yamashita, A., Yamamoto, M., Nureki, O., Yabashi, M., Ishikawa, T., Iwata, S., & Shen, J.R. (2017) *Nature*, **543**, 131–135.
- 44) Noguchi, T. & Sugiura, M. (2002) *Biochemistry*, **41**, 2322–2300.
- 45) Suzuki, H., Sugiura, M., & Noguchi, T. (2005) *Biochemistry*, **44**, 1708–1718.

著者寸描

●秋田 総理 (あきた ふさみち)

岡山大学異分野基礎科学研究所准教授。博士 (理学)。

●菅 倫寛 (すが みちひろ)

岡山大学異分野基礎科学研究所准教授。博士 (理学)。

■略歴 2009年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了, 米国 Oregon Health & Science 大学博士研究員, 岡山大学大学院自然科学研究科特任助教, 同助教, 岡山大学異分野基礎科学研究所助教を経て2017年より現職。

■研究テーマと抱負 膜タンパク質の構造生物学。

●沈 建仁 (しん けんじん)

岡山大学異分野基礎科学研究所教授, 副所長。理学博士。

■略歴 1961年中国出身。90年東京大学大学院理学研究科博士課程修了。90~97年理化学研究所基礎科学特別研究員, 研究員。97~2003年理化学研究所播磨研究所前任研究員。03~15年岡山大学大学院自然科学研究科教授。16年より現職。

■研究テーマと抱負 光合成水分分解反応の機構解明, 膜タンパク質複合体の高分解能結晶化。