

立体構造解析に基づく光合成光化学系 II 複合体の機能解明

Elucidation of the functions of photosystem II based on its 3-dimensional structure analysis

岡山大学 沈 建仁

Okayama University Jian-Ren Shen

Photosystem II (PSII) is a membrane-protein complex consisting of 17 trans-membrane subunits and 3 peripheral, extrinsic subunits with a total molecular mass of 350 kDa for a monomer. PSII performs a series of light-induced electron transfer reactions, leading to the conversion of light energy into biologically useful chemical energy, coupled with this is the splitting of water and generation of molecular oxygen. Both the chemical energy converted and molecular oxygen generated by PSII are indispensable for sustaining life on the earth; thus PSII is an extremely important protein complex. The purpose of this study was to improve the resolution of PSII crystals, and analyze its structure at an atomic resolution. By extensive screening and optimization of sample purification procedures, crystallization conditions and cryoprotectant conditions, we succeeded in obtaining PSII crystals diffracted to a resolution of 1.9 Å, and analyzed its structure. The results revealed, for the first time, the detailed structure of Mn_4CaO_5 -cluster, which is the catalytic center of light-induced water-splitting. The high resolution structure also revealed the presence of a vast number of water molecules; some of which formed extensive hydrogen-bond networks that may be important for the function of PSII.

はじめに

光化学系 II (Photosystem II, PSII)は、藻類や緑色植物のチラコイド膜上に存在し、酸素発生型光合成において、光エネルギーを利用して水を酸素、プロトン、電子に分解する反応を触媒している膜タンパク質複合体である。水は地球上豊富にある安定な物質であるが、PSII ではとても簡単に分解されており、その仕組みは未だ明らかになっていない。しかし、PSII による水分解反応は、光エネルギーを生物が利用可能な化学エネルギーに変換する点、および酸素を産出する点で極めて重要である。水の分解によって生じる電子はチトクロム b_6/f 複合体、PSI を経由して $NADP^+$ の還元に使われる。また、プロトンはチラコイド膜のルーメン側に蓄積して、膜を隔てたプロトン濃度勾配の形で ATP 合成の駆動力を供給する。そして光合成にとって不要な副産物である酸素は、地球上の好氣的生物の生存に必要なだけでなく、オゾン層の形成・維持にも不可欠である。

PSII における水分解・酸素発生反応の機構を解明するため、これまで多くの研究が展開され、膨大な知見が蓄積されてきた。この反応の直接の触媒中心は4つの Mn と1つの Ca からなる Mn_4Ca クラスタであり、それが Kok サイクルと呼ばれる、 $S_0 \sim S_4$ の遷移状態を経て 2 分子の水を分解している。

これまでの膨大な研究にもかかわらず、PSII の水分解触媒中心である Mn_4Ca クラスタの詳細な構造は長い間不明であった。その最大の原因は、PSII が巨大な膜タンパク質複合体であり、そ

の高分解能結晶化が困難であることによる。ラン藻由来の PSII は 17 種の膜貫通サブユニットと 3 種の膜表在性（親水性）サブユニットを含む、総分子量が 350 kDa に及ぶ複合体であり、さらに二量体を形成して存在している。PSII の結晶化は、2001 年にドイツの Zouni らが好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus elongatus* を用いて初めて成功し、3.8 Å 分解能の構造を報告した (Zouni, A. et al. 2001, Nature 409, 739-743)。筆者らも近縁の好熱性ラン藻 *T. vulcanus* 由来の PSII の結晶化に成功し、2003 年にその構造を 3.7 Å 分解能で報告した (Kamiya and Shen, 2003, PNAS, 100, 98-103)。また、Barber・Iwata らは 2004 年に *T. elongatus* 由来の PSII 構造を 3.5 Å 分解能で報告し (Ferreira, K.N. et al. 2004, Science 303, 1831-1838)、Zouni らは 2009 年に 2.9 Å 分解能の構造を報告した (Guskov, A. et al. 2009, Nat. Struct. Mol. Biol. 16, 334-342)。これらの構造解析は PSII を構成する 20 サブユニットや多くの補欠因子の配置、及び PSII 電子伝達鎖の相対位置関係を明らかにしたが、水分解の触媒中心である Mn_4Ca クラスターの構造を解明するには分解能が不十分であった。また、 Mn_4Ca クラスターのアミノ酸配位子をすべて確定することもできなかった。

研究目的

本研究の目的は、PSII 結晶の分解能を向上させ、原子レベルで PSII の構造を解析し、水分解の触媒中心である Mn_4Ca クラスターや PSII の各種電子伝達体の詳細な構造を解明し、PSII における一連の電子伝達、水分解・酸素発生反応の機構を解明することである。そのため、これまで用いてきた好熱性ラン藻 *T. vulcanus* について、PSII の精製条件、結晶化条件、結晶の抗凍結剤置換条件をスクリーニングし、最適化する。得られた結晶については SPring-8 の放射光を利用して回折データを収集し、構造解析を行う。

研究結果と考察

I. 結晶の分解能の向上

PSII は巨大な膜タンパク質複合体であるため、その高分解能を与える結晶の作成が重要で困難な課題であった。好熱性ラン藻を材料に用いて、試料の精製条件、結晶化条件、及び結晶の抗凍結剤の置換条件の広範なスクリーニングと最適化の結果、SPring-8 の X 線を利用して 1.7 Å 分解能を超える回折スポット (Figure 1) を与える結晶の析出に成功した。この結晶を用いて、大阪市立大学神谷信夫教授グループの協力を得て最終的に 1.9 Å 分解能で PSII の構造を解析することに成功した。

II. PSII の全体構造

PSII は二量体として存在し、1.9 Å 分解能で解析された PSII 二量体の構造を Figure 2A で示した。図からわかるように、膜貫通部分が多く領域を占めているが、膜の両側、特にチラコイド膜のルーメン側に大きな親水性領域が存在する。高分解能で解析された PSII 構造の最大の特徴は、多くの水分子が見つかったことで、PSII 二量体あたりに 2795 個の水分子が同定された。同じ結晶を用いて、1.75 Å の波長で収集したデータを用いて解析した 2.5 Å 分解能の構造では、二量体あたり 862 個の水分子しか見つからなかったため、水分子の同定に高い分解能がいかに重要かが分かる。

PSII に結合している水のほとんどは、チラコイド膜のストロマ側表面とルーメン側表面という 2 つの層に分布しており、膜貫通領域にはわずかな水しか存在していない (Figure 2B)。これは膜タンパク質の一般的な特徴とも言えるが、PSII ではルーメン側に D1, D2, CP47, CP43 各サブユ

ニットの親水性ループや3つの表在性タンパク質からなる大きな親水性領域があり、より多くの水分子が分布している。これらの水分子のうち、 Mn_4Ca クラスターの配位子や水素結合ネットワークの形成に関与しているものもあり、PSIIにとって重要な機能の一部を担っている。

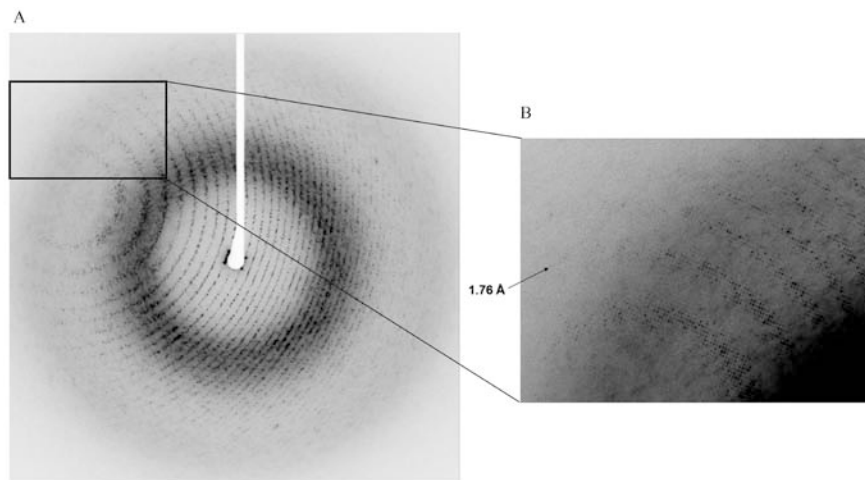


Figure 1. X-ray diffraction pattern of a PSII crystal taken at BL44XU of SPring-8, with a wavelength of 1.0 Å at 100 K. The right panel is an enlarged image of the boxed area in the left panel.

膜貫通領域は疎水性であり、水はほとんど存在しないとされていたが、PSIIの膜貫通領域にはいくつかの水分子が存在している。これらの水分子のほとんどはクロロフィルの配位子、あるいはその水素結合相手としてはたらいっている。クロロフィルのMgは通常、Hisなどのアミノ酸によって配位されるが、PSIIにある35分子のクロロフィルのうち、7分子は直接の配位アミノ酸を持っておらず、代わりに水分子が配位している。これらのクロロフィルには、直接配位する水分子以外に、さらに2つの水が近傍にあり、水素結合を形成している。従って、アミノ酸配位子を持っていないクロロフィル1個あたりに、3つの水分子が存在することになり、これらは膜貫通領域で見つかった水分子のほとんどを占めている。

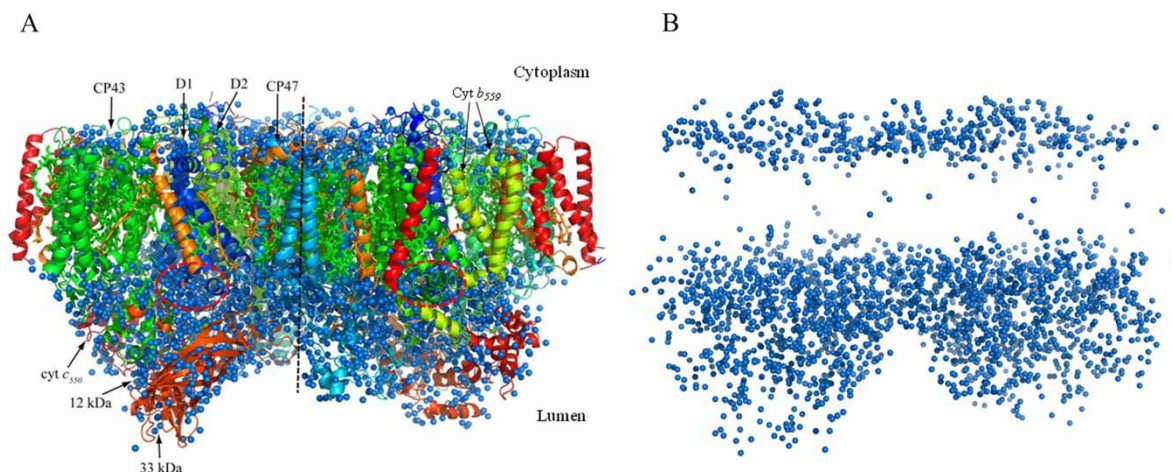


Figure 2. A. The overall structure of a PSII dimer viewed from a direction perpendicular to the thylakoid membrane. The red circles indicate the position of the Mn_4CaO_5 -cluster, and the blue balls represents the water molecules. B. Distribution of the water molecules in the PSII dimer.

III. Mn_4CaO_5 クラスターの構造

1.9 Å 分解能では、Mn, Ca イオンの電子密度がはっきり分かれており、それぞれの位置、およびそれらの間の距離をはっきりと決定することができた。金属イオン間をつないでいるオキソ酸素に対応する電子密度もはっきり確認することができ、4つのMn, 1つのCaをつないでいるのが5つの酸素原子で、全体が Mn_4CaO_5 という化学式であることが初めて明らかとなった (Figure 3)。

解析された Mn_4CaO_5 クラスター構造の最大の特徴は、ゆがんだ椅子型であると言える。このうち、3つのMn, 1つのCa, 4つのオキソ酸素が歪んだキューバン型のイスの座部を作り、4つ目のMnはキューバンの外側にあり、オキソ酸素を通してキューバンとつながっている (Figure 3)。

このようなゆがんだ形を作り出している要因は2つあり、1つはMn—O間とCa—O間の結合距離の違い、もうひとつは5つのオキソ酸素の間で、金属イオンとの結合距離に違いがあることである。Mn—Oの典型的な結合距離は1.8–2.1 Åであるが、それに対して、Ca—O間の結合距離は2.3–2.5 Åと明らかに長い、また、5つのオキソ酸素のうち、O5と金属イオンとの結合距離が2.4–2.7 Åで、他のオキソ酸素(O1–O4)と金属イオンとの結合距離より長くなっていた。このことは、5つのオキソ酸素のうち、特にO5は周りの金属イオンとの結合が弱くて切れやすい、言い換えれば、O5が高い反応性を有していることを示唆している。このような非対称的な構造は、水分解反応の触媒機構を考える上で重要な意味を持っているかもしれない。すなわち、水分解の触媒として働くためには、それ自身が反応の過程で構造変化を行うという構造上の「柔軟性」を備え持つ必要がある。 Mn_4CaO_5 クラスターがもし対称的で規則正しい構造を形成していれば、反応に伴う構造の変化が容易ではなく、触媒活性が発揮できないかもしれない。これは、水分解の人工触媒を合成する上でも重要な意味を持っており、水分解の人工触媒を得るには、非均一触媒 (heterogeneous catalysis あるいは asymmetric catalysis) の原理を応用した非対称構造を持つ化合物を見つけることが重要かもしれない。

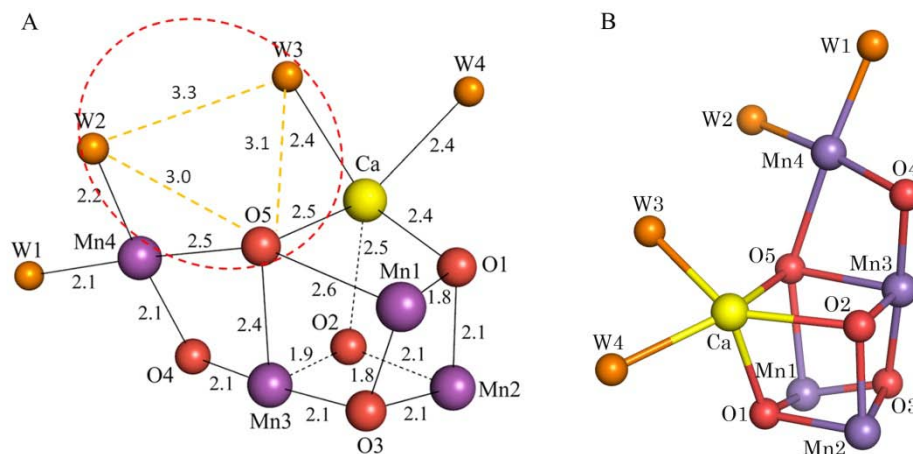


Figure 3. A. Structure of the Mn_4CaO_5 -cluster and the distances between each atom pairs (Å). W1–W4 represents the 4 water molecules, and the circle with red dotted line indicates possible area of water-splitting. Yellow dotted lines indicate hydrogen-bonds. B. Distorted chair form of the Mn_4CaO_5 -cluster, which was rotated relative to the orientation shown in panel A.

Mn_4CaO_5 クラスターには、4つの水分子が配位しており、そのうち、2つ(W1, W2)はキューバンの外側にあるMn4に、残りの2つ(W3, W4)はCaに結合している (Figure 3)。このことは、これら水分子のうちの一つまたは二つは水分解の基質としてはたらいっていることを示唆している。O5が

高い反応性を有していることを考えると、O—O結合が形成されるのは、O5付近である可能性が高い。4つの配位水のうち、W2とW3はO5と最も近く、それぞれO5と水素結合距離内にある。従って、O5、W2、W3のうちのどれか2つが水分解の基質としてはたらく、O—O結合を作っていることが示唆された。

IV. 水素結合ネットワーク

高分解能のPSII構造において、 Mn_4CaO_5 クラスターから複合体のルーメン側表面までをつなぐ水素結合ネットワークが複数個見つかると、プロトンの排出経路、あるいは基質水の進入経路としてはたらくしている可能性が示唆された。

水素結合ネットワークの1つは Y_z と呼ばれる、D1-Tyr161残基を経由したものである。 Y_z はPSIIの反応中心であるP680に電子を渡し、その代わりに Mn_4CaO_5 クラスターから電子を奪い取る役割を持っている。 Y_z はW4と直接、またはW3、さらにW1、W2とは別の水を経由して間接的に水素結合でつながっている (Figure 4A)。この水素結合ネットワークはD1-His190、D1-Asn298や他のいくつかの荷電/親水性アミノ酸、および水分子を経て、最終的にPsbVのC-末端に近いPsbV-Lys129残基からルーメン側の溶液に出ている。従って、プロトンはこのネットワークを経由して Mn_4CaO_5 クラスターからルーメン側溶液に排出される可能性がある。このネットワークは、 Y_z の電子伝達活性と連動していることから、PCET (proton-coupled electron transfer) パスとも呼ばれている。しかし、このパスが実際にプロトンの排出にはたらくしているかどうかはさらなる研究を待たなければならない。

もう1つ典型的な水素結合ネットワークの例は、 Mn_4 に結合している水分子の一つであるW2を起点として、D1-Asp61、Cl-1、及びいくつかの荷電/親水性アミノ酸、水分子によって構成され、最終的にルーメン側溶液に出ている (Figure 4B)。このうち、Cl-1は Mn_4CaO_5 クラスターの近傍で見つかった2つの塩素結合部位のうちの一つで、 Mn_4CaO_5 クラスターからの水素結合ネットワークの起点に近い位置にあり、プロトンチャンネルの構造維持に役立っているかもしれない。

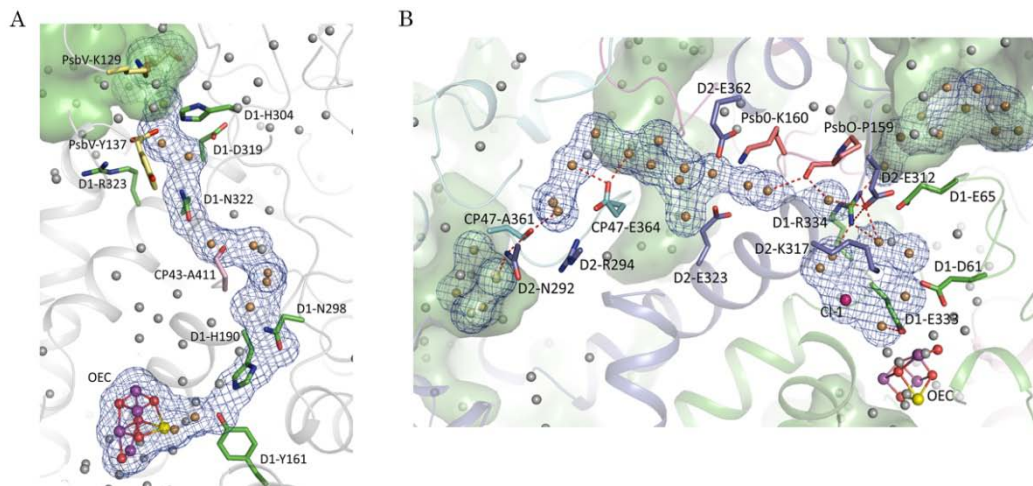


Figure 4. A. Hydrogen-bond network starting from the Mn_4CaO_5 -cluster through D1-Y161 (Y_z), to the lumenal bulk solution. B. Hydrogen-bond network starting from the Mn_4CaO_5 -cluster through Cl-1 to the lumenal bulk solution.

V. まとめ

これまで 2.0 Å を超える分解能で構造が解析された膜タンパク質の中で、PSII は最大のものである。これによって Mn₄CaO₅ クラスターの詳細な構造、水分子の存在位置、水素結合ネットワークなど多くの新しい知見が得られ、水分解・酸素発生の反応部位についても重要な情報が得られた。今後は水分解反応に伴う中間状態の構造解析や、各種変異体の構造・機能解析を組み合わせた手法でプロトンチャンネル、水チャンネルを明確に同定することで、PSII における水分解反応の詳細な機構を解明することが期待される。これによって、人工光合成による光エネルギーの高効率人工利用の実現が期待される。

研究発表

口頭発表 (国際学会の招待講演のみ)

1. Jian-Ren Shen (Invited): Mechanism of Photosynthetic water-splitting based on the structural analysis of photosystem II, Inaugural Conference on Molecular & Functional Catalysis (ICMFC-1), July 11-15, 2010, Singapore.
2. Jian-Ren Shen, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Nobuo Kamiya (invited): Crystal structure of oxygen evolving Photosystem II at an atomic resolution, 15th International Congress Of Photosynthesis (PS2010), August 22-28, 2010, Beijing, China.
3. Jian-Ren Shen, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Nobuo Kamiya (invited): Crystal structure of oxygen evolving photosystem II at an atomic resolution, The 70th Okazaki International Conference on Molecular mechanism of photosynthetic energy conversion: the present research and future prospects, December 4-6, 2010, Okazaki, Japan.
4. Shen J.-R. (Invited Main Lecture): Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution, Umeå Renewable Energy Meeting 2011, Umeå, Sweden, March 17-18, 2011.
5. Jian-Ren Shen (Opening Keynote Lecture): Atomic structure of PSII that enables photosynthetic water-splitting, Cordon Research Conference on Photosynthesis, Davidson, North Carolina, USA, June 12-17, 2011.
6. J.-R. Shen, Y. Umena, K. Kawakami, N. Kamiya (Plenary Lecture): Atomic structure of photosystem II that enables photosynthetic water-splitting, International Symposium on Activation of Dioxygen and Homogeneous Catalytic Oxidation, Okinawa, Japan, July 3-8, 2011.
7. Jian-Ren Shen, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami and Nobuo Kamiya (Plenary Lecture): Atomic structure of PSII that enables photosynthetic water-splitting, International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability", Baku, Azerbaijan, July 24 -30, 2011.
8. J.-R. Shen, Y Umena, K Kawakami, N Kamiya (Invited): Atomic structure of photosystem II that enables photosynthetic water-splitting, 5th Asia Oceania Conference on Photobiology (AOCP2011), Nara, July 30-Aug. 1, 2011.
9. Jian-Ren Shen (Plenary Lecture): Atomic structure of photosystem II that enables photosynthetic water-splitting, Botanikertagung 2011, International Botanical Congress of the Germany Botanical Society, Berlin, Germany, Sept. 18-23, 2011.
10. Shen J.-R. (Invited Lecture): Atomic structure of photosystem II that enables photosynthetic water-splitting, International Workshop on Photosystem II, Nov. 3-6, 2011, Chendu, China.

誌上発表

1. Kenji Takasaka, Masako Iwai, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, Yukari Ohmori, Masahiko Ikeuchi, Yuichiro Takahashi, Nobuo Kamiya, **Jian-Ren Shen** (2010) Structural and functional studies on Ycf12

- (Psb30) and PsbZ deletion mutants from a thermophilic cyanobacterium. *Biochim. Biophys. Acta*, 1797, 278-284.
- Nagao R, Suzuki T, Okumura A, Niikura A, Iwai M, Dohmae N, Tomo T, **Shen J.-R.**, Ikeuchi M, Enami I. (2010) Topological analysis of the extrinsic PsbO, PsbP and PsbQ proteins in a green algal PSII complex by cross-linking with a water-soluble carbodiimide. *Plant Cell Physiol.* 51, 718-727.
 - Ryo Nagao, Akira Moriguchi, Tatsuya Tomo, Ayako Niikura, Saori Nakajima, Takehiro Suzuki, Akinori Okumura, Masako Iwai, **Jian-Ren Shen**, Masahiko Ikeuchi and Isao Enami (2010) Binding and functional properties of five extrinsic proteins in oxygen-evolving Photosystem II from a marine centric diatom, *Chaetoceros gracilis*. *J. Biol. Chem.* 285, 29191-29199.
 - Tomoyasu Noji, Chihiro Kamidaki, Keisuke Kawakami, **Jian-Ren Shen**, Tsutomu Kajino, Yoshiaki Fukushima, Takeshi Sekitoh, and Shigeru Itoh (2011) Photosynthetic oxygen evolution in mesoporous silica material: Adsorption of photosystem II reaction center complex into 23-nm nanopores in SBA. *Langmuir*, 27, 705-713.
 - Keisuke Kawakami, Yasufumi Umena, Masako Iwai, Yousuke Kawabata, Masahiko Ikeuchi, Nobuo Kamiya, **Jian-Ren Shen** (2011) Roles of PsbI and PsbM in photosystem II dimer formation and stability studied by deletion mutagenesis and X-ray crystallography. *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 319-325.
 - Matsuoka H., **Shen J.-R.**, Kawamori A., Nishiyama K., Ohba Y., Yamauchi S. (2011) Proton-Coupled Electron-Transfer Processes in Photosystem II Probed by Highly Resolved g-Anisotropy of Redox-Active Tyrosine Y(Z). *J. Am. Chem. Soc.* 133, 4655-4660.
 - Kanda K., Yamanaka S., Saito T., Umena Y., Kawakami K., **Shen J.-R.**, Kamiya N., Okumura M., Nakamura H., Yamaguchi K. (2011) Labile electronic and spin states of the CaMn₄O₅ cluster in the PSII system refined to the 1.9 Å X-ray resolution. UB3LYP computational results. *Chem. Phys. Lett.* 506, 98-103.
 - Umena Y., Kawakami K., ***Shen J.-R.**, ***Kamiya N.** (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. *Nature*, 473, 55-60. (*corresponding authors)
 - Kawakami K., Umena Y., Kamiya N., **Shen J.-R.** (2011) Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution. *J. Photochem. Photobiol. B*, 104, 9-18.
 - Ivan Rivalta, Muhamed Amin, Sandra Lubner, Serguei Vassiliev, Ravi Pokhrel, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, **Jian-Ren Shen**, Nobuo Kamiya, Doug Bruce, Gary W. Brudvig, M. R. Gunner, and Victor S. Batista (2011) Structural-functional role of chloride in photosystem II. *Biochemistry*, 50, 6312-6315.
 - Sandra Lubner, Ivan Rivalta, Yasufumi Umena, Keisuke Kawakami, **Jian-Ren Shen**, Nobuo Kamiya, Gary W. Brudvig, and Victor S. Batista (2011) S1-state model of the O₂-evolving complex of photosystem II. *Biochemistry*, 50, 6308-6311.
 - S. Yamanaka, H. Isobe, K. Kanda, T. Saito, Y. Umena, K. Kawakami, **J.-R. Shen**, N. Kamiya, M. Okumura, H. Nakamura, K. Yamaguchi (2011) Possible mechanisms for the O-O bond formation in oxygen evolution reaction at the CaMn₄O₅(H₂O)₄ cluster of PSII refined to 1.9 Å X-ray resolution. *Chem. Phys. Lett.* 511, 138-145.
 - Saito K., Ishida T., Sugiura M., Kawakami K., Umena Y., Kamiya N., **Shen J.-R.**, Ishikita H. (2011) Distribution of the cationic state over the chlorophyll pair of photosystem II reaction center. *J. Am. Chem. Soc.* 133, 14379-14388.
 - Saito K., **Shen J.-R.**, Ishida T., Ishikita H. (2011) Short hydrogen bond between redox-active Tyrosine Y_Z and D1-His190 in the photosystem ii crystal structure. *Biochemistry*, 50, 9836-9844.