

研究課題別評価

1 研究課題名： 生体光エネルギー変換の分子機構—光化学系 II 複合体の構造と機能の解明及びその応用

2 研究者氏名： 沈 建仁

3 研究のねらい：

光合成光化学系 II (以下 PSII とする) はラン色細菌から高等植物までのチラコイド膜上に存在する、14-16 種の膜貫通サブユニットと 3 種の膜表在性サブユニットを含む分子量 350kDa の超分子複合体である。この複合体は太陽の光エネルギーを吸収し、一連の電子伝達反応を通して生物利用可能な化学エネルギーに変換し、同時に水を分解し分子状酸素を放出する。従って、PSII が生物エネルギーの固定と地球上酸素の供給と言う点で極めて重要な複合体である。本研究は、PSII 複合体を精製・結晶化し、その立体構造を X 線結晶構造解析法を用いて解明することにより、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詳細に解明することを目的とした。

4 研究の成果：

(1) PSII 複合体の精製・結晶化

PSII は膜貫通タンパク質と膜表在性(親水性)サブユニットを含む巨大複合体であるため、精製標品の安定性が大きな課題であったが、本研究では結晶化に必要な高い安定性と活性を持つ PSII を大量精製できる材料として、好熱性ラン色細菌 *Thermosynechococcus vulcanus* を選んだ。本研究者が従来開発した界面活性剤による可溶性・陰イオン交換カラムによる精製法を用いて PSII を精製し、結晶化を行った(図1)。得られた結晶の分解能は当初 3.7 Å であったが、本研究においてより高純度、高活性を有する PSII 標品を精製するため、界面活性剤による可溶性条件を最適化し、また、微量な夾雑物を除去するようイオン交換カラムによる精製条件を検討、最適化した。

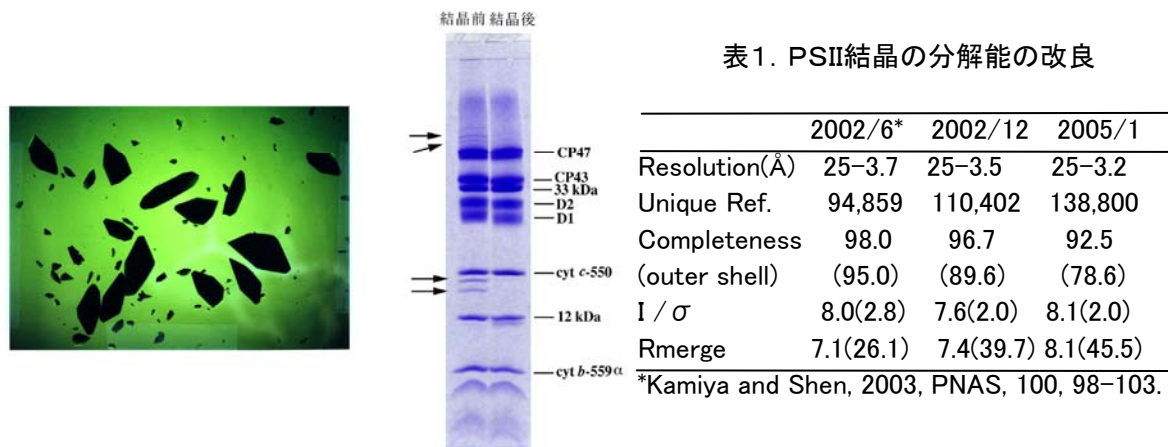


図1. PSII 複合体の結晶(左)とそのタンパク質組成(右)。矢印は結晶化前の標品に存在する夾雑物で結晶化より取り除かれたことを示す。

その結果、従来より高い酸素発生活性と純度をもつ PSII 標品を調整することができた。この標品を用いて結晶化条件の検討・改良を行い、特に結晶化方法を従来のマイクロ透析法からハンギング・ドロップ法に変更し、結晶析出に要する時間を2週間から2-3日間に短縮させ、これにより従来の結晶化法でPSIIの一部サブユニット(12kDa サブユニット)がプロテアーゼによる分解を受けていたという点を克服することができた。さらに結晶の凍結条件等を改良することにより、分解能を3.2Åに改善することに成功した(表1)。

(2) PSIIの構造解析

SPring-8の放射光を利用して重原子同型置換法により初期位相を決定し、得られた初期電子密度図を溶媒平滑法により改良し、構造解析を行った(図2)。PSIIは単量体あたり約2,800のアミノ酸残基を含んでいるが、そのうち主要な膜貫通サブユニットであるD1, D2, CP47, CP43、及び膜表在性タンパク質である33 kDa、チトクロム *c550*, 12 kDaの配列を含む約75%の2,100残基を同定し、残りをアラニンもしくはC α としてアサインした。このほか、36分子のクロロフィル、2分子のカロテノイド、4原子Mnを含むMnクラスター、2分子ヘム鉄、1分子非ヘム鉄、を同定し構造決定した。結晶分解能の向上に伴い、電子密度図を改良し、得られた構造に修正・改良を重ね、最終的に3.2-3.3 Å分解能の構造を得た。

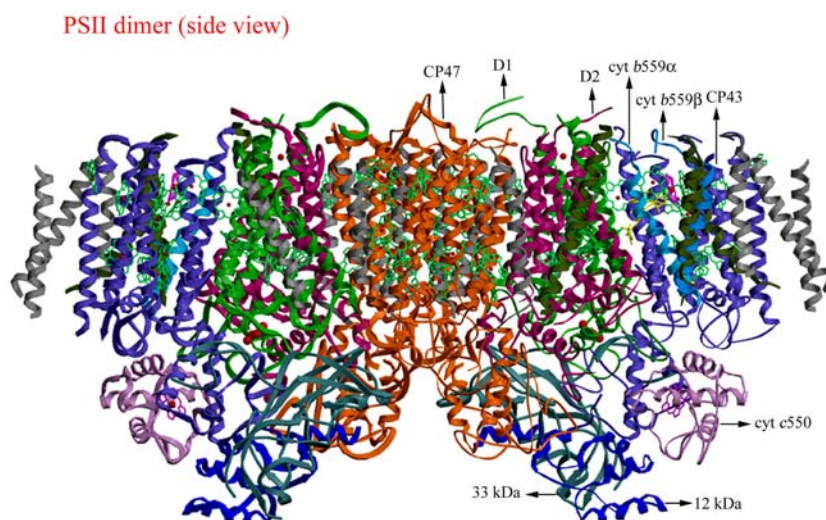


図2. チラコイド膜の側面から見たPSII二量体の結晶構造。

(3) PSIIの構造に基づく機能解明

PSIIの結晶構造からこれまで不明であった多くの機能的特徴を明らかにした。まず反応中心と呼ばれるD1, D2サブユニットの構造をより詳細に解明し、光エネルギーを直接吸収し励起するクロロフィル分子が四量体として存在するが、そのうち中心に位置する2つのクロロフィル分子がより近接しており、強い相互作用をしていることを明らかにした。PSII反応中心とD2サブユニットの近くに存在するチトクロム *b559*の間にカロテノイド分子が存在することを見つけ、このカロテノイド分子はチトクロム *b559*から反応中心への2次的電子伝達反応を仲介することでPSII複合体を過剰な光による傷害から保護していることを示した。さらに水分解・酸素発生反応を直接触媒しているMnクラスターの配置とその近傍に結合しMnクラスターを安定化している3つの膜表在性タンパク質の構造をすべて同定し、地球上最大の化学反応の一つである光合成水分解反応の機構に関する重要な知見を得た。

5 自己評価:

PSIIの標品精製法や結晶化条件・方法の改善により結晶の分解能を3.2 Åに向上させ、PSII構造モデルの改良を行った。これまでのPSII構造解析の結果を論文発表し、この研究分野に大きな

インパクトを与えたと言える。しかし、結晶構造の分解能を 3.0 Å 以上に向上させることで初めて真の原子レベルでの構造解析ができるので、その意味では本研究の結果は充分とは言えない。この分野の研究の進展は目覚しく、最近では別種のラン色細菌由来 PSII について不完全ではあるが 3.0 Å 分解能の構造が報告され、より高分解能を与える結晶の作製が求められる。さらに当初 PSII の各種変異体についても結晶化・構造解析を計画していたが、そのうちの数種について大量培養・精製を行った結果、充分よい結晶を与える変異体の PSII 標品を得ることができなかった。これは PSII が巨大な膜タンパク質複合体であるため、その Native な状態での精製が困難であることに由来しているが、PSII 複合体の構造形成と機能制御機構を完全に理解するためには、各構成サブユニットの機能をその欠失変異体の構造解析から解明することが必要であり、今後の重要な課題となっている。

6 研究総括の見解:

超分子複合体構造の解析精度を上げていくという、非常に困難で忍耐のいる仕事をきっちりと成し遂げた点、研究者としては感激的である。脚光を浴びる大成果ではないが、こういう粘り強い研究態度、姿勢がこの構造解析研究分野には必要であるという見本と評価している。構造研究の質は世界の一流に達しているの、今後は世界の関連研究者との交流や情報交換を一層積極的に行って、構造から機能へ向う研究でも世界のトップに立って欲しい。

7 主な論文等:

論文

1. Kamiya N. and Shen J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 98–103.
* 2006年2月10日現在の被引用回数: 286回。
2. Koulougliotis D., Shen J.-R., Ioannidis N. and Petrouleas V. (2003) Near-IR irradiation of the S₂ state of the water oxidizing complex of photosystem II at liquid helium temperatures produces the metalloradical intermediate attributed to S₁Y₂[•] *Biochemistry*, 42, 3045–3053.
3. Ohta H., Suzuki T., Ueno M., Okumura A., Yoshihara S., Shen J.-R. and Enami I. (2003) Extrinsic proteins of photosystem II: An intermediate member of the PsbQ protein family in red algal PSII. *Eur. J. Biochem.* 270, 4156–4163.
4. Weng J., Tan C.-Y., Shen J.-R., Yu Y., Zeng X.-M., Xu C.-H. and Ruan K.-C. (2004) pH-induced conformational changes in the soluble manganese stabilizing protein of photosystem II. *Biochemistry*, 43, 4855–4861.
5. Enami I., Suzuki T., Tada O., Nakada Y., Nakamura K., Tohri A., Ohta H., Inoue I. and Shen J.-R. (2005) Distribution of the extrinsic proteins as a potential marker for the evolution of photosynthetic oxygen-evolving photosystem II. *FEBS Journal*, 272, 5020–5030.

他9報

出版物

1. Yamamoto Y., Sakuma S. and Shen J.-R. Isolation of photosystem II-enriched membranes and the oxygen-evolving complex (OEC) subunit proteins from higher plants. In *Methods in Molecular Biology: Photosynthesis Protocols* (ed. by R. Carpentier), 274: 29–36. Humana Press, 2004.
2. Shen J.-R. and Kamiya N. 3D Crystal Structure of the Photosystem II Core, In *Photosystem II: The Light-Driven Water:Plastoquinone Oxidoreductase*, Edited by T.J. Wydrzynski and K. Satoh, pp. 449–4677, Springer, The Netherlands, 2005.
3. 神谷 信夫、沈 建仁: 光化学系 II 複合体の構造と機能、「蛋白質 核酸 酵素」、50, 1174–1179, 2005.

招待講演

1. Shen J.-R. and Kamiya N. (Plenary Lecture) Crystal structure of photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*. 11th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Tokyo (2003.8).
2. Shen J.-R. and Kamiya N. Functions of carotenoids and other pigments in photosystem II from a structural point of view. 10th Congress of the European Society for Photobiology, Vienna, Austria (2003.9).
3. Shen J.-R. Crystal structure of PSII from *Thermosynechococcus vulcanus*. 314th WE-Heraeus-Seminar: Water Oxidation in Photosynthesis, Bad Honnef, Germany (2003.11).
4. Shen J.-R., Naitow H., Kamiya N. (Plenary Lecture) Crystal structure of photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* and its functional implications. “Photosynthesis and Post-Genomic Era”, An International Satellite Meeting in conjunction with the 13th International Congress on Photosynthesis, Trios-Rivieres, Quebec, Canada (2004.8).
5. Shen J.-R. Functional analysis of photosystem II based on its three-dimensional structure. Japanese-Finnish Collaboration Seminar “Molecular Mechanisms of Regulation of Photosynthesis by Environments” and 7th Nordic Photosynthesis Congress. Turku, Finland (2004.11).

国際:他 2 件

国内:他 11 件

その他:国際学会発表:6件 国内学会発表:18件