

研究報告書

「光化学系 II 複合体の酸素発生反応の構造化学的手法による原理解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 23 年 10 月～平成 27 年 3 月

研究者: 梅名 泰史

1. 研究のねらい

植物や藻類の光合成による酸素発生は、葉緑体や藻類のチラコイド膜に存在する光化学系 II タンパク質(PSII)による水分解に由来している。PSII は 20 個のヘテロなサブユニットタンパク質と 120 個以上の補欠分子が結合した分子量 350kDa の膜タンパク質複合体となっており、チラコイド膜に二量体を形成して存在している。PSII は光合成の光エネルギーから電子への変換を担っており、作り出された電子は生体還元力のニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(NADPH)の生産に利用されている。また、水分解によって生じたプロトンはチラコイド膜内外に濃度勾配を作り出し、アデノシン三リン酸(ATP)の生合成に利用されている。これらの還元力 NADPH と生体エネルギー ATP は二酸化炭素の固定反応による炭水化物の生合成に利用されている。このことから、PSII は光合成の初期反応を担うタンパク質となっており、光合成を模倣するためには PSII の構造と機能の解明が不可欠となっている。

PSII 水分解反応の活性中心には、 Mn_4CaO_5 クラスターが触媒として存在しており、2011 年に本研究者らによる好熱性らん藻由来 PSII の 1.9 Å 分解能の結晶構造解析によって初めてその分子構造が明らかになった(Umena Y. *et al.*, *Nature*, 2011)。この原子レベル分解能の結晶構造により、触媒部位の詳細な立体配置と基質となる水分子の存在が明らかになったが、反応機構についてはまだ完全に解明されていない。反応機構を考える上で、4つの Mn 原子の酸化・還元状態を個別に理解することは、機構解明の大きな手がかりとなっている。

本研究は、Mn 金属原子の価数による X 線吸収能の違いに着目し、回折 X 線における X 線吸収効果を反映している異常分散項の電子密度マップ解析から、それぞれの Mn 原子の電子状態を特定し、 Mn_4CaO_5 クラスターの触媒としての役割を明らかにすることを目指している。また、反応が阻害される条件や、反応サイクルの中間状態にトラップさせた状態の PSII 結晶においても同様の分析を行い、立体構造の変化と Mn 金属原子の電子状態の変化から、多角的に反応機構の理解を目指している。これらの結果から、PSII で起こる光合成反応を人工的に利用するための手がかりを解明し、新たな人工光合成触媒の開発に貢献することを目指している。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では金属原子の X 線吸収能の違いを利用した新たな結晶構造解析手法を用いることで、周辺の立体構造情報と金属原子の酸化状態の違いを同時に分析することができる。従来の X 線吸収スペクトルによる 1 次元的な分析では、複数の金属原子を個別に分析することができない。また、タンパク質結晶構造解析は低分子化合物結晶ほどの精度が得られないため、結合長のヤーテラー効果に基づく価数の同定は難しい。本研究では、金属原子の酸

化状態によって X 線吸収能が急激に変化する吸収端がシフトすることに着目し、吸収端波長の X 線による回折強度測定を行い、X 線吸収に対応する異常分散項の異常分散項差電子密度マップを計算して分析に用いる。酸化数に応じたこの電子密度マップの大きさの違いから Mn_4CaO_5 クラスターの4つの Mn 原子の酸化数を個別に検証し、水分子とアミノ酸残基の配位構造から PSII における水分解を構造化学的に解明することを目指している。

これまで、Mn 原子の K-吸収端波長 1.8921 Å による 2.5 Å 分解能の結晶構造解析により、それぞれの Mn 原子を個別に分析できる異常分散項差電子密度マップが得られた。その結果、他の波長では電子密度マップに差異が小さいことに対して、K-吸収端波長においては明確な違いが得られた【図 1】。このことから、この方法がタンパク質結晶内の金属原子の価数を分析できる新たな手法になると考えられる。しかし、Yano らは X 線吸収スペクトル分析(XAFS)から PSII の Mn_4CaO_5 クラスターは X 線によって還元されることを報告している(Yano, J, et al., PNAS, 2005)。そのため、できるだけ低線量の X 線によるデータ収集を行い、自然状態に近い分析を行わなければならない。そのため研究テーマ A「 Mn_4CaO_5 クラスターの電子状態を解析する手法の確立」では PSII 結晶の調製の最適化と低線量測定に向けた問題解決を試みた。研究テーマ B「反応阻害によって反応サイクルが固定された状態の解析」では、多角的に Mn_4CaO_5 クラスターによる水分解反応を理解するために様々な条件下における分析を計画した。これらの研究を踏まえて研究テーマ C「反応中間体の電子状態と反応進行に伴う活性中心の構造変化の検証」の研究を計画し反応機構解明のため反応中間状態の分析を計画した。

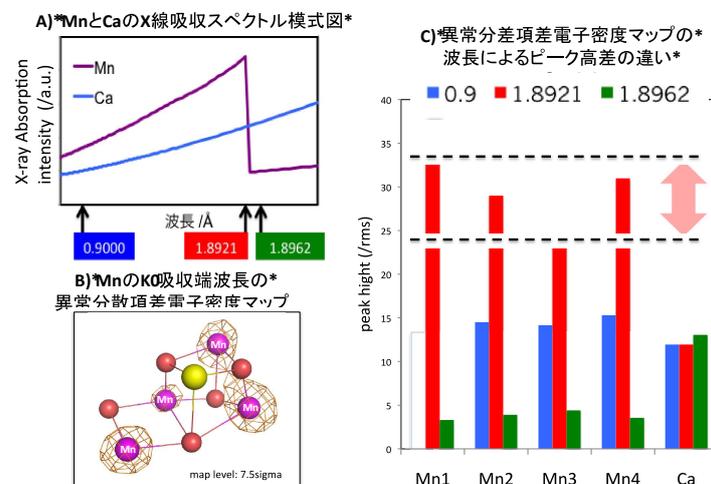


図 1. Mn_4CaO_5 クラスターに対する異常分散項差電子密度マップの X 線波長依存

(2) 詳細

研究テーマ A「 Mn_4CaO_5 クラスターの電子状態を解析する手法の確立」

本研究は結晶構造解析による分析をおこなうため、高品質な PSII 結晶を作り出す必要がある。そのため比較的安定に P 調製可能な好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus vulcanus* 由来の PSII を精製して結晶化試料とした。結晶化に向けたラン藻の大量培養には蛍光灯光源を取り付けたインキュベーターで 40L の大量培養を行い、連続回収ローターで濃縮した。細胞壁を

溶解処理して凍結破砕することで大量のチラコイド膜画分を効率良く得ることができた。チラコイド膜画分の初期可溶化には比較的安価な界面活性剤ラウリルジメチルアミン N-オキシド(LDAO)を用い、次段階に N-ドデシル-β-D-マルトシド(β-DDM)を用いる多段階の可溶化操作により、大量の粗精製を経済的に行うことができた。精製試料は低温暗所にて陰イオン交換カラムクロマトグラフィーで精製試料を調製し、結晶化試料には低分子量の界面活性剤存在下で結晶化操作を行い、そこで得られた結晶を融解させて純度の高い最終試料とした。結晶化にはポリエチレングリコール(PEG)を沈殿剤として用い、オイルで封入するバッチ結晶化法を行うことで同質性の高い結晶調製を目指した。

<可視光によるPSII結晶の輪郭画像> & <近赤外線顕微鏡による透過画像>

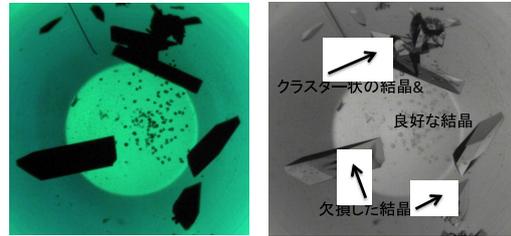
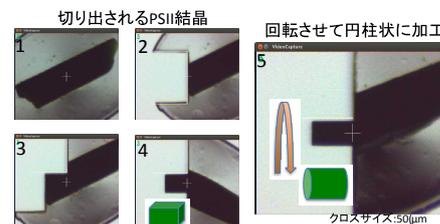


図2 近赤外線光による PSII 結晶の観察

PSII は光化学反応を行うため PSII 単量体当たり 35 個のクロロフィルと 11 個の β-カロテンなどの可視光領域に高い吸収帯をもつ色素分子を含んでいる。そのため、PSII 結晶は漆黒の結晶となり、観察時には光化学反応を抑制するため、吸収の穏やかな緑色弱光が用いられている。結晶構造解析において、結晶内部の亀裂や微結晶の付着は回折強度データの統計値の悪化や誤ったデータの混入の危険性がある。しかし、PSII 結晶の場合、結晶の輪郭しか確認できないためこれまで問題となっていた。本研究では近赤外線光による結晶観察装置を開発し、結晶内部の亀裂や微結晶が張りついた結晶の選別が行えるようになった【図 2】。

この装置は特許出願を果たし、様々な有色な結晶への応用が期待される。これらの調製法および結晶選別法によって得られた高品質な PSII 結晶を用いて、様々な X 線量による Mn の K-吸収端波長の回折強度データ収集を行い、クラスタの X 線還元による影響について検証を進めた。一方で、PSII 結晶を用いた X 線蛍光スペクトル分析を行い、X 線量増大に伴う Mn₄CaO₅ クラスタの X 線還元の状況を見積もった。これまで 3.6, 1.4, 0.6MGy の X 線量の回折強度データが得られた。2011 年に報告した



結晶の円柱加工部位のスケールリング因子の方位による変化と結晶学的統計値

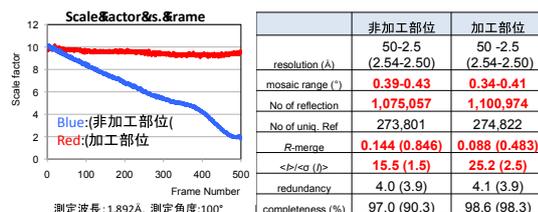


図3 PSII 結晶の円柱加工と結晶学的統計値

PSII の結晶構造は 0.8MGy であり、20-30%の X 線還元が指摘されていたことから、さらに低い線量でのデータ収集が必要となっていた。しかし、PSII 結晶はいびつな長方形の板状結晶であるため、複数の結晶に分散させてデータ収集を行うと結晶による X 線吸収による減衰に大きな違いが生じるため、統計処理が困難となる。そのため、播磨理化学研究所/SPring-8 の河野能顕博士と共同研究を結び深紫外レーザー加工機による PSII 結晶を円柱状に加工する手法を行った【図 3】。同形な結晶にすることで結晶及び母液による X 線吸収を均一にすることができ、全方位から均一な回折 X 線強度を収集することができた。この円柱加工された複数の結晶から回折強度データを分散して測定することで、これまで1つの結晶では困難であったより低線量のデータ収集が可能になり、現段階で 0.1MGy の回折強度データを得ることができ

た. その結果, Mn₂, Mn₃ に比べて Mn₄ 酸化数が低いことがわかった【図 4】. また, Mn₁ はモノマー間に違いがあるがその原因はわかっていない. これらの結果から, 研究を今後進めるための技術と方法を確立することができた.

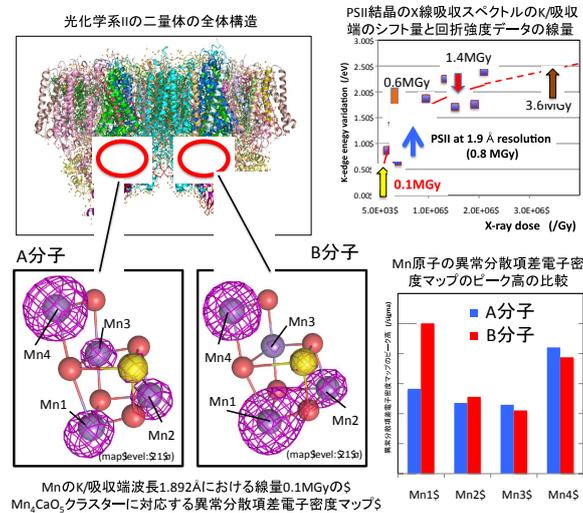


図 4 吸収端波長による低線量の異常分散項差電子密度マップ

研究テーマ B「反応阻害によって反応サイクルが固定された状態の解析」

PSII は酸性および塩基性条件下にすることで, 水分解反応が阻害されるが ESR による報告 (Bernat G. et al., *Biochemistry*, 2002) や赤外振動分光測定 の 報 告 (Suzuki H. et al., *Biochemistry*, 2005) から次段階の S₂ 状態までは pH に依存しないことが知られている. 本研究では, pH4.5 から pH9.0 の範囲で PSII の結晶化に成功し, また pH4.0 および pH9.0 の溶液に浸漬した結晶からそれぞれ 2.4 Å 分解能の

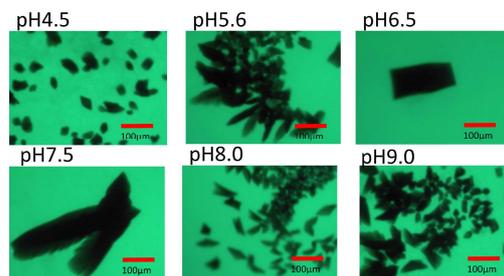


図 5 様々な pH 条件の PSII 結晶

回折強度データの収集に成功した. しかし, 現段階ではこれらの条件で Mn の K-吸収端波長 X 線によるデータ収集は達成できていない.

研究テーマ C「反応中間体の電子状態と反応進行に伴う活性中心の構造変化の検証」

現段階では, PSII の反応中間体試料を作り出すことはまだできていない. しかし, 研究テーマ A の結晶加工技術により PSII を任意の形状に加工できるため, 光が透過しにくい PSII 結晶を光化学反応が進行できる形状にすることが可能と思われる. また, 研究テーマ B の S₂ 反応中間状態をトラップできる結晶が調製できるため, 定常光を照射することによって S₂ 状態に固定することが可能と思われる. 今後の研究で, 中間状態の立体構造と活性中心の Mn₄CaO₅ クラスターの電子状態の変化から水分解反応の理解を進めることができるものと思われる.

3. 今後の展開

本研究によって、PSII の Mn_4CaO_5 クラスターの各 Mn 原子の電子状態を 3 次元の異常分散項差電子密度マップにより示すことができ、複数の金属原子の酸化状態を実験的に分析できる手法を開発することができた。クラスター内の Mn 原子は四価と三価の混合原子価状態であることが X 線吸収スペクトル分析の報告(Yachandara V.K, et al., *Science*, 1993)から示唆されている。しかし、現段階では X 線還元による影響が残っているため真の状態の評価は難しいが、相対的な強度比からの見積もりは可能と思われる。原子レベルの立体構造情報に各 Mn 原子の電子状態の情報が加わることで、 Mn_4CaO_5 クラスターの触媒機構の化学的な理解が進むものと思われる。

今後はテーマ A の手法を用いてより低線量の分析を継続して行う。また、テーマ B の成果である様々な状態におかれた PSII 結晶についても同様の分析を行い、4 つの Mn 原子それぞれの役割について多角的な検証を行う。また、テーマ C の光照射による反応中間体の分析を加工した結晶で実施し、水分解反応を構造化学的に解明することを目指す。

本研究で得られる PSII の Mn_4CaO_5 クラスターと周りのタンパク質の役割について理解を深めることで、自然界の光合成を模倣した不遍的に存在する金属を使った新たな人工光合成技術の発展に貢献したいと思う。

4. 評価

(1) 自己評価

(研究者)

本研究は光化学系 II タンパク質(PSII)の酸素発生反応の解明を目指すため、触媒として存在する Mn_4CaO_5 クラスターの 4 つの Mn 原子のそれぞれの電子状態を明らかにする新しい方法で取り組んだ。PSII は膜タンパク質複合体であるため、良質な結晶を再現良く調製することは本研究を進める上での課題の一つであった。また、研究で使用される Mn の吸収端波長は X 線吸収の影響の大きい長波長 X 線であるため、測定方法も課題であった。また、金属の活性中心は X 線による還元作用が大きいので、低線量のデータを得ることが最大の課題であった。研究テーマ A において、これらの課題を様々な新しい取り組みによりある程度まで解決することができたが、全く還元されていない自然な状態の分析までには至らなかった。研究テーマ B において様々な条件で PSII の結晶化の可能性が示し、研究を進める目処がついたが実現には間に合わなかった。また、テーマ C について当初の計画では吹きつけ装置による低温による固定を検討していたが、装置の不具合により開発が遅れて殆ど進めることができなかった。しかし、テーマ A の結晶加工やテーマ B の結晶条件によって新たな方法で中間体構造の分析を目指すことができるものと思われる。

本研究者は特任職員のため配属される学生がいなかったため単独で研究を進めていた。3 年次から技術補佐員を雇用して研究の効率化を試みたが、早い段階からの人員の拡充すべきであった。研究費の執行について、初年次から 2 年次にかけてテーマ全体を通しての課題である高品質な結晶化試料調製のための実験装置類の購入に利用し、十分に目的を達成することができた。3 年次および 4 年次は放射光における実験に対して様々な試薬および備品類を購入し、回折強度データ収集が行われた。また、3 年次に質量分析法による結晶化試料の評価のため、所属する研究機構に新設された質量分析器のタンパク質分析用のイオン化源を追加導入するように藤井律子准教授と共同で増額申請を行った。

本研究で使われた技術は、金属を持つタンパク質において、立体構造情報と共に金属原子

の電子状態を同時に理解できるため、多ヘムタンパク質や複数の鉄イオウクラスターを持つタンパク質などの研究への応用に繋がると思われる。また、本研究で特許申請された近赤外線を使った結晶観察装置は、タンパク質結晶以外にも有色の低分子化合物結晶の結晶面の特定や結晶選別に利用することが可能であり、また可視光に感受性のあるタンパク質や低分子の結晶観察にも有効であるため、新たな実験機器類として展開されることが期待される。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

梅名博士は、天然の光合成を理解する上で、長年の懸案であった光化学系II(PSII)の詳細な構造を空間分解能1.93Åでの構造解析に初めて成功した研究者である。PSIIIにおける水分子の4電子酸化による酸素発生過程を駆動する Mn_4CaO_5 クラスターと周りのタンパク質の役割などを理解し光合成の不思議を解き明かす足がかりとなる画期的な研究成果をNature誌に筆頭著者として報告している。共同研究グループの沈教授(岡山大学)、神谷教授(大阪市立大学)、川上博士(大阪市立大学)と共に世界中から極めて高い評価を受けている研究者である。本さきがけで研究では、上記の詳細な構造解析の実績を基礎に、さらに進んで、天然の光合成系の最も不思議な点、光合成の極意とされるPSII中のMnクラスターがどのようにして水分子を4電子酸化するのか、についてその分子機構を解明しようとしている。具体的には段階的な4光子の照射により電子伝達を經由してMnクラスターが+1、+2、+3、+4の高酸化状態に変化することは既に分かっているが、4個のMnイオンの中で、どのMnが最初に酸化され、次はどのMnが酸化されるのか、またそれに伴い、配位している水酸化物イオン、水、MnとMnの間の格子酸素原子がどのような変化を受けて、酸素発生につながっていくのかを、+1、+2、+3、+4の高酸化状態のそれぞれについて、無損傷X線構造解析を行うことにより解明しようとしている。極めて挑戦的な研究課題について、現在鋭意実験を進めている。これらが解明されれば、光合成の不思議の最も重要な点が明らかになることになり、極めてインパクトの大きい研究成果となる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Koua FH, Umena Y, Kawakami K, Shen JR. Structure of Sr-substituted photosystem II at 2.1 Å resolution and its implications in the mechanism of water oxidation. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 2013, **110**, 38890-3894
2. Umena, Y., Kawakami, K., Kamiya, N., Shen, J.R. Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å. 2011, *Nature.*, **473**, 55-60

(2) 特許出願

研究期間累積件数:1件

発明者: 梅名 泰史

発明の名称: 光合成関連蛋白質の X 線回折測定用結晶試料の選別方法およびそれに



用いる装置

出 願 人: 大阪市立大学

出 願 日: 2013/10/4

出 願 番 号: 特願コード 2013-209199

(2) その他の成果(主要な学会発表, 受賞, 著作物, プレスリリース等)

【学会発表】

- 1: 梅名泰史, 川上恵典, 沈建仁, 神谷信夫. 「光化学系 II における酸素発生中心 Mn_4CaO_5 クラスターの吸収端波長X線結晶構造解析」平成 26 年度日本結晶学会年会, 2014 年 11 月 1 日, 東京, (口頭発表)
- 2: Umena Y, Baba S, Kawano Y, Kumasaka T, Kamiya N, New approach in photosystem II crystal handlings: characterization using near-infrared imaging, dehydration of the glue coating crystals using humid gas and laser-processing to cylinder-shaped crystals, ICCBM15, September,(2014), Humburg, Germany, (ポスター)
- 3: Umena Y, Kawakami K, Shen J R and Kamiya N, Crystallographic studies on Mn atoms in Photosystem II using K-edge wavelength, Acta Cryst. A70, C350, (2014), Montreal, Canada (ポスター)
- 4: 梅名泰史, 清水恵理依, 川上恵典, 神谷信夫. 「不透明な光化学系 II 蛋白質結晶の赤外線による透過観察」平成25年度日本結晶学会年会, 2014年10月12日, 熊本 (ポスター)

【受賞】

- 1: 15th International Conference on the Crystallization of Biological Macromolecules (ICCBM15), Poster Award, 2014
- 2: 平成24年度日本光合成学会 特別賞 光と緑の賞「酸素発生光化学系 II の 1.9 Å 分解能における結晶構造」
- 3: 平成23年度日本結晶学会 進歩賞「酸素発生光化学系 II の構造と機能に関する結晶学的研究」

【著作】

- 1: 梅名泰史 神谷信夫,「酸素発生光合成を支える光化学系 II」, 日刊工業出版「光アライアンス」7月号, 10-14, (2014)
- 2: 梅名泰史 神谷信夫,「結晶構造から明らかにする光合成」現代化学, 3, 40-41, (2014)
- 3: 梅名泰史,「酸素発生光化学系 II の構造と機能に関する結晶学的研究」, 日本結晶学会誌 54, 247-254,(2012).

【アウトリーチ活動】

- 1: サイエンスカフェ: 科学と音楽「光合成の話とシター演奏」藤井律子准教授と共同開催
会場: 大阪「カフェレストランアリエッタ」, 2014年8月23日, 参加人数 26人
- 2: 第 84 回テクノラボツアー招待講演「人工光合成研究の最前線: 光合成を支える光化学系 II タンパク質の立体構造に基づくメカニズムの研究」, 大阪府立大学, 2013.5.28
- 3: 人工光合成フォーラム 2012 招待講演「光合成を支える光化学系 II タンパク質の立体構造に基づくメカニズムの研究」 大阪産業創造館, 2012.12.20