

光合成の水分解・酸素発生機構の解明に向けて

神谷信夫

大阪市立大学複合先端研究機構/大学院理学研究科 〒558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本 3-3-138

川上恵典

大阪市立大学複合先端研究機構 〒558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本 3-3-138

梅名泰史

大阪市立大学複合先端研究機構 〒558-8585 大阪府大阪市住吉区杉本 3-3-138

沈 建仁

岡山大学大学院自然科学研究科 〒700-8530岡山県岡山市津島中 3-3-1

要旨

光合成で、太陽の光エネルギーを吸収して水を分解し、酸素とともに、電子とプロトンを発生させている光化学系 II 膜タンパク質複合体 (PSII) の結晶構造を1.9 Å の分解能で明らかにした。これまでに報告されていた結晶構造の分解能は3.8-2.9 Å の範囲にあり、水分解・酸素発生中心 (OEC) として働く Mn_4Ca クラスタとそれを支える配位子群の構造は不確かで、OEC を取り巻いて酸素発生の基質となる水や、基質から引き抜かれたプロトンを PSII の外に運び出すプロトンパスにおける水の構造はまったく不明であった。これに対して今回の1.9 Å 分解能の構造解析では、OEC は Mn_4CaO_5 の組成を持ち「歪んだ椅子」の形をしていることが明らかとなり、金属を結びつける5個の酸素原子の内のひとつ (O5) はマイナス1価の水酸化物イオンである可能性が示唆された。また4個のMnの内の1個とCaにそれぞれ2個の水 (W1とW2, W3とW4) が配位しており、W2とW3, O5の3個の酸素原子の内の2個の間に新たな酸素-酸素結合が形成されると推定された。プロトンパスについては、酸化還元活性のチロシン残基 (Yz) を介した電子移動に共役するプロトン移動経路として、Yz から PSII の外部までつながる水のパスが新たに見いだされた。これらの知見は今後の光合成と人工光合成の研究を一気に加速すると期待される。

1. はじめに

光合成、すなわち植物の葉が太陽の光を受けて、根から吸い上げた「水」と空気中の「二酸化炭素」から「炭水化物」をつくりだし、同時に空気中に「酸素」を放出するという現象はよく知られている¹⁾。植物の葉に適当な模様をかたどった黒紙を重ねしばらく太陽光をあてた後、その葉から緑色の色素であるクロロフィルを取り除いて白くなったものにヨウ素を作用させると、黒紙のあったところは白いままで、黒紙のなかったところが紫色に染まり最初の模様が浮き出して見えるという実験をしたことのある読者も多いであろう。これはまさに、ヨウ素-デンプン反応により、光合成で植物の葉に蓄積されたデンプン (炭水化物) が検出されたことを示している。

植物やシアノバクテリアなどの光合成生物は、二酸化炭素から作られる炭水化物で自らを成長させ、呼吸により取り込んだ酸素と炭水化物を反応させエネルギーを取り出して生命活動を維持している。一方、多くの動物や微生物は光合成生物を食べるか、それらを食べて成長した生物を食べなければその活動を支えるエネルギーを得ることはでき

ない。また生物が炭水化物からエネルギーを引き出すために必要となる酸素は、現在では地球大気の20%を占めているが、元をたどれば今から30億年ほど前の海洋中に出現したシアノバクテリアに端を発する。地球は46億年前に誕生したとされており、シアノバクテリアが出現するまでの地球は二酸化炭素の大気に覆われていた。シアノバクテリアは原始的な原核微生物に分類されるが、その後の長い生物進化の歴史の中で真核生物が生まれ、多細胞生物を経て高等植物や高等動物が出現した。この間に酸素発生型光合成によって作り出された酸素が大気中に蓄積し、地球大気の上層にオゾン層が形成された。あらゆる生物にとって太陽光に含まれる紫外線は極めて有害なものであったが、オゾン層に吸収されて地表に到達する紫外線の量が少なくなると、それまで海洋にしか生存できなかった生物もようやく地表に進出するようになり、生物種の爆発的な進化をもたらした。この間、逆に大気中の二酸化炭素は著しく減少し、その濃度は現在では400 ppm 程度と極めて微量である。これは30億年に及ぶ生物進化の中で、二酸化炭素が光合成により炭酸同化され、我々人類を含め、地球上のすべての生命体を構成する有機物に形を変えたことを

意味する。

光合成は我々にとって極めて重要なものであるため、その研究には200年以上にもわたる長い歴史がある。そもそも光合成に関する研究は、蒸気機関の発明から始まった産業革命で、人間が石炭を無制限に燃やして汚した空気を植物がきれいにしているという発見から始まった。まず光学顕微鏡による観察から、植物の細胞はその全体が緑色をしているわけではなく、クロロフィルは葉緑体に集まっており、ここで光合成が行われていることが判明した。さらに電子顕微鏡が発明されると、葉緑体の内部には袋状の脂質2重膜（チラコイド膜）が積層したラメラ構造があり、クロロフィルはこの部分だけに存在することが明らかにされた¹⁾。クロロフィルは太陽光を吸収してそのエネルギーを取り入れる働きをしており、リング状のクロリン環（中心にマグネシウム）に長く伸びた鎖状のフィトール鎖が結合した構造をしている。クロリン還もフィトール鎖も水には解けにくく、逆に油に溶けやすい疎水性で、チラコイド膜に埋もれた疎水性膜タンパク質複合体に取り囲まれている。

2. 光合成で水を分解し酸素を発生する光化学系 II (PSII)

光化学系 II (PSII) はこのような膜タンパク質のひとつで、光合成で水を分解し酸素分子を作る酵素、すなわち生物界の触媒として働いている。PSIIは酸素分子とともに電子とプロトンを作り出しており (Fig. 1 参照)、これらは二酸化炭素を炭水化物に変えるために必要な化合物 (NADPH と ATP) の合成に利用される。好熱性シアノバクテリアに由来する PSII は、Fig. 1(a) に示したように、4種類の主要な疎水性膜貫通サブユニット (D1, D2, CP47, CP43) と13種類の小分子量膜貫通サブユニット (代表して PsbI と *cyt b-559* のみ表示)、3種類の親水性の膜表面性サブユニット (33 kDa, *cyt c-550*, 12 kDa) の合計20種類のサブユニットが会合した超分子複合体である。またこれらのポリペプチド以外に、クロロフィル (Chl) やフェオフィチン (Phe)、プラストキノン (Q)、カロチノイド (Car) など70以上の補欠分子族を含む。D1 と D2 サブユニットは、太陽の光エネルギーを吸収して電荷分離する反応中心 (P680, Chl 2分子のダイマー) と、P680に生じた電子の移動経路となる Phe, 非ヘム鉄 (Fe) を挟む A, B 両サイトに存在する Q (Q_A と Q_B) など、電子伝達系を構成する補欠分子族群を取り巻いている。D1 と D2 サブユニットは CP47, CP43サブユニットに挟まれている。これらは Chl や Car を多数内包しており、太陽光を効率よく吸収してそのエネルギーを P680に伝達するアンテナの役割を果たしている。D1 と D2, CP47と CP43の4サブユニットは、チラコイド膜を貫通する疎水性ヘリックスを5-6本持ち、分子量も4-5万と大きく PSII のコアを形成している。PSII ではこのコアを、分子量が1万以下の

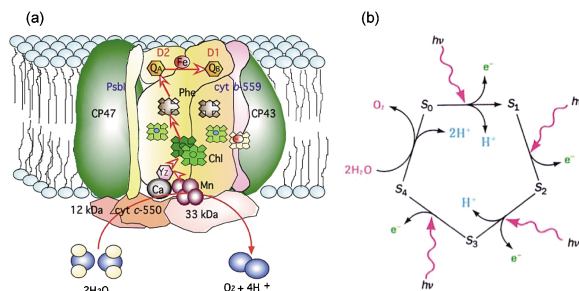


Fig. 1 (a) Schematic drawing of photosystem II monomer and (b) the Kok cycle model.

疎水性サブユニットが取り巻いて全体を安定化している。さて P680が電荷分離して、電子が Fig. 1(a) 中の矢印に沿って Q_B まで移動した後の反応中心は正の電荷を帯びて $P680^{\cdot+}$ の状態となるが、これは高い反応性を示すため、その正電荷は水から引き抜かれた電子により速やかに中和されなければならない。この水分解反応はチラコイド膜内側 (ルーメン側) の表面近くにある Mn_4Ca クラスターの上で進行する。 Mn_4Ca クラスターと P680の間には、電子伝達に関係する、酸化還元活性を持つチロシン残基 (Y_Z) がある。また Mn_4Ca クラスターは33 kDa, 12 kDa, *cyt c-550*の親水性サブユニットによりバルク領域の水から隔てられている²⁾。

さて Q_B サイトに到達した電子はプラストキノンを対応するキノールまで還元し、その還元体がチラコイド膜内のキノールプールへ移動することで、PSII で発生した電子が光合成に関連する他の構成要素へ伝達される¹⁾。一方残された $P680^{\cdot+}$ はその高い酸化力により、酸素発生中心となる Mn_4Ca クラスター上の水分子から電子を引き抜く。これにより全体として、1個の電子が水から Q_B へ移動することとなるが、PSII では Mn_4Ca クラスターの酸化状態 ($S_i, i=0\sim4$) を順次変えながら、2個の水から合計4個の電子を引き抜き、1個の酸素分子と4個のプロトンを生じる反応が繰り返される。Kok³⁾によりまとめられた水分解・酸素発生モデルを Fig. 1(b) に示した。まず暗順応させた PSII の Mn_4Ca クラスターは S_1 と呼ばれる状態にあり、4個の Mn の価数は III, III, IV, IV である。最初に P680が1個の光子を吸収すると、1個の電子を放出して S_2 状態へ変わる。P680が次の光子を吸収すると、 Mn_4Ca クラスターは2個目の電子と1個のプロトンを放出して S_3 状態となる。続いて3個目の光子が吸収されると、 Mn_4Ca クラスターは3個目の電子を放出し、もっとも酸化状態が高い S_4 状態となって2個の水を酸化し酸素を発生させる。さて Mn_4Ca クラスターから酸素が放出される過程では2個のプロトンも放出され、 Mn_4Ca クラスターは S_0 状態となる。ここで P680が4個目の光子を吸収すると、 Mn_4Ca クラスターは4個目の電子と1個のプロトンを放出して S_1 状態に戻り、以後はこのサイクルを繰り返す。

返す。Kok サイクルモデルはこれまでに集積された膨大な研究成果を包括的に説明するものであり、現在も PSII の水分解・酸素発生反応を考える際の基本となっている。しかしながらこのモデルでは反応の概要をつかむことはできるものの、 Mn_4Ca クラスターの化学構造はどのようなものか、その構造は各 S 状態でどのように変化するのか、Kok サイクルの途中で放出されるプロトンはどのようにして生じ、基質の水はどのように Mn_4Ca クラスターに取り入れられ、反応のクライマックスである $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ の過程で2個の水からどのようにして新たな酸素-酸素結合が形成されるのかなど、水分解・酸素発生の反応機構の根幹については何も知ることができない。

3. PSII の結晶化と X 線結晶構造解析

PSII は光合成で最も重要な働きをする酵素の一つであるため、その分子構造を明らかにし、酸素発生の反応機構を解明しようとする研究には長い歴史がある。X 線結晶構造解析は分子を集めて結晶とし、その X 線回折像から分子構造を明らかにする方法であり、40年ほど前から分子量の大きいタンパク質をも対象とすることが可能になった。しかしながら、その当初、結晶構造解析に成功したタンパク質はすべて水に溶けやすい水溶性のもので、PSII のような疎水性膜タンパク質の構造解析が可能になったのは、たかだか20年ほど前のことであり、放射光を利用した構造生物学の発展期とほぼ重なっている。

さて分子量の小さい化合物でも、分子量の大きいタンパク質でも、分子を結晶にする際にまず必要なことは、言うまでもなく不純物を含まない純品を得ることである。PSII は疎水性の膜貫通サブユニット17種類と親水性の膜表面性サブユニット3種類の会合した両親溶性の複合体であり、高分解能の X 線結晶構造解析を行なうためには、最も厄介な膜タンパク質のひとつである。チラコイド膜に埋もれている PSII では、まず界面活性剤を用いて可溶化し、その上で不純物を取り除いて純品に精製する。しかしながら、界面活性剤は衣服についた油汚れを可溶化する洗剤に代表されるもので、あまりに強力なものをを用いると PSII の精製標品に時間とともに変性物が混在するようになる。また PSII の親水性サブユニットは弱い界面活性剤でも容易に複合体から離脱してしまう。これらの変性物や親水性サブユニットの一部が離脱した PSII は、インタクトで活性のある PSII から容易には取り除くことができず、結晶化ではこれらの比率をいかにして低く抑えるかが成功への鍵となる。

これは膜タンパク質の結晶化が難しい理由のほんの一部に過ぎず、我々のグループでも、良質の結晶を得るために非常に長い時間を費やしてきた。我々が好熱性シアノバクテリアのチラコイド膜から PSII を精製・結晶化してその構造を明らかにしようとする研究を開始したのは、既に20年

以上も前に遡る。最初の数年で緑色の鱗片状の固形物が得られたため、それをフォトン・ファクトリー (PF) に持ち込んで X 線回折実験を試みたが、回折点はまったく確認できなかった。つまりその固形物はクロロフィルを含んで緑色をしていても、単一の PSII 分子が規則正しく配列した結晶ではなかった。ここから長い悪戦苦闘が始まったが、その後の数年間に、PSII を取り出す材料としてイネやホウレンソウなどの高等植物を試したり、シアノバクテリアについては培養に際して照射する蛍光灯の種類を変えたり、栄養源となる二酸化炭素の濃度を調整するなど培養法を再検討したり、PSII をチラコイド膜から取り出すための界面活性剤を様々に変更して精製法を抜本的に見直すなどした結果、新たに六角柱状の針状結晶が得られた。これはまぎれもなく結晶であり、PF で X 線回折実験を行うと伸長方向では4~5 Å 分解能に相当する回折点を確認することができた。しかしながらその回折点の間隔は一定ではなく、明らかな超周期性が見て取れたため、構造解析の対象としては不向きなものであった。

現在から12年ほど前、ベルリンの研究グループ⁴⁾は日本の温泉由来の好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* を用いて、4 Å 分解能を上回る PSII の結晶化に世界で初めて成功した。その後我々のグループは近縁の好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* から3.7 Å 分解能の PSII 構造を報告し⁵⁾、さらにロンドンやベルリンのグループは3.5-2.9 Å 分解能の構造を報告してきた⁶⁻⁷⁾。しかしこれらの結晶構造では、多くのサブユニットや補欠分子族の立体構造を確定させるには分解能が不足しており、特に、 Mn_4Ca クラスターとそれを支える配位子群の構造は不確かであった。また Mn_4Ca クラスターを取り巻いて酸素発生に関与する水や、サブユニット間において PSII 全体を安定化したり、酸素と同時に発生したプロトンを PSII の外に運び出すプロトンパスに関与する水の構造はまったく不明であった。

これに対して我々⁸⁾は最近、PSII の精製過程に再結晶化法を取り入れて結晶の質を飛躍的に向上させ、さらに結晶を凍結保存する前に脱水処理を施して、Kok サイクルの S1 状態に対応する X 線回折強度データを、SPring-8 の BL44XU を利用して1.9 Å の分解能で収集することに成功した。回折強度の測定は暗条件の下100 K のクライオ温度で行った。回折像の撮影は900枚に及んだが、この間100枚撮影する毎に X 線ビームの大きさの分だけ結晶を回転軸方向にシフトさせ、単位面積あたりの X 線照射量を従来の約1/9に低減させた (Mn_4Ca クラスターの X 線損傷の問題については後述する)。最終的に得られたデータセットに基づいて分子置換法によって位相を決定し、CNS と REFMAC5, COOT を用いて結晶構造を精密化した。

4. PSIIの全体構造と座標誤差

PSIIはチラコイド膜上でホモダイマー構造をとっており、その総分子量は700 kDaにも及ぶ。Fig. 2は結晶の非対称単位に含まれるPSIIダイマーの全体像を示している^{8,9}。図の中央の矢印は2個のモノマーを関係づける非結晶学的2回軸を表す。両モノマーともサブユニットのトーンを落として表示しているが、右側のモノマーではサブユニットを、左側では内包される色素群を強調している。ダイマーの全体では合計48本の膜貫通ヘリックスがチラコイド膜に対してほぼ垂直に林立しており、PSIIの疎水性領域を形成している。一方、親水性領域はチラコイド膜のストローマ側 (Fig. 2上) とルーメン側 (下) で非対称に分布しており、ストローマ側は各サブユニットの親水性ループ部分のみからなるのに対し、ルーメン側では3個の親水性サブユニットも加わって大きな親水性領域が形成されている。多数の小さな赤い球は、今回の1.9 Å分解能の解析により初めて同定された水分子を表し、その総数は2795個にも及んだ。水は言うまでもなく酸素発生反応の基質であり、また酸素発生に伴って生じるプロトンをも Mn₄Ca クラスターから PSII 分子を取り巻くバルクの水領域まで導くプロトンパスにも密接に関与するため、今回初めて多数の水分子が同定されたことの意義は極めて大きい。

さてここで、PSIIの Mn₄Ca クラスターの詳細な化学構造を説明する前に、X線結晶構造解析の結果として報告される座標の誤差を表す Cruickshank¹⁰の Diffraction-component Precision Index (DPI) についてふれておきたい。結晶解析ではまず試料結晶を調製し、そのX線回折強度を測定し、回折強度から計算される構造因子の振幅を観測関数とする最小2乗法を適用して原子座標を精密化し、原子の座標とともに占有率や温度因子を含む構造パラメータの誤差を見積もる。しかし通常のタンパク質結晶解析ではその回折分解能が不十分であり、測定される回折点の数は精密化される構造パラメータの数の2倍程度にと

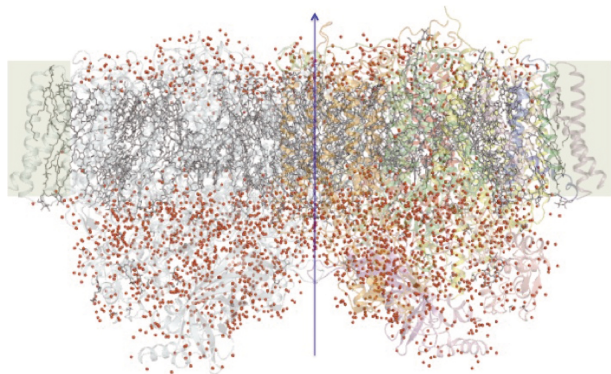


Fig. 2 Structure of photosystem II dimer in a crystallographic asymmetric unit. Two PSII monomers are related by a non-crystallographic two-fold axis. Water molecules surrounding PSII dimer were depicted by red spheres.

どまる。そこでタンパク質結晶解析では、サブユニットを構成するアミノ酸残基や含有色素について既知の構造情報を観測関数に加える「制限付き」最小2乗法が適用される。この場合、精密化された座標の誤差は測定量である回折強度 (すなわち Cruickshank のいう Diffraction-component) ではなく、既知の構造情報に付与された構造誤差に依存することとなり、正統な誤差論に基づいて化学結合長を議論することはできない。

一方 Cruickshank は、結晶構造解析が手計算で行なわれていた1950年前後に、簡単な計算で座標の誤差を1次の精度で見積もる手法を提案し、その手法は多くの結晶解析に応用されていた。その後コンピュータが実用化され、その計算能力が指数関数的に改善されると、最小2乗法の逆マトリクス演算から誤差を計算するという原理的な方法が一般化し、Cruickshankの手法はその歴史的役割を終えていた。しかしながらコンピュータの計算能力はその後も拡大を続け、2000年前後には、タンパク質の結晶構造をいわゆる「制限」のない最小2乗法により精密化できるところまで到達した。そこで Cruickshank は自らの手法に一部改良を加えて以下の DPI の計算式を導き、Concanavalin A (0.94 Å 分解能) と Cytochrome c₆ (1.1 Å 分解能) に対する精密化の結果と比較した結果、以下の式(1)により計算される DPI (座標 x の偏差 σ) が最小2乗法から計算される誤差と見事に一致することを示した。分解能が1.7 Åで回折強度の測定値と構造パラメータの数の比が小さい Immunoglobulin でも違いは15%しかなかった。

$$\sigma(x, B_{avg}) = 1.0(N_i/p)^{1/2}C^{-1/3}Rd_{min} \quad (1)$$

ここで B_{avg} は全原子にわたる平均の温度因子、 N_i と p はそれぞれ測定値と構造パラメータの数、 C は逆空間における回折強度測定の完全性、 R は R 因子、 d_{min} は分解能を表す。式(1)に従うと、今回の PSII の結晶構造解析の座標誤差は0.11 Åと計算され、これは PDB 座標 (ID: 3ARC) から計算される原子間結合距離が0.16 Åの偏差 (シグマ値) を持つことに対応している⁸。

5. 「歪んだ椅子」の形をした Mn₄CaO₅ クラスター

今回の結晶構造解析により PSII の Mn₄Ca クラスターは、Mn₄CaO₅ の組成を持ち「歪んだ椅子」の形をしていることが初めて明らかにされた^{8,9}。Fig. 3(a)の青色の電子密度分布は5シグマレベルの2Fo-Fc フーリエ図で、そのピークの高さから4個の Mn (Mn1-Mn4) と1個の Ca を明瞭に区別することができる。緑色の電子密度分布は7シグマレベルで描いた Fo-Fc 差フーリエ図で、5個の金属原子をつなぐ5個のオキソ結合の酸素 (O1-O5, 赤色)

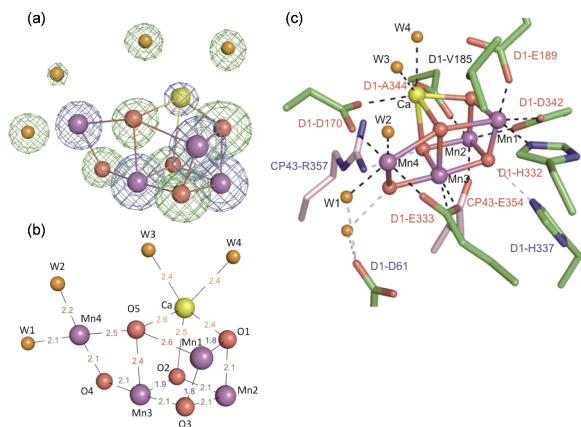


Fig. 3 (a) Identification of atoms in Mn₄CaO₅ cluster, (b) atomic distances and (c) ligation sphere around Mn₄CaO₅ cluster.

とともに、Mn4 と Ca にそれぞれ 2 個配位した水分子 (W1 と W2, W3 と W4, 橙色) の存在を明瞭に示している。これら 4 個の水分子は、酸素発生反応の基質の候補として極めて重要な意味を持つ。

Fig. 3 (b) には、Mn₄CaO₅ クラスターの結合距離を、PSII の結晶の非対称単位を構成する 2 個のモノマーから得られた距離の平均値として示した。Mn-O の結合距離のほとんどは 1.9 Å 前後と 2.1 Å 前後の 2 種類に分類され、上述の DPI に基づく結合距離の偏差 0.16 Å からすれば 0.2 Å の違いは 1.25 シグマに相当し、1.9 Å と 2.1 Å の結合距離の違いは 79% の確率で区別できることとなる。1.9 Å の結合は分子量の小さい通常 Mn-O 錯体では出現頻度が高く安定なものであり、一方 2.1 Å に伸びた結合の頻度は低く不安定であると言える。Fig. 3 (c) は PSII のアミノ酸側鎖や水を含めて Mn₄CaO₅ クラスターを取り巻く配位環境を示したものであるが、1.9 Å よりやや長い 2.1 Å の結合距離はこの環境の中で安定化されているものと考えられる。さて Fig. 3 (b) に示した Ca-O の結合距離はいずれも 2.4 Å 程度の値を持ち、通常無機・有機錯体に見られるものとはほぼ一致している。従って Fig. 3 (b) で注目すべきは、5 個のオキソ結合の酸素の内のひとつ O5 周りの結合距離が 2.5 Å 程度と、上述の 1.9 Å や 2.1 Å と比べて明らかに長いことである。0.4 Å の結合距離の違いは 2.5 シグマに相当し、これは O5 周りの結合距離が 99% の確率で 2.1 Å の結合距離より長い、より不安定な結合であることを示す。通常オキソ結合の酸素は 2 個の負電荷をもつが、これは O5 がより少ない負電荷を持つこと、すなわち O5 が水酸化物イオンである可能性を強く示唆している。

6. PSII のプロトン移動経路

Kok サイクルにおける S 状態の変化はそれぞれ電子の移動を含み、またいくつかの過程では電子移動に同期してプロトンの転移が起きる (Fig. 1 (b) 参照)。Fig. 4 は

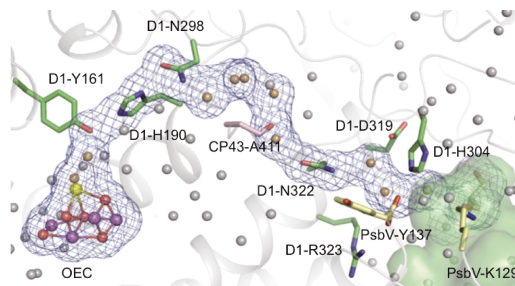


Fig. 4 Hydrogen-bond network relating to the proposal of proton-coupled electron transfer. Mesh indicates the network from Mn₄CaO₅ cluster in left to a bulk solution region out of PSII in right. Small spheres included in the mesh indicate the water molecules included in the hydrogen-bond network.

Mn₄CaO₅ クラスターから PSII 外部の水領域へつながる水素結合ネットワークのひとつである^{8,9)}。図中の OEC は酸素発生中心 (Oxygen-Evolving Complex) の略で Mn₄CaO₅ クラスターを意味している。OEC の上方にある D1-Y161 は Fig. 1 (a) の Y_Z で、OEC の上で水から引き抜かれた電子を P680^{•+} へ受け渡す役割を果たしているが、従来からこの電子移動に同期してプロトンが PSII 外部に運び出されるとする PCET (Proton-Coupled Electron Transfer) 仮説¹¹⁾ が議論されてきた。D1-Y161 は Mn₄CaO₅ クラスターの Ca に配位した W4 とは直接、W3 とは別の水分子を介して水素結合しており、また D1-H190 も 2.5 Å 前後の距離で水素結合している。PCET 仮説では D1-Y161 と D1-H190 の間に特に強い低障壁水素結合があるとし、電子移動に同期して、プロトンが D1-Y161 を介して D1-H190 に転移すると考えている。この仮説には D1-H190 上に移動したプロトンが逆流しないように、プロトンを速やかに PSII の外部に排除する機構が必要となるが、Fig. 4 の水素結合ネットワークはその構造的基盤として最も可能性の高いものである。

7. 水分解・酸素発生機構の推定

今回の結晶構造解析はあくまで S1 状態の PSII に対するものであり、5 つの S 状態から構成される Kok サイクルの全体像を S1 状態の構造のみから議論することはできないこと、以下の議論はその意味で単なる「推定」であり、これを実証するためには残る 4 つの S 状態の構造をそれぞれ解明する必要があることは言うまでもない。しかしながら PSII の OEC 構造は、長い間ブラックボックスの中におかれて「光合成研究で最後に残された最大の課題」とされてきたものであり、また今回の我々の成果は人工光合成で利用可能な水分解・酸素発生触媒の開発に弾みを付けるものとして、昨年 Science 誌による「BREAKTHROUGH OF THE YEAR 2011」に選ばれたこともあり、ある程度の無理は承知で PSII の酸素発生機構を以下

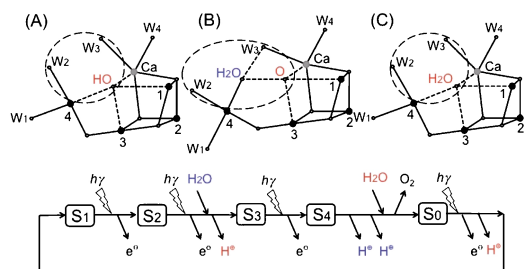


Fig. 5 Prediction of water-splitting and oxygen-evolving reaction mechanism.

に議論する。Fig. 5ではFig. 3(c)とはほぼ同様の向きからMn₄CaO₅クラスターを描き、4個のMnは対応する番号を付けた黒丸で、5個のオキソ結合酸素と、金属に配位した4個の水は白抜きの小さな丸で表した。また図の下段には一部に修正を加えたKokサイクルモデルを対応させてある。(A)はS1状態を表しO5は水酸化物イオンとした^{8,9)}。これに対して(C)はS0状態を想定したもので、S0→S1の変化に合わせて1個のプロトンが放出されることからO5を水分子とした。O5サイトに基質の水分子を置くモデルは、量子化学計算に基づいてこれまでに提案された反応機構モデル¹²⁾には見いだすことができない。しかしながらO5周りの結合長が長いという今回の新たな知見は、そのままO5周りの反応性の高さを思わせるものである。さてこれまでに報告された様々な研究成果は、OECの大きな構造変化はS1→S2では起こらず、S2状態以降に起きることを示している。そこでFig. 5の下段では、S2→S3の過程でまず1個目の水分子がOECに導入されることとした。これはFig. 1(b)のKokサイクルモデルとは異なるが、最近のFT-IRによる研究から強く示唆されている¹³⁾。(B)は基質となる水分子がMn4に配位した結果、その水がO5と近いサイトを占めることを想定している。(A)から(B)への変化には水分子が新たに入るためのスペースが必要となるが、これはMn3-O4(Mn3とMn4をつなぐオキソ結合の酸素)の結合を数10度程度回転させることにより作り出すことができる。なおこの水分子はOECの外部から来て直接Mn4に配位するのか、元々配位していたW2やW3が外部から来た水により押し込まれて(B)の位置を占めるのかについては不明である(これらの可能性を残す意味から、図では関係する要素を破線の楕円で囲んだ)。最後に、(B)から(C)すなわちS3→S4→S0の過程こそPSIIの水分解・酸素発生反応のクライマックスであり、S2→S3の過程で導入された水とO5またはW3の間に新たな酸素-酸素結合が形成されると考えている。この間にさらに2個のプロトンと生成した酸素分子が放出され、基質となる2個目の水分子がOECに導入されるが、S4状態は極めて不安定な過渡的状态であり、S3→S4→S0の過程を現段階で図に表すことは差し控えた。なおここに述べたS0→S3までの反応機構は、最近我々の

共同研究者らにより量子化学計算が行われ、その妥当性が示唆されている¹⁴⁾。

8. Mn₄Ca クラスターの X 線損傷問題

実験方法を記述した項目3の最後で述べたように、今回のX線回折強度測定では、900枚の回折像を撮影するにあたり、100枚撮影する毎にX線ビームの大きさの分だけ結晶を回転軸方向にシフトさせ、単位面積あたりのX線照射量を従来の約1/9、7×10⁵ Gyまで低減させた。これは従来のXAFS研究¹⁵⁾から、通常のタンパク質結晶構造解析に用いられるX線照射量では、PSIIのMn₄Caクラスターは還元され、結晶中のMn₄Caクラスターの80%以上がMn(II)アクア錯体に変化している、すなわち極めて激しいX線損傷を受けると報告されていたためである。しかしながら、その報告に従えば、従来の約1/9のX線照射量に制限しても、今回報告した結晶構造にはMn(II)アクア錯体がなお20-25%含まれていることとなる。既に述べたように今回の成果は、長年にわたる光合成研究に大きなブレイクスルーをもたらしたものであるが、「歪んだ椅子」の形をしたMn₄CaO₅クラスターの構造にX線照射がどのような効果を与えるか、新たな課題を提示することとなった。我々の研究グループではその後、従来と同等(すなわち「歪んだ椅子」の構造を決定した際の9倍)のX線照射量で除草剤-PSII複合体の結晶構造解析を行い、Mn₄CaO₅クラスターの形は、1.9 Å分解能の範囲では、X線照射量に依存しないことを示した(論文準備中)。これは、X線照射がMn₄CaO₅クラスターに引き起こす効果は、従来から示唆されてきたMn(II)アクア錯体にまで壊れるような「損傷」ではないことを意味している。また我々は、回折強度測定と平行して結晶のMn吸収端プロファイルを測定し、吸収端がX線照射量の増大につれて長波長側へシフトする、すなわちMn原子の「還元」が進んでいることを確認している。このX線還元によりMn₄CaO₅クラスターの原子間結合距離がどのように変化するか、今後解決すべき課題のひとつであるが、それには、今回の1.9 Åよりさらに高い分解能のX線結晶構造解析が必要とされる。

以上、PSIIのX線結晶構造解析により得られた最近の成果と、それに基づく水分解・酸素発生機構の推定について述べた。今後の光合成研究と人工光合成の実現に向けた研究の一助になればと願っている。

謝辞

本研究を遂行するためのX線回折強度測定はすべてSPring-8を利用して行った。BL44XUをはじめ、BL41XUとBL38B1のビームラインスタッフの方々に深く感謝する。

参考文献

- 1) D. Voet and J. G. Voet: "Biochemistry", John Wiley & Sons, inc., U.S.A. (2011).
- 2) A. Guskov, A. Gabdulkhakov, M. Broser, C. Glockner, J. Hellmich, J. Kern, F. Muh, W. Saenger and A. Zouni: *Chemphyschem.* **11**, 1160–1171 (2010).
- 3) B. Kok, B. Forbush and M. McGloin: *Photochem. Photobiol.* **11**, 457–475 (1970).
- 4) A. Zouni, H.-T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauss, W. Saenger and P. Orth: *Nature* **409**, 739–743 (2001).
- 5) N. Kamiya and J.-R. Shen: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 98–103 (2003).
- 6) K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber and S. Iwata: *Science* **303**, 1831–1838 (2004).
- 7) A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni and W. Saenger: *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 334–342 (2009).
- 8) Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen and N. Kamiya: *Nature* **473**, 55–60 (2011).
- 9) K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya and J.-R. Shen: *J. Photochem. Photobiol. B* **104**, 9–18 (2011).
- 10) D. R. Cruickshank: *Acta Crystallogr. D* **55**, 583–601 (1999).
- 11) C. W. Haganson and G. T. Babcock: *Science* **277**, 1953–1956 (1997).
- 12) P. E. M. Siegbahn and M. R. A. Blomberg: *Dalton Trans.* 5832–5840 (2009).
- 13) T. Noguchi: *Phil. Trans. R. Soc.* **B363**, 1189–1195 (2008).
- 14) H. Isobe, M. Shoji, S. Yamanaka, Y. Umena, K. Kawakami, N. Kamiya, J.-R. Shen and K. Yamaguchi: *Dalton Trans.* **41**, 13727–13740 (2012).
- 15) J. Yano, J. Kern, K.-D. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12047–12052 (2005).

著者紹介

**神谷信夫**

大阪市立大学複合先端研究機構・教授
E-mail: nkamiya@sci.osaka-cu.ac.jp
専門：構造生物化学・X線結晶学

【略歴】

1981年名古屋大学大学院理学研究科修了，理学博士。1985年から理化学研究所研究員，副主任研究員，2005年から大阪市立大学大学院理学研究科教授を経て，2010年より現職。

**梅名泰史**

大阪市立大学複合先端研究機構・特任准教授

E-mail: umena@ocarina.osaka-cu.ac.jp
専門：蛋白質 X線結晶学

【略歴】

2007年大阪大学大学院理学研究科修了，理学博士。同年から大阪市立大学大学院理学研究科博士研究員，2010年から大阪大学蛋白質研究所博士研究員を経て，2011年より現職。

**川上恵典**

大阪市立大学複合先端研究機構・特任准教授

E-mail: keikawa@sci.osaka-cu.ac.jp
専門：植物生理学・光化学系Ⅱの構造生物学

【略歴】

2010年岡山大学自然科学研究科修了，理学博士。2010年から日本学術振興会特別研究員を経て，2011年より現職。

**沈 建仁**

岡山大学大学院自然科学研究科・教授

E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp
専門：生化学・植物生理学

【略歴】

1990年東京大学大学院理学研究科修了，理学博士。理化学研究所基礎科学特別研究員，研究員，前任研究員を経て，2003年より現職。

Towards elucidation of water-splitting and oxygen-evolving reaction mechanism in photosynthesis

- Nobuo KAMIYA** The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA)/Graduate School of Science, Osaka City University, 3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi, Osaka 558-8585, Japan
- Keisuke KAWAKAMI** The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA), Osaka City University, 3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi, Osaka 558-8585, Japan
- Yasufumi UMENA** The OCU Advanced Research Institute for Natural Science and Technology (OCARINA), Osaka City University, 3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi, Osaka 558-8585, Japan
- Jian-Ren SHEN** Division of Bioscience, Graduate School of Natural Science and Technology/ Faculty of Science; Okayama University, Okayama 700-8530, Japan

Abstract Crystal structure of photosystem II (PSII), splitting water molecules and evolving molecular oxygen in photosynthesis, was resolved at a resolution of 1.9 Å. The crystal structures of PSII have been reported at 3.8–2.9 Å resolutions, however, structures of Mn₄Ca-cluster, the oxygen-evolving center (OEC), and of ligands around OEC are not clearly resolved due to the limited resolutions. Furthermore, water molecules including substrates of oxygen-evolving reaction and components of hydrogen-bond network for proton transfer reaction are not uncovered. X-ray crystallographic study at 1.9 Å resolution revealed the chemical composition of OEC as Mn₄CaO₅. The most significant feature of the Mn₄CaO₅ cluster is its distorted chair form. The longer distances between one of the five oxygen atoms, O5, and metal atoms suggested that O5 may exist as a hydroxide ion in the S1-state of Kok cycle, and may provide one of two substrates for the di-oxygen bond formation. Since two water molecules binding to OEC are within the hydrogen-bond distances to O5, one of these two water molecules may provide another substrate. An extensive hydrogen-bond network was found between Y_Z (D1-Tyr161) and the Mn₄CaO₅ cluster, and from Y_Z to a bulk solution region. These new findings are expected to accelerate researches of natural and artificial photosynthesis.