

X線自由電子レーザーで決定した光化学系 II 複合体の無損傷結晶構造と水分解反応機構

菅 倫寛

岡山大学大学院自然科学研究科/岡山大学光合成研究センター 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

秋田総理

岡山大学大学院自然科学研究科/岡山大学光合成研究センター 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

山本雅貴

国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学総合研究センター 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

吾郷日出夫

国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学総合研究センター 〒679-5148 兵庫県佐用郡佐用町光都 1-1-1

沈 建仁

岡山大学大学院自然科学研究科/岡山大学光合成研究センター 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

要旨

光合成は光エネルギーを有用な化学エネルギーに変換する化学反応であり、地球上ほぼ全ての生物の生命活動を支えている。光合成の最初の反応は、分子量700 kDaにも及ぶ膜タンパク質複合体である光化学系 II (PSII) が光エネルギーを利用して行う、水分子の分子状酸素への光酸化であり、これは PSII 内の酸素発生中心 (OEC) によって触媒され、S-state サイクルを経て進むことが知られている。PSII の構造は放射光を用いた X 線結晶構造解析法によって 1.9 Å 分解能で解析され、OEC の実体である Mn_4CaO_5 クラスターの歪んだ椅子型構造や配位アミノ酸など周囲タンパク質の詳細な環境が明らかにされている。しかし、OEC 中の Mn 原子が X 線照射による還元を受けやすいことが X 線吸収微細構造 (EXAFS) 測定によって示されており、放射光を用いた結晶構造解析で決定した Mn-Mn 原子間の距離は EXAFS 測定や理論計算の結果より僅かに長いことが認められていた。放射線損傷を排除するため、我々は SACLA の X 線自由電子レーザー (XFEL) と何百にも及ぶ巨大で同型な結晶を用いて PSII の S_1 状態における無損傷構造を 1.95 Å 分解能で解析した。放射光 X 線を用いて決定したものと比べると XFEL によって決定した OEC では Mn-Mn 原子間の距離が 0.1-0.2 Å 短くなっていた。 Mn_4CaO_5 クラスター中にあるユニークな酸素原子、O5 の位置もわずかに違っていたが、周りの Mn1D, Mn4A との距離が長い特徴は変わらなかった。XFEL 構造にもとづき、水分解反応の開始状態では酸素発生中心を構成する Mn の価数は Mn1D が +3, Mn2C が +4, Mn3B が +4, Mn4A が +3 であること、O5 が水分解反応における基質分子の一つを提供している可能性があり、その化学種は OH^- であることを明らかにした。これらの結果は水分解の反応機構を解明するための構造基盤を提供し、水分解の人工触媒合成のための設計図ともなり得ると期待される。

1. はじめに

光合成は植物や各種の藻類が行う、太陽光を利用して CO_2 と水から有機物をつくる化学反応であり、その副産物である酸素分子はわれわれ人類を含む地球上のすべての好気性生物の生存をささえている。また、光合成によって太陽の光エネルギーは有機物の化学エネルギーの形に変換され、地球上生物の生存に必要なエネルギーを供給している。光合成において最初に起こるのは光エネルギーの吸収、一連の電子伝達、水分解反応であり、これらの反応は光化学系 II 複合体 (PSII) により触媒されている。PSII は 20 個のタンパク質サブユニットと多数の補欠因子から

構成され、単量体の分子量が 350 kDa になる色素・タンパク質複合体であるが、シアノバクテリアでは二量体を形成し、総分子量が 700 kDa にも及ぶ巨大な膜タンパク質複合体として機能している。PSII 中の酸素発生中心 (Oxygen-evolving center, OEC) においては文字どおり水分子が水素原子、酸素原子、電子へと分解されて最終的に酸素分子が発生している。この反応は S-状態遷移モデル (Kok-cycle) に従って進行し、基質である水分子は OEC によってひとつずつの電子が引き抜かれ、反応開始状態に相当する S_1 状態から順に $S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ へと進展し、合計 4 つの電子が引き抜かれると 2 つの水分子からプロトンと酸素分子を放出して再度 S_1 状態へと戻る。この水分解反

応の機構を詳細に理解することは光合成のメカニズムを解明するのに不可欠なだけでなく、再生可能でクリーンなエネルギーを作り出す人工光合成研究への応用にも期待されており、エネルギー問題がクローズアップされている昨今において加速度的に注目が高まっている。その重要性から PSII の結晶学的な構造研究が白熱する中、2011年に岡山大学・大阪市立大学の研究グループは PSII 結晶の品質を大幅に改善することに成功し、その結晶構造を SPring-8 の放射光 X 線を利用して 1.9 Å 分解能で決定した¹⁾。この結晶構造解析により、OEC が“ゆがんだイス型構造”の Mn_4CaO_5 クラスターであることが突き止められ、OEC 周辺の水分子を含む詳細な構造情報が明らかになり、水分解反応への理解が大きく進展した。(PSII の 1.9 Å 分解能での結晶構造解析の詳細については本誌に掲載された神谷信夫氏の解説記事²⁾を参照されたい。)しかしながら放射光の X 線を用いて解析された OEC 構造中の Mn-Mn 原子間距離は、これまで報告されていた X 線吸収微細構造 (Extended X-ray Absorption Fine Structure, EXAFS) 測定法を用いて決定された Mn-Mn の距離^{3,4)} や結晶構造を基にした理論計算の結果⁵⁻⁷⁾ よりも 0.1-0.2 Å 長くなっており、放射光 X 線を用いて決定した結晶構造は放射線による損傷の影響をうけている可能性を否定できなかった。とくに、 Mn_4CaO_5 クラスターの 5 つの酸素原子のうち、O5 とよばれる酸素原子はそのまわりの Mn との結合距離がきわめて長く、このような長い結合距離が放射線損傷に由来するものなのか、それとも酵素本来の特徴を示しているのかが不明で、水分解反応の機構を考える上で大きな問題となっていた。

近年、X 線自由電子レーザー (XFEL) とよばれる新しい技術が生まれたことにより、これまで不可能とされていた放射線による損傷をうけていない結晶構造を決定する方法が実現可能となった⁸⁾。XFEL では従来の放射光の 100 兆倍もの明るい X 線を 1 パルスとして試料に照射するので、照射位置の試料は破壊されてしまうが、1 パルスの持続時間が数十フェムト秒であるため、ピコ秒単位で起こるといわれている放射線損傷による構造変化が起こるまえに X 線回折データ収集が可能となり、損傷をうけていない天然状態の構造を決定することができる。この方法はその特徴から“壊れる前に回折を記録する” (Diffraction before destruction) と呼ばれている。日本においても理化学研究所が建設した XFEL 施設である SACLA が 2012 年に共用開始し、一般ユーザーが利用できるようになった。

2. XFEL を活用した PSII の無損傷結晶構造解析

一般に、酵素による触媒反応は触媒中心の官能基と基質の構造や相互作用がごくわずかな変化することにより進行する。このごくわずかな構造や相互作用の変化と放射線

損傷による構造の変化とを区別することは困難なため、触媒反応を完全に理解するには放射線損傷による構造変化が起こらない方法での構造解析が不可欠である。また、わずかな構造や相互作用の変化を正確に検知するためには高分解能の構造解析が必要である。放射線損傷の影響のまったく受けていない PSII の高分解能の結晶構造を得ることを目的として、数百個にもおよぶ PSII の大型かつ同型な結晶を調製し、SACLA を用いて固定ターゲットによる、フェムト秒回転結晶構造解析 (Serial Femtosecond Rotation Crystallography, SF-ROX) を行った⁹⁾。XFEL の特性を活かした構造解析の例としてはナノサイズの微結晶を用いるシリアルフェムト秒結晶構造解析法 (Serial Femtosecond Crystallography, SFX) がよく知られているが、使用する結晶のサイズがナノメートルからマイクロメートルであるため、結晶格子のサイズが $8 \text{ M}\text{\AA}^3$ にもおよぶ PSII のような巨大な膜タンパク質では、SFX を適用した場合の回折分解能に限界がある¹⁰⁻¹²⁾。今回我々が採用した、大型の結晶 ($1.2 \times 0.5 \times 0.2 \text{ mm}$) を用いた SF-ROX の最大の特長は、回折に寄与する結晶の体積を大きくすることにより回折分解能を確保し、かつ、振動領域の連続した一連の静止回折写真を取得することにより既存の構造解析の手法の適用が可能となることにある。無損傷の回折データを確保するため、XFEL パルス照射するごとに照射位置を $50 \mu\text{m}$ 以上離して放射線損傷の及んでいない場所へ結晶を移動させながら、 0.2° ずつ回転させて連続静止回折写真を取得することにより、無損傷の回折データを収集した。実験時の XFEL 照射位置あたりのドーズ量とフォトン密度はそれぞれ 1.4 MGy 、 $0.26 \times 10^{10} \text{ photons}/\mu\text{m}^2$ となり、放射光 (シンクロトロン, SR) の X 線を用いた回折データ収集の条件とほぼ同程度であった。再現性を確保するため、独立のデータセットを二回収集した。一つは 254 個の結晶から計 5,592 枚の回折写真を測定し、もう一つは 82 個の結晶から計 2,058 枚の回折写真を測定し、それぞれを 1.95 Å 分解能で構造解析した。得られた構造は SR の X 線を用いて決定した結晶構造の分解能とほぼ同等であり、水分解反応の機構を議論するのに十分な精度をもっていた¹³⁾ (Fig. 1(a) 参照, PDB ID: 4UB6, 4UB8)。

3. PSII の S_1 状態の無損傷結晶構造

XFEL を用いた OEC の全体構造は SR を用いた OEC と良く似ていたが、顕著な違いが Mn-Mn, Mn-O の距離において見られた。XFEL 構造では Mn-Mn の平均距離は Mn1D - Mn2C が 2.7 Å, Mn1D - Mn3B が 3.2 Å, Mn1D - Mn4A が 5.0 Å, Mn2C - Mn3B が 2.7 Å, Mn2C - Mn4A が 5.2 Å, Mn3B - Mn4A が 2.9 Å となっており、全ての Mn-Mn 距離が SR 構造と比べて 0.1-0.2 Å ずつ短くなっており、EXAFS や理論計算の結果とも良く一致した (Fig. 1(b) 参照)。一方 Mn-Ca の距離においては Mn1D-

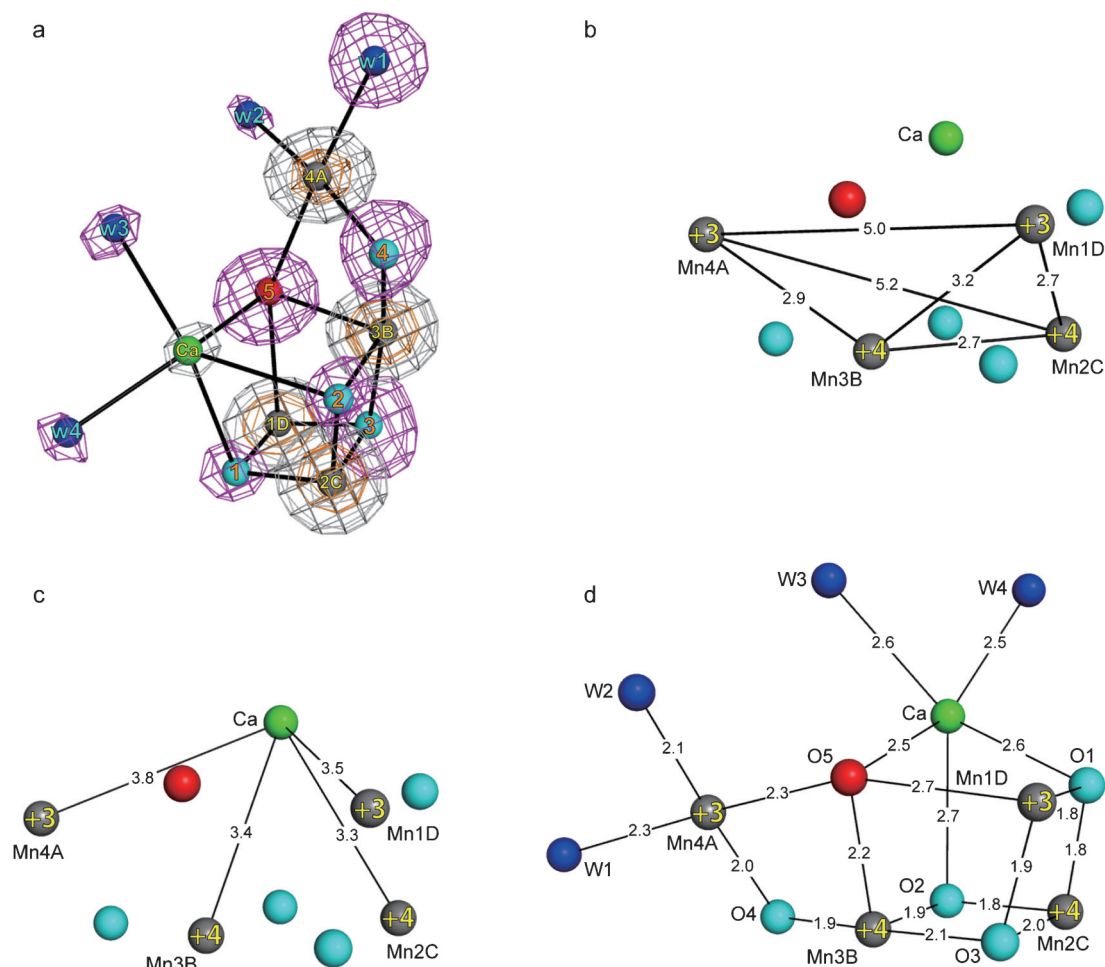


Fig. 1 (Color online) Atomic structure of the OEC by XFEL.

a, Electron density maps of the OEC. Grey, $2mF_o - DF_c$ map contoured at 7 sigma; brown, $2mF_o - DF_c$ map contoured at 15 sigma; purple, $mF_o - DF_c$ map contoured at 6 sigma. The $mF_o - DF_c$ map was calculated after introducing the manganese and calcium atoms but without the oxygen atoms and water molecules. Colour codes for atoms: grey, manganese; green, calcium; cyan, oxo-oxygen; red, O5; blue, water. Numbers 1-4 in the cyan spheres indicate O1-O4 atoms, and 1D, 2C, 3B and 4A indicate the four manganese ions. b, Mn-Mn distances in the OEC (in Å). Numerals in the spheres indicate the valence of manganese atoms assigned in this work. c, Mn-Ca distances in the OEC (in Å). d, Mn-O, Ca-O, Mn-water and Ca-water distances in the OEC (in Å). Converted from Nature **517**, 99 (2015).

Caが3.5 Å, Mn2C-Caが3.3 Å, Mn3B-Caが3.4 Å, Mn4A-Caが3.8 Åとなっており, SR構造と大きな違いは見られなかった (Fig. 1(c)参照)。このことによりMnイオンは放射線損傷により還元を受けたために互いの距離が長くなったが, Caイオンは損傷により還元を受けないためMnイオンとの距離が変化しなかったことが示唆される。

SR構造において, Mn_4CaO_5 クラスター中のオキソ原子のひとつであるO5が周囲のMn1D, Mn3B, Mn4A, Caとの結合距離が異常に長く, 2.4-2.7 Åであるという特徴があり, このO5原子が酸素分子の形成における役割について様々な議論が行われている。XFEL構造ではMn3B-O5が2.2 Å, Mn4A-O5が2.3 Å, Mn1D-O5が2.7 Å, Ca-O5が2.5 Åとなっていた (Fig. 1(d)参照)。これをSR

構造と比較するとMn3B, Mn4A, CaからのO5への結合は0.2 Åずつ短くなっていたが, Mn1Dへの結合は0.1 Å長くなっていた。これらの結果を統合的に解釈するとMn4AはMn1Dに比べて溶媒に晒された環境にあるためX線による還元を受けやすく, その結果SR構造ではMn4A-O5が長くなって観測されたことが示唆される。しかし, XFEL構造においてもO5とMnとの結合距離が他のオキソ酸素とMnの結合距離 (1.8-2.1 Å) に比べて著しく長いという特徴は変わらなかった。また, 理論計算によりO5を O^{2-} と想定した場合にはO5はMn1DもしくはMn4Aのいずれかと1.9 Å以下の短い結合を持ち, 反対側のMn (Mn4AまたはMn1D) とは結合しないという, 左型構造 (O5の左側にスペースができる) あるいは右型構造^{7,14)} になること, XFELの構造に最も適合するのはO5

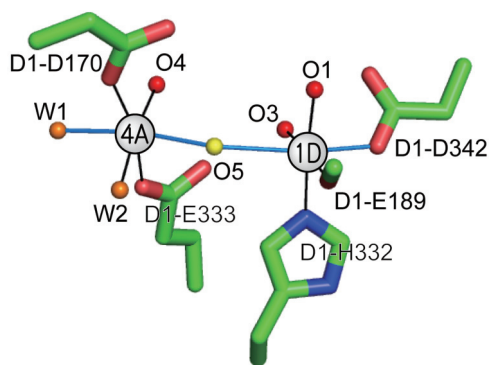


Fig. 2 (Color online) Jahn-Teller axes on Mn1D and Mn4A. Converted from Nature 517, 99 (2015).

の原子種を OH^- と想定した場合であることが示されている^{15,16}。従って、 Mn_4CaO_5 クラスター中で見られる Mn-O5 の長い結合は OH^- と Mn1D, Mn4A との結合に由来する OEC の機能に関連した特有の性質であることが考えられる (次節参照)。

XFEL 構造において、OEC を構成する四つの Mn はいずれも六配位構造となっており、平均のリガンド距離は Mn1D が 2.1 Å, Mn2C が 2.0 Å, Mn3B が 2.0 Å, Mn4A が 2.1 Å となっていた。Mn1D と Mn4A の平均リガンド距離が Mn2C と Mn3B よりも少し長いのは、Mn1D の二つの配位子 O5 と D1 タンパク質の 342 番目のアスパラギン残基の側鎖のカルボン酸酸素、Mn4A の二つの配位子 O5 と W1 の方向のリガンド距離が長くなっているためであり、この配位子の長さにおける歪みは Jahn-Teller 効果と呼ばれ、+3 の価数を持つ Mn 原子に特徴的なものである (Fig. 2 参照)。これらの知見に基づき、我々は S_1 状態の四つの Mn 原子の価数が (Mn1D, Mn2C, Mn3B, Mn4A) = (+3, +4, +4, +3) であることを提唱した。これは最近報告された OEC を模倣した合成 Mn_4CaO_4 化合物における Mn イオンの価数の分布¹⁷ や EPR と理論計算を用いて得られた S_2 状態の Mn1D の価数が +3 であるという報告¹⁸ と一致している。

4. 水分解反応機構

上述のように O5 原子が特殊な位置にあり、その化学種が OH^- である可能性が高いことが示唆されたので、O5 が酸素分子の形成に必要な基質の一つを提供していることが考えられる。これらの知見から水分解反応の機構を提唱した (Fig. 3 参照)。まず、 S_1 状態においては Mn1D および Mn4A が同じ +3 の価数を持ち、さらに、Jahn-Teller 効果により Mn1D-O5 と Mn4A-O5 は長い結合距離をもつ。PSII の反応中心が一つの光子を吸収し、 Mn_4CaO_5 クラスターから電子を一つひき抜き、 S_2 状態になると Mn1D あるいは Mn4A のいずれかが +4 の価数をもつ。

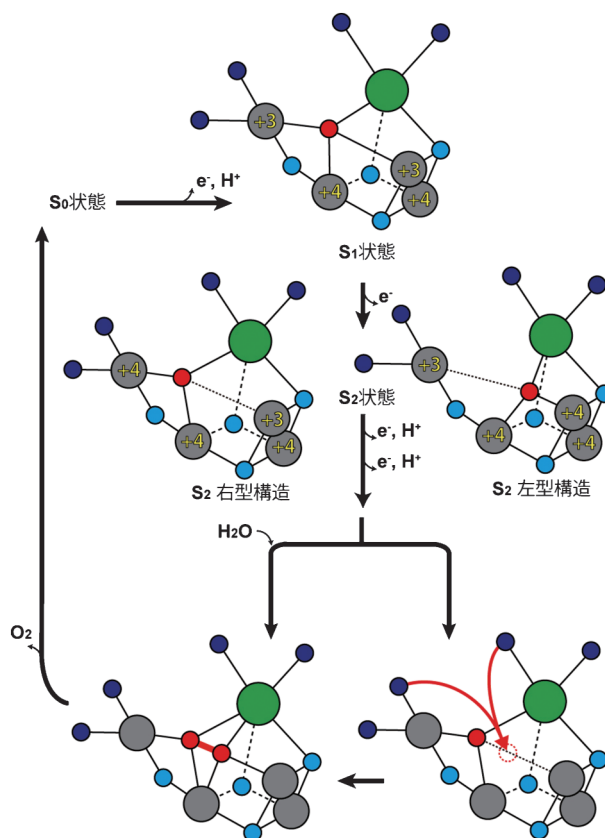


Fig. 3 (Color online) Possible mechanisms for the oxygen-evolving reaction. Converted from Nature 517, 99 (2015).

そして O5 は一方の Mn の正の電荷が高くなったこと、および、Jahn-Teller 軸の消失により、+4 の価数をもつ Mn の側にひき寄せられる。このとき、Mn4A の価数が +4 になれば O5 は Mn4A の側にひき寄せられ Mn_3CaO_4 のキューバンの部分は開いた構造をとり、その結果、Mn1D の側にスペースができて S_2 は右型構造となる。逆に、Mn1D の価数が +4 になれば O5 は Mn1D の側にひき寄せられ Mn_3CaO_4 のキューバンの部分の閉じた左型構造の S_2 状態になる¹⁹。つづく S_3 状態および S_4 状態では、この開いたスペースに新しい水分子が入り O5 と $\text{O}=\text{O}$ 結合を形成する。生成された酸素分子は排出され酸素発生中心は S_0 状態にもどり、新たな水分子が O5 の位置へと取り込まれる。つづく S_0 状態から S_1 状態への遷移にともない、O5 の水分子からプロトンが抜き取られることにより O5 は OH^- になり、 S_1 状態へもどる。これらの一連の反応機構は理論計算の結果²⁰、および、最近の電子スピン共鳴による結果²¹ と一致していた。

謝辞

本研究は岡山中島芳樹氏、清水哲哉博士、理化学研究所の平田邦生博士、上野剛博士、村上博則博士、山下恵太郎博士との共同研究であり、この場を借りてお礼を申し上げる。本研究は科学研究費特別推進研究、若手 (B)、

及び X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題の支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) Y. Umena, K. Kawakami, JR. Shen and N. Kamiya: *Nature* **473**, 55 (2011).
- 2) 神谷信夫, 川上恵典, 梅名泰史, 沈 建仁: *日本放射光学会誌* **26**, 3 (2013).
- 3) J. Yano, J. Kern, Y. Pushkar, K. Sauer, P. Glatzel, U. Bergmann *et al.*: *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences* **363**, 1139 (2008).
- 4) H. Dau and M. Haumann: *Coordination Chemistry Reviews* **252**, 273 (2008).
- 5) W. Ames, DA. Pantazis, V. Krewald, N. Cox, J. Messinger, W. Lubitz *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 19743 (2011).
- 6) A. Galstyan, A. Robertazzi and EW. Knapp: *J. Am. Chem. Soc.* **134**, 7442 (2012).
- 7) H. Isobe, M. Shoji, S. Yamanaka, Y. Umena, K. Kawakami, N. Kamiya *et al.*: *Dalton transactions* **41**, 13727 (2012).
- 8) R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert and J. Hajdu: *Nature* **406**, 752 (2000).
- 9) K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, M. Hatanaka *et al.*: *Nat. Methods* **11**, 734 (2014).
- 10) J. Kern, R. Alonso-Mori, R. Tran, J. Hattne, RJ. Gildea, N. Echols *et al.*: *Science* **340**, 491 (2013).
- 11) J. Kern, R. Tran, R. Alonso-Mori, S. Koroidov, N. Echols, J. Hattne *et al.*: *Nat. Commun.* **5**, 4371 (2014).
- 12) C. Kupitz, S. Basu, I. Grotjohann, R. Fromme, NA. Zatsepin, KN. Rendek *et al.*: *Nature* **513**, 261 (2014).
- 13) M. Suga, F. Akita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami *et al.*: *Nature* **517**, 99 (2015).
- 14) DA. Pantazis, W. Ames, N. Cox, W. Lubitz and F. Neese: *Angewandte Chemie* **51**, 9935 (2012).
- 15) M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, M. Suga, F. Akita, J.-R. Shen and K. Yamaguchi: *Theoretical studies of the damage-free S₁ structure of the CaMn₄O₅ cluster in oxygen-evolving complex of photosystem II.* *Chem. Phys. Lett.* **623**, 1 (2015).
- 16) M. Shoji, H. Isobe, S. Yamanaka, M. Suga, F. Akita, J.-R. Shen and K. Yamaguchi: *On the guiding principles for lucid understanding of the damage-free S₁ Structure of the CaMn₄O₅ cluster in the oxygen evolving complex of photosystem II.* *Chem. Phys. Lett.* **627**, 44 (2015).
- 17) C. Zhang, C. Chen, H. Dong, JR. Shen, H. Dau and J. Zhao: *Science* **348**, 690 (2015).
- 18) N. Cox, L. Rapatskiy, JH. Su, DA. Pantazis, M. Sugiura, L. Kulik *et al.*: *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 3635 (2011).
- 19) J.-R. Shen: *Annual Review fro Plant Biology* **66**, 23 (2015).
- 20) PE. Siegbahn: *Biochim. Biophys. Acta* **1827**, 1003 (2013).
- 21) N. Cox, M. Retegan, F. Neese, DA. Pantazis, A. Boussac and W. Lubitz: *Science* **345**, 804 (2014).

著者紹介



菅 倫寛

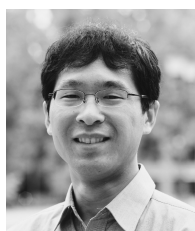
国立大学法人岡山大学大学院自然科学研究科 助教

E-mail: msuga@okayama-u.ac.jp

専門：構造生物学, 蛋白質結晶学

【略歴】

2009年大阪大学理学研究科修了, 博士(理学)。米国オレゴン健康科学大学博士研究員を経て, 2014年より現職。



秋田総理

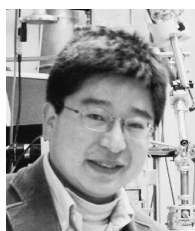
国立大学法人岡山大学大学院自然科学研究科 助教

E-mail: fusamichi_a@okayama-u.ac.jp

専門：構造生物学, 蛋白質結晶学

【略歴】

2007年大阪大学理学研究科修了, 博士(理学)。中央農業総合研究所, 産業技術総合研究所博士研究員を経て, 2014年より現職。



山本雅貴

国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学総合研究センター 利用システム開発研究部門長(兼) 基盤研究部長

E-mail: yamamoto@riken.jp

専門：放射光構造生物学

【略歴】

1991年大阪大学大学院理学研究科博士後期課程修了, 博士(理学)。同年, 理化学研究所に入所, 2011年より利用システム開発研究部門長。兵庫県立大学大学院客員教授および神戸大学連携創造本部客員教授を兼任。



吾郷日出夫

国立研究開発法人理化学研究所 放射光科学総合研究センター 利用システム開発研究部門 ビームライン基盤研究部 生命系放射光利用システム開発ユニット 専任研究員

E-mail: ago@spring8.or.jp

専門：放射光構造生物学

【略歴】

1991年大阪大学大学院理学研究科博士課程前期修了。日本たばこ産業株式会社, 理化学研究所研究員, 前任研究員を経て2013年より現職。この間1995年博士(理学)(東京工業大学)。



沈 建仁

国立大学法人岡山大学大学院自然科学研究科 教授

E-mail: shen@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, 博士(理学)。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。2013年より同光合成研究センター長を兼任。

Radiation damage-free structure of photosystem II revealed by an X-ray free electron laser illuminates water splitting reaction mechanism

Michihiro SUGA Graduate School of Natural Science and Technology/Photosynthesis Research Center
3-1-1 Tsushima Naka, Okayama, 700-8530, Japan

Fusamichi AKITA Graduate School of Natural Science and Technology/Photosynthesis Research Center
3-1-1 Tsushima Naka, Okayama, 700-8530, Japan

Masaki YAMAMOTO RIKEN SPring-8 Center
1-1-1 Kout Sayo, Hyogo, 679-5148, Japan

Hideo AGO RIKEN SPring-8 Center
1-1-1 Kout Sayo, Hyogo, 679-5148, Japan

Jian-Ren SHEN Graduate School of Natural Science and Technology/Photosynthesis Research Center
3-1-1 Tsushima Naka, Okayama, 700-8530, Japan

Abstract Photosynthesis converts light energy into biologically useful chemical energy vital to life on Earth. The initial reaction of photosynthesis takes place in photosystem II (PSII), a 700 kDa membrane protein complex that catalyzes photo-oxidation of water into dioxygen through an S-state cycle of the oxygen evolving complex (OEC). The structure of PSII has been solved by X-ray diffraction (XRD) at 1.9 Å resolution, which revealed that the OEC is a Mn_4CaO_5 cluster coordinated by a well-defined protein environment. However, extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) studies showed that the manganese atoms in the OEC are easily reduced by X-ray irradiation, and slight differences were found in the Mn-Mn distances determined by XRD and EXAFS studies. Here we report a radiation-damage free structure of PSII in the S_1 state at a resolution of 1.95 Å using femtosecond X-ray pulses of the SACLA facility and hundreds of large, highly isomorphous PSII crystals. Compared with the structure from XRD, the OEC in the X-ray free electron laser (XFEL) structure has Mn-Mn distances that are shorter by 0.1–0.2 Å. Based on the XFEL structure, the valences of each manganese atom were tentatively assigned as Mn1D (+3), Mn2C (+4), Mn3B (+4) and Mn4A (+3) in the S_1 state and that O5 is a hydroxide ion and may serve as one of the substrate oxygen atoms. These findings provide a structural basis for the mechanism of oxygen evolution, and we expect that this structure will provide a blueprint for the design of artificial catalysts for water oxidation.