

シリアルフェムト秒結晶解析により明らかにした光化学系 II の反応中間体の構造と酸素発生機構

菅 倫寛

岡山大学異分野基礎科学研究所 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

秋田総理

岡山大学異分野基礎科学研究所 〒700-8530 岡山県岡山市北区津島中 3-1-1

菅原道泰

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

久保 稔

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

岩田 想

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

岡山大学異分野基礎科学研究所 〒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、二量体の分子量が70万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 (水分解反応) である。この反応は PSII 内の酸素発生複合体 (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 (Fig. 1 参照)。水分解反応の開始状態に相当する S₁ 状態の PSII の構造は放射光および X 線自由電子レーザー (XFEL) により、2 Å を超える分解能で解析され、OEC の実体が Mn₄CaO₅ クラスターであることだけでなく、OEC 内における正確な原子間距離が明らかにされている。しかし、水分解反応の中間体状態に相当する結晶構造は、原子レベルの分解能では解析されておらず、それゆえ反応機構への考察は反応開始状態の結晶構造およびそれらに関連した理論計算や光学的知見などからの議論に限定されていた。そこで筆者らは PSII の微小結晶を用いて、二閃光照射により励起させて PSII の反応中間体 S₃ 状態を調製し、XFEL を用いたシリアルフェムト秒結晶解析法により、この構造を 2.35 Å 分解能で決定した。暗黒下で安定な S₁ 状態との同型差フーリエ電子密度マップにより、光励起によって起こる構造変化を電子供与体側と授与体側の両方で確認した。とりわけ、OEC の周辺で、プロトンの放出およびこれまで基質の候補とされていたオキソ酸素の一つである O5 近辺への新しい水分子 O6 の挿入が確認された。これらの構造変化により S-state サイクル遷移時のプロトン放出の経路、及び O5 と O6 が O=O 結合を形成する反応機構を提唱した。これらの結果は水分解の触媒反応の基本原理を明らかにしただけでなく、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 CO₂ 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 (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、シアノバクテリアでは二量体を形成し、総分子量が 70 万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 の酸素発生複合体 (Oxygen-evolving complex, OEC) では基質である水分子が酸素、プロトン、電子へと分解され、分子状酸素が放出される水分解反応が、S-state と呼ばれる 5 つの酸化状態を経て触媒されている (Fig. 1 参照)。S-state の *i* (*i*=0~4) は OEC に蓄積された酸化数を表しており、PSII 内で光励起した反応中心ク

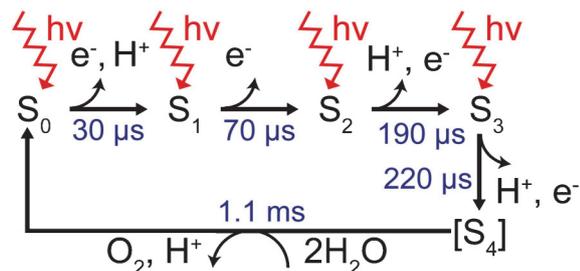


Fig. 1 (Color online) S-state cycle (Kok-cycle). Si-state cycle of the water-oxidation reaction of OEC. hv, photons.

ロロフィルの電子が電子授与体である Q_B キノンまで伝達されたことにより生じる正孔を OEC が補う事により逐次増加していく。反応開始状態である S_1 状態から反応遷移状態である S_4 状態へ達すると、OEC に蓄積された酸化力は、水分子の酸化、分子状酸素の発生を引き起こし、 S_0 状態へターンオーバーさせる。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注目が高まっている。

これまでに PSII の結晶構造解析により、OEC の S_1 状態に相当する構造は 1.9 \AA 分解能で決定され、その正体が Mn_4CaO_5 の組成を持った“歪んだイス”のような形であることが明らかになった^{1,2)}。さらに X 線損傷を受けていない 1.95 \AA 分解能の構造から、OEC の“歪んだイス”を構成する Mn 原子の価数と各原子間の正確な距離が明らかとなったが^{3,4)}、水分解反応の機構への考察はこれら反応開始状態の立体構造およびそれらに関連した理論計算や分光学的知見などから導き出されたものに過ぎなかった。(PSII の 1.9 \AA 分解能での結晶構造解析の詳細および 1.95 \AA 分解能での無損傷結晶構造解析の詳細については本誌に掲載された解説記事^{2,4)}をそれぞれ参照されたい。)特に OEC 内の O5 と呼ばれるオキソ酸素は周囲の Mn 原子との結合距離が他のオキソ酸素と比べて長く、ゆえに反応性に富む環境にあると推定されることから、O5 が酸素発生の基質のひとつとなる反応機構が提唱されていたが、そのような反応機構が実際に存在するのかが不明であった。もし仮に存在したとしても O5 近くには酸素発生に必要なもうひとつの基質水分子を許容できるだけの空間がないため、 S_1 状態の立体構造のみからでは反応機構をうまく説明できない。このため、O5 とは異なる部位で分子状酸素が形成される反応機構も複数提案され、多くの議論がなされていた。さらに、水分解反応では水分子から引き抜かれたプロトンを放出しなければならないが、そのための経路がどこであるか、また、どうして放出されたプロトンは逆流しないのか、といった疑問に対する実験的な証拠はほとんど

存在してなかった。

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結晶構造解析法が芽生えた⁵⁾。XFEL は従来の放射光の 10 億倍もの高いピーク輝度をもつ 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 パルスはわずか数十フェムト秒という短い持続時間のため、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開始する前に X 線回折データ収集が可能となる。この“壊れる前に回折が完結する” (Diffraction before destruction) の原理に基づくタンパク質構造決定法のひとつであるシリアルフェムト秒結晶構造解析法を用いれば、放射線損傷の影響を排除して、駆動する酵素反応をフェムト秒の時間分解能で捕らえることが可能である。PSII は光照射によって S 状態が遷移するため、レーザー照射による光励起とシリアルフェムト秒結晶学を組み合わせたポンププローブ実験によって反応中間体の回折データ取得が可能となる。

これまで、米国の XFEL 施設 LCLS が稼動を始めて以来、その重要性から PSII の反応中間体構造は米国の研究グループから次々と報告されていたが⁶⁻⁸⁾、いずれも分解能が 4.5 \AA 程度に止まり、反応機構の核心に迫ることができなかった。このため、高分解能での PSII 反応中間体の構造解析が待ち望まれていた。

2. PSIIの反応中間体構造の捕捉を目的とした時間分解シリアルフェムト秒結晶構造解析

筆者らは好熱性ラン藻 *Thermosynechococcus vulcanus* から単離した PSII を結晶化し、わが国の XFEL 施設である SACLA にて時分割シリアルフェムト秒結晶構造解析を行った。光励起効率を良くするため、 $100 \mu\text{m}$ 以下のサイズの微小結晶を実験に用いた。微小な結晶サイズは溶液組成や温度などの変化による品質劣化が起こり易く、また、結晶サイズが小さくなる事で X 線回折に寄与する結晶体積も減るため、高い分解能の回折斑点を与える結晶を調製することに苦労した。結晶化方法、結晶化の後に用いる溶液の組成と処理方法などの検討に加え、シリアルフェムト秒結晶解析法に使用する結晶輸送媒体⁹⁾を検討した (次項参照)。その結果、 2 \AA 分解能まで回折し、かつ、レーザー照射によって S_3 状態までの励起が十分な微小結晶を与える条件を見出した。

PSII の時分割シリアルフェムト秒結晶解析法では大量のサンプルを必要とする。600 L の細胞培養から得られた 1 g の PSII タンパク質を用いて実験を行い、光励起していない S_1 状態の PSII と二閃光照射によって励起された S_3 状態の PSII から合計 68 万枚の回折イメージを集め、最終的に両データセットとも 2.35 \AA 分解能で構造解析した¹⁰⁾。

3. シリアルフェムト秒結晶学のための結晶供給手法

シリアルフェムト秒結晶構造解析では、フレッシュなタンパク質結晶を連続してX線照射位置に送る必要があり、特にその時分割実験ではサンプルストリームを乱すことなく、一定速度で結晶を吐出しなければならない。これまで、シリアルフェムト秒結晶構造解析では結晶を含む液状試料をそのまま吐出する液体ジェットインjekターが用いられていたが（液体ジェット法）、その速い流速（～10 m/sec）によりストリームは安定するが、大量のサンプルを消費するため膜タンパク質などの試料の量が限られるサンプルには不向きである。そこでSACLAでは結晶を高粘度環境下で吐出できる高粘度試料用インjekターを開発した。例えば、ゲル状の様な高粘度媒体を用いれば、液体ジェット法と比べて低速で試料を押し出すことが可能になり、その結果、サンプル消費量を大幅に低減できる。この高粘度試料用インjekターをサンプルチャンバー、各種サンプルインjekター、および multi-port charge-coupled device (MPCCD) 検出器により構成される汎用的実験システム DAPHNIS (diverse application platform for hard X-ray diffraction in SACLA)¹¹⁾に導入した。ここで、LCLSでは空気散乱を防ぐために真空サンプルチャンバーを導入しているのに対し、DAPHNISのサンプルチャンバー内は大気圧ヘリウム雰囲気環境下のため、迅速、かつ容易に測定試料を交換することができる。SACLAでは、膜タンパク質を含む様々なタンパク質の結晶を結晶輸送媒体としてのグリースと混ぜて高粘度化することにより、低速で高粘度試料用インjekターから吐出する手法を開発し（グリースマトリックス法)^{9,12)}、従来の液体ジェット法と比べ1/10～1/100のサンプル消費量での構造決定が可能になった。しかしながら、これまで鉍物油ベース等のグリースを用いていたが、そのグリースに由来するバックグラウンド散乱ノイズは無視できなかった。

そこで本研究では、従来グリースと比較して低いバックグラウンド散乱のグリース¹³⁾を導入した。その結果、チャンバー内温度約26°Cの環境下、二閃光照射時においては5.3 mm/sec (5.6 μ l/min)、また光励起なしの測定時では2.6 mm/sec (2.8 μ l/min)の流速でサイズ100 μ m以下のPSII結晶含有グリースを内径150 μ mのインjekターノズルから安定に吐出し、良質の回折イメージを収集することができた。

4. 閃光照射によるPSIIの光励起

PSII微結晶の二閃光照射には、波長532 nmのナノ秒パルスレーザー二台を使用した。それら二台のレーザーをXFELと同期させ、一閃光目照射の10 ms後に二閃光目を照射し、そのさらに10 ms後にXFEL光を照射すること

で、S₃状態の回折イメージを取得した。ただしPSIIは多数の発色団を含み結晶内部は励起されにくいので、本研究では光励起効率を上げるために、結晶サイズのほか閃光照射の面積や強度を最適化し、さらに二回の閃光とも二方向（すなわち微結晶の表面・裏面）から照射できる励起光学系を開発した^{14,15)}。

閃光照射によるPSII微結晶の反応効率は、フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) により評価した。一閃光目照射、二閃光目照射によるFTIRのスペクトル変化には、それぞれS₁→S₂遷移、S₂→S₃遷移に特徴的なピークが現れる。それらのピーク強度から反応効率を計算した結果、十分な強度の閃光照射下では各状態遷移確率は0.6を超え、微結晶中でも0.46の占有率でS₃状態を生成できることが示唆された。このS₃占有率を達成するためには、on-siteで実験直前に微結晶をプレフラッシュ¹し、閃光照射前のPSIIをS₁状態に揃えた。

5. 光励起、S₃状態遷移に伴って起こるPSIIの構造変化

上述した二閃光照射により励起した微小結晶はFTIRにより約半分のPSIIがS₃状態を占めていることなどから、観測された構造は水分子分解の直前の状態を反映していると考えられる。ただし、遷移効率²は完全ではないのでS₂状態やS₁状態の混入があることを踏まえ、ここでは二回閃光照射した状態 (2F状態) と呼ぶことにする。

2F状態のPSIIの全体構造はS₁状態とほとんど同じであり、構造全体のRMSDは僅か0.10 Åである。2F状態とS₁状態の回折データを用いて計算した同型差フーリエ電子密度マップ³に注目すると、Si-状態遷移による構造変化がOECとQ_Bキノンの周囲に局在していた。すなわ

¹ プレフラッシュ

本稿のように光励起させたサンプルの解析では励起前のサンプルの状態が均一に揃っている必要がある。暗黒下で静置したPSIIサンプルはS₁状態に揃うことが分かっているが、サンプル調製時の顕微鏡や蛍光灯などの光に励起されてSi状態の混入が起きたり、反応中心に電子供与が可能な還元型Y_D (D2サブユニット内のチロシン160) が生じたりする可能性がある。これらの影響を排除するため実験の直前にPSIIサンプルを閃光照射してS₁状態に揃えた。

² 遷移効率

PSIIの結晶はPSIIが高濃度の状態であるため、励起光を照射しても全てのPSIIの反応中心が励起されない（この光による励起が起こる効率を本稿では光励起効率としている）。さらに励起されたPSIIの全てが次のSi状態に遷移するとは限らない。光励起により次状態に遷移される効率を遷移効率とよぶ。

³ 同型差フーリエ電子密度マップ

光励起によるPSIIの構造変化はPSII内部の限られた場所で起こり、PSII全体の構造はほとんど変化しない。つまり光励起する前の状態とよく似ている（同型である）ので、光励起した状態と励起前の状態の差の電子密度を計算して同型差フーリエ電子密度マップを計算し僅かな構造変化を可視化している。

ち、期待したとおりに光励起による S_3 状態への遷移が起こり、その結果、電子供与側と授与側で起きた酸化還元反応とプロトン移動を構造変化として観察することに成功したと考えられた。

6. 電子授与体まわりの S_3 状態遷移による構造変化

PSIIの電子授与体である Q_B キノンには2つの電子とプロトンを受け取ったのち、チラコイド膜中の酸化型プラストキノンと置き換わることが知られている。 Q_B キノンはPSIIの内部ではピンと伸びたオタマジャクシのような構造をとっており、キノン頭部はD1サブユニットのHis215とSer264と水素結合を形成し、尾部に相当するイソプレノイド鎖はD1のPhe211, Met214, Phe255, Phe265, Phe274, D2-フェオフィチン、脂質分子などに囲まれた疎水的環境にある。これまでに報告された S_1 状態の結晶構造中の Q_B キノンは熱振動の指標となる温度因子の値が高いことから、プロトン化状態の異なるものが存在している可能性や Q_B キノンが動きやすい環境にあることが推定されていた。今回得られた2F状態と S_1 状態の電子密度および結晶構造を比較すると電子授与体まわりの光励起による構造変化を以下のように説明できる (Fig. 2(a)参照)。はじめに Q_B キノンが還元されたことによりキノン頭部はベンゼン環に垂直な軸方向に約10度回転し、His215とSer264との水素結合が強化されて0.1~0.2 Å短くなり、キノン頭部は安定化して温度因子が減少する。この水素結合強化によるキノン頭部の安定化はイソプレノイド鎖をよじらせる構造変化を誘引し、それに適応するためにイソプレノイド鎖の周囲にある疎水的環境はわずかに構造を変える。そしてこれらの疎水的環境が変化することにより、 S_1 状態では Q_B キノンを周囲の溶媒環境から遮蔽

しているAsn266, Asn267を含むループ領域部分が0.8 Å程度構造変化し、 Q_B キノンがPSIIの外部に出て行くためのルートが開かれる。加えて、 Q_B キノンをプロトン化するためのプロトンはTyr246やGlu244, D2-Lys264を含めた経路を通ること、 Q_B キノン近くに位置する重炭酸イオンもプロトン移動に関与している可能性があることなどが構造解析から明らかになった。

7. OECまわりの S_3 状態遷移による構造変化

2F状態と S_1 状態の同型差フーリエ電子密度マップおよびそれぞれの原子構造を比較すると少なくとも以下の6つの顕著な構造変化がOEC周囲に見られ、それらは水分解の反応機構をうまく説明するものである (Fig. 2(b)参照)。

- 1) Mn4がわずかにOECのキュバン部分から離れるよう外側に動き、Mn4とMn1との距離は0.1~0.2 Å長くなる。
- 2) キュバン部分を構成するCa²⁺がMn4から離れるように動く。
- 3) 新規の基質の水に相当するO6の強い電子密度がO5近くに現れる (Fig. 3参照)。
- 4) Glu189がキュバン部分から遠ざかり、O5とMn1の間にO6を収容できるスペースが現れる。
- 5) W665と呼ばれる水分子の移動性が増すことで、オキソ原子O4を基点とする15 Åにも及ぶ長い水素結合ネットワークが遮断される。
- 6) 以上5点の構造変化にともない、OECの配位子であるAsp61, Asp170, His332, Ala344がわずかに動く。

8. 水分解と酸素発生の反応機構

上記のOECまわりの構造変化のうち、特にW665の移動性の増加およびO6の挿入について水分解反応機構の観点から述べる (Fig. 4参照)。W665の移動性の増加により

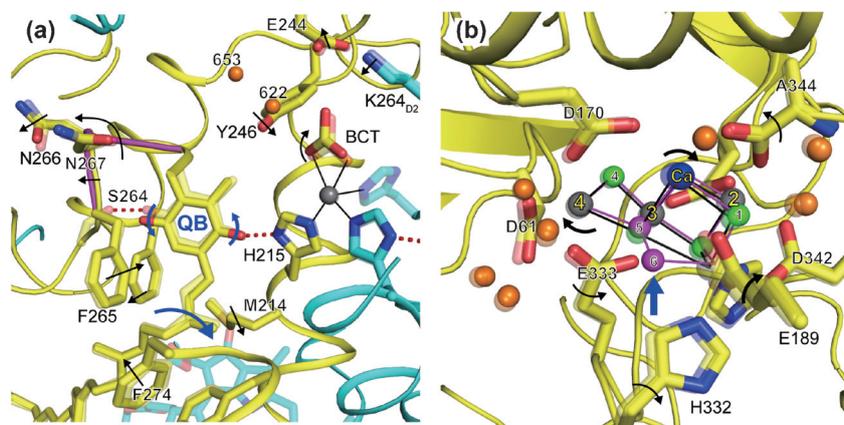


Fig. 2 (Color online) Light-induced structural changes around the Q_B binding site (a), and around OEC (b). The arrows indicate the light induced structural changes. The structure in the S_1 state is shown with faded colors. Light dark balls labeled 2-4 represent Mn ions; green and magenta balls labeled 1-6 represent oxygen atoms. Modified from *Nature* 543, 131-135 (2017).

W665 と W567 の間の水素結合が無くなり、W567 はもう一方で水素結合している O4 へと 0.1–0.2 Å 近づく。このとき W567 と O4 の距離は 2 つの PSII 単量体の平均で 2.3 Å となり、通常の水素結合よりもずっと短くなる。これは O4 が基質であり、O=O 結合のための準備段階を見ている可能性が考えられるが、結晶構造解析での原子間距離の誤差を考慮すると、S₃ 状態遷移に伴うプロトン放出の過程を見ていると筆者らは考えている。そして、W665 の移動性の増加による水素結合ネットワークの分断こそが放出されたプロトンの逆流を防ぐ理由である。なお、このプロトン放出経路は理論計算によっても予測されており^{16,17}、今回の実験結果と大方で一致する。

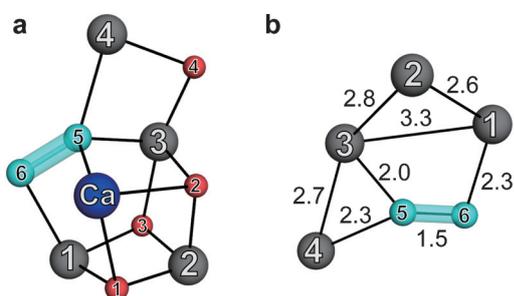


Fig. 3 (Color online) Structure of the Mn_4CaO_6 cluster after 2F illumination (a), and position of the newly inserted oxygen atom O6 relative to its nearby atoms (b). Light dark balls labeled 1–4 represent Mn ions; red and cyan balls labeled 1–6 represent oxygen atoms. Modified from *Nature* **543**, 131–135 (2017).

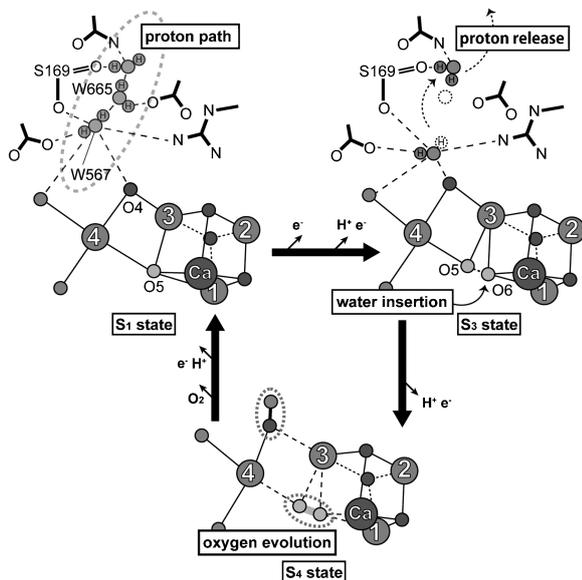


Fig. 4 Possible mechanism of O=O bond formation and proton transfer pathways from OEC. The dotted circle indicates displacement of the water molecule (W665) next to the water (W567) H bonded to O4. Possible pathways for proton transfer and the possible site of O=O bond formation are represented by the dashed circles. Modified from *Nature* **543**, 131–135 (2017).

新しい水 O6 は、基質の候補とされている O5 から 1.5 Å の位置に挿入され、O=O 結合を作るのに適した位置に挿入される。これは O5 と O6 が酸素発生のサイトであることを強く印象付けるものである。筆者らは S₁ 状態から 2F 状態への遷移に伴い、O6 の挿入により OEC は Mn_4CaO_5 から Mn_4CaO_6 クラスタ構造へと変化して酸素が発生すると結論した。この反応機構モデルは S₁ 状態の結晶構造や無損傷構造で発見された“歪んだイス”内の O5 の特異な環境に基づいて提案された反応機構^{1,3}を実証しただけでなく、理論計算¹⁸や電子スピン共鳴¹⁹による提案とも大方で一致する。

9. 今後の展望

本稿で解説した筆者らの研究は PSII における水分解・酸素発生反応の基本原則を明らかにしたといえる。すでに天然の触媒の立体構造を模倣した Mn_4Ca クラスタ合成の報告もなされている²⁰。今後は筆者らが明らかとした触媒反応の基本原則や立体構造情報をモデルテンプレートとした人工光合成研究が加速されることが期待される。また反応機構の全貌を明らかにするには残された反応中間体の構造解析や高い時間分解能での構造解析が必要となる。これらの研究においても XFEL は大きく貢献すると期待される。

謝辞

本研究は岡山中島芳樹氏、中林誠氏、梅名泰史氏、山根卓大氏、中野貴光氏、米倉慎一郎氏、Long-Jiang Yu 氏、坂本共洋氏、本村大樹氏、Jing-Hua Chen 氏、東京大学の中根崇智氏、井上茂之氏、濡木理氏、大阪大学の鈴木守氏、京都大学の榊田哲哉氏、名古屋大学の加藤祐樹氏、野口巧氏、理化学研究所の山下恵太郎氏、木村哲就氏、野村高志氏、登野健介氏、城地保昌氏、亀島敬氏、初井宇記氏、南後恵理子氏、田中里枝氏、内藤久志氏、松浦祥悟氏、山下鮎美氏、山本雅貴氏、矢橋牧名氏、石川哲也氏らとの共同研究であり、この場を借りてお礼を申し上げます。本研究は科学研究費特別推進研究、若手(A)、新学術領域公募研究及び X 線自由電子レーザー重点戦略研究課題等の支援を受けて行われた。

参考文献

- 1) Y. Umena, K. Kawakami, J. R. Shen and N. Kamiya: *Nature* **473**, 55 (2011).
- 2) 神谷信夫, 川上恵典, 梅名泰史, 沈 建仁: *放射光学会誌* **26**, 3 (2013).
- 3) M. Suga, F. Akita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami and Y. Nakajima et al.: *Nature* **517**, 99 (2015).
- 4) 菅 倫寛, 秋田総理, 山本雅貴, 吾郷日出夫, 沈 建仁: *放射光学会誌* **28**, 177 (2015).
- 5) R. Neutze, R. Wouters, D. van der Spoel, E. Weckert and J.

- Hajdu: Nature **406**, 752 (2000).
- 6) J. Kern, R. Alonso-Mori, R. Tran, J. Hattne, R. J. Gildea and N. Echols *et al.*: Science **340**, 491 (2013).
 - 7) J. Kern, R. Tran, R. Alonso-Mori, S. Koroidov, N. Echols and J. Hattne *et al.*: Nat. Commun. **5**, 4371 (2014).
 - 8) C. Kupitz, S. Basu, I. Grotjohann, R. Promme, N. A. Zatsepin and K. N. Rendek *et al.*: Nature **513**, 261 (2014).
 - 9) M. Sugahara, E. Mizohata, E. Nango, M. Suzuki and T. Tanaka *et al.*: Nature methods **12**, 61 (2015).
 - 10) M. Suga, F. Akita, M. Sugahara, M. Kubo, Y. Nakajima and T. Nakane *et al.*: Nature **543**, 131 (2017).
 - 11) K. Tono, E. Nango, M. Sugahara, C. Song, J. Park, T. Tanaka, R. Tanaka, Y. Joti, T. Kameshima, S. Ono, T. Hatsui, E. Mizohata, M. Suzuki, T. Shimamura, Y. Tanaka, S. Iwata and M. Yabashi: J. Synchrotron Radiat. **22**, 532 (2015).
 - 12) 菅原道泰, 登野健介, 南後恵理子, 岩田 想: 放射光学会誌 **29**, 198 (2016).
 - 13) M. Sugahara, T. Nakane, T. Masuda, M. Suzuki and S. Inoue *et al.*: Scientific Reports **7**, 703 (2017).
 - 14) M. Kubo, E. Nango, K. Tono, T. Kimura and S. Owada *et al.*: J. Synchrotron Rad. **24**, 1086 (2017).
 - 15) E. Nango, A. Royant, M. Kubo, T. Nakane and C. Wickstrand *et al.*: Science **354**, 1552 (2016).
 - 16) K. Saito, W. A. Rutherford and H. Ishikita: Nat. Commun. **6**, 9488 (2015).
 - 17) T. Takaoka, N. Sakashita K. Saito and H. Ishikita: J. Phys. Chem. Lett. **7**, 1925 (2016).
 - 18) P.E. Siegbahn: Biochim. Biophys. Acta **1827**, 1003 (2013).
 - 19) N. Cox, M. Retegan, F. Neese, D. A. Pantazis, A. Boussac and W. Lubitz: Science **345**, 804 (2014).
 - 20) C. Zhang, C. Chen, H. Dong, J. R. Shen, H. Dau and J. Zhao: Science **348**, 690 (2015).

著者紹介



菅 倫寛

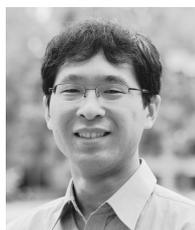
国立大学法人岡山大学異分野基礎科学研究
所 准教授

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, 岡山大学助教を経て, 2017年より現職。



秋田総理

国立大学法人岡山大学異分野基礎科学研究
所 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, 2016年より現職。



菅原道泰

国立大学法人京都大学大学院医学研究科
特定研究員

特定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 客員研究員

E-mail: msuga@spring8.or.jp

専門: 構造生物学

【略歴】

2000年大阪大学工学研究科修了, 博士(工学)。米国リーハイ大学化学科博士研究員, 理化学研究所研究員などを経て, 2017年4月より現職。



久保 稔

特定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 専任研究員

E-mail: minoru.kubo@riken.jp

専門: 時間分解ラマン・赤外分光

【略歴】

2003年北海道大学大学院理学研究科修了, 博士(理学)。岡崎統合バイオサイエンスセンターIMSフェロー, JSPS海外特別研究員(ノースイースタン大学), 兵庫県立大学特任准教授などを経て, 2014年4月より現職。



岩田 想

国立大学法人京都大学大学院医学研究科
教授

E-mail: s.iwata@spring8.or.jp

専門: X線結晶学, 膜タンパク質構造生物学

【略歴】

1991年東京大学大学院農学系研究科博士課程修了, 農学博士。インペリアルカレッジロンドン生命科学科(イギリス)教授, ダイヤモンド放射光実験施設(イギリス)ダイヤモンドフェローなどを経て, 2007年3月より現職。2012年6月より特定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・グループディレクター兼任。



沈 建仁

国立大学法人岡山大学異分野基礎科学研究
所 教授・副所長

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年より岡山大学大学院自然科学研究科教授, 2016年4月より現職。

Intermediate structure and oxygen-evolving mechanism of photosystem II revealed by serial femtosecond crystallography

Michihiro SUGA	Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University 3-1-1 Tsushina Naka, Okayama, 700-8530, Japan
Fusamichi AKITA	Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University 3-1-1 Tsushina Naka, Okayama, 700-8530, Japan
Michihiro SUGAHARA	RIKEN SPring-8 Center, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
Minoru KUBO	RIKEN SPring-8 Center, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
So IWATA	RIKEN SPring-8 Center, 1-1-1, Kouto, Sayo-cho, Sayo-gun, Hyogo 679-5148, Japan
Jian-Ren SHEN	Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University 3-1-1 Tsushina 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 dimeric 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 analyzed at resolutions higher than 2.0 Å by using X-ray diffraction (XRD) as well as X-ray free-electron lasers (XFEL), which revealed that the OEC is a Mn_4CaO_5 cluster with its accurately determined inter-atomic distances. The mechanism of O=O bond formation, however, remains obscure owing to the lack of intermediate-state structures determined at atomic resolution, thereby has been discussed extensively from the results of theoretical calculations based on the S_1 state structure and spectroscopic analyses. We prepared PSII in the S_3 state by providing two-flash illumination into micro-sized crystals at room temperature and determined the structure at 2.35 Å resolution by using time-resolved serial femtosecond crystallography with an XFEL. An isomorphous difference Fourier map between the two-flash-illuminated and dark-adapted states revealed apparent structural changes in both regions around the electron donor and acceptor. Among them, the insertion of a new oxygen atom O6 close to the putative substrate oxo-bridge O5, and structural changes related with possible proton release around OEC were observed. These structural changes allowed us to propose the proton exit path used when the S-state advances and the mechanism of O=O bond formation between O5 and O6. These findings provide a structural basis for the mechanism of oxygen evolution, and we expect that the structure will provide a blueprint for the design of artificial catalysts for water oxidation.