

研 究 報 告 書

「フェムト秒パルス光を用いた光化学系Ⅱの酸素発生機構の解明」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2016 年 10 月～2020 年 3 月

研 究 者: 秋田 総理

1. 研究のねらい

本研究は、あらゆる植物に普遍的に存在し、基礎的な生理現象である光化学系Ⅱ(PSII)の酸素発生メカニズムを、X 線自由電子レーザー(XFEL)と可視光レーザーを用いて解明する挑戦的な試みである。1970 年に Kok らによって提唱された、酸素発生サイクルを解き明かし、人工光合成の実現に必要な人工触媒の設計の基盤を確立する。

PSII は 20 種のサブユニットからなる、分子量 350 kDa の超分子複合体である。2011 年に 1.9 Å の構造が詳細に示され、酸素発生中心部分の Mn クラスターの構造は“ゆがんだ椅子”構造と形容され、その年の Science 誌 10 大成果に選出された。しかしながら、この構造は反応開始状態の S_1 であり、その全容を解明するにはその他の状態(S_2 , S_3 , (S_4), S_0)の構造解析が必要である。本研究は、調製した PSII の結晶を可視光レーザーで励起し、XFEL を照射して回折像を収集し、解析を行うことでこれらの反応中間体の構造を明らかにすることを目的とする。

本研究を成功に導く方法として、XFEL を使用し、微小結晶を用いる事が挙げられる。強力な X 線レーザーを数十フェムト秒という極めて短い時間で照射し、X 線による損傷の無い状態の回折像を得る事ができ、PSII の微結晶溶液を一定流速で流しながら XFEL を照射する事で、可視光レーザーを結晶に照射して PSII 分子を励起させ、その下流で XFEL を照射する事で反応中間体の回折像を得る事ができる。また、100 μm 以下の微小結晶を調製し実験を行うことにより、結晶内の PSII 分子が十分に励起され、中間体をトラップする事ができる。我々は、脱水処理により 2.5 Å を超える分解能の結晶を準備できており、反応中間体の構造変化を解析するために十分なデータを収集できると確信している。

光合成は、ほぼ無限に降り注ぐ太陽光のエネルギーを化学エネルギーに変換するため、持続可能なエネルギー源を提供することが可能である。そのため本研究の成功は、太陽光エネルギーの高効率利用を目指した人工光合成の実現に必要な人工触媒の設計の基盤と成り、産業的・工業的な側面からも世界に多大な影響を及ぼすものと期待される。

2. 研究成果

(1) 概要

光化学系Ⅱ(PSII)は光エネルギーを利用して、水分子を酸素、プロトン、電子に分解する反応を触媒している。この反応機構を解明することは、人工光合成の実現にも重要な意味を持っており、本研究によって人工触媒の設計に必要な基盤を提供することができる。

PSII の中心にはマンガンクラスターと呼ばれる構造体が存在し、光を受けることで、 S_1 から S_2 , S_3 , (S_4), S_0 状態へと遷移し、また S_1 へと戻る(図 1)。その過程で水分子が分解されるのであるが、 S_1 状態しかその構造が明らかになっていなかった。

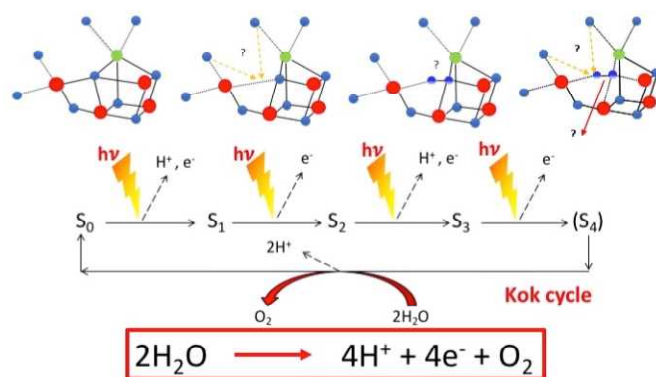


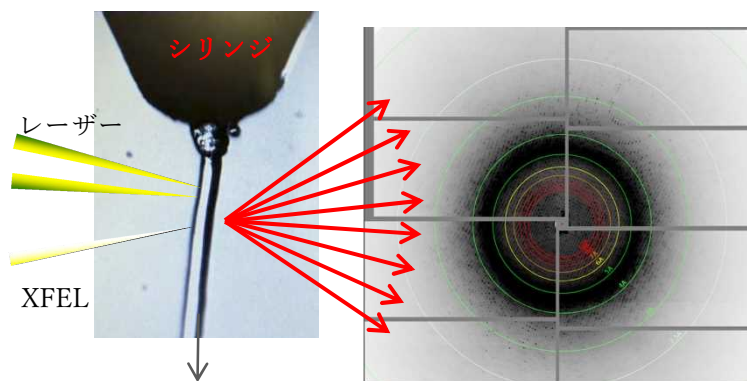
図 1. 光化学系 II による水分解反応

本研究では、PSII の水分解・酸素発生メカニズムを、X線自由電子レーザー (XFEL) を用いて解明する。PSII の微結晶溶液を一定流速で流しながら可視光レーザーを結晶に照射して PSII 分子を励起させ、その下流で XFEL を照射する事で反応中間体のデータを収集した。その結果、2.35 Å 分解能の S_1 構造とレーザー2回照射後の S_3 構造が得られ、これらのデータの比較から、世界で初めて酸素発生の中心部であるマンガンクラスターに基質の水 O6 が配位した構造を明らかにした (Suga, Akita et al. *Nature*, 2017)。

(2) 詳細

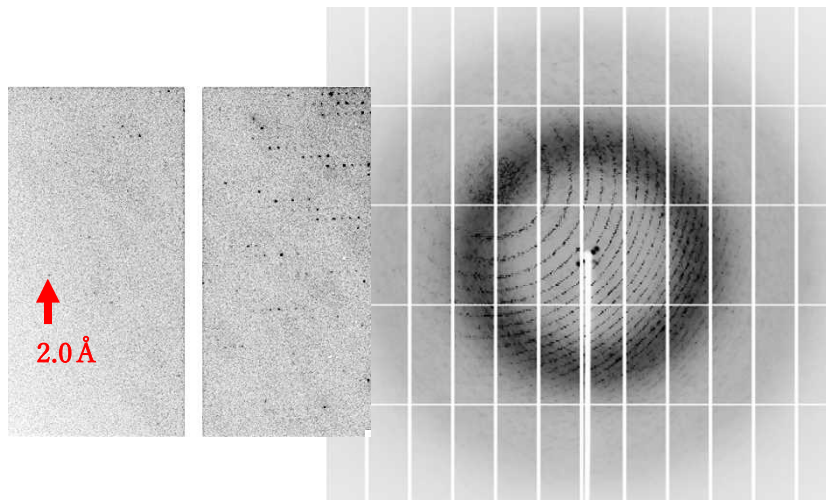
【研究テーマ A】SFX 実験

高濃度に調製した PSII の微結晶溶液をグリースと混合し、シリンジから一定流速で流しながら数十フェムト秒という極めて短い時間で XFEL を照射し、損傷の無い状態の回折象を収集した。この方法では、室温で実験できるので、可視光レーザーを結晶に照射して PSII 分子を励起させ、その下流で XFEL を照射する事で反応中間体の回折像を得ることが出来る。微小結晶の大きさを、結晶内の PSII 分子が十分に励起されるよう 100 μm 以下に調整した。



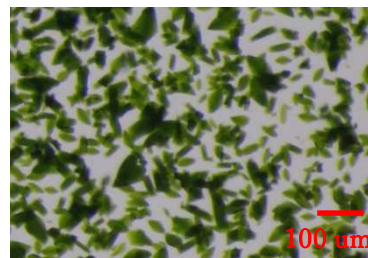
【研究テーマ B】結晶の改良

微結晶化による分解能の低下を改善するために回収した結晶の溶液条件を検討した。回収した結晶を段階的に高濃度の沈殿剤溶液に浸漬することで分解能を向上させた。SFX 実験では最高で 2.0 Å 分解能の回折イメージが得られるようになった。



【研究テーマ C】微結晶の調製法

SFX 実験に必要な PSII の微結晶作成条件を検討した。PSII 溶液と沈殿剤を等量加え、ボルテックスで数秒攪拌した後、20℃で数時間静置することで、簡単に微結晶を作成することが出来た。100 μm 程度に成長した結晶を振動攪拌装置で数秒攪拌し回収した。結晶保存溶液の条件を検討し、3～4 日反応効率・分解能が維持される条件を確立した。



得られた微結晶

【研究テーマ D】PSII の大量調製

SFX 実験では、2～3 g の高純度 PSII が必要である。そのため、PSII の大量調製システムの確立が必須である。単純に培養スケールを 20 L から 180 L へ、最終精製のイオン交換カラムの容量を 20 mL から 200 mL へ拡大した。その結果、一度の精製で従来の 20 mg から 300 mg の収量が得られるようになった。

3. 今後の展開

我々はこれまでに S_1 , S_3 の構造を解明しているが、酸素発生メカニズムを解明するためには、残りの (S_4), S_0 の構造を解明する必要がある。また、 $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ の各ステップを更に時分割で調べ、そのメカニズムを詳細に調べる必要がある。本研究によって水分解の人工触媒の設計に必要な基盤を提供できると考えている。

4. 自己評価

SFX の実験に必要なサンプルの供給体制、微結晶の作成・高分解能化を達成することが出来た。SFX のマシンタイムが限られているため、期間中に全ての中間体構造を解明することはできなかったが、SFX を用いた PSII 中間体構造解析の実験手法を確立することが出来た。また、世界で初めて酸素発生の中心部であるマンガンクラスターに基質の水 O6 が配位した構造を明らかにした。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Suga M.*, Akita F.*, Sugahara M.*, Kubo M.*, Nakajima Y.*, Nakane T., Yamashita K., Umena Y., Nakabayashi M., Yamane T., Nakano T., Suzuki M., Masuda T., Inoue S., Kimura T., Nomura T., Yonekura S., Yu L.-J., Sakamoto T., Motomura T., Chen J.-H., Kato Y., Noguchi T., Tono K., Joti Y., Kameshima T., Hatsui T., Nango E., Tanaka R., Naitow H., Matsuura Y., Yamashita A., Yamamoto M., Nureki O., Yabashi M., Ishikawa T., Iwata S., Shen J.-R. Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL. *Nature*, 2017, 543:131–135
2. Morton J., Chrysina M., Craig V.S.J., Akita F., Nakajima Y., Lubitz W., Cox N., Shen J.-R., Krausz E. Structured near-infrared Magnetic Circular Dichroism spectra of the Mn₄CaO₅ cluster of PSII in *T. vulcanus* are dominated by Mn(IV) d-d ‘spin-flip’ transitions. *Biochim. Biophys. Acta*, 2017, 1859:88–98
3. Nakajima Y., Umena Y., Nagao R., Endo K., Kobayashi K., Akita F., Suga M., Wada H., Noguchi T., Shen J.-R. Thylakoid membrane lipid sulfoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG) is required for full functioning of photosystem II in *Thermosynechococcus elongatus*. *Journal of Biological Chemistry*, 2018, 293 (38):14786–14797
4. Kato Y., Akita F., Nakajima Y., Suga M., Umena Y., Shen J.-R., Noguchi T. Fourier transform infrared analysis of the S-state cycle of water oxidation in the microcrystals of Photosystem II. *J. Phys Chem Lett*, 2018, 9 (9): 2121–2126

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3) 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)

1. Nagao R., Kato K., Suzuki T., Ifuku K., Uchiyama I., Kashino Y., Dohmae N., Akimoto S., Shen J.-R., Miyazaki N., Akita F. Structural basis for energy harvesting and dissipation in a diatom PSII-FCPII. *Nature Plants*, 2019, 5(8):890–901
2. 秋田 総理, 菅 倫寛, 沈 建仁「光合成水分解・酸素発生反応の構造基盤」生化学, 2017, 89(5), 699–709
3. 宮崎 直幸, 長尾 遼, 加藤 公児, 沈 建仁, 秋田 総理「クライオ電子顕微鏡単粒子解析による光合成超分子複合体の構造解析」光合成研究, 2018, 28, 111–117.
4. プレスリリース「褐色を呈する光化学系 II-集光性色素タンパク質複合体の立体構造を解明～光合成生物の進化と多様化を解明する糸口に～」2019.7.30
5. Akita F., Nagao R., Kato K., Miyazaki N., Shen J.-R. Cryo-EM structures of photosystem II-antenna supercomplexes. 第 57 回日本生物物理学学会年会(招待講演), 2019.9.24