

生体光エネルギー変換の分子機構—光化学系 II 複合体の構造と機能の解明と応用

研究者 沈 建仁  
岡山大学大学院 自然科学研究科

概要

光合成光化学系 II (以下 PSII とする) はラン色細菌から高等植物までのチラコイド膜上に存在する、14-16 種の膜貫通サブユニットと 3 種の膜表在性サブユニットを含む分子量 320 kDa の超分子複合体である。この複合体は太陽の光エネルギーを吸収し、一連の電子伝達反応を通して生物利用可能な化学エネルギーに変換し、同時に水を分解し分子状酸素を放出する。従って、PSII が生物エネルギーの固定と地球上酸素の供給と言う点で極めて重要な複合体である。本研究は、PSII 複合体を精製・結晶化し、X線結晶構造解析法を用いてその立体構造を解明することにより、PSII における一連のエネルギー伝達・電子伝達、水分解・酸素発生反応の機構を詳細に解明することを目的とした。

1. PSII 複合体の精製・結晶化

PSII は膜貫通タンパク質と膜表在性(親水性)サブユニットを含む巨大複合体であるため、精製標品の安定性が大きな課題であったが、本研究では結晶化に必要な高い安定性と活性を持つ PSII を大量精製できる材料として、好熱性ラン色細菌 *Thermosynechococcus vulcanus* を選んだ。本研究者が従来開発した界面活性剤による可溶性・陰イオン交換カラムによる精製法を用いて PSII を精製し、結晶化を行った(図1)。得られた結晶の分解能は当初 3.7 Å であったが、本研究において標品精製の条件、結晶化条件、さらに結晶の凍結条件等を検討・改良することにより、3.3Å に改善することに成功した(表1)。

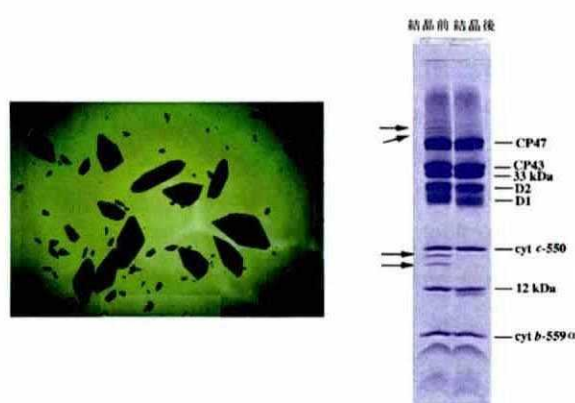


表1. PSII結晶の分解能の改良

	2002/6*	2002/12	2005/1
Resolution(Å)	25-3.7	25-3.5	25-3.3
Unique Ref.	94,859	110,402	138,800
Completeness	98.0	96.7	92.5
(outer shell)	(95.0)	(89.6)	(78.6)
I / σ	8.0(2.8)	7.6(2.0)	8.1(2.0)
Rmerge	7.1(26.1)	7.4(39.7)	8.1(45.5)

\*Kamiya and Shen, 2003, PNAS, 100, 98-103.

図1. PSII 複合体の結晶(左)とそのタンパク質組成(右)。矢印は結晶化前の標品に存在する夾雑物で結晶化より取り除かれたことを示す。

2. PSII の構造解析

SPring-8 の放射光を利用して重原子同型置換法により初期位相を決定し、得られた初期電子密度図を溶媒平滑法により改良し、構造解析を行った(図2)。PSII は単量体あたり約 2,800 のアミ

ノ酸残基を含んでいるが、そのうち主要な膜貫通サブユニットである D1, D2, CP47, CP43、及び膜表在性タンパクである 33 kDa, チトクロム *c550*, 12 kDa の配列を含む約 75% の 2,100 残基を同定し、残りをアラニンもしくは C $\alpha$  としてアサインした。このほか、36分子のクロロフィル、2分子のカロテノイド、4原子 Mn を含む Mn クラスタ、2分子ヘム鉄、1分子非ヘム鉄、を同定し構造決定した。結晶分解能の向上に伴い、電子密度図を改良し、得られた構造に修正・改良を重ね、最終的に 3.3 Å 分解能の構造を得た。

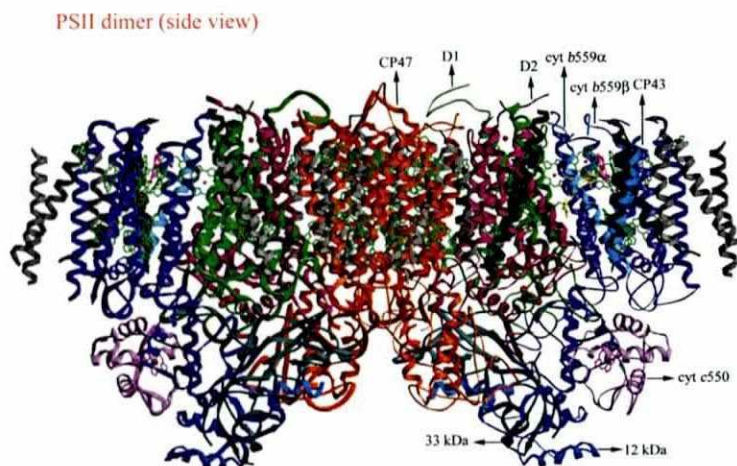


図2. チラコイド膜の側面から見たPSII二量体の結晶構造

### 3. PSIIの構造に基づく機能解明

PSIIの結晶構造からこれまで不明であった多くの機能的特徴が明らかにされた。まず反応中心と呼ばれるD1, D2サブユニットの構造が解明され、光エネルギーを直接吸収し励起するクロロフィル分子が四量体として存在するが、そのうちの2つのクロロフィル P<sub>D1</sub>, P<sub>D2</sub> がより近接しており、強い相互作用をしていることが明らかになった。反応中心と D2 サブユニットの近くに存在するチトクロム *b559* の間に2つのカロテノイド分子が存在し、チトクロム *b559* から反応中心への2次的電子伝達反応を仲介することでPSII複合体を過剰な光による傷害から保護していることが示唆された。さらに水分解・酸素発生反応を直接触媒している Mn クラスタの配置が明らかにされ、地球上最大の化学反応とも呼ばれる光合成水分解反応の機構に関する重要な知見を得た。

### 4. 今後の展開

PSII結晶の分解能を原子レベルに近くまで向上させたが、生体光エネルギー変換の機構を完全に理解するためには、さらなる分解能の向上が求められる。これまでの結果から結晶化方法を含めた結晶化条件の改善によりさらに分解能を上げることが可能であり、3.0 Å を超える分解能での構造解析を行い、PSII の構造を完全に解明し、水分解・酸素発生反応の機構を真の原子レベルで解明したい。これにより太陽光エネルギーのより有効な人工利用に重要な知見を提供することになる。一方、光による水分解・酸素発生反応を化学反応として捉え、理解するため、高分解能結晶を用いた時間分割構造解析法や分子動力学、及び変異体を用いた構造解析等を駆使し、1光子吸収に伴う電子移動・プロトン移動の径路やそれに伴うタンパク質マトリックスの構造変化を明らかにして行きたい。

## 原著論文

1. Kamiya N. and Shen J.-R. (2003) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* at 3.7 Å resolution. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** *100*, 98-103.  
\* 被引用回数260回(2005年10月末現在)。
2. Koulougliotis D., Shen J.-R., Ioannidis N. and Petrouleas V. (2003) Near-IR irradiation of the S<sub>2</sub> state of the water oxidizing complex of photosystem II at liquid helium temperatures produces the metalloradical intermediate attributed to S<sub>1</sub>Y<sub>Z</sub>' **Biochemistry**, *42*, 3045-3053.
3. Hayashi F., Suzuki H., Iwase R., Uzumaki T., Miyake A., Shen J.-R., Imada K., Furukawa Y., Yonekura K., Namba K. and Ishiura M. (2003) ATP-induced hexameric ring structure of the cyanobacterial circadian clock protein KaiC. **Genes to Cells** *8*, 287-296.
4. Henmi T., Yamasaki H., Sakuma S., Tomokawa Y., Tamura N., Shen J.-R. and Yamamoto Y. (2003) Dynamic interaction between the D1 protein, CP43 and OEC33 at the lumenal side of photosystem II in spinach chloroplasts: Evidence from light-induced cross-linking of the proteins in the donor-side photoinhibition. **Plant Cell Physiol.** *44*, 451-456.
5. Enami I., Iwai M., Akiyama A., Suzuki T., Okumura A., Katoh T., Tada O., Ohta H. and Shen J.-R. (2003) Comparison of binding and functional properties of two extrinsic components, cytochrome c550 and a 12 kDa protein, in cyanobacterial PSII with those in red algal PSII. **Plant Cell Physiol.** *44*, 820-827.
6. Ohta H., Suzuki T., Ueno M., Okumura A., Yoshihara S., Shen J.-R. and Enami I. (2003) Extrinsic proteins of photosystem II: An intermediate member of the PsbQ protein family in red algal PSII. **Eur. J. Biochem.** *270*, 4156-63.
7. Tan C.-Y., Xu C.-H., Shen J.-R., Sakuma S., Yamamoto Y., Balny C. and Ruan K.-C. (2003) Thermodynamic and Kinetic Analysis of Unfolding of P23k Protein Isolated from Spinach Photosystem II (in Chinese with English Abstract). **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, *35*, 677-681.
8. Vasil'ev S., Shen J.-R., Kamiya N. and Bruce D. (2004) The orientations of core antenna chlorophylls in photosystem II are optimized to maximize the quantum yield of photosynthesis. **FEBS Lett.** *561*, 111-116.
9. Hino T., Kanamori E., Shen J.-R. and Kouyama T. (2004) An Icosahedral assembly of the Light-Harvesting Chlorophyll *a/b* Protein Complex from Pea Chloroplast Thylakoid Membranes. **Acta Crystallogr. D**, *60*, 803-809.
10. Weng J., Tan C.-Y., Shen J.-R., Yu Y., Zeng X.-M., Xu C.-H. and Ruan K.-C. (2004) pH-induced conformational changes in the soluble manganese stabilizing protein of photosystem II. **Biochemistry**, *43*, 4855-4861.
11. Tan C.-Y., Xu C.-H., Wong J., Shen J.-R., Sakuma S., Yamamoto Y., Lange R., Balny C., and Ruan K.-C. (2005) Pressure Equilibrium and Jump Study on Unfolding of 23kDa Protein from Spinach Photosystem II. **Biophys J.** *88*, 1264-1275.
12. Årsköld S.P., Smith P. J., Shen J.-R., Pace R. J. and Krausz E. (2005) Key cofactors of photosystem II cores from four organisms identified by 1.7-K absorption, CD and MCD. **Photosynthesis Res.** *84*, 309-316.
13. Enami I., Suzuki T., Tada O., Nakada Y., Nakamura K., Tohri A., Ohta H., Inoue I. and Shen J.-R. (2005) Distribution of the extrinsic proteins as a potential marker for the evolution of photosynthetic oxygen-evolving photosystem II. **FEBS Journal**, *272*, 5020-5030.
14. Kamata T., Hiramoto H., Morita N., Shen J.-R., Mann N. H. and Yamamoto Y. (2005) Quality control of photosystem II: An FtsH protease plays an essential role in the turnover of the reaction center D1 protein in *Synechocystis* PCC 6803 under heat stress as well as light stress conditions. **Photochemical & Photobiological Sciences**, in press (advance web publication, Sept. 9, 2005).

### 総説・著書

1. Yamamoto Y., Sakuma S. and Shen J.-R. (2004) Isolation of photosystem II-enriched membranes and the oxygen-evolving complex (OEC) subunit proteins from higher plants. In *Methods in Molecular Biology: Photosynthesis Protocols* (ed. by R. Carpentier), 274:29-36. Humana Press.
2. Shen J.-R. and Kamiya N. (2005) 3D Crystal Structure of the Core – I, In *Photosystem II: The Water/Plastoquinone Oxido-Reductase In Photosynthesis*, Edited by T. Wydrzynski and K. Satoh, Springer, in press.
3. 神谷 信夫、沈 建仁 (2005) 光化学系 II 複合体の構造と機能、「蛋白質 核酸 酵素」、Vol. 50, No. 10, 1174-1179.

### 国際招待講演

Shen J.-R. Molecular mechanism of photosystem II based on its crystal structure analysis. Annual Meeting and the 40<sup>th</sup> Anniversary Meeting of the Founding of the Chinese Society for Plant Physiology, Hangzhou, China (2003.4).

Shen J.-R. and Kamiya N. (Plenary Lecture) Crystal structure of photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*. 11<sup>th</sup> International Symposium on Phototrophic Prokaryotes, Tokyo (2003.8).

Shen J.-R. and Kamiya N. Crystal structure of Photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus*. Japan-Swiss Joint Seminar “Biogenesis, Function and Acclimation of the Photosynthetic Apparatus”, Okayama (2003.9).

Shen J.-R. and Kamiya N. Functions of carotenoids and other pigments in photosystem II from a structural point of view. 10<sup>th</sup> Congress of the European Society for Photobiology, Vienna, Austria (2003.9).

Shen J.-R. Crystal structure of PSII from *Thermosynechococcus vulcanus*. 314<sup>th</sup> WE-Heraeus-Seminar: Water Oxidation in Photosynthesis, Bad Honnef, Germany (2003.11).

Shen J.-R., Naitow H., Kamiya N. (Plenary Lecture) Crystal structure of photosystem II from *Thermosynechococcus vulcanus* and its functional implications. “Photosynthesis and Post-Genomic Era”, An International Satellite Meeting in conjunction with the 13th International Congress on Photosynthesis, Trios-Rivieres, Quebec, Canada (2004.8).

Shen J.-R. Functional analysis of photosystem II based on its three-dimensional structure. Japanese-Finnish Collaboration Seminar “Molecular Mechanisms of Regulation of Photosynthesis by Environments” and 7<sup>th</sup> Nordic Photosynthesis Congress. Turku, Finland (2004.11).

### 国内招待講演

沈 建仁、膜タンパク質複合体の結晶化と結晶構造：光化学系II酸素発生複合体、日本学術振興会産学協力研究委員会・回折構造生物 第169委員会、第14回研究会、仙台、2004年9月26-27  
他 10件

その他：国際学会発表：6件。国内学会発表：18件