

学位論文の要旨

Abstract of Thesis

研究科 School	自然科学研究科
専攻 Division	地球生命物質科学
学生番号 Student No.	51427204
氏名 Name	中島 芳樹

学位論文題目 Title of Thesis (学位論文題目が英語の場合は和訳を付記)

Structural and functional studies of oxygen-evolving photosystem II
(酸素発生光化学系 II の構造・機能解析)

学位論文の要旨 Abstract of Thesis

光合成において水を分解し、酸素を発生させる反応を触媒しているのが光化学系 II(PSII)と呼ばれる巨大な膜タンパク質複合体である。PSII 酸素発生触媒中心の構造はシアノバクテリアから高等植物に至るまで保存されており、Kok cycle と呼ばれる反応サイクル (S-状態サイクル) において 5 つの中間状態 ($S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$) を経て水分解反応を触媒することが知られている。これまで報告された PSII の構造は暗条件下で安定な S_1 状態に対応するもので、他の中間状態の構造が不明であり、そのため PSII による水分解・酸素発生の詳細な反応機構は不明である。PSII による水分解・酸素発生触媒機構を明らかにするため、フェムト秒の X 線自由電子レーザー (XFEL) を用いたシリアルフェムト秒結晶構造解析 (SFX) とポンププローブ法を組み合わせた時間分解構造解析が適している。しかし、このためには光照射により結晶中の PSII が目的の中間状態へ高効率に励起される必要があり、従来の結晶サイズである長辺 1.0-1.2 mm の PSII 単結晶では結晶内部に色素が高密度に含まれるために光が十分に透過しないという問題があった。これを解決するために好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* から単離した PSII dimer を 30-50 μm 程度のサイズに抑えて大量に結晶化する手法を確立した。しかし、このような結晶ではサイズが小さいために高分解能のデータを得ることが困難であった。これを解決するため、結晶化手法と条件の改良、結晶サイズを 100 μm 前後に大きくすること、結晶化後の処理条件の適用や抗凍結剤条件の検討を行った結果、最大で 2.1 \AA の回折点を観察できるまでに結晶の質を改善した。この結晶に対して二回の閃光照射を行い、 S_3 相当の中間状態を作製し回折データを収集した結果、2.35 \AA 分解能で解析可能なデータ(2F)を収集することに成功した。光非照射 (Dark) の結晶について同様に収集したデータと 2F のデータとの $|F_0| - |F_1|$ 差フーリエマップから、電子受容体であるプラストキノン Q_B と Mn_4CaO_5 クラスタ周辺に明らかな差電子密度が観察され、二回の閃光照射によりこの 2 領域で構造変化が引き起こされたことが示された。特に Mn_4CaO_5 クラスタにおいて、酸素原子の一つである O_5 の近傍に新たな酸素原子 (O_6) が挿入されたことを示す差電子密度が観察され、 Mn_4CaO_5 クラスタにおける酸素分子の形成部位と基質酸素原子について有力な知見を得ることができた。

一方、水分解反応の全機構を解明するため、 S_3 状態以降の遷移にともなう構造変化を検出する必要がある。2 閃光照射と同様の方法で 3 閃光照射し、構造変化を検出する試みを行ったが、顕著な構造変

化は検出されなかった。微結晶についてフーリエ変換赤外分光法(FTIR)を用いた測定により、微結晶中の PSII は活性を保持していたが、高分解能を得るために必要な高濃度の抗凍結剤溶液で処理すると S 状態の遷移効率が低下することが示されていたので、3 閃光照射によって S₃以降の S 状態に遷移する割合が極めて少ないことが原因であることが考えられた。このため、結晶中 PSII の S 状態の遷移効率を向上させる必要があった。この問題を解決するために、溶液状態の PSII を用いた熱発光 (TL) 測定により種々の抗凍結剤溶液が S 状態の遷移効率に対する影響を調べた。まず、18% ポリエチレングリコール (PEG) と 23% glycerol を含む従来の抗凍結剤条件で処理したとき、1-7 回までの閃光照射による TL-band のピーク強度の振幅は未処理試料に比べて著しく小さくなった。このことはこれまでの報告と同様に、高濃度の抗凍結剤条件で S 状態の遷移効率が著しく低下することを示していた。同時に TL のピーク温度が高温側にシフトし、新たな TL ピークも観察され、S 状態遷移の一部で異常が起こったことが示唆された。これらの現象は 20% glycerol のみの溶液でも観察され、高濃度の glycerol が原因であることが示された。一方、glycerol を dimethyl sulfoxide (DMSO) に置き換えたところ、20% の DMSO まで TL は未処理試料とほぼ同じ挙動を示した。20% DMSO を含む溶液で PEG 濃度を徐々に増加させたところ、TL ピーク強度の振幅は徐々に小さくなった。したがって、S 状態の遷移効率は PEG 濃度にも依存して低下することが示唆された。高濃度 PEG は結晶の分解能向上に寄与しているが、本研究の結果から遷移効率向上のために低 PEG 濃度などで高分解能の微結晶を与える抗凍結剤条件の検討が必要であることが分かった。

高分解能での結晶構造解析により、PSII には 20 以上の脂質分子が結合していることが分かっている。酸素発生型光合成生物は、主に Monogalactosyl-diacylglycerol (MGDG), Digalactosyl-diacylglycerol (DGDG), Sulfoquinovosyl-diacylglycerol (SQDG), Phosphatidylglycerol (PG) の 4 つの脂質を共通で持っており、光合成機能にとって重要な役割を持つと考えられている。様々な生物種における SQDG 欠損変異株の研究から、生育や酸素発生活性の維持における SQDG の要求性は種によって大きく異なることが知られているが、その原因は明らかになっていない。SQDG は PSII モノマーあたり 4 つ結合しているが、SQDG が欠損した PSII の結晶構造は不明であり、SQDG が構造的にどのような役割を持つかはわかっていなかった。本研究で、SQDG 合成酵素を欠損させた好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* から高純度の PSII を単離・精製し、結晶化・構造解析を行った。同時に、3 つの分光学的解析、FTIR、TL、遅延蛍光(DL)を用いて SQDG の欠損による PSII 機能への影響を調べた。機能解析の結果、SQDG の欠損は Q_B の交換に影響を及ぼす可能性が示され、また、これまで報告されていたように、PSII がモノマー化しやすく、酸素発生活性がわずかに低下することが確認された。2.1 Å 分解能で構造解析を行った結果、PSII の全体構造は野生型のもので変わらなかったが、4 つの SQDG 結合領域において、他の脂質分子の結合を示す電子密度が観察された。そのうち、1 か所は PG であると同定されたが、他の 3 か所については同定することができなかった。脂質分析の結果は、変異体では SQDG の代わりに PG が増加したことが示され、このことは他の生物種での SQDG 欠損の特徴と一致していた。同定できなかった SQDG 結合領域において PG を仮に配置したところ、本来あった SQDG と近傍アミノ酸などの水素結合のほとんどがなくなった。これらの結果は、変異体でおそらく PG が SQDG の代わりに結合し、機能を維持しているが、ヘッド部分の構造の違いによって PG の結合が不安定になり、これが電子密度の不鮮明さの原因となっていると推測された。また、このような構造の不安定化は PSII の機能に影響を及ぼしている原因であることが考えられる。以上のことから SQDG は PSII に重要な機能を持っており、それを欠失することはできないので、欠損株では他の脂質、おそらく PG が SQDG の結合部位に結合し、PSII の機能を維持しているが、両者のヘッド部分の構造の違いによって PSII の一部で機能障害が引き起こされたと考えられる。