

解説

光合成水分解・酸素発生を可能にする光化学系IIの原子構造<sup>‡</sup>

岡山大学 大学院 自然科学研究科  
沈 建仁\*

1. はじめに

酸素発生型光合成において、光化学 II (Photosystem II, PSII) における水分解・酸素発生反応の機構は最大で最後の謎と言っても過言ではない。なぜなら、水は地球上豊富にある極めて安定な物質であるが、PSIIではいとも簡単に分解されており、その仕組みについてはこれまで世界中で数十年間研究されてきたにも拘わらず、未だ明らかとなっていないからである。しかし、PSIIによる水分解反応が生物の進化や地球環境の維持にも極めて重要であることはいうまでもない。水の分解によって生じる電子は、チトクロム $b_6/f$ 複合体、PSIを経由してNADP<sup>+</sup>の還元に使われ、また、プロトンはチラコイド膜のルーメン側に蓄積して、膜を隔てたプロトン濃度勾配の形成に貢献することによってATP合成の駆動力を供給する。何よりも、光合成にとって不要な副産物である酸素は、地球上の好氣的生物の生存を可能にし、オゾン層の形成・維持に不可欠である。今日、藻類や植物による光合成で産出される酸素の量は年間2600億トンと見積もられており、約4600年で大気中の酸素が1回入れ替わることになる。これは言い換えれば、もしPSIIによる水分解反応が止まり、酸素が産出されなければ、大気中の酸素は4600年で好気生物によって使い果たされることになる。人間などは現在の21%の酸素濃度が1/4—1/5低下すると、生活が困難になってくるため、PSIIによる水分解反応が止まれば、人類文明は1000年と維持できなくなるであろう。

PSIIにおける水分解・酸素発生反応の機構を解明するため、これまで多くの生化学、生物物理学、分子生物学的手法を用いた研究が展開され、膨大な知見が蓄積されてきた。この反応の直接の触媒中心は4つのMnと1つのCaからなるMn<sub>4</sub>Caクラスターであり、それがKokサイクルと呼ばれる4周期サイクル (図1)

を経て、2分子の水を1分子の酸素、4つのプロトンと4つの電子に分解することが分かっている。Kokサイクル (S状態遷移) における各遷移状態は、S<sub>4</sub>を除いてすべて実験的に捕捉できるようになった。そのうち、暗黒で安定に存在するのはS<sub>1</sub>状態であり、一定時間 (数分—数十分) 暗順応したチラコイド膜やPSII試料では、S<sub>0</sub>:S<sub>1</sub>=0.25:0.75の比率で存在するが、さらに長時間 (数時間—1日) 暗順応した試料では、ほぼ100% S<sub>1</sub>状態になる。これは、Y<sub>D</sub>と呼ばれる、反応中心タンパク質の一つであるD2サブユニットに結合しているチロシン残基 Tyr160により、S<sub>0</sub>状態のMn<sub>4</sub>Caクラスターが酸化されるからである<sup>1)</sup>。

2. PSIIの結晶化

これまでの膨大な研究にも拘わらず、Mn<sub>4</sub>Caクラスターの詳細な構造は長い間不明であり、そのため、

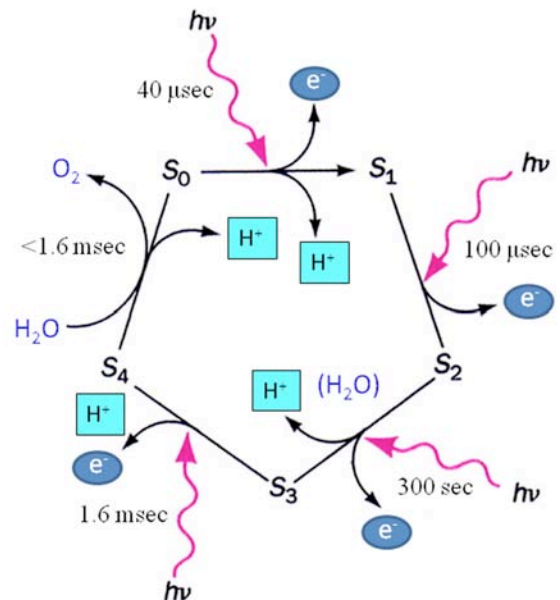


図1 酸素発生反応のKokサイクルモデル。

<sup>‡</sup> 解説特集「光合成の光エネルギー変換メカニズム —物理学的手法によるアプローチ—」

\* 連絡先 E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp

水分解・酸素発生反応の機構は未だ解明されていない。その最大の原因は、PSIIが巨大な膜タンパク質複合体であり、その高分解能結晶化が困難であったことである。PSIIの構成サブユニットは原核生物のシアノバクテリアと真核の藻類、高等植物の間で若干の違いがあるが、その中心部分やMn<sub>4</sub>Caクラスターの周辺は高度に保存されている。これまで構造解析が行われたシアノバクテリア由来のPSIIは17種の膜貫通サブユニットと3種の膜表在性（親水性）サブユニットを含み、これ以外に35分子のクロロフィル、カロテノイド、プラストキノン、ヘム、非ヘム鉄、Mn、Ca、Clなど多数の補欠因子を持ち、総分子量が350 kDaに及ぶ複合体であり、さらに二量体として存在している。このような巨大膜タンパク質複合体の構造を解析するには、X線結晶構造解析法より他に方法がないが、そのためには、まず良質な結晶を得ることが必要不可欠である。

PSIIを結晶化するため、筆者は1990年にその精製に着手した。結晶化には、室温で高い安定性を持つPSIIが望ましいが、それまでのPSIIに関する研究は、高等植物を材料として用いたのがほとんどであった。しかし、植物から精製したPSIIコア標品（アンテナタンパク質を除いた、酸素発生能を持つPSIIの最小単位）は不安定で、常温ですぐに失活してしまうという欠点があった。

この主な原因は、酸素発生活性の維持に必要な3つの表在性タンパク質 PsbO, PsbP, PsbQ が PSII への結合が弱く、精製の段階で脱落しやすい (PsbP, PsbQ) ためであった<sup>2)</sup>。常温性のシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC 6803 を用いた研究も盛んに行われていたが、このシアノバクテリアからは酸素発生活性を保持したPSIIコア標品の精製すらほとんどできず、PSIIに関する研究は主に遺伝子操作技術で特定の amino 酸を改変した変異株の細胞、あるいはチラコイド膜を用いたものであった。結晶化に適した、安定なPSIIコア標品を得るには、好熱性シアノバクテリアが有望であると考えられたので、当時入った理化学研究所太陽光エネルギー研究グループの主任研究員井上頼直さんに言われて、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* を用いてPSIIの精製を始めた。このシアノバクテリア及びそれに近縁の *T. elongatus* からPSIIを精製した報告は以前にあったが、得られたPSIIの活性は高等植物のものと同様1000  $\mu\text{moles O}_2/\text{mg Chl}/\text{hr}$  程度で、表在性タンパク質としてはPsbOのみが結合しており、高等植物のPsbP, PsbQに対応するものがないとされていた<sup>3)</sup>。しかし、精製途中の粗PSII標品は3000  $\mu\text{moles O}_2/\text{mg Chl}/\text{hr}$  を超える活性を示していたので、純化したPSIIコア標品の活性がなぜそれより著しく低かったかという謎があった。

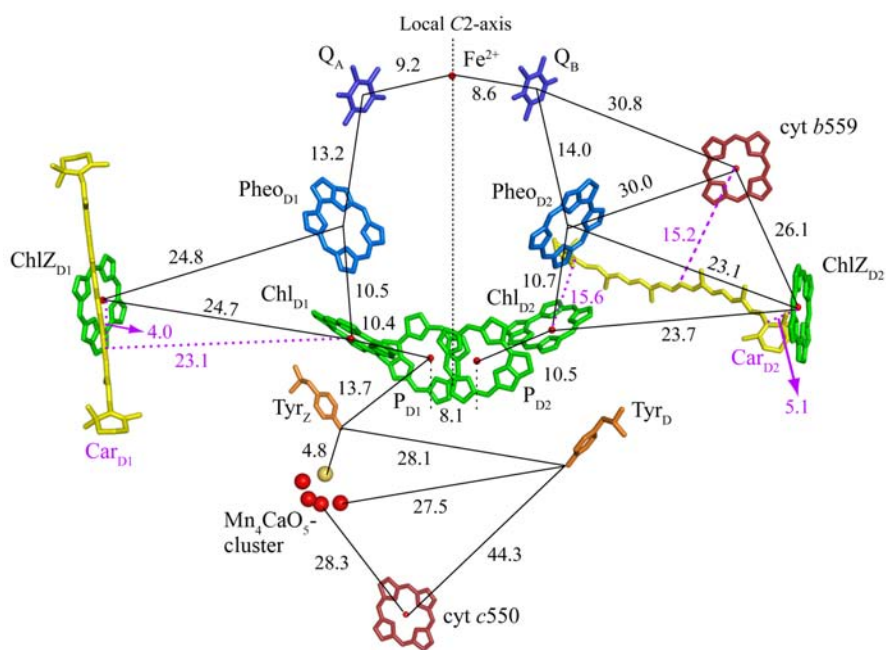


図2 PSIIにおける電子伝達成分の配置。

各補欠因子間の距離は1.9 Å分解能で解析された構造中の分子のセンター—センター間の距離を示している。

さらに、得られたコア標品にはまだ狭雑物と思われるバンドが数個あり、結晶化には適していなかった。筆者はより高純度で安定な標品を得るため、精製方法を改良した<sup>4)</sup>。その結果、酸素発生活性が3000  $\mu\text{moles O}_2/\text{mg Chl/hr}$ を超える高純度のPSIIコア標品を得ることに成功した。興味深いことに、得られた標品には新しいタンパク質が2つ含まれ、その後の研究によって、表在性タンパク質の PsbU (12 kDa) と PsbV (チトクロム $c_{550}$ )であることが分かった<sup>5-7)</sup>。

*T. vulcanus*から精製したPSII標品を用いて結晶化を始めたが、経験不足もありX線回折能を持つ結晶を得るには至らなかった。1994年の光合成ゴードン会議に結晶らしきかたまりをポスターで発表した時、WittやBarberがそれを見て、その後すぐに*T. elongatus*からPSIIの精製、結晶化に着手した。結局、WittグループのZouniらがPSIIの結晶化に最初に成功し、2001年に3.8 Å分解能の構造をいち早く報告した<sup>8)</sup>。筆者らは2003年に*T. vulcanus*からのPSII構造を3.7 Å分解能で報告し<sup>9)</sup>、さらにBarberグループは2004年に*T. elongatus*由来PSII構造を3.5 Å分解能で報告した<sup>10)</sup>。その後Zouniらは結晶の分解能を少しずつ向上させ、2009年に2.9 Å分解能の構造を報告した<sup>11)</sup>。これらの構造解析により、PSIIを構成する20サブユニットすべての配置、35クロロフィル分子や10個程度のカロテノイド、2つのプラストキノン(Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>)、2つのヘム鉄(チトクロム $b_{559}$ , チトクロム $c_{550}$ )、非ヘム鉄、20個以上の脂質などの配置が示され、PSII電子伝達鎖の構成成分間の相対位置関係がだいたい明らかとなった(図2)。しかし、これまで最高の2.9 Å分解能では、Mn<sub>4</sub>Caクラスターの構造を解明するには不十分であった。4つのMnと1つのCaイオンが存在することは分かっていたが、得られた電子密度図ではこれらの原子を示すものが一つのかたまりとなっており、一つのサッカーボール中に5つの金属イオンを配置しようとするようなもので、それぞれの金属イオンの位置を決定することはできなかった。さらに金属イオン間をつないでいる酸素原子(オキソ酸素)、あるいは基質として存在するであろう水分子に対応する電子密度は全く見えなかった。また、Mn<sub>4</sub>Caクラスターのアミノ酸配位子もすべて確定されたとは言えず、各グループ間で異なった配位パターンが報告されていた。

PSII結晶の分解能を向上させるため、筆者の研究室では*T. vulcanus* PSIIを用いて標品の純度や結晶化条件

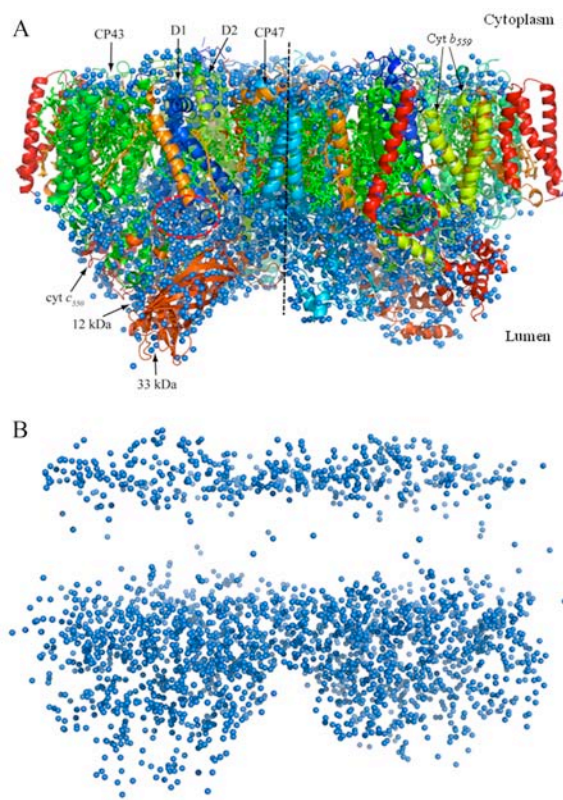


図3 A. チラコイド膜の側面から見た1.9 Å分解能におけるPSII二量体の全体構造。B. タンパク質を除いた水分子の分布。真ん中の線は2回対称軸で、2つの単量体を分けている。赤い丸はMn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターの位置を、青色のボールは水分子を示している。

の改善を続け、2008年までに2.9—3.0 Å分解能の結晶を得ていた。しかし、これより高分解能を与える結晶を得るには標品の純度や結晶化条件の抜本的改善が必要であった。これらの改善を続けた結果、2009年夏の終わりに、当時大学院生であった川上君が実験室のX線装置を用いて2.5—2.6 Å分解能の回折スポットを与える結晶を得ることに成功した。この結晶はこれまで得た結晶と明らかに異なり、構造解析で大きな問題となる回折パターンの異方性や3.0—3.5 Å付近で見られる、不規則的な分子の配列に由来すると思われるdiffuse scatteringが極めて小さかった。この回折パターンを見た時、SPring-8のX線を用いればさらに分解能の高い回折データを取得することができていることを知っていたので、これまでの最高分解能である2.9—3.0 Åの壁を大きく突破したことを感じた。その後細かい改善を加え、2009年11月の終わりにSPring-8で1.9 Å分解能の回折データを収集し、さらに約1年間大阪市立大学神谷さんの研究室で構造解析を

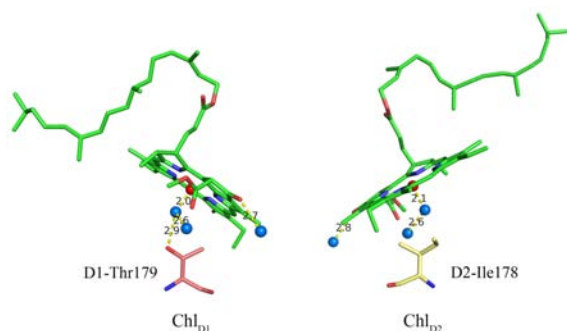


図4 水を配位子とする2つのクロロフィルの例。  
反応中心にある「アクセサリー」クロロフィルChl<sub>D1</sub>, Chl<sub>D2</sub>を示した。赤のボールはMg, 青のボールは水分子である。

行ってもらい、最終構造を得た。この構造を報告する論文を発表したのが本年なので<sup>12, 13)</sup>、結晶化を目指して好熱性シアノバクテリアからPSIIの精製に着手してから21年目ということになる。

### 3. PSIIの全体構造

1.9 Å分解能で解析されたPSII構造の最大の特徴の一つは、多くの水分子が見つかったことである(図3)。最終的に決定された構造では、PSII二量体あたりに2795個の水分子が同定できた。同じ結晶を用いて、1.75 ÅのX線波長で収集したデータを用いて解析された2.5 Å分解能の構造では、二量体あたり862分子の水しか見つからなかったことから<sup>12)</sup>、水分子の同定に高い分解能がいかに重要かが分かる。

PSIIに結合している水のほとんどは、チラコイド膜のストロマ表面とルーメン表面という2つの層に分布しており、膜貫通領域にはわずかな水しか結合していない(図3B)。これは膜タンパク質の一般的な特徴ともいえるが、PSIIではルーメン側により大きな親水性領域があり、より多くの水分子が分布している。これらの水分子は、膜表面から突き出ているD1, D2, CP47, CP43の親水性ループや3つの表在性タンパク質の中に多く存在し、ルーメン側に大きな親水性領域が存在することと対応している。後で述べるが、これらの水分子のうち、Mn<sub>4</sub>Caクラスターの配位子や水素結合ネットワークの形成に参加しているものもあり、PSIIにとって重要な機能の一部を担っている。

膜貫通領域は疎水性であり、水はほとんど存在しないとされていたが、PSIIの膜貫通領域にはいくつかの水分子が存在し、それらのほとんどはクロロフィルの配位子、あるいはその水素結合相手として働いてい

る。クロロフィルのポルフィリン環の中央にあるMgは通常、Hisなどのアミノ酸によって配位されるが、PSIIにある35分子のクロロフィルのうち、7つは直接の配位アミノ酸を持っておらず、代わりに水がMgに配位している(図4)。これらのクロロフィルには、直接の水配位子以外に、さらに2つの水が近傍にあり、水素結合を形成している。つまり、アミノ酸配位子を持っていないクロロフィル1個あたりに、3つの水分子が存在することになり、これらは膜貫通領域で見つかった水のほとんどを占めている。

### 4. Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターの構造

Mn<sub>4</sub>Caクラスターは、これまで詳細な構造が不明であったため、Mn<sub>4</sub>CaO<sub>x</sub>クラスターとも書かれていた。1.9 Å分解能では、Mn, Caイオンの電子密度がはっきり分かれており、それぞれの金属イオンの位置、及び

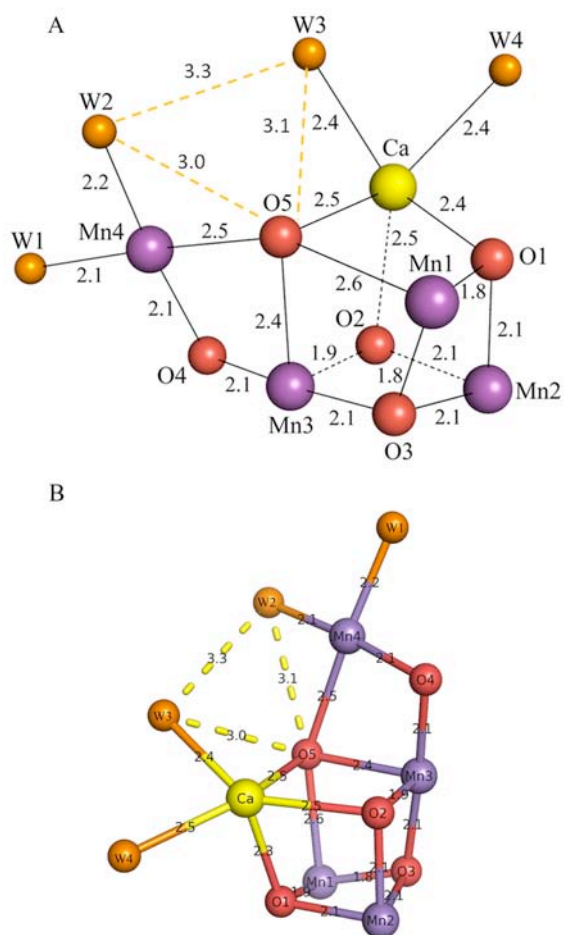


図5 A. Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターの構造と各原子間の距離(Å)。W1-W4は水分子。B. ゆがんだ椅子型の形がよりはっきり見えるようにAの構造を回転したもの。

それらの間の距離をはっきりと決定することができた<sup>12,13</sup>。さらに金属イオン間をつないでいるオキソ酸素に対応する電子密度もはっきり確認することができ、4つのMn、1つのCaをつないでいるのが5つの酸素原子で、全体が $Mn_4CaO_5$ という化学式であることが初めて分かった(図5)。

解析された $Mn_4CaO_5$ クラスター構造の最大の特徴は、ゆがんだ椅子型であるということが言える。このうち、3つのMn、1つのCa、4つのオキソ酸素が歪んだキューバン型のイスの座部を作り、4つ目のMnはキューバンの外側にあり、オキソ酸素を通してキューバンとつながっている。

このようなゆがんだ形を作り出している要因は2つあり、1つはMn—O間とCa—O間の結合距離の違い、もうひとつは5つのオキソ酸素の間で、金属イオンとの結合距離に違いがあることである。Mn—Oの典型的な結合距離は1.8—2.1 Åであるが、それに対して、Ca—O間の結合距離は2.3—2.5 Åと明らかに長い。キューバンの中で、金属イオンは3つのMnと1つのCaであるため、オキソ酸素との結合距離に違いが生じていた。また、5つのオキソ酸素のうち、O1—O4に比べて、O5とMn、あるいはO5とCaとの結合距離が明らかに長くなっていった。例えば、O5—Mn3の距離は2.4 Åで、O5—Mn1、O5—Mn4の距離はそれぞれ2.6 Å、2.5 Åであった。これらの距離は、無機Mn化合物と比較すると考えられないほど長く、結合していないことすら示唆している。さらにO5—Caの距離も2.7 Åで他のO—Ca間距離より長い。このことは、5つのオキソ酸素のうち、特にO5は周りの金属イオンとの結合が弱くて切れやすい、言い換えれば、O5が高い反応性を有していることを示唆している。

$Mn_4CaO_5$ クラスターの構造が非対称で「ゆがんでいる」ことは、水分解反応の触媒機構を考える上で重要な意味を持っているかもしれない。水分解の触媒として働くためには、それ自身が反応の過程で構造変化を行い、基質である水の分解に伴い構造が元に戻るという構造上の「柔軟性」を備え持つ必要がある。実際、水分解のS-stateサイクルでは、 $Mn_4CaO_5$ クラスターの構造が変化することが分光学的手法で検出されている。 $Mn_4CaO_5$ クラスターがもし対称的で規則正しい構造を形成していれば、反応に伴う構造の変化が容易ではなく、触媒活性が発揮できないかもしれない。これは、水分解の人工触媒を合成する上で

も重要な意味を持っており、触媒活性を持つ人工触媒を得るには、非均一触媒 (heterogeneous catalysisあるいはasymmetric catalysis) の原理を応用した非対称構造を持つ化合物を見つけることが重要かもしれない。

$Mn_4CaO_5$ クラスターには、4つの水分子が配位しており、そのうち、2つはキューバンの外側にあるMn4に(W1, W2)、残りの2つはCaに結合している。このことは、これら水分子のうちの1つまたは2つは水分解の基質として働いていることを示唆している。上に述べたように、O5が反応部位の一部を形成している可能性が高いことを考えると、O—O結合が形成されるのは、O5付近である可能性が高い。4つの配位水のうち、Mn4に結合しているW2とCaに結合しているW3は

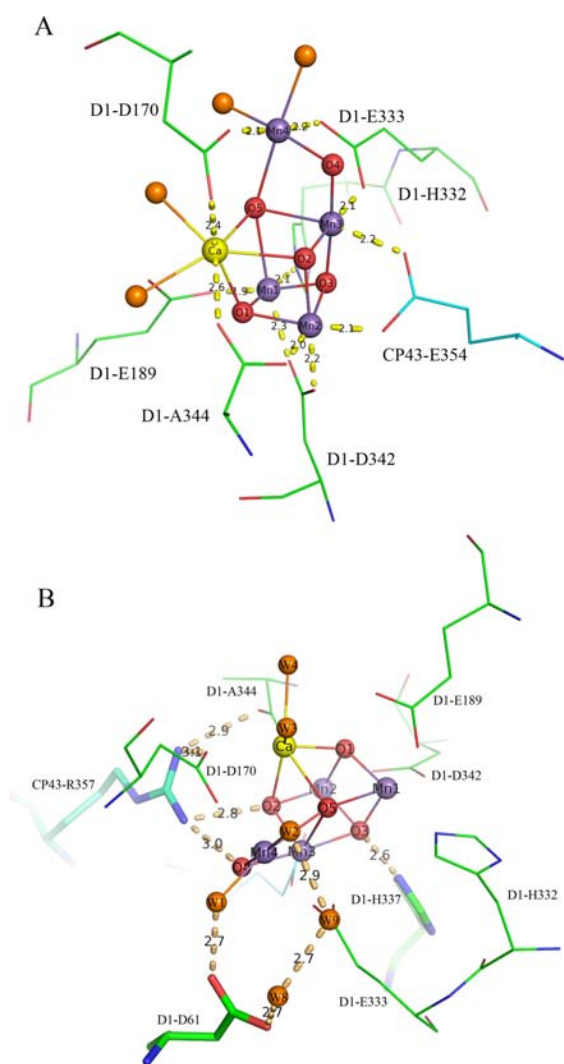


図6 A.  $Mn_4CaO_5$ クラスターの配位構造。B. 直接の配位子以外に、 $Mn_4CaO_5$ クラスターに水素結合を形成する3つの残基 (CP43-R357, D1-D61, D1-H337) の構造。

O5と最も近く、それぞれO5と水素結合距離内にある。従って、O5, W2, W3のうちのどれか2つの分子種が水分解の基質として働き、O—O結合を作っていることが示唆された。

オキソ酸素と水以外に、7つのアミノ酸が $Mn_4CaO_5$ クラスターの配位子として働いていることが分かった(図6A)。そのうち、6つがカルボキシル基で、1つのみがHis残基であった。カルボキシル基のうち、1つのみがCP43由来のGlu354で、他はすべてD1サブユニットのものであった(D1-Asp170, Glu189, Glu333, Asp342, 及びC末端であるAla344)。そしてHis残基もD1由来のHis332であった。His残基はMnと1本の結合を作っているが、カルボキシル基のうち、D1-Asp189以外はすべてそれぞれ2つの金属イオンにブリッジする形で2本の結合(bi-dentate結合)を作っている。その結果、すべてのMnには6つの配位子、そしてCaには7つの配位子が存在していることになる。

高分解能で同定された配位子のうち、これまで報告された配位子構造と明らかに異なる点が2つある。一つはD1-Asp170で、以前の構造ではMn4にのみ結合しており、Caには配位していなかったが、新しい構造ではMn4とCaの両方に配位していた。もうひとつはD1-Glu189に関するもので、従来Mn1とCaの両方に配位していたのに対して、新しい構造ではMn1のみに配位していた。新しい構造では、4つのMnと1つのCaの配位子が飽和していたので、これ以外の配位パターンは考えられない。

以上に述べた直接の配位子以外に、 $Mn_4CaO_5$ クラスターのオキソ酸素に直接、あるいは間接的に水素結合しているアミノ酸残基が3つある。このうち、CP43-Arg357はオキソ酸素のO2とO4に、D1-His337はO3に直接水素結合し、D1-Asp61は水分子を通してO4に水素結合でつながっている(図6B)。これらの水素結合は、オキソ酸素をクラスターの外側に向かって引きだし、金属イオンであるMnやCaとの結合が強くなりすぎないようにする役割を持っているかもしれない。このような水素結合が存在しない場合、Mn—O、及びCa—Oの結合が強くなり、典型的な無機化合物で見られるような結合距離となり、構造が「硬く」安定的なものになるかも知れない。このような「硬い」構造は触媒に求められる構造変化能を持つことが難しく、従って触媒活性が失われることが予想される。実際に、CP47-Arg357, D1-Asp61, D1-

His337のうち、どれか一つを改変した変異株ではPSIIの活性が大きく損なわれる、あるいは失われることが知られている。

## 5. 水素結合ネットワーク

水分解反応において、2分子の水が分解される時、4つのプロトンが放出されることになる。 $Mn_4CaO_5$ クラスターはチラコイド膜の表面に存在し、大きな親水性タンパク質領域に覆われているので、放出されたプロトンが反応部位に留まると、局所的なpHが急激に低下し、活性部位を破壊してしまう可能性が高い。このため、プロトンは素早く複合体表面、ルーメン側のバルク溶液に排出される必要がある。これまでの構造では水分子が見えなかったため、水とアミノ酸残基から構成される水素結合ネットワークが特定できず、

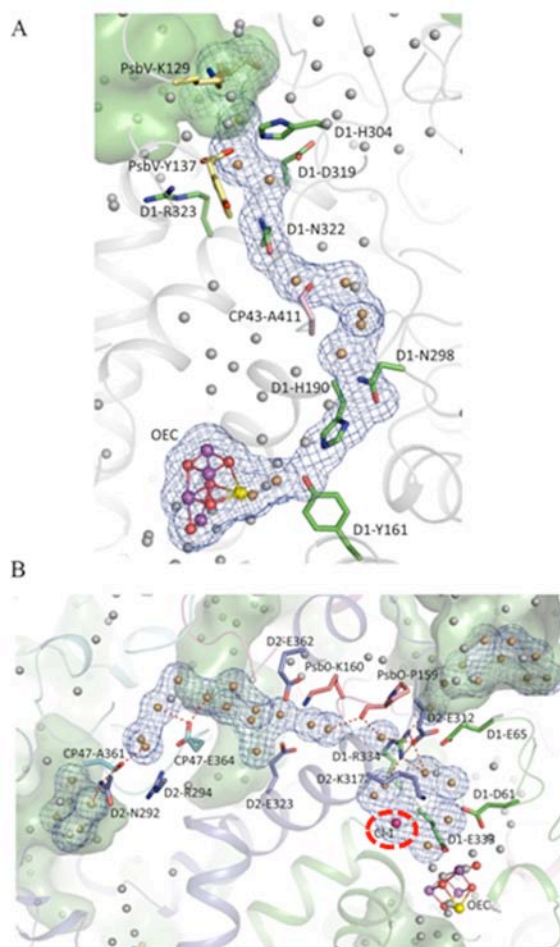


図7 A.  $Mn_4CaO_5$ クラスターからYzを経由した水素結合ネットワーク。B.  $Mn_4CaO_5$ クラスターからD1-D61, Cl-1を経由した水素結合ネットワーク。

両方の図において薄緑色で表した部分は、ルーメン側表面の溶液領域を表している。

プロトンの排出はタンパク質の中を通る間隙であるチャンネルの形で議論されていた<sup>14-16</sup>。しかし、プロトンは水素結合ネットワーク上を脱プロトン化とプロトン化のリレーの形で初めて効率的に輸送されるので、水分解の活性部位であるMn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターから複合体のルーメン側表面までをつなぐ水素結合ネットワークの存在が必要であった。このような水素結合ネットワークは、1.9 Å 分解能の構造で初めて同定可能となった。その結果、複数個の水素結合ネットワークが見つかり、そのうちの典型的なものを2つ下に紹介する。

水素結合ネットワークの1つはY<sub>Z</sub>と呼ばれる、D1-Tyr161残基を経由したものである。Y<sub>Z</sub>はPSIIの反応中心であるP680に電子を渡し、その代わりにMn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターから電子を奪い取る役割を持っている重要な電子伝達体であるが、水分解に伴うプロトンの排出にも関わっていることが以前から示唆されていた<sup>17, 18</sup>。高分解能構造において、Y<sub>Z</sub>はCaに結合している水W4と直接、またはW3、さらにMn4に結合しているW1, W2とは別の水を経由して間接的に水素結合でつながっている(図7A)。一方、Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターの反対側でY<sub>Z</sub>はD1-His190と水素結合し、D1-His190はさらにD1-Asn298や他のいくつかの荷電/親水性アミノ酸、及び水分子と水素結合ネットワークを形成し、このネットワークは最終的にPsbVのC-末端に近いPsbV-Lys129残基を経てルーメン側の溶液に出ている。従って、プロトンはこのネットワークを経由してMn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターからルーメン側溶液に排出される可能性がある。このネットワークは、Y<sub>Z</sub>の電子伝達活性と連動していることから、PCET (proton-coupled electron transfer) パスとも呼ばれている。しかし、最近の研究でこのパスがプロトンの排出に働いていないことも報告されており、この経路が実際に機能しているかどうかはさらなる研究を待たなければならない。

高分解能構造で見つかった典型的な水素結合ネットワークの2つ目の例は、Mn4に結合している水分子の一つであるW2を起点として、D1-Asp61, Cl-1、及びいくつかの荷電/親水性アミノ酸、水分子によって構成され、最終的にルーメン側溶液に出ている(図7B)。このうち、Cl-1はMn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターの近傍に見つかった2つの塩素結合部位のうちの一つで<sup>19, 20</sup>、これを通したプロトンチャンネルは以前の構造で示

唆されていたが、水素結合ネットワークが形成されていることは高分解能構造で初めて明らかになった。Cl-1はMn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターからの水素結合ネットワークの起点に近い位置にあり、プロトンチャンネルの構造維持に役立っているかも知れない。

## 6. 今後の展望

PSIIと同程度の巨大膜タンパク質複合体の中で、1.9 Å分解能はこれまで解析された構造の中で最高のものである。これによってMn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>クラスターの詳細な構造、水分子の存在位置、水素結合ネットワークなど多くの新しい知見が得られ、水分解・酸素発生反応部位についても重要な情報が得られた。しかし、解析された構造は主に暗黒で安定なS<sub>1</sub>状態のものであり、この構造のみから水分解の反応機構を決定することは困難である。O—O結合の形成についても、少なくとも3つの可能性、すなわち、O5—W2, O5—W3, W2—W3が残されている。今後はS状態遷移に伴う中間状態、少なくともS<sub>2</sub>, S<sub>3</sub>状態の構造を解明する必要がある。また、プロトンチャンネル、水チャンネルを明確に同定するには、各水素結合ネットワークを構成しているアミノ酸残基を改変し、得られた変異株の構造・機能解析を行う必要がある。さらに酸素チャンネルの同定も必要であるが、これは疎水性チャンネルの可能性が高く、酸素に近い性質を持つ不活性化ガスを導入した結晶構造解析を行う必要がある。そしてPSIIの多くの構成サブユニット、特に 10 kDa以下の低分子量サブユニットの機能を解明するため、それぞれの欠失変異体の構造・機能解析を行い、サブユニットの欠失により引き起こされる構造変化を明らかにする必要がある。このようなPSIIの構造・機能解析には、X線結晶構造解析だけでなく、微小な変化を検出できる振動分光法<sup>21, 22</sup>を中心とした物理的測定法や理論計算を活用することが重要である。

なお、本稿で述べた筆者らの研究は、神谷信夫、梅名泰史、川上恵典諸博士との共同研究であることを附記しておく。

*Received November 8, 2011, Accepted November 9, 2011, Published December 31, 2011*

## 参考文献

1. Styring, S., and Rutherford, A. W. (1987) In the oxygen-evolving complex of photosystem II the  $S_0$  state is oxidized to the  $S_1$  state by  $D^+$  (Signal  $II_{slow}$ )<sup>+</sup>, *Biochemistry* 26, 2401-2405.
2. Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1986) Characterization of  $O_2$  evolution by a wheat photosystem II reaction center complex isolated by a simplified method: disjunction of secondary acceptor quinone and enhanced  $Ca^{2+}$  demand, *Arch. Biochem. Biophys.* 247, 97-107.
3. Koike, H., Mamada, K., Ikeuchi, M., Inoue, Y. (1989) Low-molecular-mass proteins in cyanobacterial photosystem II: identification of psbH and psbK gene products by N-terminal sequencing, *FEBS Lett.* 244, 391-396.
4. Shen, J.-R., Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1992) Stoichiometric association of extrinsic cytochrome *c*-550 and 12 kDa protein with a highly purified oxygen-evolving photosystem II core complex from *Synechococcus vulcanus*, *FEBS Lett.* 301, 145-149.
5. Shen, J.-R., and Inoue, Y. (1993) Binding and functional properties of two new extrinsic components, cytochrome *c*-550 and a 12 kDa protein, in cyanobacterial photosystem II, *Biochemistry* 32, 1825-1832.
6. Shen, J.-R., Vermaas, W., and Inoue, Y. (1995) The role of cytochrome *c*-550 as studied through reverse genetics and mutant characterization in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 270, 6901-6907.
7. Shen, J.-R., Ikeuchi, M., and Inoue, Y. (1997) Analysis of the *psbU* gene encoding the 12 kDa extrinsic protein of photosystem II and studies on its role by deletion mutagenesis in *Synechocystis* sp. PCC 6803, *J. Biol. Chem.* 272, 17821-17826.
8. Zouni, A., Witt, H. T., Kern, J., Fromme, P., Krauß, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature* 409, 739-743.
9. 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.
10. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Science* 303, 1831-1838.
11. Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A., and Saenger, W. (2009) Cyanobacterial photosystem II at 2.9 Å resolution and role of quinones, lipids, channels and chloride, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 16, 334-342.
12. Umena, Y., Kawakami, K., Shen, J.-R., and Kamiya, N. (2011) Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, *Nature* 473, 55-60.
13. Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., and Shen, J.-R. (2011) Structure of the catalytic, inorganic core of oxygen-evolving photosystem II at 1.9 Å resolution, *J. Photochem. Photobiol. B* 104, 9-18.
14. Murray, J. W., and Barber, J. (2007) Structural characteristics of channels and pathways in photosystem II including the identification of an oxygen channel, *J. Struct. Biol.* 159, 228-237.
15. Ho, F. M., and Styring, S. (2008) Access channels and methanol binding site to the  $CaMn_4$  cluster in Photosystem II based on solvent accessibility simulations, with implications for substrate water access, *Biochim. Biophys. Acta* 1777, 140-153.
16. Gabdulkhakov, A., Guskov, A., Broser, M., Kern, J., Müh, F., Saenger, W., and Zouni, A. (2009) Probing the accessibility of the  $Mn_4Ca$  cluster in photosystem II: Channels calculation, noble gas derivatization, and cocrystallization with DMSO, *Structure* 17, 1223-1234.
17. Hoganson, C.W., and Babcock, G.T. (1997) A metalloradical mechanism for the generation of oxygen from water in photosynthesis, *Science* 277, 1953-1956.
18. Tommos, C., and Babcock, G.T. (2000) Proton and hydrogen currents in photosynthetic water oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1458, 199-219.
19. Murray, J.W., Maghlaoui, K., Kargul, J., Ishida, N., Lai, T.-L., Rutherford, A. W., Sugiura, M., Boussac, A., and Barber, J. (2008) X-ray crystallography identifies two chloride binding sites in the oxygen evolving centre of Photosystem II, *Energy Environ. Sci.* 1, 161-166.
20. Kawakami, K., Umena, Y., Kamiya, N., and Shen, J.-R. (2009) Location of chloride and its possible functions in oxygen-evolving Photosystem II revealed by X-ray crystallography, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 106, 8567-8572.
21. Noguchi, T. (2008) FTIR detection of water reactions in the oxygen-evolving centre of photosystem II, *Philos. Trans. R. Soc. B. Biol. Sci.* 363, 1189-1194.
22. Noguchi, T. (2008) Fourier transform infrared analysis of the photosynthetic oxygen-evolving center, *Coord. Chem. Rev.* 252, 336-346.

## Atomic Structure of Photosystem II That Enables Photosynthetic Water-Splitting

Jian-Ren Shen\*

Graduate School of Natural Science and Technology, Faculty of Science, Okayama University, Japan