

2011A1286、2011B1311、2012A1791、2012B1345、2012B1593 BL38B1、BL41XU

## 酸素発生光化学系 II 複合体の Mn の価数の決定 Determination of the Mn Valence in Oxygen-Evolving Photosystem II

梅名 泰史<sup>a</sup>、川上 恵典<sup>b</sup>、沈 建仁<sup>a</sup>、神谷 信夫<sup>b</sup>Umeha Yasufumi<sup>a</sup>, Kawakami Keisuke<sup>b</sup>, Shen Jian-Rena, Kamiya Nobuo<sup>b</sup><sup>a</sup>岡山大学異分野基礎科学研究所, <sup>b</sup>大阪市立大学複合先端研究機構<sup>a</sup>RIIS, Okayama University, <sup>b</sup>OCARINA, Osaka City University

光合成の水分解反応を行っている光化学系 II 蛋白質の活性中心  $Mn_4CaO_5$  クラスタは III と IV 価の混合原子価状態と考えられているが、各 Mn の価数の議論はまだ結論がついていない。本研究は、Mn の X 線吸収端が価数に応じてシフトすることに着目し、X 線吸収に依存する異常分散項の電子密度差電子密度マップを用いて各 Mn の価数を分析した。その結果、K-吸収端波長領域において、各 Mn の価数に応じた変化を明らかにした。

**キーワード：**光合成、金属蛋白質、Mn クラスタ、価数、異常分散項差電子密度マップ

### 背景と研究目的：

植物や藻類による光合成では、光化学系 II 蛋白質 (Photosystem II, PSII) が光エネルギーを使って水を分解して炭素固定に必要な電子を取り出し、その副産物として動物の呼吸に必要な酸素ガスを放出している。PSII は 20 個のサブユニット蛋白質と色素分子や金属イオンなどで構成される分子量 35 万の複合体蛋白質が、二量体としてチラコイド膜中に存在している。PSII の活性中心には 4 個の Mn 原子と 1 個の Ca 原子から構成される  $Mn_4CaO_5$  クラスタ (Mn クラスタ) が存在しており、5 段階の反応サイクル (S 状態サイクル) によって水分解反応が行われている[1]。PSII の結晶構造は、2001 年に Zouni らによって初めて PSII の構造が 3.8 Å 分解能で解析された[2]。2011 年には、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* 由来の PSII が 1.9 Å 分解能で解析され、初めて Mn クラスタの分子構造が 5 つの酸素原子で結ばれた歪んだ椅子の形をした  $Mn_4CaO_5$  クラスタであると報告された[3]。

この Mn クラスタは、III 価と IV 価がクラスタ内で局在化している混合原子価状態であることが、X 線吸収分光(XAS)や電子スピン共鳴(EPR)による分析から示されている[4][5]。また近年では、理論化学計算やヤーン・テラー効果[6]による歪みに基づく議論も行われている[7][8]。しかし、EPR や XAS におけるスペクトル分析だけでは、二量体である PSII の合計 8 個の Mn 原子の価数をそれぞれ判別することは難しいと思われる。また、ヤーン・テラー効果による歪みは、0.1

- 0.2 Å 程度の結合長の変化に基づく議論が多く、1.9 Å 分解能で解析された PSII の結晶構造の報告には、結合長に 0.16 Å の誤差があることが述べられている[3]。

本研究は、Mn クラスタにおける個々の Mn 原子の価数を、スペクトル分析や結合長に基づかない、新しい結晶構造解析法で評価を行った。一般に、金属の X 線吸収が急激に変化する吸収端は、価数に応じてシフトすることが知られており、本研究ではこの現象に着目した。我々は、吸収端波長にて PSII 結晶の X 線回折強度測定を行い、回折強度における X 線吸収を反映する異常分散項の差電子密度マップ(アノマラス差マップ)から、各 Mn 原子の価数を特定できるか検証を行った。ただし、XAS による先行研究から、X 線損傷の指標とされる「ヘンダーソンリミット」(20 MGy)[9]を越える X 線が照射されると、PSII の Mn は II 価まで還元されると報告されている[10]。

#### 実験：

PSII の Mn クラスタに由来する Mn の K-吸収端を求めるため、PSII 結晶の蛍光 XAS 測定を行った。また、蛍光 XAS 測定の標準試料として、3 種類の価数の異なる酸化マンガン化合物を測定し、Mn の価数と K-吸収端のシフト幅について確認した。また、本研究で問題となる PSII の X 線還元を確認するため、PSII 結晶に対して X 線照射と蛍光 XAS 測定を交互に繰り返す実験を行い、X 線還元によって Mn の K-吸収端がどのようにシフトするのかを検証した。

アノマラス差マップによる価数の分析には、PSII 結晶の蛍光 XAS 測定から決定した Mn クラスタ由来の K-吸収端波長 1.8921 Å を用いて、SPring-8 のビームライン BL38B1 にて回折強度測定を行った。回折強度測定は、ビームサイズを 200 x 200 μm、1 枚あたりの振動角 0.3°で照射時間 10 秒の X 線回折像を二次元 CCD 検出器で撮影し、総振動角 180°の回折強度データを収集した。その際、異常分散項を精度よく集めるため、インバース・ビームジオメトリ法により、結晶を 180°回転させて重複測定を行い、合計 1200 枚の X 線回折像を構造解析に用いた。また、X 線還元を抑えるため、上記の回折強度データは PSII 結晶の 3 点に分散して測定し、X 線量をヘンダーソンリミットの 10 %程度に当たる 1.7 MGy に抑えた。また、アノマラス差マップの波長依存を確認するため、別の結晶を用いて波長 0.9000 Å で測定し、アノマラス差マップのピーク高を比べた。2 つのデータを比較する際、吸収端が Mn の K-吸収端よりも以遠にあり波長依存が少ない Ca のアノマラス差マップのピーク高で規格化した。PSII の溶液試料を用いた先行研究では、二量体 PSII の単量体間は本質的に同じと考えられている。結晶のパッキングによる影響を考慮するため、まず各単量体における Mn のピーク高を Ca で規格化した後、それぞれの Mn の単量体間の平均ピーク高を PSII の Mn クラスタの評価に用いた。

#### 結果および考察：

PSII 結晶の蛍光 XAS 測定によって、Mn クラスタ由来の K-吸収端は 1.8921 Å であった。標準試料として測定した 3 種類の酸化マンガン化合物の XAS スペクトルから、Mn の価数に応じた蛍光 X 線強度の大小関係が変わらない K-吸収端領域は 12 eV ほどの範囲であり、IV 価から II 価まで還元された場合は 7 eV ほどシフトすることがわかった (図 1A)。PSII 結晶の X 線還元を検

証した結果、照射線量が 10 MGy 以上でおよそ 6 eV シフトし、それ以上は変わらなかったことから、10 MGy 以上では全ての Mn が II 価に還元されたと思われる (図 1B)。しかし、途中の IV 価から III 価への X 線還元のプロセスは分からなかったため、Mn クラスターの分析に許容される照射線量については、蛍光 XAS 測定からは決定できなかった。

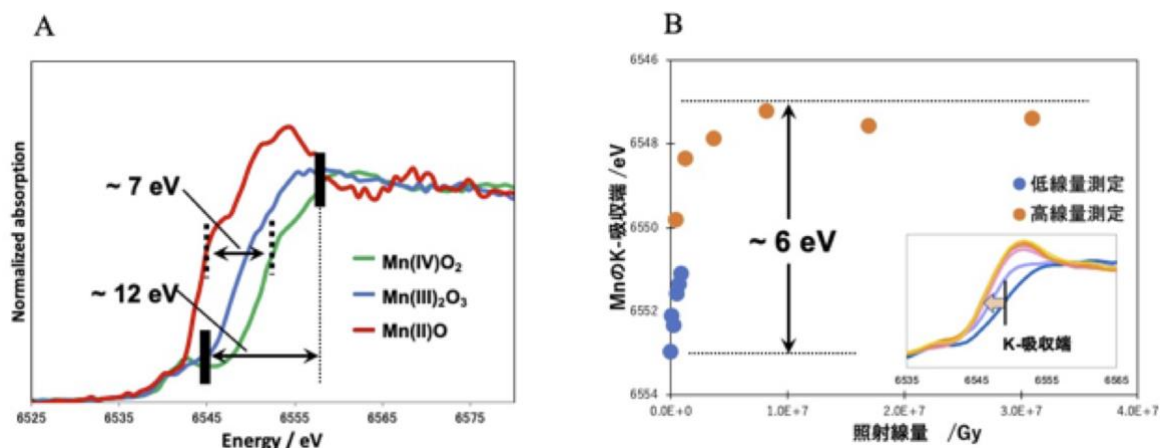


図 1. 酸化マンガン化合物の XAS スペクトル (左) と PSII 結晶の X 線還元 (右)

アノマラス差マップ分析で用いた吸収端波長 1.8921 Å では、結晶母液によって回折 X 線が減衰するため高い分解能は期待できなかった。しかし、長さが 1 mm 程度の大きい PSII 結晶を用意することで、2.5 Å 分解能の解析が可能となり、アノマラス差マップを計算したところ、各 Mn に対応するマップは分離しており、Mn2 と Mn3 は Mn1 と Mn4 よりも小さいことが分かった (図 2A)。アノマラス差マップの波長依存を検証するために用いた 2 つ波長の回折強度データの結晶学的統計値を表 1 に示す。

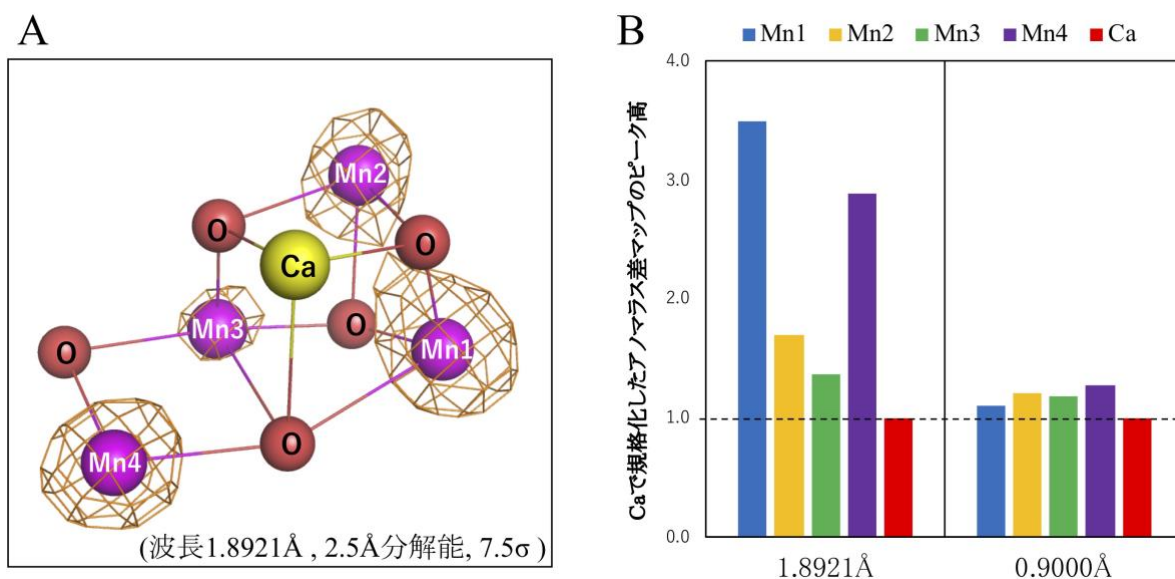


図 2. PSII 結晶のアノマラス差マップ (左) と各原子のアノマラス差マップの平均ピーク高

表 1. 回折強度データの結晶学的統計値

Wavelength (Å)	0.9000	1.8921
Resolution (Å) <sup>a</sup>	50 - 1.9 (1.97-1.90)	50 - 2.5 (2.54-2.50)
Redundancy	7.4 (6.7)	6.5 (5.6)
Completeness (%)	99.6 (99.7)	96.9 (92.4)
$R_{\text{merge}}$ (%)	6.0 (77.3)	13.4 (82.2)
$\langle I \rangle / \langle \sigma I \rangle$	21.6 (2.6)	17.5 (2.2)
Model Refinement		
$R_{\text{work}} / R_{\text{free}}$ (%) <sup>b</sup>	17.4 / 20.1	21.9 / 26.3

<sup>a</sup> Values in parentheses are for the highest-resolution shell.

<sup>b</sup> Test-set reflections (5% of the data) were excluded in refinement

また、Ca で規格化した各 Mn のアノマラス差マップの平均ピーク高を比較したところ、1.8921 Å データにおける各 Mn 間の差は、0.9000 Å データよりも大きいことが分かった (図 2B)。本実験で用いた 1.8921 Å (6552 eV) では、III よりも IV 価の X 線吸収は小さくなるため、アノマラス差マップは相対的に小さくなる。Mn クラスタは III 価と IV 価の混合原子価状態であると報告された先行研究 [4][5]を考慮すると、Mn1 と Mn4 は III 価、Mn2 と Mn3 は IV 価であることが示唆された。

#### 今後の課題：

本研究によって、Mn クラスタの各 Mn 原子における価数の違いを確認することができた。しかし、PSII 結晶の連続的な XAS 測定の結果で示されたように、現状の線量では X 線還元による影響を否定できない。また、異常分散項は回折強度全体の数%とされているため、正確な分析には、より多くの回折強度情報が得られる高い分解能が必要である。今後は X 線還元を抑え、かつより高い分解能のデータの収集から、自然状態に近い Mn クラスタの価数の分析を目指す。

#### 参考文献：

- [1] B. Kok, B. Forbush, M. McGloin, *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457, (1970)
- [2] A. Zouni et al., *Nature*, **409**, 739, (2001)
- [3] Y. Umena et al., *Nature*, **473**, 55, (2011)
- [4] G. W. Brudvig, W. F. Beck, J. C. de Paula, *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.*, **18**, 25, (1989)
- [5] L.V. Kulik et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **129**, 13421, (2007)
- [6] H. Jahn, E. Teller, *Proc. Royal Soc. Lond.*, **161**, 220, (1937)
- [7] M. Suga et al., *Nature*, **517**, 99, (2015)
- [8] K. Kanda et al., *Chem. Phys. Lett.*, **506**, 98, (2011)
- [9] R. Henderson. *Philos. Trans. R. Soc. London B*, **241**, 6–8, (1990)
- [10] J. Yano et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **102**, 12047, (2005)

(Received: March 23, 2019; Accepted: December 16, 2019; Published: January 22, 2020; Revised March 26, 2020)