

研究終了報告書

「量子ビームが拓く光合成膜タンパク質のマルチモーダル構造解析」

研究期間：2018年10月～2022年3月

研究者：菅 倫寛

1. 研究のねらい

光合成での水分解・酸素発生反応は光化学系 II (PSII) 内部の Mn_4CaO_5 クラスターが酸化状態を5段階 (S_0 状態から S_4 状態へ) に順次変化させて触媒する。このとき、光駆動による S 状態遷はピコ秒スケールの光化学反応、ナノ秒～マイクロ秒スケールの電子伝達と酸化還元反応、マイクロ秒～ミリ秒スケールのタンパク質の構造変化によって効率的に遷移することが知られているが、その構造基盤は不明である。特に電子供与側において刻々と変化する Mn_4CaO_5 クラスターの構造や金属の価数やスピン状態および周囲のプロトン化状態などについて不確定な点が多く、水分子の酸化、プロトンの放出、酸素分子の発生などの反応機構の全貌は解明されていない。

近年開発された X 線自由電子レーザー (XFEL) は放射光の 10 億倍以上の輝度の X 線を 10 フェムト秒のパルスとして発振することのできる量子ビームの技術である。この技術を用いることでタンパク質が放射線損傷を引き起こす前に回折現象を測定することができるため、タンパク質を無損傷の機能を有した状態のまま解析することが可能となった。また、XFEL はフェムト秒のパルス X 線であるため、高い時間分解能で回折現象を記録することが可能である。このためトリガーによって励起した生化学反応について特定の時間経過後に XFEL で測定することにより、構造のダイナミクスを明らかにすることができると期待されている。

本研究では光合成膜タンパク質 PSII の光励起した中間体状態を対象にして XFEL を用いて高い原子分解能で構造解析することを目指す。さらに、レーザー照射により光励起した後一定時間経過した構造を解析することでピコ秒～ミリ秒スケールで起こる PSII の構造ダイナミクスを明らかにすることを目指す。研究全体を通して PSII の Mn_4CaO_5 クラスター中の金属価数とスピン状態の情報を与え、かつ、原子レベルの立体構造をフェムト秒時間で解析することのできる技術を開発する。また本研究で得られた構造解析技術を PSII 以外の光合成膜タンパク質や金属タンパク質にも適用することで多くの生命現象の理解に資することを目的とする。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では研究者が 2017 年に発表した S_3 状態 PSII のシリアルフェムト秒結晶構造法の技術基盤を発展させ、PSII 結晶を光励起後に遅延時間を経て XFEL を照射して構造解析することにより、PSII の時間分割シリアルフェムト秒構造解析の技術を開発するものである。タンパク質の時間分割シリアルフェムト秒構造解析は技術開発が進められているが、これを PSII に直ちに適用することはできない。そこで、研究テーマ A「シリアルフェムト秒構造解析法の開発」を実施した。研究テーマ A では以下の点を検討した。①培養・精製のスケールの拡大。②結晶試料の調製条件の最適化。③シリアルフェムト秒回折実験の条件および回折データの

処理方法の最適化による解析分解能の改善。これらの点を改善して複数の遅延時間後のデータが取得できる技術基盤の確立を第一の目的とした。さきがけ研究ではこれらの項目を丁寧検討し、ナノ秒からミリ秒にかけて遅延時間の後にデータを測定することが可能となった。また、回折実験の最適化の過程で光励起の条件を決定する方法を確立したので、これを *IUCrJ* 誌にまとめた(代表的論文 2)。

また、テーマ B「固定ターゲット法による PSII の S 状態中間体の構造解析」を実施した。テーマ A では大量の試料を必要とするため、サンプルが十分に確保できなければ実施が困難である。そのため、サンプルの消費が軽減できる固定ターゲット法を用いた。この手法では凍結試料を用いて分析するので凍結によって時間分解能は失われるが、S 状態中間体の寿命は十分に長いので構造解析が可能である。この手法を用いて PSII の S₂ 状態と S₃ 状態の結晶構造を 2.15 Å 分解能で解析することに成功した。解析から S₃ 状態の触媒部分の化学構造に関する知見や、基質水を輸送するチャネルに関する知見を得た。この結果は *Science* 誌にまとめた(代表的論文 1)。

また、研究テーマ A の技術基盤を他のタンパク質結晶にも適用することを目的としてテーマ C「光合成膜タンパク質や金属タンパク質へのマルチモーダル構造解析の展開」を実施した。シリアルフェムト秒結晶構造解析ではサンプルの量の確保、結晶の品質向上など様々なハードルがあるので PSII 以外のタンパク質でシリアルフェムト秒結晶構造解析を研究期間中に実施することはできなかった。しかし、今後の解析対象の可能性のある緑藻 PSI-LHCI 超複合体の構造解析に成功し *Nature Plants* 誌に発表した(代表的論文 3)。

(2) 詳細

研究テーマ A「シリアルフェムト秒構造解析法の開発」

A01: 試料の大規模

項目 01 <結晶試料の調製スケールの拡大と条件の最適化>

研究開始時と比べ培養量を 2 倍の 20 L に増やすことを目指した。2018 年度に導入した人工気象器および精製カラムの大型化により一度に精製できる結晶化サンプルの量が 2 倍程度に増えた。得られた精製サンプルを用いて結晶化を行い、これまでの試料と同程度のものが得られていることを大型放射光施設で確認した。2019 年度から研究補助員 1 名を雇用し、細胞培養と精製の頻度を倍にした。これにより研究開始時と比べ 4 倍程度の結晶試料を確保できるようになった。試料の大規模化と並行して結晶の品質改善も行った。これまでの結晶よりも回折分解能の良い結晶を得る条件は見つかっておらず、また回折分解能の良い結晶を再現良く得る方法も探索を継続している。

A02: データ処理の最適化

<回折実験から得られた回折データの処理方法の改善>

XFEL で取得された静止回折写真は、放射光で測定される振動回折写真とは異なり部分反射の割合を正確に見積もることができない。このため観測された反射を全て完全反射と想定し、モンテカルロシミュレーションにより完全反射の強度を算出する方法が用いられている。このアルゴリズムを実装したソフトウェアが複数存在し、いずれもが未だ開発段階にあるた

め PSII のように巨大な膜タンパク質複合体の構造解析に適した方法を見つける必要がある。CrystFEL および DIALS/cctbx.xfel の二種類のソフトウェアを比較した。その結果、多くの構造解析例がある CrystFEL に比べて DIALS/cctbx.xfel を用いた場合に CC1/2 を基準として判断した回折データの分解能に改善が見られた。また DIALS/cctbx.xfel を用いて回折写真を処理した場合の方が全体の温度因子の指標となる Wilson プロットの温度因子が低くなる傾向が見られた。さらに異常分散差フーリエマップから算出された Mn イオンに由来する異常分散差ピークにも改善が見られたことから、PSII の静止回折写真は DIALS/cctbx.xfel で指数付け、積分、企画化すると CrystFEL に比べて回折データに改善が見られることがわかった。

A03: 構造解析とデータ解析

<シリアルフェムト秒結晶構造のための光励起方法の検討>

PSII の水分解反応を室温で進行させて解析するためには励起光を複数回照射して、S 状態を遷移させる必要がある。しかし、試料を連続して供給するシリアルフェムト秒結晶構造解析では結晶を運ぶ粘性媒体の種類とその流速に依存して光励起される領域が変化する。結晶を含む試料の流速が速すぎると励起光が重なる領域が狭くなり高い酸化状態の S 状態の調製が難しくなる。流速が遅すぎると意図した回数以上の光励起が起こるため光のコンタミが起こる。さきがけ研究開始時において、シリアルフェムト秒結晶構造解析のための光励起の条件を最適化する合理的な方法はなかった。しかし、PSII 以外のタンパク質の構造解析においても光励起の条件決定は重要な課題である。

これまでに室温状態で S₂ 状態の構造解析を試みたが、微小結晶を移動させる粘性の媒体であるグリース中で光の散乱が起きることが判明した。そこでグリース中の光の散乱する範囲を決定するために励起レーザーと X 線自由電子レーザーの照射タイミングをスワップし、試料の流速を変化させて励起レーザーと X 線自由電子レーザーの照射位置をできるだけ離れた。散乱光の影響は光照射により構造変化する PSII 内部の水分子に注目して、差フーリエマップを解析することで算出した。続いて、この実験により決定した光散乱範囲に基づいて、室温で S₂ 状態の回折データを収集し、2.4-Å の原子分解能で立体構造を決定した。

まず、光励起方法の条件を決定するため以下のように実験を行った。励起光照射からおおよそ 100 ms (99.99995 ms) 後に XFEL を照射した。ここで XFEL は 10 Hz なので、励起光照射の 50 ns 前に前測定の XFEL が照射されることになる (-50 ns の遅延時間で構造解析することになる)。もし光のコンタミが起こる条件であれば S₁ 状態の光化学系 II 部分的に励起されて S₂ 状態を一定割合で含む、光のコンタミが起こらない条件であれば光励起されていない S₁ 状態として構造解析されると予想される。S₁-to-S₂ の立体構造変化のうち、W665 と呼ばれる O4-channel に存在する水分子は S₁-to-S₂ 遷移に伴ってその可動性が大きく増加するので、この構造変化を指標にして光のコンタミが起こらない条件を探索した。その結果、流速を通常の 2 倍にしても (4.9 μl/min) 光のコンタミが見られたが、4 倍にすると光のコンタミの影響が完全になくなった (9.8 μl/min)。グリース中を散乱光は 700 μm にも影響することが判明した。そこで 4 倍の流速で光照射して 10 ms における S₂ 状態を 2.4-Å の原子分解能で構造解析した。

構造解析の結果、酸素発生を行う触媒自身の構造はこれまでの低温での解析結果と良く合致した。これに対し、タンパク質の残基や O1-channel の水分子、キノン QB 結合サイトなどに

は違いが見られ、これらは解析された温度(室温もしくは低温)、光励起後の遅延時間による違いを反映していると考えられた。さらに O1-channel とよばれる、触媒部分の O1 酸素原子を起点とするチャンネル内部の水分子は S₂ 状態遷移後の時間に伴い触媒部分から周囲の水分子へ熱運動性が伝播することが考えられた。このことは O1-channel が酸素形成のための基質水分子を運搬するために機能していることを示唆するものである。この内容についてまとめて研究者を最終・責任著者として *IUCrJ* 誌に論文発表した(代表的論文 2)。

<PSII の時間分割シリアルフェムト秒結晶構造>

上述の光条件をもとに、S 状態遷移に至る段階をターゲットとして回折データを収集した。PSII は光エネルギーを吸収した後、反応中心での電荷分離反応がピコ秒スケールで完了し、続いて QA、QB への電子伝達がナノ～マイクロ秒のスケールで起こる。電子伝達に伴い、タンパク質環境がどのように変化をすることを観測することを目指した。データは現在構造解析中で近日中に解析を終えて投稿する予定である。

研究テーマ B 「固定ターゲット法による PSII の S 状態中間体の構造解析」

2015年にS₁状態の構造解析で利用した、大型結晶の固定ターゲット法によるシリアルフェムト秒結晶構造解析法を微小サイズの結晶に適用して構造解析することを目的として理化学研究所の山本雅貴博士・吾郷日出夫博士らと共同研究を行った。この手法ではサンプルホルダー全体を励起する大きな径のレーザー光を用いて PSII を反応中間体へ遷移させ、窒素気流により速やかに凍結することで反応中間体をコールドトラップすることを目的とした。固定ターゲット法による回折実験を行ったところ、サンプルを吐出し続けるシリアルフェムト秒結晶構造解析法と比べ、サンプルの消費量が 1/10 に軽減した。また回折写真のバックグラウンド低下により回折分解能が改善した。その結果、S₁、S₂、S₃ 状態を 2.15-Å 分解能で構造解析することに成功した。分解能が改善したことにより、S₃ 状態における酸素原子の化学構造が oxyl/oxo である可能性が高いことを明らかにした。また S 状態遷移に伴う OEC の詳細な立体構造の変化や基質水分子流入のためのチャンネル開閉に関する新しい知見を得た。これらの内容は研究者を筆頭著者・責任著者として *Science* 誌に発表した(代表的論文 1)。

研究テーマ C「金属タンパク質へのマルチモーダル構造解析の展開」

研究テーマ A で開発した技術基盤を他のタンパク質結晶にも適用することを目的とした。PSII の構造解析に注力したので、シリアルフェムト秒結晶構造解析を研究期間内に行うことはできなかった。しかし、構造解析に向けてサンプルの調製、クライオ電子顕微鏡構造解析、放射光による結晶構造解析などを並行して進めた。その結果、緑藻 PSI-LHCI 超複合体の構造解析に成功し結果は *Nature Plants* 誌(代表的論文 3)にまとめた。今後はこれらのタンパク質についてサンプルの改善を継続し、シリアルフェムト秒結晶構造解析を推進していきたいと考えている。

3. 今後の展開

さきがけ研究では PSII の光合成の酸素発生反応機構について、動画的な視点や金属の価数

やスピン状態を解析することを目指した。従来の構造生物学は静止画から生化学反応を理解するものであるため、本さがけ研究では酵素反応をマルチモーダルな視点から理解する研究を展開することを目指した。研究期間内に PSII の時間分解のシリアルフェムト秒結晶構造解析の技術を確立できただけでなく、解析によってナノ～マイクロ秒の時間スケールで起こるタンパク質の働きを活写することにも成功できた。また、理論科学計算の結果を参考にすることで中間体状態における触媒部分の価数や化学状態に関する情報を突き止めることができた。一方で速い時間帯で観測された立体構造の変化を理論科学計算から検証することができておらず今後の課題である。これは、理論計算手法の守備範囲とする時間スケールがシリアルフェムト秒結晶構造解析で得られる時間スケールとがうまく一致していないのが原因のひとつと考えられる。生化学反応を時分割の立体構造情報だけに依らずに多面的に捉えることは本さがけ研究で目指したものであるため、この方向性を維持して研究を展開していきたい。

さがけ研究では光合成の水分解反応の S_3 状態について精度の高い解析を行い、反応機構の核心に迫る成果を得ることができた。この知見は人工光合成のための触媒開発へと展開されることが期待されるものである。現在の人工光合成研究では、大きく分けると天然のシステムである PSII を模倣するアプローチと独自の人工システムをデザインするアプローチの二通りがある。本さがけ研究では天然のシステムで酸素分子が発生する直前の状態を捉えることに成功したので前者のアプローチにとって意義深い成果である。しかし反応機構の全貌解明には至っていない。例えば水分解反応での酸素分子の発生には水素イオンと電子を取り除く必要があり、その制御方法は現在不明であるが、今後 10 年で詳細に解析されると期待される。

4. 自己評価

さがけ研究は PSII の光合成の酸素発生反応機構について、動画的な視点や金属の価数やスピン状態を解析することを目指したものであるが、最終年度のぎりぎりではあるが、時間分解のデータ解析に着手することができた。テーマ A で掲げる本技術は大量のサンプルを必要とするので、消費サンプル量の少ない方法を用いたアプローチであるテーマ B を並行して展開したことも良かった。もしテーマ A のみに固執していたら、解析可能なデータを取得するのに苦労したであろう。テーマ B の解析結果は筆頭著者・責任著者として *Science* 誌に発表できたのは非常に幸運であった(代表論文 1)。この論文は 2021 年現在 125 回引用されており (google scholar)、科学技術や社会・経済への波及効果も大きいと思われる。これらの成果が評価され、国際光合成学会より Robin Hill 賞の受賞が内定している。テーマ C でも時間分解の構造解析を目指したが研究期間内には着手できなかった。しかし、本さがけ研究で培った技術・知識・人脈を生かして自身の今後の研究において展開させたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 8件

代表的3報(*corresponding author, †equal contribution)

1. **M Suga**^{*}, F Akita[†], K Yamashita, Y Nakajima, G Ueno, H Li, T Yamane, K Hirata, Y Umena,



S Yonekura, LJ Yu, H Murakami, T Nomura, T Kimura, M Kubo, S Baba, T Kumasaka, K Tono, M Yabashi, H Isobe, K Yamaguchi, M Yamamoto, H Ago* and JR Shen*. An oxyl/oxo mechanism for dioxygen formation in PSII revealed by X-ray free electron lasers. *Science*, 366, 334–338 (2019).

2017年の論文発表後にO5とO6が基質となる反応機構は受け入れられたが、これら酸素原子の化学構造や反応機構に関して議論を引き起こした。固定ターゲット法により2つの中間体を含む3つの状態の立体構造を2.15 Åの高分解能で解析した。その結果、酸素分子の形成に必要と考えられる2つの酸素O5とO6の原子間距離に基づいてこれら酸素原子の化学的な性質を明らかにした。また反応に必要な水分子を取り込むための経路や反応で生じた水素イオンを排出するための経路を突き止めた。

2. H Li[†], Y Nakajima[†], T Nomura, M Sugahara, S Yonekura, SK Chan, T Nakane, T Yamane, Y Umena, M Suzuki, T Masuda, T Motomura, H Naitow, Y Matsuura, T Kimura, K Tono, S Owada, Y Joti, R Tanaka, E Nango, F Akita, M Kubo, S Iwata, JR Shen* and **M Suga***. Capturing structural changes of the S₁ to S₂ transition of photosystem II using time-resolved serial femtosecond crystallography. *IUCr*, 8, 431–443 (2021).

光によって反応を開始するシリアルフェムト秒結晶構造解析では、励起光によって光のコンタミネーションが起きない条件を決めることが重要である。S₂状態で大きく変化する水分子に注目して、励起光条件を決定する方法を見出した。解析の結果、φ=250 μmの励起光では光の散乱が800 μmにも及ぶことが判明した。

3. **M Suga[†]**, SI Ozawa[†], K Yoshida-Motomura, F Akita, N Miyazaki*, Y Takahashi*. Structure of the green algal photosystem I supercomplex with a decameric light-harvesting complex I. *Nature plants*, 5, 626–636 (2019).

緑藻の光化学系は植物よりもさらに巨大な光捕集アンテナを持つことが知られており、これにより水生環境の弱い光エネルギーを効率良く利用することができると考えられているが、その分子基盤は不明であった。緑藻の植物光化学系I-光捕集アンテナI超複合体をクライオ電子顕微鏡で解析して2.8 Å分解能で立体構造を決定した。この解析により緑藻の光化学系Iの持つ最大10個のサブユニットからなる光捕集アンテナ複合体の集光性色素の位置と向きを正確に決定した。

(2) 特許出願: 0 件 (特許公開前のもも含む)

(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. X-ray free electron lasers reveal the molecular mechanism for water oxidation in photosystem II, Michihiro Suga , 11th International workshop on X-ray radiation damage to biological samples – RD11, online 2020 年 10 月 14 日 (Invited) |
| 2. Structural changes of oxygen-evolving PSII during S-state transitions and a possible mechanism for oxygen evolving reaction revealed by X-ray free electron laser pulses, |

Michihiro Suga, 2019 ESP-IUPB world congress 2019 年 8 月 25 日 (Invited)

3. X-ray free electron laser reveals the molecular mechanism for water oxidation in nature, **Michihiro Suga**, International Workshop on Frontier of Science and Technology for Solar Energy Conversion 2019 年 11 月 5 日 (Invited)
4. Intermediate Si-state structures of photosystem II reveal the molecular mechanism for water oxidation in nature, **Michihiro Suga**, 3rd International Solar Fuels Conference (keynote lecture) 2019 年 11 月 24 日
5. 日本光生物学協会奨励賞(日本光生物学協会), **菅倫寛**, 2020 年
6. Robin Hill Award (国際光合成学会), Michihiro Suga, 2022 年