

X線分光法を用いた酸素発生錯体の構造に関する研究

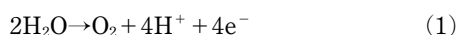
矢野淳子

Physical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory 1 Cyclotron Rd., Berkeley, CA 94720, USA

要旨

自然界における水分解反応は光化学系 II 酸素発生複合体 (Photosystem II, 以下 PSII) においておこり, その活性中心である酸素発生錯体 (oxygen-evolving complex, OEC) は, 4 個の Mn と 1 個の Ca がオキソ架橋した Mn_4CaO_5 クラスタと, 6 つのカルボキシル基, 1 つのヒスチジル基によって構成される。我々のグループでは, PSII の光駆動サイクル中におこる Mn_4CaO_5 クラスタの構造と電子状態変化を理解し, ひいては反応機構そのものを解明するため様々な分光法を用いて実験を行っている。元素選択性のある X 線分光法はタンパク質中の特定元素の化学構造変化を理解するのに威力を発揮する。本稿では, 酸素発生 (水分解) 過程で生ずる Mn_4CaO_5 クラスタの状態変化に関して, X 線分光法から得られている現在の知見を概説する。

自然界において, 太陽光エネルギーを吸収して生物が利用可能な化学エネルギーに変換する酸素発生型光合成反応では, 水が外来的な電子の供給源 (電子供与体) として用いられる。その活性中心である酸素発生錯体では, 以下の式に示すとおり 2 つの水分子が 4 電子酸化されることによって 4 つのプロトンと 4 つの電子, および 1 分子の酸素が放出される。



ここで生成された電子は最終的に電子伝達体である NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸) の生成に用いられ, そしてチラコイド膜 (クロロプラスト内の PSII を含む光合成膜タンパク質が存在する脂質二重膜) の内外に形成されたプロトン濃度勾配による膜電位を利用して合成される ATP (Adenosine Triphosphate, アデニン三リン酸) とともに, CO_2 を糖に還元するのに利用される¹⁾。

水分解反応は, Mn_4CaO_5 クラスタにおける反応中間体 S_n ($n=0\sim 4$) の光駆動サイクル (Kok cycle) によっておこる (Fig. 1)²⁾。n が大きいほどより酸化が進んだ状態を表し, PSII が 1 光量子を吸収することに 1 ステップずつ酸化反応が進行する ($S_n \rightarrow S_{n+1}$)。まず PSII を暗いところに 1 時間程度おいてやると S_1 状態で安定化される (暗順応)。 S_1 状態は, 反応中心であるクロロフィル a 二量体 P680 の光誘起に伴って S_2 , S_3 へと 1 電子ずつ酸化される。そして 3 回目の光励起後に寿命の短い S_4 状態を経て 1 酸素分子を遊離した後, S_0 状態へ戻る。

光駆動サイクルにおいておこる Mn_4CaO_5 クラスタ各 S 状態の構造と電子状態変化, 脱プロトン化, および基質

PSII (monomer)

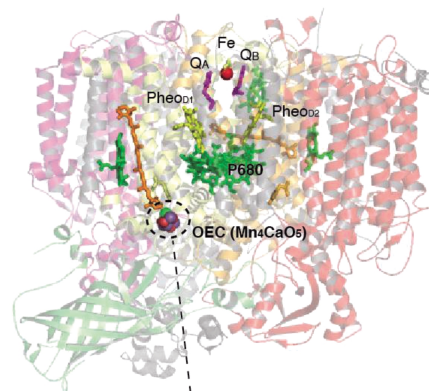
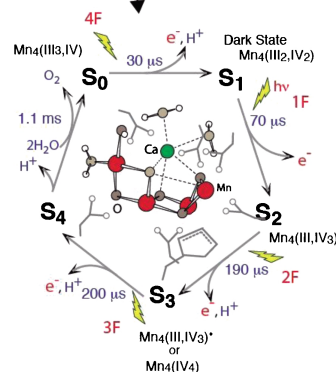
Kok cycle and Mn_4CaO_5 cluster

Fig. 1 (Color online) (top) PS II monomer structure showing the location of the reaction center pigments, P₆₈₀, pheophytins (Pheo), the donor OEC, and acceptor side Fe and quinones Q_A and Q_B^{3,4)}. (bottom left) The Kok cycle with the S-state intermediates, proposed oxidation states, and kinetics. The inset shows the proposed structure of the S₁ state of the Mn_4CaO_5 cluster from EXAFS, EPR, and theoretical studies based on the XRD structure.

水分子の交換現象については、X線構造解析法および様々な分光法を用いた実験と理論解析を通して次第に明らかになりつつある。しかしその一方、水分解機構そのものに関しては未だ解明されておらず、現在も様々な方面から研究が続けられている。

タンパク質の構造を知る手法は、放射光X線源を利用して行う単結晶X線構造解析がいうまでもなくその主たる方法である³⁻⁵⁾。より小さな結晶からより高い分解能のデータを得るため、第3世代放射光施設のような高輝度の放射光源が利用されている。その一方で、測定中に起こりうる試料の放射線損傷は、X線を用いる研究に常に存在する問題であり、試料の損傷の程度をいかにして評価し、かつ最低限に留めて活性型構造を得るかが課題である⁶⁾。PSIIのような金属タンパク質の場合、その金属活性中心の構造を調べる別の方法として、X線吸収(XAS)法が幅広く用いられている。XAS法を金属タンパク質に応用する際の利点は、まずEXAFSスペクトルからは、活性中心付近の原子間の距離に関する情報を高い精度(距離分解能: PSIIのMn EXAFSの場合、およそ0.10から0.15 Å, 距離の精度: ~0.02 Å)で求めることができる点が挙げられる。また、測定に用いるX線量を容易に制御できる。PSIIの場合、EXAFS測定に用いるX線量(6.6 keV, 10 K)はおよそ 10^7 photon/ μm^2 で、この条件下では試料の活性を保つことができる。

2. マンガンクラスターの構造と構造変化

PSIIを暗順応させると、まずS₁状態で安定化される。この際、Mn₄CaO₅クラスターは2.7 Å付近に3つのMn-Mn相互作用、3.3 Å付近に1つのMn-Mn相互作用、そして3.4 Å付近に2つから3つのMn-Ca相互作用を持つことがこれまでのEXAFSスペクトル解析からわかっている⁷⁾。つまり、4つのMn間がdi- μ -oxo(2つの酸素によるオキソ架橋)、あるいはmono- μ -oxo架橋(1つの酸素によるオキソ架橋)でつながった構造をもつ。また、Mnとリガンド(O/N)間の平均距離は1.87 Åである。EXAFS法から得られている距離情報と、結晶構造解析から得られたMn₄CaO₅クラスターの幾何学的構造³⁾、及びEPR(electron paramagnetic resonance spectroscopy, 電子スピン共鳴法)⁸⁾からのデータを照らし合わせると、S₁状態においてクラスターはFig. 1(bottom)に示すような化学構造をとるのではないかと考えられる。

Mn₄CaO₅クラスター中の原子間距離は、S状態転移に伴いその化学構造変化を反映してわずかに変化する。ここで、光合成細菌*T. elongatus*をSr環境下(Caフリー)で培養して得られるMn₄SrO₅クラスターを用いてMn及びSrのEXAFS測定を行い、クラスターの構造変化を調べた。Sr置換型のPSIIにおいても酸素発生反応は維持されることがこれまでの研究からわかっている。Fig. 2にS₀から

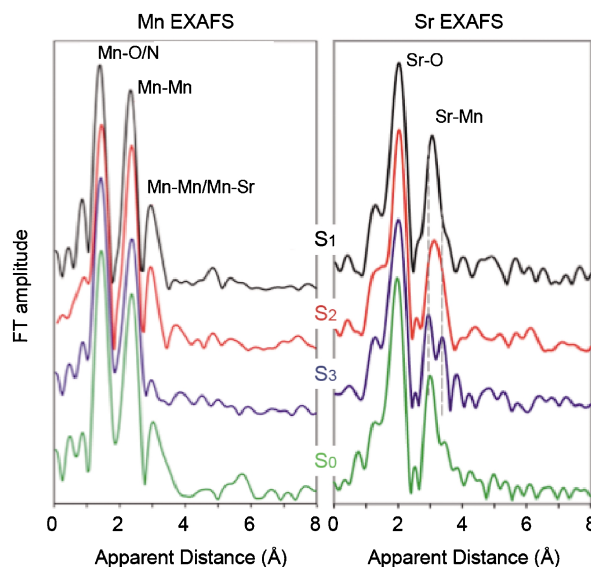


Fig. 2 (Color online) Mn and Sr EXAFS spectral changes of Sr-substituted PSII (Mn₄SrO₅)⁹⁾. For Mn EXAFS, $2.5 < k / (\text{Å}) < 11.5$ was used for Fourier Transform (k^3 -weighted). For Sr EXAFS, $2 < k / (\text{Å}) < 13.5$ was used.

らS₃状態それぞれの溶液試料から得られたMn及びSrのEXAFSスペクトルを示す⁹⁾。光駆動サイクルにおいて現れるS₀からS₃中間状態は、レーザー照射とそれに続く急冷法を組み合わせた手法でとらえることができる。

S₁からS₂状態への転移に際してはクラスターの顕著な構造はみられない。一方、S₂からS₃状態への転移においてEXAFSスペクトルは変化し、Mn-Mn間の平均距離は2.7 Åから2.8 Åになる。同様のスペクトル変化がSr-EXAFSデータからも得られており、S₂からS₃状態における構造変化はおそらくMn₄Sr(/Ca)O₅クラスター全体の構造変化を伴うであろうと考えられる。酸素発生錯体からCaを取り除くとS₂からS₃状態への転移が阻害されることがわかっているが、この結果はS₂→S₃状態転移においてCaが構造的に重要な役割を果たすことを意味している。最も還元型のS₀状態では、Mnとリガンド、Mn-Mn間の距離ともにS₁状態と比較すると長くなっており、おそらくS₀中に存在するであろう3つの3価MnのJahn-Teller効果の影響によるものと考えられる。

一方、S₃状態から酸素を放出してS₀状態へ戻る過程で現れる準安定な中間体(S₄状態)は、他のS中間状態のようにレーザー照射と続く急冷法によってはとらえることができないため、その物理化学的性質に関してはこれまでのところほとんどわかっていない。

3. 偏光 XAS 法

前項では、PSI I 溶液試料を用いた EXAFS スペクトルの結果を示したが、加えて PSII の 2 次元配向膜や単結晶などの配向試料の偏光 EXAFS 測定を行うことで原子間相互作用の配向性を知ることができる。放射光 X 線は線偏光特性があるため、入射 X 線の電磁波ベクトル (e) に対して結晶の方位を変えることにより、結晶方位に依存した偏光スペクトルが得られる。偏光 EXAFS スペクトルの吸収断面積 (σ) は次の式で表すことができる。

$$\sigma \propto c \sum |\langle \phi_f | e \cdot \mathbf{r} | \phi_i \rangle|^2 = c \sum \cos^2 \theta |\langle \phi_f | \mathbf{r} | \phi_i \rangle|^2$$

ここで、 c は定数、 ϕ_f と ϕ_i は始状態と終状態の波動関数、 e は入射 X 線電磁波ベクトル方向の単位ベクトル、 \mathbf{r} は遷移モーメント演算子、 θ は e と \mathbf{r} 間の角度である。EXAFS スペクトルの強度は、それを構成する分子間相互

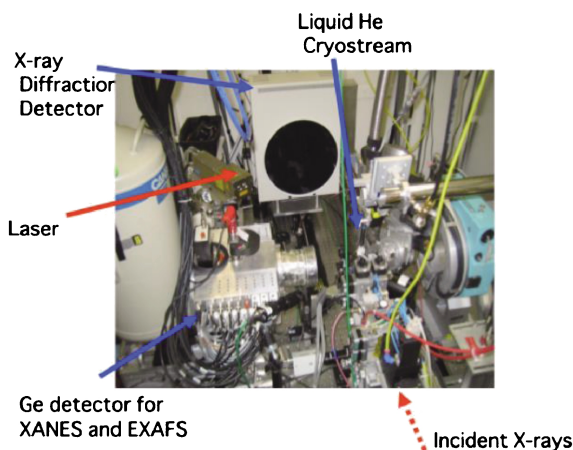


Fig. 3 (Color online) Single crystal XAS setup at Stanford Synchrotron Radiation Lightsource, BL 9-3.

作用ベクトル (\mathbf{r}) の結晶中での配向と入射 X 線電磁波ベクトル (e) のなす角度 θ に $\cos^2 \theta$ の関係で依存する。従って、結晶の方位を変えて偏光スペクトルを測定することによって、結晶中、さらには分子中での特定の相互作用の配向方向を決定することができる。さらに、溶液試料のスペクトルでは方向的に平均化されて分離不可能であった成分をその方向依存性によって分離することが可能である¹⁰⁾。

スタンフォード放射光施設 BL9-3 の単結晶用 XAS 装置を Fig. 3 に示す。銅パーゴニオメーターに取り付けられた単結晶は、液体ヘリウム吹き付け装置によっておよそ 10 K に保持される。下流側に設置した X 線回折用検出器を用いて測定した回折パターンから各結晶の方位を知ることができる。回折パターンをもとに目的の結晶方位を決定後、XAS 用検出器 (Ge 検出器) によって XAS スペクトルの測定を行う。

Fig. 4 に、PSII 結晶の各 unit cell 軸方向の偏光 EXAFS スペクトルを示す¹¹⁾。PSII の結晶格子空間群は $P2_12_12_1$ であり、結晶格子中に 4 つの PSII ダイマーを含む。つまり、図に示した偏光スペクトルは、8 つの PSII モノマーの寄与を含む。得られる偏光特性から、PSII タンパク質中での Mn_4CaO_5 クラスターのおおよその配向方向に関する情報を推定することができる。つまり、単結晶を用いた EXAFS スペクトルの偏光特性は、可能なモデル構造を絞り込むのに非常に有効である。

また、溶液試料と同様の方法 (レーザー照射と続く急冷法) を用いることによって、PSII 結晶中においても S 状態変化を誘起することが可能であり、構造変化の方向性に関する情報を得ることができる。

4. リガンドの化学構造変化

Mn_4CaO_5 クラスターのリガンドは、架橋酸素とカルボ

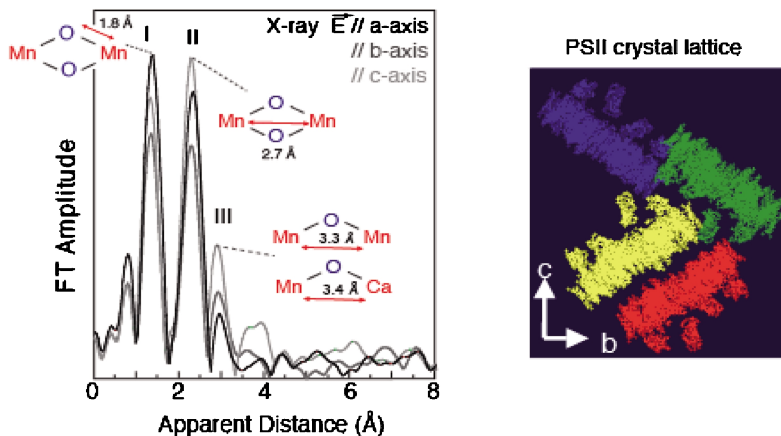


Fig. 4 (Color online) Single crystal EXAFS spectra of the PSII S_1 state, which was collected along the crystal unit cell axes.

キシル基に由来する末端酸素、基質水分子の酸素原子、及びヒスチジル基に由来する窒素原子が一つ存在する¹²⁾。分解能1.9 Åの結晶構造において、Mnに対して5つのカルボキシル基は二配座 (bidentate)、1つのカルボキシル基は単座配位 (monodentate) している。また、4つの水分子のうち2分子が末端のMn、残りがCaに配位している³⁾。

S中間体の転移過程では、脱プロトン化状態も含めたりガンド環境の変化がおこると考えられる。例えば、酸素発生錯体の脱プロトン化は、 $1(S_0 \rightarrow S_1) : 0(S_1 \rightarrow S_2) : 1(S_2 \rightarrow S_3) : 2(S_3 \rightarrow S_0)$ の割合でおこることが様々な実験結果によって支持されている¹³⁾。また、 Mn_4CaO_5 クラスターが水分子をどの段階でどの位置に取り込むか、ということは水分解反応を理解する上で非常に重要な課題である。しかし、タンパク質中でおこるリガンドのような軽元素の構造変化をとらえるのはタンパク質中に多く存在する他の軽元素からのシグナルが大きなバックグラウンドになるため非常に困難である。1つの間接的手法として、特定アミノ酸残基の変異体を用いてそれぞれのリガンドの役割を解明する方法が挙げられる¹⁴⁾。Fig. 5にヒスチジン残基をグルタミン酸基に置換したPSII変異株 (His332Glu) の暗状態 (S_1) のEXAFSスペクトルを示す。野生株の S_1 状態と変異株間のスペクトル変化から、1つのアミノ酸残基の置換によって Mn_4CaO_5 クラスターの構造が大きく変化したことがわかる。Mnとリガンド、及びMn-Mn距離2.7 Åに相当するピークがシフトしており、それらの原子間相互作用が長くなっている (Mnとリガンド: 1.87 Å → 1.89 Å, Mn-Mn: 2.72 Å → 2.77 Å) ことを示している。つまり、PSIIにおいて、 Mn_4CaO_5 クラスター周囲のリガンド環境が構造とその水分解反応機構に大きく寄与していることを示唆する。Mn-Mn間の距離が0.05 Å程度長くなる理由としては、例えば架橋酸素のプロトン化、あるいは二配座であったカルボキシル基が単配座になるような化学変化が考えられる。

リガンド環境を知るもう一つの方法として、最高被占軌道 (Valence orbitals) からMnの1s軌道への電子の遷移に相当する蛍光線 ($K\beta_{2,5}$ と $K\beta'$ ピーク) を用いるX線発光法がある¹⁵⁾。1s軌道上の電子が励起、あるいはイオン化された後の緩和過程においておこる発光X線のうち、 $K\beta_{2,5}$ スペクトルとそのサテライトピークである $K\beta'$ スペクトルは最高被占軌道からMnの1s軌道への遷移に相当する。 $K\beta_{2,5}$ スペクトルが主にリガンドの2p軌道からの遷移であるのに対して、 $K\beta'$ スペクトルはリガンドの2s軌道からMnの1s軌道への遷移に由来する。したがって、これらのスペクトルのエネルギー位置と強度は金属に直接結合したリガンドの種類 (N, O, Cなど)、そのプロトン化状態、金属原子-リガンド間の結合強度などに依存することがわかっている^{15,16)}。Fig. 6にPSIIの S_1 状態及びMnモデル化合物の $K\beta'$ スペクトルを示す。

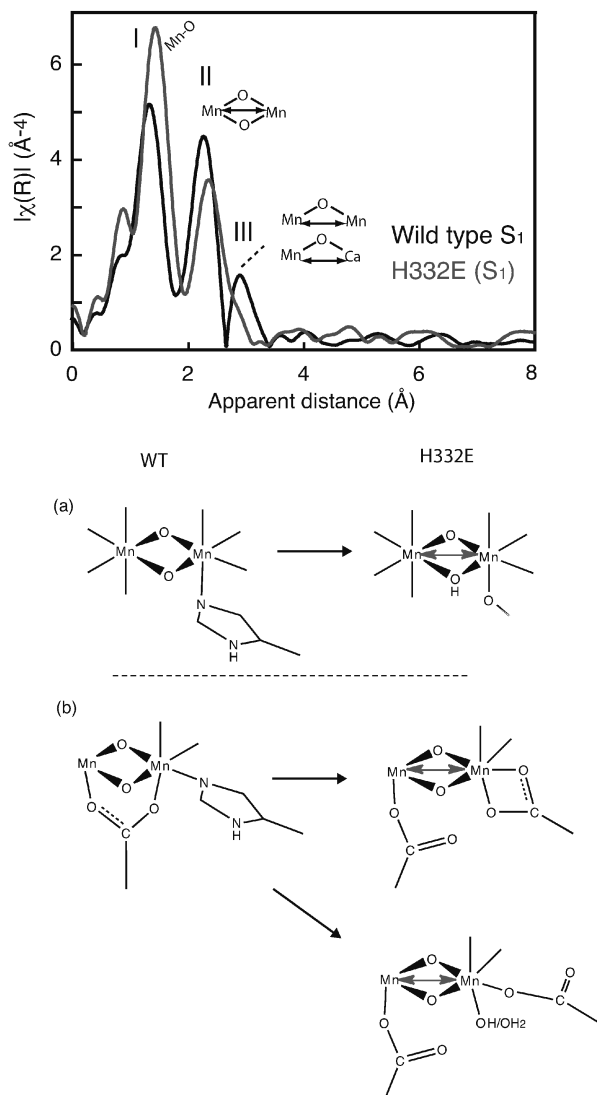


Fig. 5 (top) Mn EXAFS spectra of native PSII S_1 state (black) and His332Glu mutant in the dark (S_1) state (gray). (bottom) (a, b) possible structural changes caused by the histidine to glutamate mutation¹⁴⁾.

PSIIにおいて、例えば Mn_4CaO_5 クラスター中のオキソ架橋のプロトン化状態が変化する場合、それは $K\beta_{2,5}$ および $K\beta'$ スペクトルの形状に影響を及ぼすことが期待される¹⁷⁾。ただし本実験では、非常に弱い $K\beta_{2,5}$ および $K\beta'$ スペクトルを希薄な (Mn: ~1 mM) タンパク質の系でいかにして効率よく測定するか、ということが問題となる。今後デッドタイムを短くすることや分光器の立体角をあげる努力などが必要である。

5. 今後の展望-XFELの応用

上記の項で述べたとおり、PSIIの S_0 , S_1 , S_2 , 及び S_3 状態のような比較的安定な中間状態は、急冷法でとらえることが可能であり、さまざまな分光手法を用いて液体ヘリ

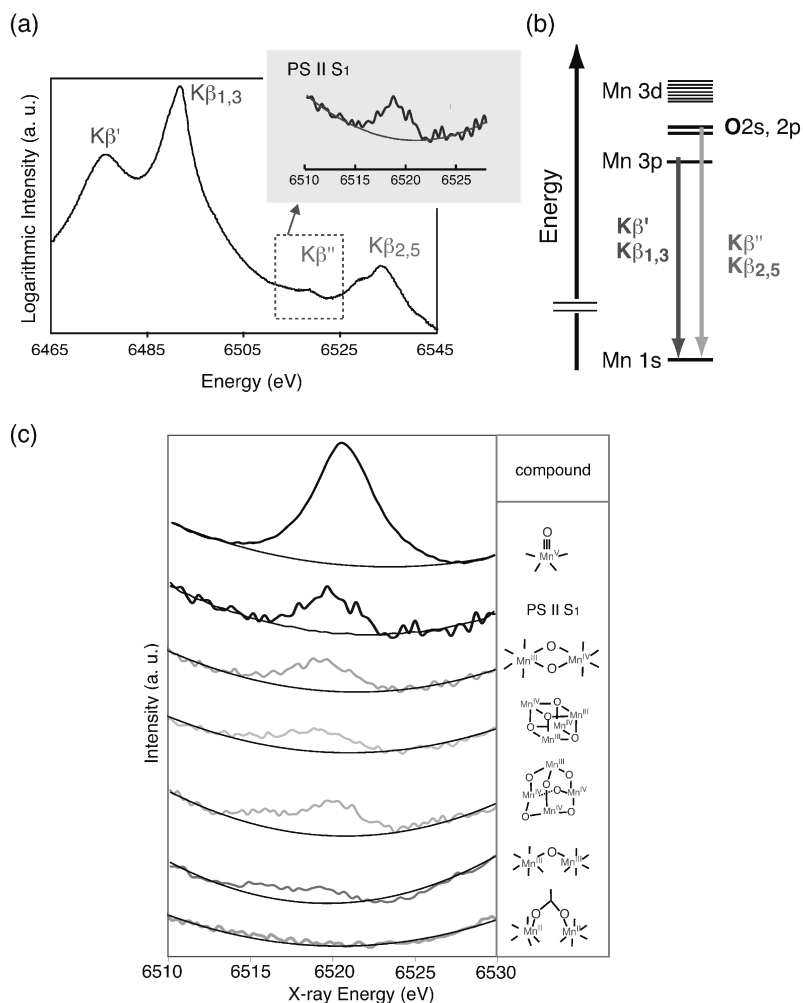


Fig. 6 (a) Logarithmic plot of the MnO $K\beta$ spectrum. The O-Mn cross-over $K\beta''$ transition is highlighted. (b) Energy diagram of Mn $K\beta$ transitions in MnO. The $K\beta'$ and $K\beta_{2,5}$ transitions are from valence molecular orbitals; $K\beta''$ is the O 2s to Mn 1s 'cross-over' transition. (c) The $K\beta''$ emission spectra from a series of multinuclear Mn complexes with oxo-bridging groups, a Mn^v-oxo complex and PS II in the S₁ state. The crossover peak from the O ligand is prominent when short bridging Mn-O distances are present¹⁷⁾.

ウムや液体窒素温度下でスペクトル測定することができる。一方で、S₄状態のような不安定な中間状態はこれまでのところ同様の方法ではとらえることができていない。そのような中間体に関しては、室温で時間分解測定を行い、反応を経時的に追う手法が適していると考えられる。その際、タンパク質試料のX線を用いた手法で問題となるのは、ヒドロキシラジカルの拡散（～ピコ秒）による試料のX線損傷である。こういった系においては、最近利用可能になったX線自由電子レーザーが威力を発揮する。X線自由電子レーザーを用いた実験では、非常に短いパルス幅（～50フェムト秒）のX線（～10¹² photons/pulse）を用いて測定を行う。パルス幅がラジカルの拡散速度よりも短いため、室温においてもX線損傷のないデータを得ることができる。

我々のグループでは、X線自由電子レーザー施設においてミクロンサイズのPSII単結晶のX線回折法とX線

発光法の同時測定を試みている（Fig. 7）^{18,19)}。X線回折パターンからは結晶構造に関する情報が、そして同時にX線発光スペクトルからはクラスターの電荷状態や化学構造変化に関する情報を得ることができる¹⁹⁾。これまでの実験結果から、室温においてもPSII S₁単結晶の構造データが得られること、そして強度の強いX線自由電子レーザーを用いても放射光源から得られるような通常のX線発光スペクトルが得られることを確認している²⁰⁾。従って、X線自由電子レーザーを用いた研究は、酸素発生反応中間体の物性解明のみならず、生体試料一般の室温におけるX線構造解析やX線分光法に有効な手法として今後ますます用いられることが期待される。

謝辞

本研究はDOE（Director, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, Contract: DE-AC02-05CH11231）,

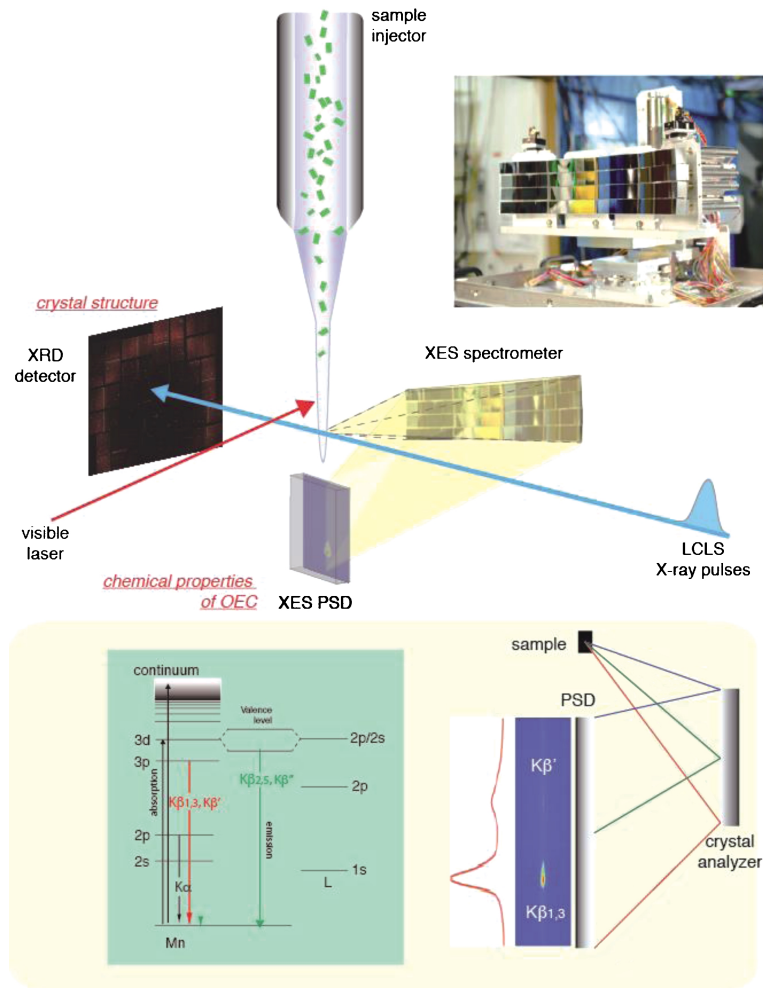


Fig. 7 (Color online) (Top) The setup for the simultaneous XRD/XES experiment at LCLS (Linac Coherent Light Source, Stanford). The injector delivers the crystals/solutions to the interaction region of the optical laser pump and X-ray laser probe. The XRD detector is downstream, and the XES spectrometer and position sensitive detector (PSD) at 90 degrees to the X-ray beam. The inset (top right) is the energy-dispersive XES spectrometer with 16 analyzer crystals⁵⁾. Bottom panels (left) show the energy level diagram for $K\alpha$ emission lines, (right) shows the energy dispersive scheme for collecting the entire spectrum in a shot-by-shot mode on the PSD.

NIH (National Institute of Health, GM 55302) によって支援されている。共同研究者である Drs. Vittal K. Yachandra, Jan Kern, Rosalie Tran, Roberto Alonso Mori, Uwe Bergmann に感謝する。放射光施設は Stanford Synchrotron Radiation Lightsource (SSRL) を利用し、本研究はその共同利用実験課題として行われている。

参考文献

- 1) T. Wydrzynski and S. Satoh: in *Advances in Photosynthesis and Respiration* (Ed.: Govindjee), Springer, Dordrecht, **2005**.
- 2) B. Kok, B. Forbush and M. McGloin: *Photochem. Photobiol.* **11**, 457–475 (1970).
- 3) Y. Umena et al.: *Nature* **473**, 55–60 (2011).
- 4) A. Guskov et al.: *Nat Struct Mol Biol* **16**, 334–342 (2009).
- 5) K. N. Ferreira et al.: *Science* **303**, 1831–1838 (2004).
- 6) J. Yano et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **102**, 12047–12052 (2005).
- 7) J. Yano and V. K. Yachandra: *Inorganic Chemistry* **47**, 1711–1726 (2008).
- 8) W. Ames et al.: *J Am Chem Soc* **133**, 19743–19757 (2011).
- 9) Y. Pushkar et al.: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 1879–1884 (2008).
- 10) J. Yano et al.: *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 12989–13000 (2007).
- 11) J. Yano et al.: *Science* **314**, 821–825 (2006).
- 12) R. J. Debus: *Coord Chem Rev* **252**, 244–258 (2008).
- 13) H. Suzuki, M. Sugiura and T. Noguchi: *J Am Chem Soc* **131**, 7849–7857 (2009).
- 14) J. Yano et al.: *J. Biol. Chem.* **286**, 9257–9267 (2011).
- 15) P. Glatzel and U. Bergmann: *Coordination Chemistry Reviews* **249**, 65–95 (2005).
- 16) G. Smolentsev et al.: *J Am Chem Soc* **131**, 13161–13167 (2009).
- 17) Y. Pushkar et al.: *Angewandte Chemie-International Edition*

- 49, 800–803 (2010).
- 18) J. Kern et al.: Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**, 9721–9726 (2012).
 - 19) R. Alonso-Mori et al.: Review of Scientific Instruments **83**, 073114 (2012).
 - 20) R. Alonso-Mori et al.: Proceedings of the National Academy of Sciences **109**, 19103–19107 (2012).

著者紹介



矢野淳子

Lawrence Berkeley National Laboratory,
Physical Biosciences Division, Staff
Scientist

E-mail: JYano@lbl.gov

専門：放射線科学，振動分光，生物物理化学

【略歴】

広島大学生物圏科学研究科博士課程前期修了，広島大学生物生産学部助手，大阪大学理学部高分子学科論文博士（理学），Golda Meir Research Fellow, Lawrence Berkeley National Laboratory 研究員を経て現職。

X-ray spectroscopy study of the oxygen-evolving complex in Photosystem II

Junko YANO Physical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory
1 Cyclotron Road, MS: 66R0200 Berkeley, CA 94720 USA

Abstract Oxygen, that supports all aerobic life, is abundant in the atmosphere because of its constant regeneration by photosynthetic water oxidation, which is catalyzed by a Mn_4CaO_5 cluster in Photosystem II (PS II), a multi subunit membrane protein complex. The structure of PS II and the catalytic intermediate states have been studied intensively over the past several years and various X-ray spectroscopy techniques have provided useful information about the structure and electronic structure of the Mn_4CaO_5 cluster. This topic describes a brief review of the various X-ray spectroscopic techniques that are critical for understanding of the Mn_4CaO_5 cluster, and also mentions future direction using X-ray Free Electron Laser facilities that can be used for following the reaction in real time at room temperature using crystallography and X-ray spectroscopy.