

光合成の酸素発生触媒反応を高速時間領域で観測する

菅 倫寛
Suga Michihiro

沈 建仁
Jian-Ren Shen

1. はじめに

植物や藻類は光のエネルギーを利用して、水分子と大気中の二酸化炭素から炭水化物を合成し、その副産物として酸素分子を放出する。この過程は光合成と呼ばれ、多くのタンパク質が協調して織りなす酵素反応によるものである。光合成の発端は光化学系 II (Photosystem II, PSII) による水分解・酸素発生反応である。PSII は光のエネルギーを吸収して利用し、水分子からプロトンと電子を取り出し、酸素分子を大気に放出する反応を触媒する。



この反応は水分解・酸素発生反応と呼ばれ、以下の順序で起きる。始めに PSII の特殊なクロロフィル P680 が光エネルギーを吸収して ps (10^{-12} s) から ns (10^{-9} s) の時間内に電荷分離反応を起こし、これにより放出された電子はタンパク質に結合したプラストキノンである Q_A まで移動する。続いて、P680 に生じた正孔を中性に戻すためにラジカル活性のある特殊なチロシン残基 Y161 (Y_Z) が ns から μs (10^{-6} s) の時間内に P680 に電子を供与する。続いて Y_Z は中性に戻るため、マンガククラスターから μs から ms (10^{-3} s) の時間内に電子を引き抜く (図 1a)。水を分解する触媒の実体であるマンガククラスターは電荷分離反応が起こる度に酸化数が上昇する。これは、 S_i 状態 ($i=0\sim 4$) と呼ばれ、 S_4 状態に到達するとマンガククラスターは水分子を酸素分子へと酸化し、マンガククラスターの酸化数が S_0 状態に戻る (図 1b)。一方、電子受容体側ではキノン Q_A に移動した電

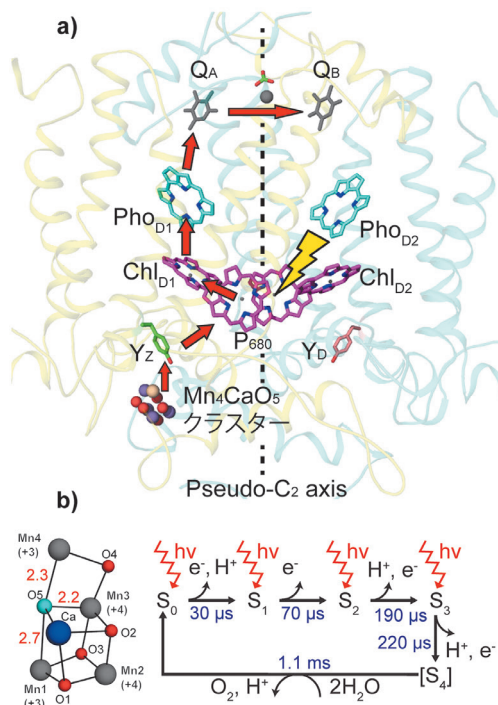


図 1 PSII の全体構造と水分解・酸素発生反応

a) 光エネルギー吸収と電荷分離反応後にはたらく電子伝達鎖, b) ゆがんだイス型のマンガククラスターと S_i -状態遷移サイクル。 S_1 状態のマンガククラスターについて Mn の価数を原子名の後に示し、O5 と周囲の Mn イオンとの距離 (Å) を赤字で示している

子は ms のうちにキノン Q_B へ到達し、二電子還元を経てキノンプールのプラストキノンと交換される。PSII は、可視光によって水から電子とプロトンを取り出すことのできる天然に存在する唯一の酵素である。このため、反応機構の解明は光エネルギーと水から電子と化学エネルギーを取り出して有用な化学物質に変換する、人工光合成触媒の開発に役立つとして注目されている。

2. ゆがんだイス型のマンガンクラスター触媒

水を酸化する実体である PSII のマンガンクラスターの光未照射状態 (S_1 状態) の構造は、放射光 X 線や X 線自由電子レーザー (X-ray free electron laser, XFEL) を用いて解析され、4 つのマンガン原子と 1 つのカルシウム原子と 5 つの酸素原子からなる“ゆがんだイス型”の構造をしていることが明らかになっている (図 1b)^{1,2)}。ここで 3 つの Mn イオン、1 つの Ca イオンと 4 つの酸素原子は椅子の座部を形成し、もう 1 つの Mn イオンと酸素原子は椅子の背もたれに相当する部分に位置し、キューバン型の椅子の座部と背もたれは 2 つのオキソ酸素でつながっている。この“ゆがんだイス型”の構造は触媒の機能に関連しており、触媒を構成する原子間の距離とその配位環境に注目すると興味深い特徴が見えてくる。マンガンクラスター中の酸素原子の 1 つである O5 は周囲の Mn1, Mn3, Mn4, Ca との結合距離が長くて特徴的である。具体的には、Mn3-O5 が 2.2 Å, Mn4-O5 が 2.3 Å, Mn1-O5 が 2.7 Å, Ca-O5 が 2.5 Å であり (1 Å は 10^{-10} m)、他の酸素 (O1 ~ O4) と Mn の結合距離 (1.8 ~ 2.1 Å) に比べて著しく長い (図 1b)。これは O5 の結合が弱く、反応性が高いことを示唆しており、O5 が反応の基質となる反応機構の可能性を示唆するものである。マンガンクラスターは 6 つのカルボキシ基 (D170, E189, E333, D342, A344 のカルボキシ末端、そして CP43 タンパク質サブユニットの E354) と 1 つの His 残基 (H332) が配位しており、それら以外に Ca と Mn4 には水分子がそれぞれ 2 つずつ配位している。配位子のカルボキシ基のほとんどは二座配位子であるが、唯一の例外として Mn1 に配位する E189 は単座配位子であり、この E189 の配位は後述する水分子の取り込みにおいて重要である。これらの配位子によってマンガンクラスターを構成する 4 つの Mn はいずれも六配位構造となっており、平均の配位距離は Mn1 が 2.1 Å, Mn2 が 2.0 Å, Mn3 が 2.0 Å, Mn4 が 2.1 Å である。Mn1 と Mn4 の平均配位距離は Mn2 と Mn3 よりも少し長くなっており、これは Jahn-Teller 効果と呼ばれる Mn^{+3} イオンに特徴的な配位子のゆがみによる。このことより、 S_1 状態の 4 つの Mn イオンの価数は (Mn1, Mn2, Mn3, Mn4) = (+3, +4, +4, +3) と推定されている (図 1b)。

この S_1 状態の構造は、“ゆがんだ椅子型”構造を構成する Mn イオンの価数や各原子間の正確な距離を与えるが、それだけからは水分解・酸素発生反応を説明することはできない。このため、 S_1 状態の立体構造及び関連した理論計算や分光学的知見等から様々な可能性が議論されていた。特に Mn1 と Mn4 の間に存在する酸素原子 O5 は周囲の Mn イオンとの結合距離が他の酸素原子と比べて長く、ゆえに反応性に富む環境にあると推定されることから、O5 が酸素分子の基質の 1 つとなる反応機構が提唱されていたが、そのような反応機構が存在するのかが不明であった。仮に存在したとしても O5 周辺には酸素分子形成に必要なもう 1 つの基質水分子を許容できる空間がないため、 S_1 状態の立体構造からは反応機構をうまく説明できなかった。したがって、水分解反応の機構解明には、光照射による S_1 状態の中間体の構造、特に酸素分子が放出する直前の構造を解明する必要があった。

3. PSII の反応中間体 S_3 状態の立体構造

筆者らは反応機構の中間体状態を捉えるため、100 μ m サイズの微小な PSII の結晶を可視レーザー光で励起して反応を開始させて、その際の構造変化を XFEL で追跡した。光励起していない S_1 状態の結晶と、2 回閃光照射して 10 ms 後の、 S_3 状態に励起された結晶を用いてそれぞれの構造を 2.35 Å の分解能で決定した³⁾。2 回の閃光照射により励起した結晶はフーリエ変換赤外分光法により約半分の PSII が S_3 状態を占めていることが確認され、観測された構造には水分子分解の直前の状態が含まれていると考えられた。 S_3 状態にある PSII の全体構造を見てみると S_1 状態とほとんど同じであるが、両者の回折データから計算した差の電子密度図に注目すると、 S_3 状態の遷移による構造変化がマンガンクラスターの周囲に局在していた。このことは、期待したとおりに光励起による S_3 状態への遷移が起こり、その結果、マンガンクラスターで起きた構造変化を観察することに成功したことを示している。

フーリエ差電子密度図及びそれぞれの立体構造を比較すると以下の 4 つの顕著な構造変化がマンガンクラスターとその周囲に見られた (図 2)。1) Mn4 がわずかにマンガンクラスターから離れるよう外側

に動き、Mn4 と Mn1 との距離は 0.1~0.2 Å 長くなった。2) マンガンクラスターを構成する Ca イオンが Mn4 から離れるように動いた。3) E189 がマンガンクラスターから遠ざかり、O5 と Mn1 の間に水分子を 1 つ収容できるスペースが現れた。4) O5 の近くに新たに水分子 1 個分に相当する O6 の電子密度が現れた。興味深いことに、新しく見つかった酸素 O6 (図 2) は、基質の候補として注目していた O5 から 1.5~2.0 Å 程度の位置に挿入されていた。これは O-O 結合を作るのに適した位置であり、O5 と O6 が酸素分子の基質であることを強く印象付けるものであった。また、E189 はマンガンクラスターを構成する配位子のうち、単座配位子を持つ唯一のカルボキシ基であるため、この大きな構造変化を許容することができる。しかし、このことを S₁ 状態の構造から予想することはできなかったため、中間体の構造は反応機構の理解に不可欠であったと言えるだろう。

その後、筆者らは工夫を重ね、サンプルループに塗布した PSII の結晶に大きな径のレーザー光を照

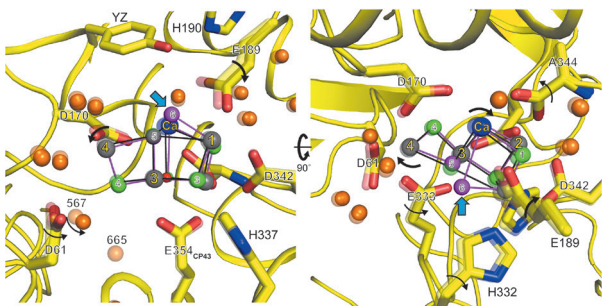


図 2 S₁ と S₃ 状態におけるマンガンクラスター付近の構造変化
S₁ 状態を半透明で、S₃ 状態を通常色で示した。O6 が挿入された箇所を青矢印で示した

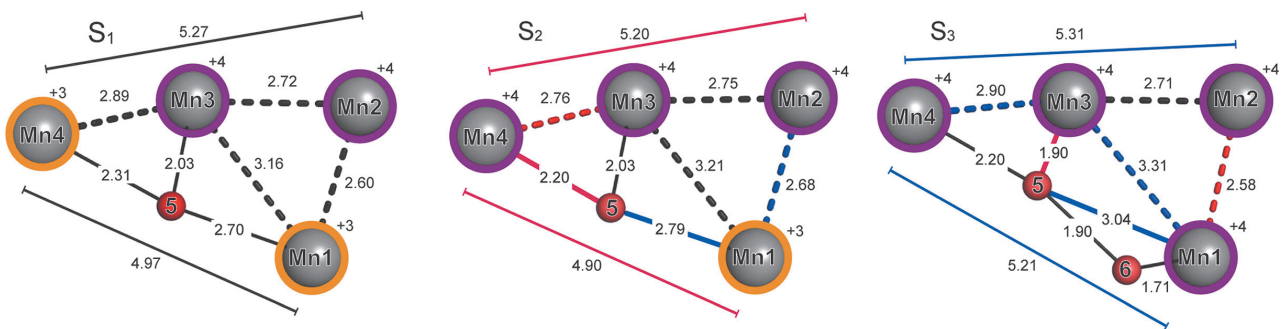


図 3 S₁, S₂, S₃ 状態におけるマンガンクラスターの構造

Mn イオンと O5 及び O6 の距離 (Å) を数字で示している。S 状態遷移後に原子間の距離が長くなるものは青色、短くなるものは赤色、変化の小さいものは黒色で表した

射して S₁ 状態に遷移させた後、速やかに凍結することで反応中間体を捕捉して S₁, S₂, S₃ 状態を 2.15 Å 分解能で構造解析した⁴⁾。構造解析の分解能が向上した結果、S₁ 状態遷移に伴うマンガンクラスター中の Mn-Mn 距離のわずかな変化が検出され、反応機構の理解が進展した (図 3)。具体的には Mn4 が S₁ → S₂ 状態遷移で酸化されて +4 になり、Mn4 に O5 が引き寄せられることで Mn1 と O5 の距離は少し長くなり、O6 の挿入が促進されることが判明した (図 3)。また、S₃ 状態の O5 と O6 の距離が 1.9 Å であることから化学構造はオキソ/オキシルであり、スーパーオキサイドやパーオキサイド等の他の化学構造の可能性は排除される (図 3)。このことより酸素分子は O5 と O6 の両者のラジカルカップリング機構により生成することが示唆された。更に、S₂ 状態と S₃ 状態での PSII の全体構造を比較すると、マンガンクラスターを構成する酸素原子の 1 つである O1 から PSII の外部へつながる、O1 チャネルと呼ばれる水チャネルが開閉する構造変化が見られた⁴⁾。これは O1 チャネルが基質の水分子取り込みに働くことを示唆するものであるが、その水分子の取り込み機構は次項で解説する。

4. PSII の反応中間体 S₁ → S₂ → S₃ 状態遷移における立体構造のダイナミクス

O6 は PSII の外部からどこを通過してマンガンクラスターに到達するのか、そして、いつ、どのような仕組みによってマンガンクラスターの内部へ取り込まれるのだろうか。これに答えるため、筆者らは S₁ → S₂ 状態 (閃光 1 照射, 1F) と S₂ → S₃ 状態 (閃

光2照射, 2F) の遷移開始後 20 ns~5 ms までの6つのタイムポイントに相当する, 合計12つのタイムポイントにおける PSII の時間分割構造を 2.15~2.3 Å 分解能で解析した⁵⁾。実験では電子受容体側での Q_B キノン周囲の立体構造の変化や C11 チャンネルにおけるプロトン排出に関連した構造変化も明らかにしたが⁵⁾, 本稿では電子供与側とマンガクラスタ周囲の構造変化に焦点を当てる。1F 照射後の S₁→S₂ 状態遷移では 200 ns には光照射後の電荷分離反応を反映し, PSII 反応中心 P680 のクロロフィル *a* 分子にある Mg イオンにフーリエ差電子密度図の正のシグナルが観察された (図4: 200 ns 青丸)。これに伴い, マングクラスタから Y_Z を介し P680 の P_{D1} に電子が供与された。Y_Z から P680 への電子供与のため, Y_Z と P680 の間に位置する F186 は, Y_Z 及び Q165 と共に P680 側に移動した (図4: 200 ns~1 μs)。S₁ 状態で Y_Z と短い低障壁水素結合を形成している H190 は, 一過的に Y_Z から離れて典型的な水素結合を形成した (図4: 1~30 μs)。これらの一過的な構造変化は時間の経過と共に徐々に消失し, 電子供与後に元の状態に戻った (図4: 5 ms)。

PSII の内部にはチラコイド膜のルーメン側からマンガクラスタに至る, 多くの水素結合で形成された水のチャンネルが存在する。このうち, O1 チャンネルはマンガクラスタを構成する酸素原子の1つである O1 から PSII の外部へつながる, 口径の広いチャンネルである。O1 チャンネルに存在する水分子は高い流動性を持ち, 基質の水分子の取り込みに働く可能性がある。この解析から O1 チャンネルにおいてマンガクラスタの近傍の5つの水分子から構成されるダイヤモンド型の水クラスタを中心に構造変化が見つかった (図5)。S₁→S₂ 状態遷移では 0.2~200 μs の間では水分子クラスタは不安定となって揺らいだが, 5 ms までに揺らぎは終息した。また P680 への電子供与に伴い, 200 ns ではマンガクラスタの Mn1 と Mn3 の電子密度が増加したが, 閃光照射 5 ms 後に S₂ 状態が形成されると, Mn1 と Mn3 は元に戻り, 代わりに Mn4 がわずかに位置を変え Mn4 から P680 への電子供与の安定化に順応した。この時点で, O4 チャンネルの水素結合ネットワークに関与する水分子 W16 が不安定になり, W10 が大きく移動した (図5a)。

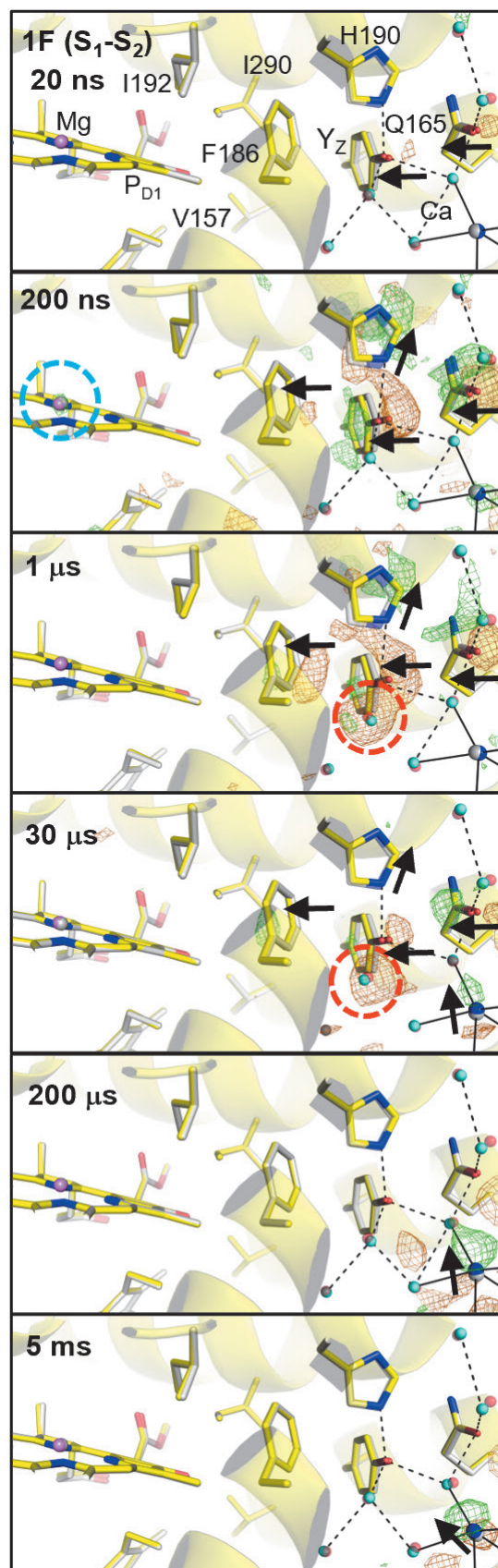


図4 閃光1照射後 (S₁→S₂ 状態遷移) の P680-Y_Z-マンガクラスタの近傍の構造ダイナミクス

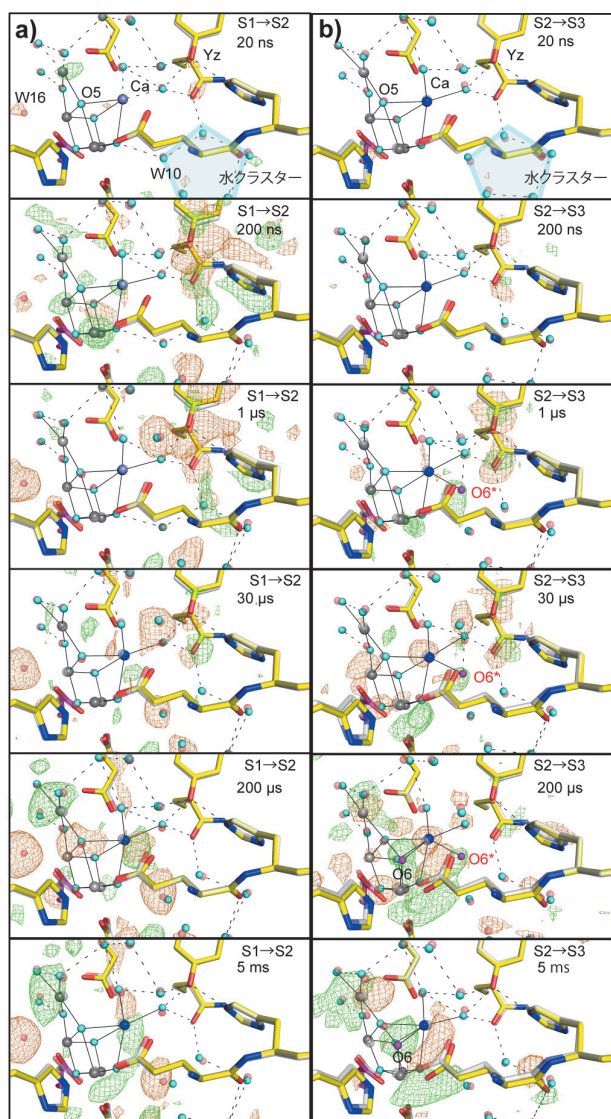


図5 S_i 状態遷移でのマンガンクラスター及びその周辺の構造ダイナミクス

a) S₁ → S₂ 状態遷移での構造変化
 b) S₂ → S₃ 状態遷移での構造変化

これに対し、S₂→S₃ 状態遷移では 200 ns までの構造はほとんど変化しなかったが、1 μs になるとマンガンクラスターを構成する Ca イオンから 2.2 Å の距離に新たな水分子（あるいは水酸化物イオン）O6* が結合した。O6* は 200 μs までは Ca イオンに結合しているが 5 ms には存在しなくなり、その一方で O6 は 30 μs から出現し、5 ms で最大となった（図 5b）。この O6* と O6 の出現するタイミングと位置関係から、O6* は O6 の前駆体であり、水分子がマンガンクラスターの内部に O6 として取り込まれる前に一時的に結合した状態である可能性がある。そして O6* は Ca イオンとの結合距離から水分

子からプロトンを 1 つ失った水酸化物イオン (OH⁻) の状態であることが示唆される。つまり、O6* が出現する 1 μs までに水分子クラスターの 1 つの水分子からプロトンが奪われ、生成した水酸化物イオンが 1~200 μs の間に Ca イオンに結合し、その後 30 μs~5 ms の間に O6 の位置に挿入される反応機構が考えられる。興味深いことに S₂→S₃ 状態遷移では Mn1 と Mn4 は逆方向に移動し、E189 は大きく側鎖を移動させ、これらの変化が O6 の挿入するスペースを作っている。マンガンクラスターを構成する Ca イオンは、O6 が配位すると S₂ 状態の 7 配位から S₃ 状態では 8 配位に変化する。このようにタンパク質には温和な条件で触媒反応を効率的に進行させる巧妙な仕組みが幾つも備わっている。

5. おわりに

PSII の立体構造研究は、反応開始の S₁ 状態の構造からの推測に依らざるを得なかったが、反応中間体の構造情報が追加され、更に速い時間領域の構造情報が加わったことで、水分解の反応機構が明瞭になりつつある。構造変化の追跡により、タンパク質や水分子がオーケストラのように協奏的に働き、水分子の移動やプロトンの排出を進行させる仕組みが明らかになった。最近、3F 後の S₃→(S₄)→S₀ 状態遷移に伴う構造変化に関する論文⁶⁾ も発表されているが、一過的な S₄ 状態には多くの謎が残されており、今後の進展が期待される。近年は AI による高精度の立体構造予測が可能となり、立体構造を実験的に解析する意義が新たためて問われている。しかし、進行する酵素反応の全貌を捉えることは酵素の本質的な理解につながることで、また、立体構造予測は最も安定な状態を予測していることを踏まえると、構造生命科学が取り組む課題はまだ多く残されている。

参考文献

- 1) Y. Umena, *et al.*, *Nature*, **473**, 55-60 (2011)
- 2) M. Suga, *et al.*, *Nature*, **517**, 99-103 (2015)
- 3) M. Suga, *et al.*, *Nature*, **543**, 131-135 (2017)
- 4) M. Suga, *et al.*, *Science*, **366**, 334-338 (2019)
- 5) H. Li, *et al.*, *Nature*, **626**, 670-677 (2024)
- 6) A. Bhowmick, *et al.*, *Nature*, **617**, 629-636 (2023)

(岡山大学異分野基礎科学研究所)