

光化学系 II 複合体の酸素発生中心の X線吸収分光法に基づく立体構造研究 Structural analysis of oxygen-evolving complex in photosystem II based on X-ray absorption fine structure spectroscopy

梅名泰史^{1,*}, 朝倉清高², 川上恵典¹, 神谷信夫^{1,3}

¹大阪市立大学複合先端研究機構, 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

²北海道大学触媒化学研究センター, 〒001-0021 札幌市北区北 21 条西 10

³大阪市立大学大学院理学研究科, 〒558-8585 大阪市住吉区杉本 3-3-138

Yasufumi Umena^{1,*}, Kiyotaka Asakura², Keisuke Kawakami¹ and Nobuo Kamiya^{1,3}

^{1,3}3-3-138, Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka, Osaka 558-8585, Japan

²N21-W10, Kita-ku, Sapporo, Hokkaido 001-0021, Japan

1 はじめに

植物や藻類の光合成は光エネルギーによる電荷分離反応により、炭水化物の生産に必要な還元力や生体エネルギーを作り出している。この光エネルギーの変換に伴って水が分解され、酸素分子が大気に放出されている。この光エネルギーの変換と水分解・酸素発生反応は植物の葉緑体や藻類のチラコイド膜に存在する分子量 700 kDa の光化学系 II 複合体 (photosystem II; PSII)が行っている。2011 年、我々の研究グループは好熱性らん藻由来 PSII の結晶構造を 1.9 Å分解能で解析し、水分解・酸素発生の活性中心に触媒として存在する Mn_4CaO_5 クラスタ (oxygen-evolving complex; OEC)の詳細な構造を初めて明らかにした^[1]。しかし、結晶構造における Mn_4CaO_5 クラスタは X 線損傷による構造変化が起こっている可能性を X 線吸収分光法(XAS)や量子化学計算の研究グループなどから指摘されている^[2,3,4]。そのため、真の OEC の構造を解明することが、これまでブラックボックスとされていた光合成の酸素発生の原理解明に繋がるものと期待されている。しかし、1.9 Å分解能の結晶構造には 0.11 Åの原子位置の誤差があり、そのため配位構造だけでは Mn 原子の正確な価数情報も得ることができない。本研究では、結晶構造よりも原子間距離の精度が高い広域 X 線吸収微細構造解析(EXAFS)を行って OEC の金属原子間距離を精密に検証すると共に、X 線照射量に応じた X 線損傷を X 線吸収端近傍構造解析(XANES)による X 線還元の様子を調べることで、真の OEC の立体構造を明らかにすることを目指す。

2 実験

結晶化が可能な純度まで精製した PSII 二量体の試料溶液を 3 種類の塩 ($MgSO_4$, $NaCl$, $CaCl_2$) と MES 緩衝液(pH6.0), 構造安定化のための界面活性剤 0.03 % β -ドデシルマルトシドと 1 M ベタインを含む安定保存溶液に、クロロフィル換算で 8 mgChl/ml と 17 mgChl/ml まで限外ろ過法により濃縮

および溶液交換を行った。この試料の OEC 由来の Mn 原子はそれぞれ約 49 ppm と約 119 ppm 存在していると試算した。PSII 溶液試料は 10 x 20 mm の窓枠のある厚み 4 mm のアクリル板および銅板に 50 μm のカプトンフィルムで窓枠を塞いだ試料セルに封入した。常温での測定はビームライン BL-9A で行い、低温ヘリウムガス吹きつけ装置による温度 5K での測定はビームライン BL-12C にてそれぞれ行った。微量な PSII 由来の Mn 原子を測定するため、19 素子 SSD を検出器として用いた蛍光 X 線測定を行った。検出器面には Cr フィルターとソーラースリットを取り付け、散乱 X 線の寄与を減らすために周囲を鉛で十分に覆うことが必要であった。

3 結果および考察

試料濃縮法と試料セルの改良及び鉛での十分な遮蔽により有意なスペクトルが得られる測定条件が得られた。BL-9A における常温下の測定では X 線還元によりスペクトルが徐々に低エネルギー側にシフトして、およそ 30 分で約 2 eV ほどシフトしてほぼ完全に還元された状態となった(図 1A)。一方で、BL-12C における低温ヘリウムガスによる 5K の低温下の測定では、1 時間の連続測定でもスペクトルの大きなシフトが見られず、強度の弱い OEC からのシグナルを積算することが可能であった(図 1B)。

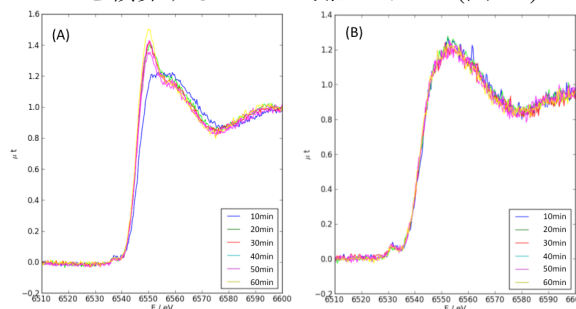


図 1. PSII 溶液試料の(A)常温下での測定と(B)低温ヘリウムガス吹きつけ装置による温度 5K での OEC 由来 Mn 原子の XANES 測定

4 まとめ

これまで PSII を対象とした XAS 測定は海外のグループで先行研究が行われている。しかし、当研究グループでは結晶化が可能な高純度な好熱性らん藻由来の PSII 試料と様々な PSII の結晶構造解析と連携した構造研究を行っている。今回、初めて有意な蛍光 X 線測定のスเปクトルデータが得られ、今後の実験に必要な測定条件が構築されつつある。特に、測定温度を 5K の極低温下に保つことで、X 線還元を抑えることが確認され、積算測定による EXAFS の構造解析が可能な測定を今後行うことができるものと期待される。

参考文献

- [1] Y.Umena, K.Kawakami, J.R. Shen, N.Kamiya *Nature*, **473**, 55-60, (2011)
- [2] J.Yano, et al., *PNAS*, **102**, 12047-12052, (2005)
- [3] A.Galstyan, et al., *J.Am.Chem.Soc.*, **134**, 7442-7449, (2012)
- [4] H.Dau, et al., *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 88-105, (2012)

* umena@ocarina.osaka-cu.ac.jp