光合成光化学系 II における水分解・酸素発生の反応メカニズム

Mechanism of Light-Induced Water-Oxidation/Oxygen Evolution Catalyzed by Photosystem II in Photosynthesis

岡山大学異分野基礎科学研究所 沈 建仁

Research Institute for Interdisciplinary Science, Okayama University

Jian-Ren Shen

Received September 28, 2018; E-mail: shen@cc.okayama-u.ac.jp

Photosystem II (PSII) is a huge membrane-protein complex catalyzing light-induced electron transfer and water oxidation reactions, leading to the conversion of light energy into chemical energy and the evolution of molecular oxygen, two products indispensable for sustaining almost all life forms on the earth. This account describes the structure of PSII with the focus on that of the catalytic center for water oxidation, a Mn_4CaO_5 -cluster embedded in the protein matrix of PSII, revealed by conventional high-resolution X-ray crystallography and femtosecond X-ray free electron laser (XFEL) crystallography. Latest results on the structural changes of the Mn_4CaO_5 -cluster during the water oxidation reaction cycle obtained by the femtosecond XFEL crystallography are also described. Based on these results as well as those obtained with other approaches, the mechanism of water oxidation and oxygen evolution is discussed. Other functions of PSII such as proton release pathways and light energy absorption and transfer are also discussed briefly.

■ ■ 1. はじめに

各種藻類や植物が行う光合成は、太陽の光エネルギーを利用して水と二酸化炭素から有機物を合成し、同時に酸素を放出する過程である。これによって作られる有機物は、他の様々な生物の生存に必要なエネルギーを供給し、また、分子状酸素は、誕生直後およびその後 15 億年以上にわたって嫌氣的であった地球大気を酸化的なものに変換し、酸素呼吸を行う生物の出現と進化を可能にした。さらに我々が現在利用している化石エネルギーも、太古の昔光合成生物が作った有機物が蓄積し、腐敗して変換されたものである。したがって、光合成は地球上の生命活動や大気環境の維持に極めて重要な役割を持っている。

光合成は多くの反応ステップを含む複雑な過程であり、大きく分けて光を必要とする「明反応」と、光を必要としない「暗反応」がある。「明反応」は主にシアノバクテリア細胞や真核藻類、植物の葉緑体内にあるチラコイド膜と呼ばれる生体膜で行われ、膜上に存在する様々な色素—タンパク質複合体が光エネルギーの吸収・

伝達を行い、それによって一連の電子伝達反応が誘導され、ATP 合成反応が行われるようになる。暗反応は、電子伝達・ATP 合成反応によってもたらされた高エネルギー化合物 ATP や還元力を利用して、シアノバクテリアの細胞質内あるいは真核生物の葉緑体のストロマで、一連の酵素によって二酸化炭素を糖に変換するものである。本稿では、主に明反応のうち、光化学系 II 複合体 (Photosystem II, PSII) ¹⁻³⁾ による水分解・酸素発生反応の機構について紹介する。

Fig. 1 Membrane protein complexes located in the thylakoid membrane and involved in photosynthetic energy conversion. The shadowed region in the middle represents the membrane region.

Fig. 1 にチラコイド膜の模式図を示す。この膜には、4つの大きな膜タンパク質複合体が存在しており、それぞれ PSII、シトクロム b_6/f 複合体 (cyt b_6/f)、光化学系 I (PSI)、および ATP 合成酵素である。太陽の光エネルギーは、生物によって種類が異なる、PSII および PSI コアに結合しているアンテナ色素タンパク質によって吸収

連絡先著者名: 沈 建仁 (しん けんじん)

連絡先: 700-8530 岡山市北区津島中 3-1-1

岡山大学異分野基礎科学研究所

Tel: 086-251-8502; Fax: 086-251-8502

Corresponding Author: Jian-Ren Shen

Address: Tsushima-naka 3-1-1, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan

Keywords: photosystem II, water oxidation, oxygen-evolving complex, photosynthesis, Mn cluster, distorted chair, O–O bond formation, X-ray crystallography, X-ray free electron laser, pump-probe experiment.

され、それぞれ PSII, PSI の反応中心色素に伝達される。PSII および PSI のコアでは、反応中心色素が受け取った光エネルギーにより励起され、励起電子がそれぞれ近傍の電子受容体に移動することで、一連の電子伝達反応が始まることになる。PSII の反応中心は P_{680} と呼ばれるクロロフィル a 分子が 4 つ集まったクラスターで、そのうちの 1 つ由来の励起電子は最初の電子受容体であるフェオフィチンに移動し、その後順にタンパク質に結合したプラストキノンである Q_A , Q_B に移動することになる¹⁻³⁾。 Q_B は 2 電子受容体であり、2 電子を受け取った後プロトン化され、還元型のプラストキノールになり、結合部位から外れるようになる。還元されたプラストキノールは膜の中を移動し、電子を $cyt\ b_6/f$ に渡す。その電子はさらに水溶性の電子キャリアであるプラストシアニンもしくはシトクロム c_6 を経て PSI に渡され、最終的にフェリドキシンを経て $NADP^+$ を $NADPH$ に還元するのに利用される。

Fig. 2 S-state transition model for the water oxidation reaction catalyzed by the oxygen-evolving complex (OEC) of PSII.

一方、酸化された PSII の反応中心 P_{680} は近傍のチロシン残基から電子を受け取り再還元され、チロシン残基は Mn_4Ca から構成されるクラスターから電子を奪い取る¹⁻³⁾。 Mn_4Ca クラスターは水分子から電子を奪い取る。そしてこの電子伝達反応が連続で 4 回行われると、2 分子の水から 4 電子が奪い取られ、水分子が分解され、一つの分子状酸素が形成されることになる。したがって、水分解反応は 4 電子反応であり、この反応の機構を説明するため、「S-状態遷移モデル」(Fig. 2) が提唱された^{4,5)}。このモデルでは、触媒は $S_0 - S_4$ の状態を取るとされ、光子が 1 つ吸収されるごとに電子が一つ奪われ、S 状態は一つ先に進むことになる。そして $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ の遷移において分子状酸素が放出される。これら S 状態のうち、 S_0 , S_1 , S_2 , S_3 は安定または準安定な状態であり、実験的に捕捉されているが、 S_4 は不安定な状態で、実験的に捕捉されていないと言ってよい。この反応モデルは、フラッシュ照射による酸素発生パターンの測定結果⁶⁾を説明するために

考案されたもので、酸素発生パターンの測定では、暗黒に適応させておいた試料に短いフラッシュを照射すると、1, 2 回目の照射では酸素がほとんど観測されないが、3 回目の照射で酸素発生の大きいピークが観測された。以降 4 回照射ごとに酸素発生のピークが現れ、酸素発生の「4 周期振動」現象が観測されていた。このため、触媒は光未照射の状態では安定的な S_1 状態にあり、最初の 3 回のフラッシュ照射で $S_3 \rightarrow (S_4) \rightarrow S_0$ の遷移が誘発され、酸素が発生するが、以降 4 回照射ごとに酸素が発生することになる。この S 状態遷移モデルが提案されてから 50 年近くなるが、その後の様々な手法を用いた実験で、モデルが正しいことが証明されている¹⁾。

PSII の水分解反応はチラコイド膜のルーメン側で行われ、それによって放出される水素イオンはルーメン側で蓄積することになる (Fig. 1)。また、 $cyt\ b_6/f$ で行われる電子伝達・プロトン輸送反応によって、ストロマ側からルーメン側に水素イオンが輸送され、蓄積されることになる。このようにルーメン側で蓄積した水素イオンは膜の両側で水素イオン濃度勾配を形成し、同じチラコイド膜上に存在する ATP 合成酵素はこの水素イオン濃度勾配を利用して、ストロマ側で ADP とリン酸から ATP を合成する。合成された ATP と電子伝達によって作られた $NADPH$ は、二酸化炭素を糖に変換するのに必要なエネルギーと還元力を供給する。したがって、光合成の電子伝達によって光エネルギーは生物が利用可能な化学エネルギーに変換されることになる。

■ 2. 光化学系 II の全体構造

PSII は多くのサブユニットから構成される巨大膜タンパク質複合体で、そのうち、表在性サブユニットや低分子量膜貫通サブユニットのいくつかは生物種によって異なっているものがあるが⁷⁻⁹⁾、コア部分のタンパク質組成は原核のシアノバクテリアから真核の高等植物まで高度に保存されている¹⁻³⁾。PSII の構造を原子レベルで解明するため、筆者らは安定性が高く、取り扱いが容易な、温泉から採取した高熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus vulcanus* から PSII 二量体を調製し^{10,11)}、結晶化を行った¹²⁾。得られた結晶の分解能は当初十分ではなかったが¹³⁾、様々な結晶化条件・結晶の凍結条件を最適化した結果、結晶の質を大幅に向上させることができ、SPring-8 の放射光 X 線を利用して回折データを収集し、構造解析を行った結果、1.9 Å 分解能で PSII の構造を解析することができた¹⁴⁾。

Fig. 3 Crystal structure of a PSII dimer. A. Side view; B. Top view from the stromal side. Solid line in the middle of panel A and dashed line in the middle of panel B divide two monomers.

PSII は二量体として存在し、その全体構造を Fig. 3A に示した。この図では、真ん中に 2 回回転対称軸があり、2 つの PSII 単量体を左側と右側に分けている。また、上側がストロマ側で、下側がルーメン側を示している。

PSII の中心部分は 4 つの大きな膜貫通サブユニット、D1, D2, CP47, CP43 が占めており (Fig. 3B)、そのうち、D1, D2 はそれぞれ 5 回ずつ膜を貫通し、PSII のすべての電子伝達成分を結合している。CP47, CP43 はそれぞれ 6 回ずつ膜を貫通し、多数のクロロフィル *a* を結合しており、反応中心に光エネルギーを直接渡す光捕集アンテナの役割を果たしている。この 4 つの大きな膜貫通サブユニットの周りには、13 個の小さい (低分子量、分子質量が 10 kDa 以下の) 膜貫通サブユニットが取り囲んでおり、複合体の構造維持や安定化などの役割を果たしている。これらの低分子量サブユニットのうち、PsbZ は 2 回膜貫通ヘリックスを持っているが、その他のサブユニットはいずれも 1 回膜貫通ヘリックスのみを持っている (Fig. 3B) ^{2,3)}。

PSII のルーメン側表面には 3 つの水溶性サブユニット、PsbO, PsbU, PsbV が結合しており、水分解の触媒中心である Mn_4Ca クラスターのフタの役割を担っており、当該クラスターを水溶液から隔離し、安定化する働きを持っている ^{2,3,7-9)}。

タンパク質を取り除いた、電子伝達成分の配置を示したのが Fig. 4 で、各電子伝達成分間の距離・分子の配向関係が示されている。これら分子間の距離・配向は長い進化の結果、電子伝達反応が最適化され、逆反応が極力抑えられるようになったと考えられる。

Fig. 4 Arrangement of the electron transfer cofactors in PSII. Numbers are distances depicted in Å.

上述したように PSII の反応中心は P_{680} と呼ばれる 4 つのクロロフィルからなっているが、最初に光を吸収するクロロフィルは、D1 タンパク質に結合している、光合成細菌の反応中心との類似性から「アクセサリクロロフィル」と呼ばれる、 Chl_{D1} であると考えられている ^{15,16)}。励起された Chl_{D1} は極めて短い時間で P_{D1} から電子を受け取り、再酸化される。 P_{D1} は D2 サブユニットに結合しているもう一つのクロロフィル、 P_{D2} と相互作用し、二量体を作っており、正のホールは $\text{P}_{\text{D1}}/\text{P}_{\text{D2}}$ に一部非局在化しているが、 P_{D1} により多く局在化していることが理論計算によって示されている ^{17,18)}。 Chl_{D1} は極めて短寿命であるが、酸化された $\text{P}_{\text{D1}}/\text{P}_{\text{D2}}$ はある程度の寿命を持って存在するので、PSII の“安定的”な反応中心 P_{680} は一般的にこの $\text{P}_{\text{D1}}/\text{P}_{\text{D2}}$ 二量体を指す。

光によって励起された P_{680} 由来の電子は、フェオフィチン、D2, D1 サブユニットに結合している Q_A , Q_B の順に伝達し、 $\text{cyt } b_6/f$ を経由して PSI に送られることになる。また、PSII の酸化側では、 P_{680} の近傍に存在する、D1 サブユニットのチロシン残基 Tyr161 が P_{680} に直接電子を供給し (Fig. 4)、そして Tyr161 はその近傍に存在している Mn_4CaO_5 クラスターから電子を受け取り、再酸化され、 Mn_4CaO_5 クラスターは水分子から電子を奪い取ることになる。一連の電子伝達反応は $\mu\text{sec} - \text{msec}$ の時間スケールで完了する。

■ 3. Mn_4CaO_5 クラスターの構造と水分解反応の機構

3.1. 放射光によって解析された Mn_4CaO_5 クラスターの高分解能構造

上述のように PSII における水分解の直接の触媒は Mn_4CaO_5 クラスターであるが、このクラスターの正確な化学組成と構造は長い期間不明であった。PSII の結晶構造は 2001 年にドイツの Zouni らによって初めて報告

され、そのときの分解能は 3.8 Å であった¹⁹⁾。その後著者らを含む 3 つのグループにより分解能は徐々に向上され、2009 年までに 2.9 Å までにあがった^{13,20-23)}。しかし、後述のように Mn_4CaO_5 クラスター中の Mn—O 原子間の距離が 1.8—2.0 Å 前後であるので (Fig. 5)、クラスター中の原子の位置を電子密度から明確に判別できるためには、原理的には同程度の分解能が必要である。したがって、2.9 Å 分解能までの構造では、クラスター中の Mn, Ca のような重い原子 (金属イオン) の数やおおよその位置は分かるが、その間をつないでいるオキソ酸素の数・位置はあいまいで、全体の構造を決定するには至らなかった。

筆者らが 2011 年に発表した 1.9 Å 分解能の PSII 構造において¹⁴⁾、オキソ酸素を含めた Mn_4CaO_5 クラスター中の各原子の位置が初めて電子密度に基づき決定され、クラスターの全体構造が明らかになった (Fig. 5A)。この構造では、3 つの Mn イオンと 1 つの Ca イオンが 4 つのオキソ酸素によってつながれ、キューバン型構造を作っており、その外側に 4 つ目の Mn イオン Mn4 が 2 つのオキソ酸素を通してキューバン部とつながり、全体が「ゆがんだイス」のような形になっている (Fig. 5B)。4 つの Mn イオンのうち、キューバンの外側にある Mn4 には 2 つの水分子が、また、Ca イオンにも 2 つの水分子が末端配位子として結合している。そのほかの配位子は合計 7 つのアミノ酸によって供給され (Fig. 5C)、そのうちの 6 つが D1 サブユニット、1 つのみが CP43 サブユニットから供給されている。これらの配位アミノ酸のうち、6 つがカルボキシル基を供給し、一つのみがヒスチジン由来のアミド基である。

上述した 7 つのアミノ酸配位子とオキソ酸素、および 4 つの水配位子によって、 Mn_4CaO_5 クラスター中の 4 つの Mn イオンはそれぞれ 6 配位構造、また、Ca イオンは 7 配位構造を取っていることが分かった (Mn1 と O5

の距離が通常の Mn—O 結合距離より著しく長く、その間の結合があるかどうかは議論があるところである。詳細は後述)。また、6 つのカルボキシル基を持つアミノ酸のうち、5 つは 2 つの金属イオン (Mn と Mn、または Mn と Ca) に配位する bidentate 構造を取っており、一つのみ (D1-Glu189) が monodentate 構造となっている。Mn—Mn イオン間の距離は Mn1—Mn2 で 2.8 Å、Mn2—Mn3 で 2.9 Å、Mn3—Mn4 で 3.0 Å、Mn1—Mn3 で 3.3 Å、Mn1—Mn4 で 5.0 Å、Mn2—Mn4 で 5.4 Å であった (Fig. 6A) (Mn イオン同士の距離に関する詳細な議論は後部による総説を参照)²⁴⁾。

Fig. 5 Structure of the Mn_4CaO_5 -cluster determined at 1.9 Å resolution by SPring-8 synchrotron X-rays. A. Superposition of the atoms with their omit electron density maps; B. Distorted chair form of the Mn_4CaO_5 -cluster with their inter-atomic distances depicted in Å; C. Coordination structure of the Mn_4CaO_5 -cluster with their amino acid ligands.

Fig. 6 Inter-atomic distances of the Mn_4CaO_5 -cluster determined by XFEL. A. Mn—Mn distances (numbers in parenthesis are distances determined by the SPring-8 synchrotron X-rays); B. Inter-atomic distances within the Mn_4CaO_5 -cluster.

しかし、X 線結晶構造解析によって決定された Mn—Mn 同士、特に Mn1—Mn2、Mn2—Mn3、Mn3—Mn4 間の距離は、これまで X 線吸収スペクトル (EXAFS, extended X-ray absorption fluorescence spectra) 測定によって推定された距離よりわずかに (0.1—0.2 Å 程度) 長かった^{25,26)}。また、筆者らが決定した結晶構造の座標を用いて、理論計算 (量子力学/分子力学、QM/MM 計算) によって得た Mn—Mn 間距離のいくつかも、結晶構造よりわずかに短いことが報告された²⁷⁻³²⁾。このような、結晶構造と EXAFS 測定、QM/MM 計算結果間の相違の原因として、X 線による損傷があげられた。2011 年で決定された Mn_4CaO_5 クラスターの構造は、SPring-8 の連続放射光 X 線を利用して解析されたもので、その際、結晶由来の回折データ 1 枚につき、約 1 秒間 X 線を照射して得られたものである。完全な回折データを収集するため、180° にわたって 0.2° おきに結晶を回転し、回折イメージを収集したので、大きい結晶を用いてできる

だけ結晶の異なる部位から回折データを収集する方法を取ったにもかかわらず、同じ結晶部位に合計数十秒にわたって強い X 線を照射したことになる。その結果、タンパク質のアミノ酸、特に PSII に含まれる Mn イオンは X 線損傷を受け、構造が変化した可能性が否定できなかった。後述のように Mn_4CaO_5 クラスター中の Mn イオンは 3 価もしくは 4 価の状態にあるので、X 線損傷を受けやすく、それによって還元を受け、 Mn^{2+} になる可能性がある。その結果、Mn—Mn 同士の距離が長くなる可能性を否定できなかった。

Mn_4CaO_5 クラスターの「ゆがみ」を作りだしている要因は 2 つある。1 つは、キューバン構造のなかに含まれる 4 つの金属イオンのうち、3 つが Mn イオンで、1 つのみが Ca イオンとなっている。Mn—O 原子間の典型的な結合距離が 1.8—2.1 Å であるのに対して、Ca—O 原子間の結合距離が 2.4—2.7 Å であるため (Fig. 5B)、キューバンの中の原子間距離が均一ではない。もう一つの要因は、5 つのオキソ酸素原子のうち、O1—O4 までの 4 つの酸素原子と Mn との結合距離が典型的な 1.8—2.1 Å 程度になっているが、O5 と Mn との結合距離が 2.5—2.6 Å で、著しく長くなっている (Fig. 5B)。このことは、触媒の構造に歪みをもたらしただけでなく、O5 が特殊な位置にあり、Mn との結合が弱く、このため、反応中に結合部位から切り出され、分子状酸素の形成に関わる可能性があること、すなわち、O5 を中心とした部位が反応部位であることを示唆している。しかし、このような原子間距離に基づいた考察も、もし触媒が X 線損傷を受け、構造が変化していたなら、成り立たなくなる可能性がある。

3.2. Mn_4CaO_5 クラスターの無損傷構造と酸化状態

水分解反応の機構を解明するため、損傷を受けていない、天然状態の Mn_4CaO_5 クラスターの構造を解析することが不可欠である。通常、X 線による損傷は、強い X 線の照射により、分子または結晶中の水分子が攻撃を受け、ラジカルとなる活性酸素種を生じさせ、それらがアミノ酸または金属イオンを攻撃し、構造が変化することによる。この一連のイベントはピコ秒単位で起こるとされている。したがって、X 線損傷をなくすためには、ピコ秒よりも短い時間で X 線回折データを収集する必要がある。このような極短い時間の X 線パルスでは、1 パルス当たりの X 線量 (光子数) を通常の放射光 X 線よりも 10^{11} — 10^{12} 倍もしくはそれ以上大きくする必要がある。このような極大強度・極短時間の X 線パルスを供給できるのが、フェムト秒の X 線自由電子レーザー XFEL (X-ray Free Electron Laser) である³³。XFEL 装置はアメリカのスタンフォードで世界初の装置 LCLS (Linac Coherent Light Source) が建設さ

れ、2009 年に運用が開始した。その 3 年後の 2012 年春、世界で 2 番目の XFEL 施設 SACLA (SPring-8 Angstrom Compact Free-electron Laser) が日本で建設・運用開始された³⁴。SACLA の XFEL は、1 パルスの時間が 10 fsec で、SPring-8 の X 線と同等または若干低い X 線量を供給してくれる。このような XFEL パルスを利用することで、X 線損傷を受けない構造を解析することができるようになる。

Mn_4CaO_5 クラスター中の Mn—Mn イオン間の距離を決定し、X 線損傷によって変化したものと区別するため、分解能の高い構造解析が必要である。しかし、XFEL のパルス X 線の強度が極めて高いため、結晶に 1 パルス XFEL を照射すると、照射された箇所が破壊され、次の X 線パルス照射ができなくなる (X 線回折データは結晶が破壊される前に得られるので、影響を受けない)³⁵。すなわち、結晶の 1 か所あたり 1 回折イメージしか取得できない。通常の X 線結晶構造解析では、結晶を回転しながら一定の角度ごとに回折データ (イメージ) を収集するので、数百枚—1000 枚程度の回折イメージを収集する必要がある。したがって、XFEL を用いた結晶構造解析では、小さい結晶 (ナノメートル—マイクロメートルサイズ) を用いて、結晶を連続的に交換しながら XFEL を照射するという「シリアルフェムト秒結晶構造解析法」、(SFX 法、Serial Femtosecond X-ray Crystallography) が考案され、利用されていた^{36,37}。この方法では、微小結晶をジェット気流などと類似の方法により噴出し、連続的に供給しながら、それに対して一定周波数の XFEL パルスを照射する。噴出された気流中の結晶の配向がランダムであるため、X 線に対する結晶の配向もランダムで未知である。したがって、回折イメージを取得後、結晶の方位を回折データからシミュレーションにより推定するという手法を取る必要があり、そのためのソフトウェア (CrystFEL など)³⁸ が開発されていた。しかし、シミュレーションによる結晶方位の推定にはある程度の誤差が含まれるため、方位が近い結晶からの回折データをできるだけ多く収集し、推定の精度を上げる必要があった。したがって、通常の X 線結晶構造解析で用いる回折データの冗長度 (Redundancy、あるいは Multiplicity) が 10 以下で十分であるのに対して、XFEL の回折データの冗長度は通常 100 以上が必要で、300—800 程度が望ましい。これは、測定に必要な微小結晶の数が大量に必要であることを意味する。

PSII のような巨大膜タンパク質結晶について、SFX 法の問題点は、PSII の微小結晶では分解能が高くないことであった。微小結晶で分解能が大きい結晶より低い原因は 2 つ考えられる。一つは PSII の分子量が大きいこと、微小結晶中に含まれる分子数が少なく、回折に有効な繰り返しユニット数が少ないこと、もう一つは大きい結

晶が成長する結晶化条件は結晶形成に最適化されたもので、得られた結晶について最高の分解能を与えるが、微小結晶の成長条件は必ずしも結晶の形成と成長に最適ではなく、結晶を大きく成長させないため、「準最適」の結晶化条件下で結晶するか、結晶が大きくなる前に成長を止めてしまうといった措置を取る必要があり、得られた結晶の質が必ずしも最善のものではない、ということである。しかし、 Mn_4CaO_5 クラスター中の Mn—Mn 原子間の距離を十分な精度で決定し、損傷を受けた構造との区別をするためには、十分高い分解能の構造解析が必要である。この問題を解決するため、筆者らは PSII の大型結晶を用いて、凍結条件下で結晶の 1 か所に XFEL を 1 パルス照射し、結晶を 50 μm 移動して次の XFEL パルスを照射するという「固定ターゲットシリアル結晶構造解析法」を用いて回折データを収集した (Fig. 7)³⁹⁾。XFEL のビームサイズは 2–3 μm であるので、予備実験により 50 μm 移動すれば、XFEL 照射による影響を受けていない結晶部位から回折データを収集できることを確認した⁴⁰⁾。この方法により、大型 PSII 結晶 (長さ約 1 mm) を利用して、1 結晶当たり数十枚–100 枚程度の回折イメージを収集することができた。結晶の中心から外れた部位では、分解能が低下したり、回折イメージのスポットが割れたりといった問題も生じるので、収集したすべてのイメージを構造解析に利用することはできなかった。このため、一つの完全な回折データセットを収集するため、数十から数百個の大型 PSII 結晶が必要であった³⁹⁾。

Fig. 7 Fixed-target serial femtosecond X-ray crystallography using XFELs and a large PSII crystals. A. Illustration of the experimental set-up; B. A large PSII crystal (with a length over 1.0 mm) before XFEL irradiation; C. The PSII crystal after XFEL irradiation. A lot of bubbles in the surface of the crystal can be seen which are caused by irradiation of a single femtosecond XFEL pulse.

このような「固定ターゲット結晶構造解析法」を用いて、フェムト秒の XFEL パルスにより 1.95 Å 分解能の PSII 構造を解析することができた³⁹⁾。その結果、Fig. 6A で示したように、Mn1 – Mn2, Mn2 – Mn3, Mn3 –

Mn4 間の距離がそれぞれ 0.1 – 0.2 Å ずつ短くなり、他の Mn – Mn 原子間の多くも短くなった。これらの距離は EXAFS 測定や QM/MM 計算結果とほぼ一致しており、XFEL によって解析された構造が X 線損傷を受けていない、天然状態の構造であることを示した。ただ、EXAFS 測定で得られたのは原子間距離のみで、クラスターの幾何学構造は結晶構造解析で初めて明らかになったものである。また、QM/MM を用いた理論計算は、一部タンパク場の環境やカルボキシル基、イミダゾール基、および水分子のプロトン化状態に依存し、さらに計算に用いられたパラメーターの値によっても結果が変わる可能性があり、得られた結果は必ずしも結晶構造解析から得られた結果と厳密に一致するとは限らない。また、結晶構造解析では原子間距離に一定の誤差が含まれており、これも QM/MM 計算や EXAFS 測定の結果との間のずれの一因になる。

無損傷で解析された Mn_4CaO_5 クラスターの構造において、Mn – O、および Mn と配位子間の距離の一部も放射光 X 線で解析された構造から変化していたが (Fig. 6B)、その多くは若干短くなっていた。しかし、O5 と Mn1, Mn4 との距離はそれぞれ 2.7 Å, 2.3 Å となり、放射光 X 線構造からわずかに変化した、他の典型的な Mn – O 間距離より著しく長いという特徴は維持されており、O5 が他のオキソ酸素に比較して特殊な位置にある性質は変わらなかった。この特徴は、極めて低線量の放射光 X 線によって解析された無損傷・高分解能構造でも観測された⁴¹⁾。したがって、O5 を中心とする部位が O=O 形成に関わる反応部位であることは無損傷構造でも示唆された。

無損傷構造における Mn と配位子間との距離から、Mn イオンの酸化状態 (価数) を推定することができる。解析された構造は光未照射のものなので、 S_1 状態に対応する。電子スピン共鳴 (EPR, electron paramagnetic resonance) や EXAFS などの手法を用いたこれまでの研究で、 S_1 状態における Mn_4CaO_5 クラスター中の 4 つの Mn イオンの価数状態は一般的に III, III, IV, IV (以降 3, 3, 4, 4 とする) であることが報告されている^{3,26,42)} (これより 2 電子多い状態、2, 3, 3, 4 という「低酸化状態」とする説もあるが^{43,44)}、これについては本稿で詳述しない)。4 つの Mn はいずれも 6 配位であり、それぞれ 2 つの配位子が Mn 原子を中心にほぼ直線で結ばれて、一つの配位子ペアを作っているが、配位子ペア間で Mn イオンとの平均結合距離に違いがあった。そのうち、Mn2, Mn3 に結合している 3 つの配位子ペアの結合距離はいずれも 1.8 – 2.0 Å の範囲内にあり (Fig. 8)、典型的な Mn – O 結合距離と変わらない。しかし、Mn1 と Mn4 の 3 つの配位子ペアのうち、それぞれ一つのペアが Mn との平均結合距離が 2.0 Å より明らかに長く (Mn1

— O5/Asp342 = 2.46 Å, Mn4 — O5/W1 = 2.29 Å)、通常の Mn — O 結合と異なる性質を示した。このような長い結合ペアは 3 価 Mn に特有の Jahn-Teller 軸に対応しており、したがって、Mn1, Mn4 はそれぞれ 3 価であり、Mn2, Mn3 は 4 価であることが示された³⁹⁾。

Fig. 8 Ligand distances of the four Mn ions in the radiation damage-free structure determined by XFEL. A. Mn4 and Mn1; B. Mn2 and Mn3.

3.3. S_2 中間体の構造

以上により決定された Mn_4CaO_5 クラスターの構造は、暗黒で安定な、反応開始前の S_1 状態の構造であり、この構造から、O5 を中心とする領域が分子状酸素の形成に関わっている反応部位である可能性が示唆された。しかし、O5 の近傍で Mn4 に配位している水分子 W2、および Ca に配位している水分子 W3 が存在しており、いずれも O5 と水素結合距離にある。この領域でどの 2 つの酸素原子が近づき、反応が行われるか、それに伴い Mn_4CaO_5 クラスターの構造がどのように変化し、また、プロトンがどの経路から放出されるかといった問題に対する答えは不明である。これらの問題に答えるためには、 S 状態遷移の中間状態の構造を解析しなければならない。

S_1 状態に 1 フラッシュを照射すると触媒は S_2 状態に遷移する。 S_2 状態の構造は今のところ実験から報告されていないが、理論計算 (QM/MM 計算) から 2 種類あることが報告されている^{45,46)}。一つは、O5 が Mn4 に近づき、強い結合を作り、Mn1 との結合が切れるオープン型キューバン構造 (あるいは右側オープン、右型構造⁴⁵⁾)、もう一つはその逆で、O5 が Mn1 に近づき、クローズドキューバン型構造 (左側オープン、左型構造) である (Fig. 9)。

それぞれ EPR のマルチライン信号 (右型) と $g = 4.1$ 信号 (左型) に対応するものであることが示唆された。2 つの EPR 信号のうち、マルチライン信号が優位であり、 $g = 4.1$ 信号は実験条件によっては観察されないことがわかっているが、これらに対応する 2 タイプの構造は今のところ実験では解析されていない。

Fig. 9 Two types of structures of the Mn_4CaO_5 -cluster at the S_2 -state based on theoretical calculations. A. Open-cubane (right-side open) structure; B. Closed-cubane (left-side open) structure.

3.4. S_3 中間体の構造

S_2 状態からさらに 1 フラッシュ照射すると S_3 状態に遷移する。この時、右型から優先的に遷移するか、左型から遷移するかなどについて様々な理論計算が行われているが⁴⁷⁻⁵⁰⁾、筆者らは XFEL と微小結晶を用いた SFX 法を利用したポンプ-プローブ実験により、 S_3 状態由来の X 線回折データを収集し、 S_1 状態とのフーリエ差電子密度から S_1 状態から S_3 状態へ遷移する際の構造変化を特定し、O=O 結合の形成部位について重要な知見を得た⁵¹⁾。

上述のように SFX 法では、多数の微小結晶を用いて連続的に結晶試料を供給しながら一定間隔でフェムト秒の XFEL パルス照射し、回折データを得る。 S_3 状態由来の回折データを得るため、532 nm のグリーンレーザーをポンプとし、10 msec の間隔で 2 回照射し、2 回目の照射後、10 msec 経過した時点で XFEL を照射して回折データを取得した。 S_3 状態由来のデータから光未照射の S_1 状態由来のデータを差し引いたフーリエ差電子密度図から、 S_1 から S_3 への遷移によって引き起こされた構造変化が明らかになった (Fig. 10)。

Fig. 10 Structural changes of the Mn_4CaO_5 -cluster induced by 2-flashes illumination. A. Isomorphous Fourier-difference map of S_3 - S_1 state around the Mn_4CaO_5 -cluster; B. Position of the O6 atom in the S_3 -state based on the S_3 - S_1 isomorphous Fourier-difference map.

差フーリエ電子密度から、二次電子供与体 Y_0 、電子受容体 Q_B および非ヘム鉄周辺、そして Mn_4CaO_5 クラスタ周辺で有意な差が認められ、これらの領域で構造変化が起きたことが示された⁵¹⁾。本稿では水分解反応に関連して、 Mn_4CaO_5 クラスタ周辺の構造変化についてのみ述べる。

Fig. 10A に示したように、2 閃光照射により OEC 周辺で多くの差フーリエマップが見られ、多くの構造変化が起きたことが示された。そのうち、 Mn4 はキューバンの外側に若干 ($0.1 - 0.2 \text{ \AA}$) 移動し、 Mn1 との距離が少し長くなった。 Ca , Mn1 についても一部の差フーリエ密度が見られ、位置が変化したことが示唆された。しかし、水分解反応にとって重要な構造変化として以下の 3 つが見つかった。

O5 近傍にプラスの電子密度が見つかり、この部位に新たな水分子 (ヒドロキシル基あるいは酸素原子) が挿入されたことが示唆された。

D1-Glu189 残基の側鎖が Mn1 側にフリップし、O5 との間により大きなスペースを作った。

W665 という水分子に強いマイナスの電子密度が現れ、この水分子が 2 閃光照射によってディスオーダーしたことが示された。

上記構造変化のうち、1) の構造変化により、O5 近傍に新たな酸素原子 (水分子) O6 が挿入されたことが分かった (Fig. 10B)。O6 は O5 と近い距離にあり、両者の間で $\text{O}=\text{O}$ 結合を形成し、放出することが可能になる⁵¹⁾。2) の構造変化は O6 の挿入を可能にするためのもので、なぜなら、もしこの構造変化がなければ、D1-Glu189 のカルボキシル酸素のうちのひとつは O6 と $2.3 \text{ \AA}$ の距離にあり、O6 の挿入が不可能になる。このため、D1-Glu189 のカルボキシル基は $0.5 \text{ \AA}$ ほど O5 から離れる方向にシフトし (Fig. 11)、その結果、O6 との距離が $2.7 \text{ \AA}$ になり、O6 の挿入が可能になる。

Fig. 11 Movement of the carboxylate group of D1-Glu189 induced by the 2-flashes illumination.

2 閃光照射によって引き起こされた構造変化のうち、3) の W665 水分子のディスオーダーは、プロトンの排出に関連していると考えられる。W665 は W567 を介して Mn_4CaO_5 クラスタ中のオキソ酸素の一つ O4 と水素結合によりつながっており、この水素結合は PSII 複合体の表面、ルーメン側溶液まで他の水分子やアミノ酸残基を介してネットワークを形成し、水分解反応に伴って放出されるプロトンがルーメン側溶液へ排出される経路の一つとして考えられている^{52,53)}。2 閃光照射することによって W665 がディスオーダーすることにより、この水素結合ネットワークが切断されることになる。これは、閃光照射により Mn_4CaO_5 クラスタから放出されたプロトンの一つがこのネットワークを通して外側 (ルーメン側) に排出され、排出されたプロトンの逆流を防ぐため、水素結合ネットワークが一時的に切断されたことを反映していると考えられる。したがって、O4-W567-W665 を介した水素結合ネットワークが、 $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_3$ への遷移で放出されるプロトンの排出経路を担っていることが示唆された⁵¹⁾。

3.5. 水分解反応の機構

S_3 状態における O6 の挿入により、 $\text{O}=\text{O}$ 分子の形成部位や水分解反応の機構について重要な知見が得られた。O6 が O5 と極めて近いため、両者が反応基質であり、分子状酸素を作り出していることが示された (Fig. 12)。しかし、X 線構造解析での誤差を考えれば、どのような機構で $\text{O}=\text{O}$ 結合が形成されるかについては不明な点がある。筆者らが報告した構造では、O5 と O6 の距離が $1.5 \text{ \AA}$ であり⁵¹⁾、これが正しければ、両者がスーパーオキシド機構を通して $\text{O}=\text{O}$ 結合を形成することになる^{48,54)}。この場合、 S_3 状態で 2 つの Mn^{4+} が Mn^{3+} に還元されることが予想されるが、EPR や EXAFS の実験結果から Mn^{4+} の還元は観察されていない^{25,26,42)}。構造解析の誤差を考慮し、O5 - O6 の距離が $2.0 \text{ \AA}$ 程度になれば、オ

キシルーオキシ (Oxyl-Oxo) 機構で O=O 結合が形成されることになる。O5 – O6 距離がさらに長く、2.4 Å 程度になれば、ヒドロキシルーオキシ (Hydroxyl-Oxo) 機構になる^{48,54–56)}。理論計算では後者の2つとも可能であることが示されているが、どちらが正しいかは精度の高い構造解析による検証が必要である。ここで触れておかなければならないのは、筆者らとほぼ同様のポンプ-プローブ法を用いて米国のグループが報告した S_3 の構造では、O6 の挿入が観察されず、 Mn_4CaO_5 クラスタで顕著な構造変化が見られず、別の反応機構が必要であることが提案されていた⁵⁷⁾。しかし、その実験から得られた XFEL データの冗長度が低く、構造変化について結論を導き出すには不十分と言わざるを得ない。実際、同著者らはその後の追加実験により O6 に近い位置に新たな水分子の挿入があることを示唆している。

Fig. 12 Structure of the Mn_4CaO_5 -cluster in the S_1 and S_3 -states, showing the insertion of O6 and the structural changes of the cluster upon S_1 -to- S_3 transition.

3.6. プロトン排出チャンネル

Mn_4CaO_5 クラスタは PSII 複合体の表面から中に入った位置にあり、その周りは大きなタンパク質領域に覆われており、外側の水溶液から隔離されている。これは、水分子が Mn_4CaO_5 クラスタの基質でもあるために、水との直接の接触を避けるために必要な配置であると思われる。もし、 Mn_4CaO_5 クラスタが直接水溶液に露出し、自由に動き回っている水と接触していれば、どの水分子を基質として使うか決められないかもしれない。あるいは基質として結合している水分子がフリーの水分子によって攻撃され、不安定化するかもしれない。これは、触媒反応を秩序よく進めるために、ランダムな基質ではなく、あらかじめ決まった位置に基質を配置しておく必要性から取らなければならない戦略であったと考えられる。実際、 Mn_4CaO_5 クラスタを覆っているタンパク質 (表在性タンパク質) の一部または全部を解離させ、クラスタを覆っているキャップに穴を開けたり、あるいはキャップを取り外したりすると、 Mn_4CaO_5 クラスタが不安定になり、水分解活性の一部または全部が

失われることが知られており、これらタンパク質領域が Mn_4CaO_5 クラスタを水から隔離し、保護していることが示されている。 Mn_4CaO_5 クラスタが大きなタンパク質領域に覆われていることは、別の問題をもたらす。すなわち、水分解に伴って4つのプロトンが放出されるが、これらのプロトンを素早く反応部位から遠ざけ、複合体の外側の溶液に排出する必要があるが、タンパク質中でのプロトンの自由拡散は速くないので、専用のプロトン排出チャンネルが必要になる。高分解能結晶構造において、 Mn_4CaO_5 クラスタから複合体表面までつなぐ水素結合ネットワークが複数見つかり、これらのネットワークがプロトンチャンネルとして機能していることが示唆された^{3,14,20)}。そのうちの一つは上述した O4 を起点とするネットワークで、2 閃光照射により W665 の構造変化が確認され、 $S_1 \rightarrow S_3$ 遷移に伴って放出されるプロトンのパスとして機能していることが示唆された。もう一つは Y_Z (D1-Tyr161) と D1-His190 を介した水素結合ネットワークで、赤外分光測定や D1-Gln298 の変異体を用いた研究から、プロトンの排出に関わっていることが示唆されている^{58,59)} (Fig. 13)。この他にも、D1-Asp61 を介した水素結合ネットワークがプロトンの排出に重要な役割を果たしていることが報告されている^{60,61)}。

Fig. 13 Two hydrogen-bond networks starting from the OEC to outside of the PSII protein complex revealed by the high-resolution structural analysis. A. The hydrogen-bond network from OEC through His190-Asn298; B. The hydrogen-bond network from OEC through Asp61.

■ 4. PSII における光捕集とエネルギー伝達

Mn_4CaO_5 クラスターは水分解触媒として精密にできている、高い効率を有しているが、それを駆動しているのは PSII の反応中心クロロフィルによって吸収された光エネルギーである。しかし、光エネルギーが極めて希薄なものであるため、一つのクロロフィルで吸収できる光子は 1 秒間に 1 個強程度で⁶²⁾、4 つの光子を吸収して 2 分子の水を分解するためには、一つのクロロフィルが吸収した光のみで駆動するとなると、反応が極めて遅くなる。この問題を解決するため、PSII は巨大なタンパク質複合体として進化させ、反応中心の周りに多くのクロロフィルを結合した「アンテナタンパク質」を配置させた。これらアンテナタンパク質は、反応中心を結合している D1, D2 タンパク質の両側に存在し、それぞれ CP47, CP43 と呼ばれるサブユニットである。この両サブユニットはそれぞれ 16 個、13 個のクロロフィルを結合しており、吸収した光エネルギーを効率よく反応中心に伝達するようになっている。

Fig. 14 Arrangement of the chlorophylls in the two antenna subunits CP47 and CP43, and their connections with the reaction center chlorophylls. A. Side view of the membrane, showing the distribution of chlorophylls in two layers; B. Connection of the bulk antenna chlorophylls with the reaction center chlorophylls through two “bridging” chlorophylls in each side.

CP47 と CP43 に結合しているアンテナクロロフィルは、主に膜の上（ストロマ側）と下（ルーメン側）の二層に分布しており、各層内のクロロフィル同士は 10 Å 程度のセンター間距離にあり、効率よくエネルギーの伝達・平衡化ができる構造になっている (Fig. 14A)¹⁴⁾。

また、2 つの層の間では、1 個のクロロフィルが配置されており、層間のエネルギー伝達を仲介している。さらに CP47, CP43 と反応中心クロロフィルの間には各 2 つずつのクロロフィルが配置されており、アンテナからのエネルギーを反応中心に「橋渡し」する役割を果たしている (Fig. 14B)¹⁴⁾。ただし、これらの「橋渡し」クロロフィルと反応中心のクロロフィル間の距離（センターとセンター）は 20 Å 以上離れており、反応中心へのエネルギー伝達の律速ステップになっている可能性がある。反応中心からのこのような長い距離での橋渡しクロロフィルの配置は、反応中心からエネルギーの逆流を防いでいると考えられており、長い進化の歴史で光合成生物が見つけたエネルギー利用の最適化戦略であるといえる。

■ 5. おわりに

PSII の高分解能結晶構造、XFEL を利用した無損傷構造や反応中間体の構造解析によって、可視光を利用した水分解反応の機構について多くの重要な知見を得た。その結果、触媒としての Mn_4CaO_5 クラスターの詳細な構造、O=O 結合の形成部位、プロトンの排出チャンネルなどの多くが明らかになった。今後は残りの反応中間体の構造、より早い時間での触媒の構造変化、各種変異体の構造・機能解析などを通して、水分解の全貌やプロトンパス、PSII の各サブユニットの詳細な役割などが解明されるだろう。これらの知見は、水分解触媒の人工合成にもヒントとなることが期待されるが、可視光を利用した水分解の人工システムの創出には、光の吸収を水分解の触媒にカップリングさせることも重要な課題となる。生物は、長い進化の歴史を経て光吸収・電子伝達・水分解をすべて同じタンパク質複体内で完成させるように変化してきたが、それぞれの過程を効率よくカップリングさせることは容易ではない。人工システムでそれぞれの要素技術の開発に合わせて、それらの間を効率よくつなぐシステム工学的な手法が必要となる。地球大気中の酸素がほとんど PSII から作られたものであり、生物の生存に必要なエネルギーもほとんど PSII から始まる光合成システムで太陽光から変換されたものであることを考えると、生物進化の力の強大さを改めて感じざるを得ない。

■ 6. 謝辞

本稿で紹介した筆者らの研究は、多くの共同研究者との共同研究の成果である。そのうち、放射光 X 線を利用した PSII の高分解能構造解析は、神谷信夫教授、梅名泰史博士（以上大阪市立大学）、川上恵典博士（当時：

岡山大学)、XFEL を用いた無損傷構造解析は菅倫寛博士、秋田総理博士、中島芳樹氏等 (以上岡山大学)、山本雅貴博士、吾郷日出夫博士グループ (以上理化学研究所)、S₃ 中間体の構造解析には菅倫寛博士、秋田総理博士、中島芳樹氏等 (以上岡山大学)、岩田想教授グループ (京都大学)、菅原道泰博士、久保稔博士等 (以上理研) 等の協力によるものである。この場を借りて感謝の意を表します。

7. 文献

- 1) *Photosystem II: The Light Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase*, T. J. Wydrzynski, K. Satoh (eds), Springer, Dordrecht, The Netherlands (2005).
- 2) J.-R. Shen, T. Henmi, N. Kamiya, In *Photosynthetic Protein Complexes, A Structural Approach*, F. Fromme (ed), WILEY-VCH, pp. 83–106 (2008).
- 3) J.-R. Shen, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **66**, 23 (2015).
- 4) B. Kok, B. Forbush, M. McGloin, *Photochem. Photobiol.*, **11**, 457 (1970).
- 5) P. Joliot, *Photosynth. Res.*, **76**, 65 (2003).
- 6) P. Joliot, G. Barbieri, R. Chabaud, *Photochem. Photobiol.*, **10**, 309 (1969).
- 7) I. Enami, A. Okumura, R. Nagao, M. Iwai, T. Suzuki, J.-R. Shen, *Photosynth. Res.*, **98**, 349 (2008).
- 8) T. M. Bricker, J. L. Roose, R. D. Fagerlund, L. K. Frankel, J. J. Eaton-Rye, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1817**, 121 (2012).
- 9) K. Ifuku, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **79**, 1223 (2015).
- 10) J.-R. Shen, M. Ikeuchi, Y. Inoue, *FEBS Lett.*, **301**, 145 (1992).
- 11) J.-R. Shen, Y. Inoue, *Biochemistry*, **32**, 1825 (1993).
- 12) J.-R. Shen, N. Kamiya, *Biochemistry*, **39**, 14739 (2000).
- 13) N. Kamiya, J.-R. Shen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 98 (2003).
- 14) Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, *Nature*, **473**, 55 (2011).
- 15) B.A. Diner, F. Rappaport, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **53**, 551 (2002).
- 16) G. Raszewski, B.A. Diner, E. Schlodder, T. Renger, *Biophys. J.*, **95**, 105 (2008).
- 17) K. Saito, T. Ishida, M. Sugiura, K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya, J.-R. Shen, H. Ishikita, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 14379 (2011).
- 18) K. Saito, J.-R. Shen, H. Ishikita, *Biophys. J.*, **102**, 2634 (2012).
- 19) A. Zouni, H. T. Witt, J. Kern, P. Fromme, N. Krauß, W. Saenger, P. Orth, *Nature*, **409**, 739 (2001).
- 20) K. Kawakami, Y. Umena, N. Kamiya, J.-R. Shen, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 9 (2011).
- 21) F. N. Ferreira, T.M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber, S. Iwata, *Science*, **303**, 1831 (2004).
- 22) B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni, J. Biesiadka, *Nature*, **438**, 1040 (2005).
- 23) A. Guskov, J. Kern, A. Gabdulkhakov, M. Broser, A. Zouni, W. Saenger, *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **16**, 334 (2009).
- 24) 磯部 寛, *Bull. Jpn. Soc. Coord. Chem.*, **70**, 2 (2017).
- 25) C. Glöckner, J. Kern, M. Broser, A. Zouni, V. Yachandra, J. Yano, *J. Biol. Chem.*, **288**, 22607 (2013).
- 26) J. Yano, V. K. Yachandra, *Chem. Rev.*, **114**, 4175 (2014).
- 27) S. Lubner, I. Rivalta, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, G.W. Brudvig, V.S. Batista, *Biochemistry*, **50**, 6308 (2011).
- 28) W. Ames, D.A. Pantazis, V. Krewald, N. Cox, J. Messinger, W. Lubitz, F. Neese, *J. Am. Chem. Soc.*, **133**, 19743 (2011).
- 29) K. Kanda, S. Yamanaka, T. Saito, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, H. Nakamura, K. Yamaguchi, *Chem. Phys. Lett.*, **506**, 98 (2011).
- 30) S. Yamanaka, H. Isobe, K. Kanda, T. Saito, Y. Umena, K. Kawakami, J.-R. Shen, N. Kamiya, M. Okumura, H. Nakamura, K. Yamaguchi, *Chem. Phys. Lett.*, **511**, 138 (2011).
- 31) T. Saito, M. Shoji, K. Kanda, H. Isobe, S. Yamanaka, Y. Kitagawa, S. Yamada, T. Kawakami, M. Okumura, K. Yamaguchi, *Int. J. Quant. Chem.*, **112**, 121 (2012).
- 32) A. Galstyan, A. Robertazzi, E.W. Knapp, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 7442 (2012).
- 33) R. Neutze, R. Wouts, D. van der Spoel, E. Weckert, J. Hajdu, *Nature*, **406**, 752 (2000).
- 34) T. Ishikawa et al., *Nat. Photon.*, **6**, 540 (2012).
- 35) H.N. Chapman, C. Coleman, N. Timneanu, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.*, **369**, 20130313 (2014).
- 36) S. Boutet, L. Lomb, G. J. Williams, T. R. Barends, A. Aquila, R. B. Doak, U. Weierstall, D. P. DePonte, J. Steinbrener, R. L. Shoeman, M. Messerschmidt, A. Barty, T. A. White, S. Kassemeyer, R. A. Kirian, M. M. Seibert, P. A. Montanez, C. Kenney, R. Herbst, P. Hart, J. Pines, G. Haller, S. M. Gruner, H. T. Philipp, M. W. Tate, M. Hromalik, L. J. Koerner, N. van Bakel, J. Morse, W. Ghonsalves, D. Arnlund, M. J. Bogan, C. Coleman, R. Fromme, C. Y. Hampton, M. S. Hunter, L. C. Johansson, G. Katona, C. Kupitz, M. Liang, A. V. Martin, K. Nass, L. Redecke, F. Stellato, N. Timneanu, D. Wang, N. A. Zatsepin, D. Schafer, J. Defever, R. Neutze, P. Fromme, J. C. Spence, H. N. Chapman, I. Schlichting, *Science*, **337**, 362 (2012).
- 37) H. N. Chapman, *Methods Mol. Biol.*, **1607**, 295 (2017).
- 38) T. A. White, A. Barty, F. Stellato, J. M. Holton, R. A. Kirian, N. A. Zatsepin, H. N. Chapman, *Acta Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.*, **69**, 1231 (2013).
- 39) M. Suga, F. Akita, K. Hirata, G. Ueno, H. Murakami, Y. Nakajima, T. Shimizu, K. Yamashita, M. Yamamoto, H. Ago, J.-R. Shen, *Nature*, **517**, 99 (2015).
- 40) K. Hirata, K. Shinzawa-Itoh, N. Yano, S. Takemura, K. Kato, K. Muramoto, T. Kawahara, T. Tsukihara, E. Yamashita, K. Tono, G. Ueno, T. Hikima, H. Murakami, Y. Inubushi, M. Yabashi, T. Ishikawa, M. Yamamoto, T. Ogura, H. Sugimoto, J.-R. Shen, S. Yoshikawa, H. Ago, *Nature Methods*, **11**, 734 (2014).
- 41) A. Tanaka, Y. Fukushima, N. Kamiya, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 1718 (2017).
- 42) N. Cox, M. Retegan, F. Neese, D. A. Pantazis, A. Boussac, W. Lubitz, *Science*, **345**, 804 (2014).
- 43) D. R. Kolling, N. Cox, G. M. Ananyev, R. J. Pace, G. C. Dismukes, *Biophys. J.*, **103**, 313 (2012).
- 44) R. J. Pace, L. Jin, R. Stranger, *Dalton Trans.*, **41**, 11145 (2012).
- 45) H. Isobe, M. Shoji, S. Yamanaka, Y. Umena, K. Kawakami, K. Kamiya, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, *Dalton Trans.*, **41**, 13727 (2012).
- 46) D. A. Pantazis, W. Ames, N. Cox, W. Lubitz, F. Neese, *Angew. Chem. Int. Ed.*, **51**, 9935 (2012).
- 47) M. Capone, D. Bovi, D. Narzi, L. Guidoni, *Biochemistry*, **54**, 6439 (2015).
- 48) H. Isobe, M. Shoji, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, *Inorg. Chem.*, **55**, 502 (2016).

- 49) K. Yamaguchi, H. Isobe, M. Shoji, S. Yamanaka, M. Okumura, *Mol. Phys.*, **114**, 519 (2016).
- 50) D. Narzi, M. Capone, D. Bovi, L. Guidoni, *Chemistry*, **24**, 10820 (2018).
- 51) M. Suga, F. Akita, M. Sugahara, M. Kubo, Y. Nakajima, T. Nakane, K. Yamashita, Y. Umena, M. Nakabayashi, T. Yamane, T. Nakano, M. Suzuki, T. Masuda, S. Inoue, T. Kimura, T. Nomura, S. Yonekura, L.-J. Yu, T. Sakamoto, T. Motomura, J.-H. Chen, Y. Kato, T. Noguchi, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, T. Hatsui, E. Nango, R. Tanaka, H. Naitow, Y. Matsuura, A. Yamashita, M. Yamamoto, O. Nureki, M. Yabashi, T. Ishikawa, S. Iwata, J.-R. Shen, *Nature*, **543**, 131 (2017).
- 52) K. Saito, A. W. Rutherford, H. Ishikita, *Nat Commun.*, **6**, 8488 (2015).
- 53) N. Sakashita, H.C. Watanabe, T. Ikeda, K. Saito, H. Ishikita, *Biochemistry*, **56**, 3049 (2017).
- 54) M. Shoji, H. Isobe, T. Nakajima, Y. Shigeta, M. Suga, F. Akita, J.-R. Shen, K. Yamaguchi, *Faraday Discuss.*, **198**, 83 (2017).
- 55) P. E. Siegbahn, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 9442 (2013).
- 56) M. R. Blomberg, T. Borowski, F. Himo, R. Z. Liao, P. E. Siegbahn, *Chem Rev.*, **114**, 3601 (2014).
- 57) I. D. Young, M. Ibrahim, R. Chatterjee, S. Gul, F. D. Fuller, S. Koroidov, A. S. Brewster, R. Tran, R. Alonso-Mori, T. Kroll, T. Michels-Clark, H. Laksmono, R. G. Sierra, C. A. Stan, R. Hussein, M. Zhang, L. Douthit, M. Kubin, C. de Lichtenberg, L. V. Pham, H. Nilsson, M. H. Cheah, D. Shevela, C. Saracini, M. A. Bean, I. Seuffert, D. Sokaras, T.-C. Weng, E. Pastor, C. Weninger, T. Fransson, L. Lassalle, P. Bräuer, P. Aller, P. T. Docker, B. Andi, A. M. Orville, J. M. Glowina, S. Nelson, M. Sikorski, D. Zhu, M. S. Hunter, T. J. Lane, A. Aquila, J. E. Koglin, J. Robinson, M. Liang, S. Boutet, A. Y. Lyubimov, M. Uervirojnangkoon, N. W. Moriarty, D. Liebschner, P. V. Afonine, D. G. Waterman, G. Evans, P. Wernet, H. Dobbek, W. I. Weis, A. T. Brunger, P. H. Zwart, P. D. Adams, A. Zouni, J. Messinger, U. Bergmann, N. K. Sauter, J. Kern, V. K. Yachandra, J. Yano, *Nature*, **540**, 453 (2016).
- 58) H. Kuroda, N. Kodama, X. Y. Sun, S. Ozawa, Y. Takahashi, *Plant Cell Physiol.*, **55**, 1266 (2014).
- 59) R. Nagao, H. Ueoka-Nakanishi, T. Noguchi, *J. Biol. Chem.*, **292**, 20046 (2017).
- 60) R. J. Service, W. Hillier, R. J. Debus, *Biochemistry*, **49**, 6655 (2010).
- 61) R. J. Debus, *Biochemistry*, **53**, 2941 (2014).
- 62) H. Inoue, T. Shimada, Y. Kou, Y. Nabetani, D. Masui, S. Takagi, H. Tachibana, *ChemSusChem*, **4**, 173 (2011).

Profile

沈 建仁 (しん けんじん)

岡山大学異分野基礎科学研究所教授 理学博士

〔経歴〕 1986 年東京農工大学大学院農学研究科修士課程修了, 1990 年東京大学大学院理学研究科博士課程修了, 同年理学博士取得。1990 年理化学研究所太陽光エネルギー研究グループ基礎科学特別研究員, 研究員, 前任研究員を経て, 2003 年岡山大学大学院自然科学研究科教授, 2016 年より現職。朝日賞, みどりの学術賞, 日本結晶学会西川賞, 日本錯体化学会貢献賞等を受賞

〔専門〕 光合成, 生化学, 植物生理学