

氏名	FAISAL HAMMAD MEKKY KOUA
授与した学位	博士
専攻分野の名称	理学
学位授与番号	博甲第4775号
学位授与の日付	平成25年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Structural and Biophysical Studies of Photosystem II from a Thermophilic Cyanobacterium <i>Thermosynechococcus vulcanus</i> (好熱性シアノバクテリアサーモシネココッカス・ブルカヌス由来光化学系 II に関する構造生物学的, 生物物理学的研究)
論文審査委員	教授 沈 建仁 教授 山本 泰 教授 高橋裕一郎

### 学位論文内容の要旨

Photosystem II (PSII) is a multi-subunit membrane protein complex with a total molecular mass of 700 kDa for its functional dimeric state that exists in the thylakoid membranes of cyanobacteria, eukaryotic algae and higher plants. PSII catalyses the light driven water oxidation by accumulating highly oxidizing equivalents through several intermediate states called S-states (Kok-cycle) within its catalytic centre, an oxygen-evolving complex (OEC). The structure of PSII and OEC have been revealed in the recent X-ray diffraction analysis of PSII crystals at 1.9 Å resolution from this lab (Umena et al. 2011, *Nature*, 473, 55-60), which showed that the OEC is consisted of 4 Mn, 1 Ca and 5 oxygens serving as oxo-bridges ( $\mu$ -oxo), forming a cubane-like  $Mn_4CaO_5$  cluster. However, the mechanisms of water oxidation, the location of two substrate water molecules involved in this reaction, and the role of  $Ca^{2+}$  in the  $Mn_4CaO_5$  cluster, remain open questions.

This study aims to understand the mechanisms of water splitting by means of X-ray crystallography. The current study consists of three main phases. The first phase focuses on the role of  $Ca^{2+}$  in the  $Mn_4CaO_5$  cluster, by substitution of  $Ca^{2+}$  with  $Sr^{2+}$  in the catalytic center, purification, crystallization, and crystal structural analysis of  $Sr^{2+}$ -substituted PSII to reveal structural changes upon  $Sr^{2+}$ -substitution. To achieve this goal, I established suitable protocols for purification and crystallization of  $Sr^{2+}$ -substituted PSII, and improved the resolution of  $Sr^{2+}$ -PSII crystals remarkably from previously reported 6.5 Å to 2.1 Å. Structural analysis of  $Sr^{2+}$ -substituted PSII showed that the position of  $Sr^{2+}$  was moved slightly toward outside of the  $Mn_3SrO_4$  cubane relative to the position of  $Ca^{2+}$ , resulting in several small changes in the Sr-Mn distances. The largest change, however, was found in the bond length between Sr and one of the water ligand W3, which was 2.5-2.7 Å, whereas the bond length between Sr and another water ligand W4 was not much changed (2.3 Å). These results strongly suggest that W3 binds rather weakly to  $Ca^{2+}$ , and is more mobile than W4, implying that W3 may have a higher reactivity than W4, thus forming part of the substrate water molecules.

The second phase of this study contained the improvement of the native PSII crystals toward a more detailed elucidation of the PSII structure. Improvement in the reproducibility of PSII crystals and higher diffraction limit beyond 1.9 Å could be seen, but the resulted crystals still had large mosaic spread and need to be further improved.

The third phase is the study of the structures of intermediate states by utilization of the emerging techniques of X-ray free electron lasers (XFEL), by taking advantage of its extremely strong intensity and ultra-short (fs) pulses (10-20 fs for each pulse in this study). Two datasets were collected for the first time from PSII macro-crystals at cryogenic temperature using the hard XFEL of the BL3 of SACLA, Japan. Preliminary analyses showed that the XFEL diffraction datasets were processed to resolutions of 3.0-3.2 Å (some crystals diffracted maximally to 1.88 Å), showing the possibility of utilizing this technique to refine the structure of the  $Mn_4CaO_5$  cluster in its different oxidation states before the radiation damage is propagated.

## 論文審査結果の要旨

上記学生は主に構造生物学的手法を用いて、光化学系 II 複合体 (以下 PSII とする) の構造と機能に関する研究を行った。PSII は太陽の光エネルギーを利用して生物利用可能な化学エネルギーに変換すると同時に、水を分解し酸素を発生する反応を触媒している重要な複合体である。PSII は 17 種の膜タンパク質と 3 種の膜表面性タンパク質を含む、分子量 350 kDa の超分子複合体であるが、その立体構造は 1.9 Å 分解能で解析されており、それにより水分解を直接触媒している  $Mn_4CaO_5$  クラスターの構造が明らかになった。しかし、当該クラスター中の Ca イオンの役割や、反応にともなうクラスターの構造変化は明らかになっておらず、そのため、水分解反応の詳細な機構は分かっていない。これらの課題を解決するため、上記学生は博士課程在籍中、次の 3 つのテーマについて研究を行い、成果を得た。① PSII 複合体中の Ca イオンを Sr で置換した PSII 試料を調製し、その精製・結晶化・結晶の質の向上を行った。その結果、構造解析に使用することができる、十分高い分解能 (2.1 Å) を与える、Sr で置換した PSII の結晶を得た。② Sr で置換した PSII の構造を 2.1 Å 分解能で解析し、得られた構造を Ca を持った PSII の構造と比較し、Sr 置換による  $Mn_4CaO_5$  クラスターの構造変化を明らかにした。その結果、Sr 置換により、Ca に配位していた 2 つの水分子のうち、W3 と呼ばれる水分子と Sr の結合距離が著しく長くなったことがわかった。この結果は、W3 が Ca との結合が弱く、その結合位置が変化しやすいことを示しており、従って、W3 が高い反応性を持っており、水分解の反応サイクルにおいてその位置を移動し、O-O 結合に参加する可能性が高いことが示唆された。③ PSII の水分解反応中間体の構造を解析するため、native PSII 結晶の質の改善を試み、さらに得られた結晶を X 線自由電子レーザー-SACLA を用いて回折実験を行い、大きな PSII 結晶を用いて、低温条件で X 線自由電子レーザーによる良好な回折パターンが得られることを初めて確認した。これらの成果の一部はすでに論文として発表された。これらのことから、当該学生が博士学位の授与に十分値すると判断した。