

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24年 6月 6日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21750012

研究課題名（和文）光合成細菌の電荷分離反応に関わる機能分子のエネルギー準位相関解明

研究課題名（英文）Energetics of functional molecules for the light-induced charge separation in photosynthetic bacteria

研究代表者

加藤 祐樹 (KATO YUKI)

東京大学・生産技術研究所・助教

研究者番号：10376634

研究成果の概要（和文）：本研究は、驚異の光エネルギー変換効率を実現している光合成細菌の電荷分離反応につき、効率の要因の一つとされる機能分子エネルギー準位相関の解明を目的に、電子供与体・受容体の酸化還元電位を分光電気化学計測法により実測した。さらに生物種による異同を調べることで、電荷分離反応における機能分子エネルギー準位の調節機構を明らかにし、光合成反応の必然性と許容性について議論を展開した。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the energetics for the light-induced charge separation in photosynthetic bacteria, in which redox properties of cofactors were obscure because of insufficient measurement technique, redox potentials of the cofactors have been determined in the present work by spectroelectrochemistry using an optically-transparent thin-layer electrode cell. Further, by investigating the cofactors' redox potentials in various species, we have discussed the inevitability and admissibility of the energetics in the photosynthetic reactions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：生物物理化学・光合成

## 1. 研究開始当初の背景

光合成は生物が営む生理作用で、光エネルギーを化学エネルギーに変換する。その反応量子収率はほぼ100%に近いので、光合成は非常に優れた光エネルギー変換システムだといえる。

葉緑体に見られる光合成は、光エネルギー変換により水と二酸化炭素を原料にして有機物を合成し酸素を放出する。このような酸素

発生型生物の祖先とされる光合成細菌（紅色と緑色型がある）は、硫化水素や水素あるいは有機酸と二酸化炭素を原料にして有機物を合成する。いずれの光合成生物も、反応中心と呼ばれる部位で、クロロフィルあるいはバクテリオクロロフィルの二量体（これをスペシャルペアと呼ぶ）の光励起と電子受容体への励起電子授受という電荷分離反応が起こり、これを駆動力にして一連の電子移動とそれに

伴うプロトン輸送を行なっている。安定な電荷分離状態と引き続く高速電子伝達が、逆反応（電荷再結合）を抑制し、100%に近い量子収率を実現していると考えられるが、その要因はスペシャルペアと電子受容体を含む電子伝達機能分子の空間配置（距離・配向）と電子エネルギー準位の巧妙な調節にあるとされる。

光合成反応中心における機能分子の空間配置は、1984年に報告された紅色光合成細菌のX線結晶構造解析の結果を皮切りに、詳細が明らかにされつつある。近年の技術の向上により、紅色光合成細菌では2.0 Å以下の分解能で、酸素発生型光合成生物では3.0 Å程度の分解能で構造が決定され、機能分子の空間配置と電子伝達経路が原子レベルで明らかにされてきた（緑色光合成細菌については、まだ報告例はない）。

一方、反応中心機能分子の電子エネルギー準位、すなわち酸化還元電位は完全に明らかにされてるとはいえず、部分的には推測にとどまる。実測できていない理由は、高電位・低電位領域で機能分子を安定的に酸化還元する手段が見出されていないからだといえる。したがって、反応中心における電子伝達機構については、電子伝達経路は原子レベルでの可視化が進んでいる一方で、物理化学的特性の理解は立ち遅れているのが現状であった。

## 2. 研究の目的

本研究は、酸素発生型で水分解→酸素発生を担う重要な器官である光化学系 II と、その祖先とされる紅色光合成細菌を対象にして、次のような研究から、電子エネルギー準位相関の解明を目指し、光合成反応の必然性と許容性について議論を行うこととした。

(1) 酸素発生型光化学系 II におけるエネルギー準位相関解明：光合成初期過程では、二つの光化学系 (PS: photosystem) における電荷分離反応と続く一連の電子伝達反応により、水の酸化と化学エネルギー-NADPH と ATP の生成が行われている。水の酸化は、PS II が担い、一次電子供与体 P680 と受容体フェオフィチン (Phe) *a* との電荷分離によって生じる P680<sup>+</sup>が酸化力の根源とされるが、この酸化力の強さ、すなわち酸化還元電位  $E_m$  は、未だ実測できないため、光合成研究における最大の関心事の一つとなっている。そこで、Phe *a* や二次電子受容体プラストキノン  $Q_A$  の  $E_m$  と速度論的解析によって得られる自由エネルギー差  $\cdot G$  を基に、これまで P680 の  $E_m$  が推測されてきたが、 $E_m$  の実測値には誤差が大きく、また研究者間でばらつきがあるため、P680 の  $E_m$  の推測値 (+1100 ~ +1260 mV) を含め PS II のエネルギー論には不確定な部分が多く残る。こうした状況を鑑み、我々はこの不確定性は従来  $E_m$  の測定に供されてきた酸化還元滴定法によるものと考え、本研究では分光電気化学的

手法の適用により、Phe *a* と  $Q_A$  の  $E_m$  を統一的に計測し、PS II のエネルギー論を再考することとした。

(2) 紅色光合成細菌反応中心におけるエネルギー準位相関解明：光化学系 II に加え、紅色光合成細菌を実験対象とする第一の理由は、光合成反応中心の中では現時点で唯一、電荷分離を担う一次電子供与体 (スペシャルペア) と一次電子受容体の両者の酸化還元電位を実測できる系だと考えるからである。紅色光合成細菌の一次電子供与体 870 については既に計測例があり、一方 BPheo はこれまでに実測されていないが、近い電位領域にあると考えられる光化学系 II の計測法が適用できれば、BPheo の電位の実測可能性は高まるものと想定される。

以上を鑑みて、本研究は、紅色光合成細菌の一次電子供与体 P870 の電位 ( $E_m$ (P870/P870<sup>+</sup>)) と BPheo *a* の電子受容電位 ( $E_m$ (BPheo/BPheo<sup>+</sup>)) を分光電気化学計測法により実測し、電荷分離反応における機能分子エネルギー準位相関の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

申請者がこれまでに、主に光化学系 I で培ってきた分光電気化学的手法を展開することで、光化学系 II・紅色光合成細菌における機能分子の酸化還元電位計測を図る。ただし、Phe・BPhe など電位領域が低い機能分子の酸化還元電位計測には、従来の化学酸化還元滴定法において問題とされてきた次の課題の解決がまず先決だといえる。

(1) 一般的な滴定法自体に起因することとして、酸化・還元剤の滴下により系全体の酸化還元平衡が得られたかどうかは見極めが難しいため、系の平衡電位と目的物の酸化還元特性の相関が必ずしも正確に測定できているとはいえない

(2) Pheo を還元するのに、ジチオナイト (亜二チオン酸ナトリウム:  $Na_2S_2O_4$ ) を用いているが、還元力を高めるために、系を生理的条件から外れたアルカリ性 (~pH 11) にしている

以上の問題に対し、薄層電解セルを用いた分光電気化学法の適用と適切な電位を持つ電子メディエーターの選択により、まず (i) が一挙に解決され、高精度な計測が期待できる。申請者は P700 などを対象に、各電極電位に制御してから数十秒程度で酸化還元平衡に達することが観測できており、理論曲線とほぼ一致し誤差 ±2 mV と高精度な測定を実現できている。(2) に関しては、電極を用いると pH に関係なく系の電位を任意に制御できるが、実際の制約は、水溶液だと水素発生電位 (上述のプロトンの酸化還元平衡電位に過電圧が加わったもの) となる。この水素化電圧が最も大きいものとして水銀が知られ、金が水銀

と容易に合金化することに着目すると、金網電極に水銀を電解メッキすれば水銀メッキ網電極が作成できる。これを薄層電解セルの作用極とすれば、これまで成し得なかった卑な電位領域での分光電気化学測定が初めて可能になると考えられる。

以上の方針を基に、以下に示す実験内容を計画し、遂行した。

- ①低電位領域における分光電気化学法の測定条件確立
- ②電子メディエーターの合成と評価
- ③光化学系 II における Phe *a* の電子受容電位計測
- ④第二電子受容体 Q<sub>A</sub> の電位計測
- ⑤紅色光合成細菌 P870 の電位計測
- ⑥BRC における BPhen の電位計測
- ⑦BRC における Q<sub>A</sub> の電位計測

#### 4. 研究成果

##### (1) PSII における Phe *a* の電位計測

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* から分画した PSII を用いて、水銀メッキ網電極を用いた低電位領域における分光電気化学法を適用したところ、従来では不可能であった生理的 pH での測定が可能となり、結果として pH 6.5 で  $-505 \pm 6$  mV と決定した(図 1; *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106, 17356-17370, 2009)。これは 30 年前に報告されていた値 ( $-610 \pm 30$  mV@pH 11) よりも 100 mV 貴であるが、本手法によってより実態に近づいた電位値を提示できた

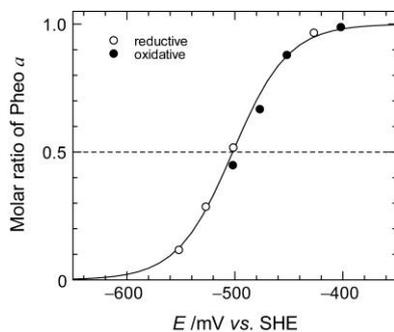


図 1 分光電気化学計測によって得られた Phe *a* のネルンストプロット

いえる。

##### (2) PSII における Q<sub>A</sub> の電位計測

二次電子受容体 Q<sub>A</sub> については、蛍光法と電気化学法を組み合わせることで、新たな分光電気化学的計測手法を確立し、*T. elongatus* の光化学系 II において  $-140$  mV と決定した(図 2; *Biochemistry*, 48, 10682-10684, (2009))。この結果と先の Phe *a* の結果より、自由エネルギー差  $\cdot G$  は  $-300 \sim -370$  mV にはずだとはいえ、酸化還元電位測定の結果により初めてエネルギー相関

を提示できた(図 3)。さらにこれらの電位を基に既報の速度論的解析で得られた結果をあてはめると、P680 の電位は  $+1170$  mV  $\sim$   $+1210$  mV にはずだと結論付けた。

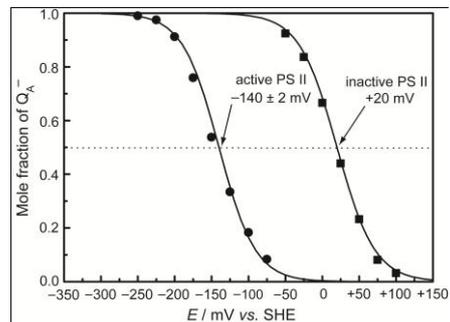


図 2 分光電気化学計測によって得られた Q<sub>A</sub> のネルンストプロット

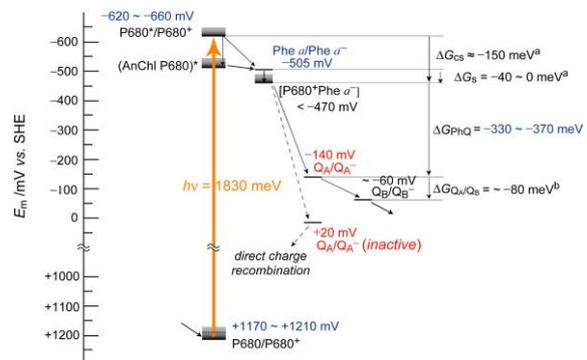


図 3 Phe *a* と Q<sub>A</sub> の酸化還元電位を基にしたエネルギー準位相関図。ΔG<sub>CS</sub>、ΔG<sub>S</sub> の値(a)は Vasil'ev *et al.*, *BBA*, 1276, 35 (1996) を、ΔG<sub>Q<sub>A</sub>/Q<sub>B</sub></sub>(b)は Minagawa *et al.*, *Biochemistry*, 38, 770 (1999)を参考にしてしている。

##### (3) PSII の電位相関の生物種依存性

前年度までに確立した計測技術をもとに、さまざまな酸素発生型 PSII を用いて、Q<sub>A</sub> の酸化還元電位の測定を行った。具体的には、前年度に計測に成功したシアノバクテリア *T. elongatus* に加えて、高等植物ホウレンソウ、紅藻 *Cyanidium caldarium*、緑藻 *Chlamydomonas reinhardtii* の 4 種を実験対象とした。測定の結果、Q<sub>A</sub> の電位は生物種によって異なり、それぞれ  $-140 \pm 2$  mV、 $-162 \pm 3$  mV、 $-104 \pm 4$ 、 $-171 \pm 3$  mV と最大で 67 mV 異なることが明らかとなった(*FEBS Lett.*, 584, 1526-1530, (2010))。こうした違いは、他の電子伝達機能分子の電位にも影響してくるものと考えられ、これまで報告されている速度論的解析によるデータとつきつめると、水酸化を担う P680 の電位も生物種によって異なる可能性があるといえる。

##### (4) BRC における機能分子電位相関

*Rb. sphaeroides*、*Bl. viridis*、*Rps. palustris* の 3 種類の紅色光合成細菌につい

て、既報を参考に反応中心蛋白質 (RC) を精製した。まず、分光電気化学的手法により P の電位を測定したところ、いずれも一電子酸化還元反応が観測でき *Rb. Sphaeroides* では +495 mV vs. SHE、*Bl. viridis* では +513 ± 3 mV、*Rps. palustris* では +511 ± 1 mV と決定できた (図 4)。

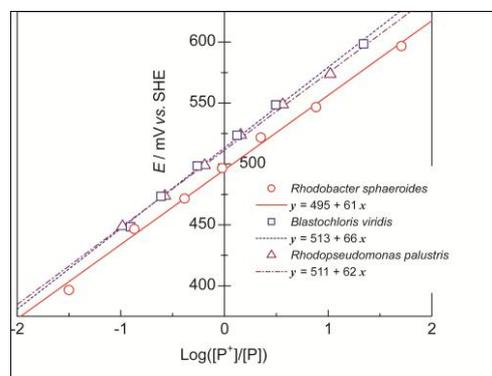


図 4 分光電気化学計測によって得られた BRC における一次電子供与体 P のネルンストプロット

今回決定した P の電位は +495 ~ +513 mV と 20 mV 程度の範囲に収まっているが、光励起エネルギーを加えて P\* の電位を算出すると -935 ~ -767 mV と 100 mV 以上のばらつきがある。これまで生物間での電位の差異は注目されてこなかったが、本研究の結果から P よりもむしろ P\* の電位が生物によって大きく異なるといえる。また、既往の研究において *Rb. sphaeroides* の P865\* と BPh<sub>a</sub> の電位差は 170 ~ 260 mV と算出されており、この値を参考にすると *Rb. sphaeroides*、*Rps. palustris* の BPh<sub>a</sub> の電位はそれぞれ -765 ~ -675 mV、-739 ~ -649 mV と推測できる。このように BPh<sub>a</sub> の還元力が強いとすると、本研究で確立した分光電気化学的手法でも測定は困難であるといえる。また、*Bl. viridis* の BPh<sub>b</sub> の電位は -600 mV 以下である可能性が示唆されたが、その場合 P960\* と BPh<sub>b</sub> の電位差は 170 mV 以下となり P865\* と BPh<sub>a</sub> の電位差とは大きく異なるといえる。P\* の電位の差異を明確に出来たことにより、P\* と BPh 間の電位差も生物によって大きく変わると推察できる (論文取り纏め中)。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① Y. Kato, T. Shibamoto, S. Yamamoto, T. Watanabe, N. Ishida, M. Sugiura, F. Rappaport, A. Boussac, Influence of the PsbA1/ PsbA3, Ca<sup>2+</sup>/Sr<sup>2+</sup> and Cl<sup>-</sup>/Br<sup>-</sup>

exchanges on the redox potential of the primary quinone Q<sub>A</sub> in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* as revealed by spectroelectrochemistry, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, 2012 (印刷中), 査読有。

- ② 加藤祐樹, 渡辺 正, 「分光電気化学法による光合成光化学系 II 電子受容分子の酸化還元電位計測」, 生物物理, 51, 134-135 (2011), 査読有, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/51/3/51\\_3\\_134/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/51/3/51_3_134/_pdf)

- ③ M. Sugiura, Y. Kato, R. Takahashi, H. Suzuki, T. Watanabe, T. Noguchi, F. Rappaport, A. Boussac, “Energetics in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* with a D1 protein encoded by either the *psbA<sub>1</sub>* or *psbA<sub>3</sub>* gene”, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, 1797, 1491-1499 (2010), 査読有, doi:10.1016/j.bbabi.2010.03.022.

- ④ T. Shibamoto, Y. Kato, R. Nagao, T. Yamazaki, T. Tomo, T. Watanabe, “Species-Dependence of the Redox Potential of the Primary Quinone Electron Acceptor Q<sub>A</sub> in Photosystem II Verified by Spectroelectrochemistry”, *FEBS Lett.*, 584, 1526-1530 (2010), 査読有, doi:10.1016/j.febslet.2010.03.002.

- ⑤ T. Shibamoto, Y. Kato, M. Sugiura, T. Watanabe, “Redox Potential of the Primary Plastoquinone Electron Acceptor Q<sub>A</sub> in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* Determined by Spectroelectrochemistry”, *Biochemistry (Rapid Reports)*, 48, 10682-10684 (2009), 査読有, doi: 10.1021. bi901691j.

- ⑥ Y. Kato, M. Sugiura, A. Oda, T. Watanabe, “Spectroelectrochemical Determination of the Redox Potential of Pheophytin *a*, the Primary Electron Acceptor in Photosystem II”, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 106, 17365-17370 (2009), 査読有, doi: 10.1073/pnas.09053 88106.

[学会発表] (計 14 件)

- ① 山本昌一、芝本匡雄、加藤祐樹、杉浦美羽、Alain Boussac、渡辺正、酸素発生複合体における Ca<sup>2+</sup>/Sr<sup>2+</sup> および Cl<sup>-</sup>/Br<sup>-</sup> 置換が光化学系 II のエナジェティクスに及ぼす影響、第 53 回日本植物整理学会年会、2012 年 3 月 16 日、京都産業大学
- ② 加藤祐樹 (招待講演)、Energetics within photosystem II based on redox potentials revealed by spectroelectrochemistry、第 49 回日本生物物理学会、2011 年 9 月 16

- 日、兵庫県立大学
- ③中島 聡、加藤祐樹、渡辺 正、紅色光合成細菌反応中心一次電子供与体の分光特性と酸化還元電位、第 19 回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー、2011 年 7 月 9 日、大阪大学
- ④ Y. Kato, T. Shibamoto, A. Oda, S. Yamamoto, M. Sugiura, T. Watanabe, Spectroelectrochemical Study on Energetics within Photosystem II Composed of Either PsbA1 or PsbA3 from *Thermosynechococcus elongatus*, Gordon Research Conferences -2011 Photosynthesis, 2011 年 6 月 14 日, Davidson, アメリカ
- ⑤ Y. Kato, T. Watanabe (招待講演), Energetics within photosystem II based on the redox potentials of cofactors on the acceptor side determined by spectroelectrochemistry, Molecular Mechanism of Photosynthetic Energy Conversion: The Present Research and Future Prospects, 2010 年 12 月 4 日, 岡崎コンファレンスセンター
- ⑥加藤祐樹, 芝本匡雄, 長尾遼, 山崎拓也, 杉浦美羽, 鞆達也, 渡辺 正, Spectroelectrochemical investigation of redox potential of the primary quinone electron acceptor  $Q_A$  in photosystem II for various species, 第 48 回日本生物物理学会年会、2010 年 9 月 20 日, 東北大学
- ⑦ Y. Kato, T. Shibamoto, A. Oda, M. Sugiura, T. Watanabe, Spectroelectro-chemical determination of the redox potentials of electron acceptors, pheophytin *a* and primary quinone  $Q_A$  in photosystem II, The 15th International Congress of Photosynthesis, 2010 年 8 月 23 日, 中国・北京
- ⑧ Y. Kato, M. Sugiura, T. Watanabe, Energetics within photosystem II based on the redox potentials of pheophytin *a* and primary quinone  $Q_A$  determined by spectroelectro-chemistry, Molecular Basis of Photosynthetic Energy and Electron Transfer and Related Respiratory Processes ~Satellite Meeting, 2010 年 8 月 18 日, Nanyang Technical University, シンガポール
- ⑨加藤祐樹, 芝本匡雄, 杉浦美羽, 渡辺 正, 分光電気化学法による光化学系 II 電子受容分子の酸化還元電位計測, 第 37 回生体分子科学討論会, 2010 年 6 月 18 日, 山口大学
- ⑩加藤祐樹, 芝本匡雄, 杉浦美羽, 渡辺 正,

- 分光電気化学計測でみる光化学系 II コファクターのエネルギー準位相関, 第 1 回日本光合成学会公開シンポジウム, 2010 年 6 月 4 日, 東京大学
- ⑪加藤祐樹, 芝本匡雄, 杉浦美羽, 渡辺 正, 分光電気化学計測による光合成光化学系 II 電子伝達分子のエネルギー準位相関の解明, 日本化学会第 90 春季年会, 2010 年 3 月 26 日, 近畿大学
- ⑫加藤祐樹, 杉浦美羽, 渡辺 正, *Thermosynechococcus elongatus* の光化学系 II 一次電子受容体フェオフィチン *a* の酸化還元電位: コアタンパク質 D1:1 と D1:3 の違いが電位に及ぼす影響について, 第 51 回日本植物生理学会年会, 2010 年 3 月 19 日, 熊本大学
- ⑬加藤祐樹, 杉浦美羽, 渡辺 正, Redox potential of pheophytin *a* in photosystem II measured by spectroelectrochemistry, 第 47 回日本生物物理学会年会, 2009 年 10 月 30 日, 徳島文理大学
- ⑭加藤祐樹, 仲村亮正, 杉浦美羽, 渡辺 正, Redox potentials of chlorophyll *a* and pheophytin *a* in the electron transfer chain of oxygenic photosynthesis determined by spectroelectrochemistry, 14th International Conference on Biological Inorganic Chemistry, 2009 年 7 月 26 日, 名古屋国際会議場

[図書] (計 1 件)

- ①加藤祐樹, 分光電気化学法による電子伝達機能分子の酸化還元電位計測, 伊藤繁, 南後守, 杉浦美羽編, 化学同人, 「光合成のエネルギー・物質変換—人工光合成を目指して」, 印刷中。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

加藤 祐樹 (KATO YUKI)  
東京大学・生産技術研究所・助教  
研究者番号: 10376634