

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25291033

研究課題名(和文) 光合成による光エネルギー変換：光駆動電子移動の分子制御機構の解明

研究課題名(英文) Photosynthetic light-energy conversion: Clarification of the molecular mechanism of light-driven electron transfer

研究代表者

野口 巧 (Noguchi, Takumi)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：60241246

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：フーリエ変換赤外分光法 (FTIR) などの分光学的手法と量子化学計算を用いて、植物およびシアノバクテリアにおいて水分解・酸素発生反応を担う光化学系 II 蛋白質の電子移動反応の制御機構を調べた。その結果、キノン電子受容体、非ヘム鉄、チロシンYZ、YDなどの各電子伝達成分の電子・プロトン移動反応は周辺蛋白質との直接的な相互作用および蛋白質内のプロトン移動経路、さらに電子伝達成分間の長距離相互作用によって制御されることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The molecular mechanism of regulation of electron transfer reactions in photosystem II (PSII) protein complexes, which perform photosynthetic water oxidation in plants and cyanobacteria, was investigated using spectroscopic method such as Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) and quantum chemical calculations. From the obtained results, it was shown that electron-proton transfer reactions of cofactors in PSII, such as quinone electron acceptors, non-heme iron, and redox-active tyrosines YZ and YD, are regulated by immediate molecular interactions with surrounding proteins, proton transfer pathways, and long-range interactions between cofactors.

研究分野：光合成の生物物理学

キーワード：電子移動 光合成 光化学系II 赤外分光法 量子化学計算 酸化還元電位 水分解 プロトン移動

1. 研究開始当初の背景

光合成は、生命が 40 億年の進化の過程によって獲得した極めて高性能な生体光エネルギー変換システムである。それは、生態系の 1 次エネルギー、及び呼吸に必要な酸素の供給源として地球上の生命の生存を支えている。また炭素循環を通して地球環境を維持する役割を担っている。光合成の基本的な原理は、光エネルギーによる電気分解であり、水から電子を引き抜き、その電子によって二酸化炭素を還元して、化学エネルギーとしての糖を合成する。こうした光合成における電子移動過程は、100%に近い極めて高い量子効率で行われている。それは、光合成蛋白質に結合した各電子伝達成分の絶妙な空間配置（位置及び配向）と精密なエネルギー制御によって実現する。一方、光強度や温度変化などの環境変化に応じて、電子伝達成分の酸化還元電位を変化させ、電荷再結合を促して、過剰な光反応による蛋白質の損傷を抑えるしくみも存在する。最近の高分解能 X 線結晶構造によって、光合成蛋白質における電子伝達成分の位置および構造がほぼ明らかとなった。しかし、各成分の酸化還元電位を決定する要因や、環境変化に応じた電子移動反応の制御機構については未だほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究は、こうした光合成反応における電子移動反応の制御メカニズムを原子・分子レベルで明らかにすることを目的とする。そのため、光合成電子伝達鎖の酸化側末端に位置し、光エネルギーによる水分解によって水から電子を獲得する機能を持つ光化学系 蛋白質に注目して研究を行った。光化学系は、環境変化に応答する様々な制御機構を持ち、光合成全体の活性をコントロールする重要な蛋白質である。赤外分光などの分光的手法と量子化学計算を用い、(1)各電子伝達成分の酸化還元電位の決定要因、および(2)環境変化による酸化還元電位および電子移動反応の制御のしくみ、の解明を目指して研究を行った。

3. 研究の方法

光化学系 膜標品または光化学系 蛋白質複合体は、ハウレンソウおよびシアノバクテリアから調製した。定常光またはパルスレーザーからの閃光を用いて、光化学系の各電子伝達成分（マンガングラスタ、チロシン Y<sub>Z</sub>, Y<sub>D</sub>, キノン電子受容体 Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub>, 非ヘム鉄、フェオフィチン電子受容体、など）の光反応の際の光誘起フーリエ変換赤外 (FTIR) 差スペクトルを測定した。また、FTIR 差スペクトル法と電気化学セルと組み合わせた FTIR 分光電気化学計測によって、電子伝達成分の酸化還元電位を求め、赤外バンドの振動数から得られる分子相互作用と酸化還元電位との関係を調べた。さらに、密度汎関数法 (DFT)

や、広い範囲での蛋白質領域を取り込んだ量子力学/分子力学法 (QM/MM) による量子化学計算を行い、基準振動解析による観測赤外バンドの帰属、およびエネルギーと分子相互作用の関係についての理論的考察を行った。さらに、水分解マンガングラスタを除去した光化学系 試料を用いて、マンガングラスタの有無がキノ電子受容体および非ヘム鉄の構造・電位に与える効果を検出し、光化学系における長距離相互作用と電位制御の分子メカニズムを調べた。

4. 研究成果

(1) キノン電子受容体 Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> の電子移動反応の制御機構

キノ電子受容体の酸化還元電位決定要因

キノ電子受容体 Q<sub>A</sub> および Q<sub>B</sub> を構成するプラストキノ (PQ) の様々な水素結合複合体モデルについて DFT 計算を行い、水素結合数と酸化還元電位 (E<sub>m</sub>) との相関を調べた。その結果、PQ の C=O 基への水素結合数と E<sub>m</sub> には線形関係があり、1 水素結合あたり 100-200 mV の E<sub>m</sub> 上昇があることが示された。また、DFT 計算による振動解析と Q<sub>A</sub>, Q<sub>B</sub> の光誘起 FTIR 差スペクトルから、Q<sub>A</sub> は対称的な 2 つの水素結合を持つのに対し、Q<sub>B</sub> は非対称的な 3 つの水素結合を持つことが明らかとなった (図 1)。このことから、この水素結合数の違いが Q<sub>A</sub> および Q<sub>B</sub> の E<sub>m</sub> の違いの主原因であることが示された。

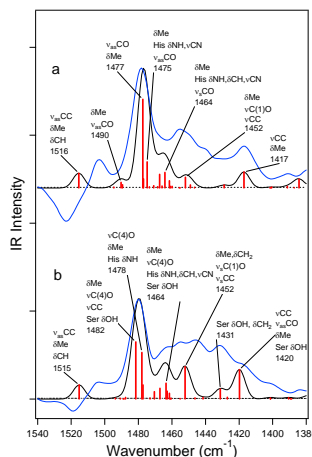


図 1. キノン電子受容体 Q<sub>A</sub>(a) および Q<sub>B</sub>(b) の光誘起 FTIR スペクトルと基準振動解析による帰属

末端キノ電子受容体 Q<sub>B</sub> の酸化還元電位の計測および Mn クラスタ除去の効果

光化学系における末端キノ電子受容体 Q<sub>B</sub> の酸化還元電位を、光誘起 FTIR 差スペクトル法と分光電気化学計測を用いて初めて測定し、およそ +90 mV と見積もった (図 2)。さらに、水分解マンガングラスタを除去した試料について、Q<sub>B</sub> の酸化還元電位を測定し、未処理試料の値と比較した。その結果、マンガングラスタ除去によって Q<sub>A</sub> の電位は 150 mV 程上昇するのに対し、Q<sub>B</sub> の電位はほとんど変化せず、それらの電位ギャップが小さくなることが示された。この電位ギャップの減少は、Q<sub>A</sub> と P680\* 間の直接的な電荷再結合が促す。これが、マンガングラスタ不活性化の

際の光化学系 の光保護機構の分子メカニズムであることが明らかとなった。

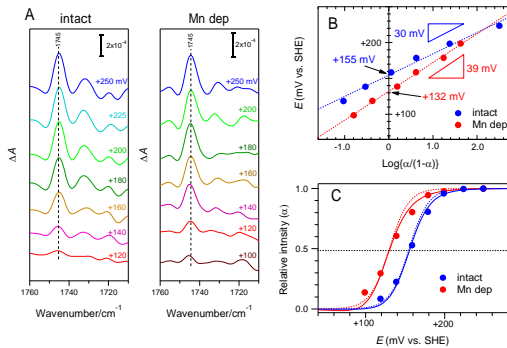


図2 . FTIR 分光電気化学計測による末端キノン電子受容体  $Q_B$  の酸化還元電位測定

### (2) 非ヘム鉄の酸化還元電位制御

FTIR 電気化学計測によって、 $Q_A$  と  $Q_B$  を架橋する非ヘム鉄の酸化還元電位を見積り、Mn クラスタ除去の効果を調べた。その結果、Mn クラスタ除去により、非ヘム鉄の近傍に存在するアミノ酸残基への構造変化と+18 mV の酸化還元電位の変動が認められた (図3)。この結果によって、光化学系 における酸化側と還元側との長距離相互作用による電子移動制御機構の存在が明確に示された。

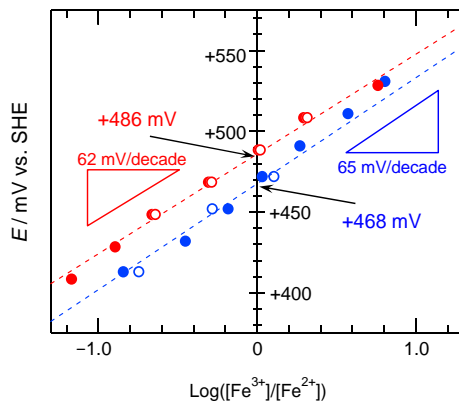


図3 . FTIR 電気化学計測により求めた非ヘム鉄の酸化還元電位。青：未処理 PSII ; 赤：マンガン除去 PSII

### (3) 異なるクロロフィル種を持つシアノバクテリアにおける電子移動制御

近赤外光を吸収するクロロフィル  $d$  を持つシアノバクテリア *Acaryochloris marina* におけるフェオフィチンおよび第一キノン電子受容体の分子相互作用を、FTIR 法を用いて調べた。その結果、これらの電子受容体はクロロフィル  $a$  を持つ通常のシアノバクテリアとは異なる水素結合相互作用を持つことが示された。*A. marina* は、この相互作用変化によって酸化還元電位を上昇させ、通常よりも小さなエネルギーで光合成を行うことを可能にしていることが明らかとなった。

### (4) チロシン $Y_Z$ 、 $Y_D$ の相互作用とプロトン共役電子移動反応

光化学系 において対称的に位置するチロシン  $Y_Z$  とチロシン  $Y_D$  は、いずれもクロロフィル P680 への電子供与体として働くが、 $Y_Z$  の電子移動反応は  $Y_D$  のそれに比べて著しく速く、 $Y_Z$  のみが水分分解系への直接的な電子受容体として機能する。そこで、これらのチロシンの反応性の違いの原因を解明するため、FTIR 法を用いて、 $Y_Z$  および  $Y_D$  の光酸化の際のプロトン放出反応を調べた。その結果、 $Y_Z$  の光酸化の際の FTIR 差スペクトルには、プロトン化したヒスチジンカチオンの NH 伸縮振動が観測され、 $Y_Z$  は酸化によって隣接するヒスチジン残基にプロトンを受け渡して中性ラジカルとなることが示された (図4B)。一方、Mes 緩衝剤の赤外バンドを用いたプロトン検出実験から、 $Y_D$  は光酸化によってプロトンを蛋白質外へ放出することが明らかとなった (図4A)。このプロトン移動距離の顕著

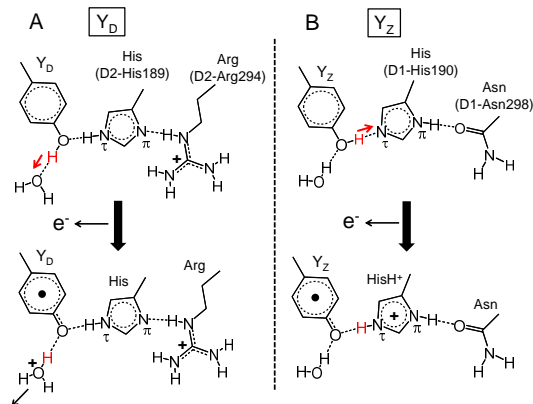


図4 . PSII におけるチロシン  $Y_D$  (A) および  $Y_Z$  (B) のプロトン共役電子移動反応

な違いが  $Y_Z$ 、 $Y_D$  の反応速度の大きな違いを生じ、水分分解反応の高い量子効率を実現させていることが示された。また、QM/MM 法による  $Y_Z$  近傍の水素結合構造の計算から、 $Y_Z$  の光酸化によって近傍の水分子が移動し、水素結合ネットワークの再構築が起こることが示された。この結果から、水分分解反応における  $Y_Z$  を経由する新規なプロトン移動機構を提唱した (図5)。

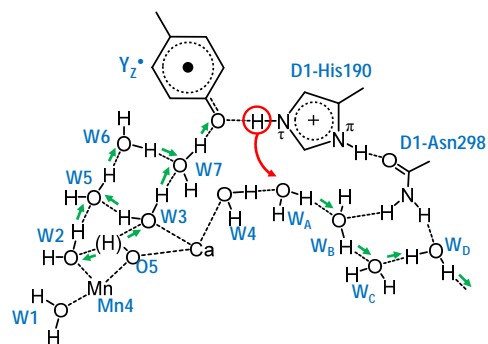


図5 . チロシン  $Y_Z$  を経由するプロトン移動反応

#### (5) Mn クラスタにおけるプロトン・電子移動反応

FTIR 法を用いて、水分解 Mn クラスタの近傍に存在する水分子ネットワークの OH 振動バンドを観測し、QM/MM 法による基準振動解析により、それらのバンドを帰属した。その結果、 $2800\text{ cm}^{-1}$  付近の幅の広いバンドが、強い水素結合を持つ水分子および複数の水分子に非局在化した OH 伸縮振動に由来することが明らかとなった (図 6)。Mn クラスタ中の Ca を除去することによりこのバンドが消失することから、これらの水分子の振動が、Ca 除去によって阻害される  $S_2$ - $S_3$  中間状態遷移におけるプロトン放出および基質水分子の取り込みに重要な役割を果たすことが示唆された。

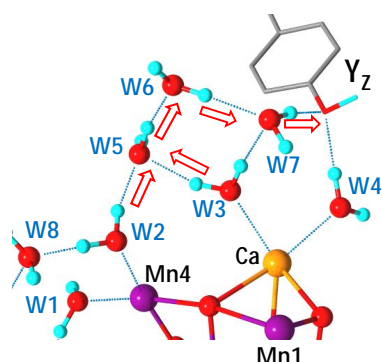


図 6 . マンガンクラスタ周りの水分子ネットワークの非局在化した OH 伸縮振動

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 19 件)

K. Ifuku and T. Noguchi, Structural coupling of extrinsic proteins with the oxygen-evolving center in photosystem II, *Front. Plant Sci.* 7, 84 (2016)

DOI: 10.3389/fpls.2016.00084 (査読有)

T. Nishimura, R. Nagao, T. Noguchi, J. Nield, F. Sato, and K. Ifuku, The N-terminal sequence of the extrinsic PsbP protein modulates the redox potential of Cyt  $b_{559}$  in photosystem II, *Sci. Rep.*, 6, 21490 (2016)

DOI: 10.1038/srep21490 (査読有)

S. Nakamura, K. Ota, Y. Shibuya, and T. Noguchi, Role of a water network around the  $Mn_4CaO_5$  cluster in photosynthetic water oxidation: A Fourier transform infrared spectroscopy and quantum mechanics/molecular mechanics calculation study, *Biochemistry*, 55, 597-607 (2016)

DOI: 10.1021/acs.biochem.5b01120 (査読有)

A. Mohamed, R. Nagao, T. Noguchi, H. Fukumura, and Y. Shibata, *Structure*

based modeling of fluorescence kinetics of photosystem II: Relation between its dimeric form and photoregulation, *J. Phys. Chem. B*, 120, 365-376 (2016)

DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b09103 (査読有)

C. Azai, Y. Sano, Y. Kato, T. Noguchi, and H. Oh-oka, Mutation-induced perturbation of the special pair P840 in the homodimeric reaction center in green sulfur bacteria, *Sci. Rep.*, 6, 19878 (2016)

DOI: 10.1038/srep19878 (査読有)

Y. Kato, R. Nagao, and T. Noguchi, Redox potential of the terminal quinone electron acceptor  $Q_B$  in photosystem II reveals the mechanism of electron-transfer regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, 620-625 (2016)

DOI: 10.1073/pnas.1520211113 (査読有)

S. Nakamura and T. Noguchi, Infrared detection of a proton released from tyrosine  $Y_D$  to the bulk upon its photo-oxidation in photosystem II, *Biochemistry*, 54, 5045-5053 (2015)

DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00568 (査読有)

Y. Yamanaka, Y. Kato, K. Hashimoto, K. Iida, K. Nagasawa, H. Nakayama, N. Dohmae, K. Noguchi, T. Noguchi, M. Yohda, and M. Odaka, Time-resolved crystal structures of the reaction intermediate of nitrile hydratase reveal a role for the cysteine-sulfenic acid ligand as a catalytic nucleophile, *Angew. Chem. Int. Ed.* 54, 10763-10767 (2015)

DOI: 10.1002/anie.201502731 (査読有)

Y. Sano, K. Endo, T. Tomo, and T. Noguchi, Modified molecular interactions of the pheophytin and plastoquinone electron acceptors in photosystem II of chlorophyll d-containing *Acaryochloris marina* as revealed by FTIR spectroscopy, *Photosynth. Res.* 125, 105-114 (2015)

DOI: 10.1007/s11120-014-0073-x (査読有)

R. Nagao, T. Tomo, and T. Noguchi, Effects of extrinsic proteins on the protein conformation of the oxygen-evolving center in cyanobacterial photosystem II as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy, *Biochemistry* 54, 2022-2031 (2015)

DOI: 10.1021/acs.biochem.5b00053 (査読有)

野口 巧, 光合成による水分解: 生命の巧みな光エネルギー変換のしくみ, *日本物理学会誌*, 70 巻, 742 - 751 (2015) (査読有)



有)  
T. Noguchi, Fourier transform infrared difference and time-resolved infrared detection of the electron and proton transfer dynamics in photosynthetic water oxidation, *Biochim. Biophys. Acta* 1847, 35-45 (2015)  
DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.06.009 (査読有)  
Y. Kato and T. Noguchi, Long-range interaction between the Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub> cluster and the non-heme iron center in photosystem II as revealed by FTIR spectroelectrochemistry, *Biochemistry* 53, 4914-4923 (2014)  
DOI: 10.1021/bi500549b (査読有)  
S. Nakamura, R. Nagao, R. Takahashi, and T. Noguchi, Fourier transform infrared detection of a polarizable proton trapped between photooxidized tyrosine Y<sub>2</sub> and a coupled histidine in photosystem II: Relevance to the proton transfer mechanism of water oxidation, *Biochemistry* 53, 3131-3144 (2014)  
DOI: 10.1021/bi500237y (査読有)  
T. Nishimura, C. Uno, K. Ido, R. Nagao, T. Noguchi, F. Sato, and K. Ifuku, Identification of the basic amino acid residues on the PsbP protein involved in the electrostatic interaction with photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 1447-1453 (2014)  
DOI: 10.1016/j.bbabi.2013.12.012 (査読有)  
R. Ashizawa and T. Noguchi, Effects of hydrogen bonding interactions on the redox potential and molecular vibrations of plastoquinone as studied by density functional theory calculations, *Phys. Chem. Chem. Phys.* 16, 11864-11876 (2014)  
DOI: 10.1039/C3CP54742F (査読有)  
Y. Shibata, W. Katoh, T. Chiba, K. Namie, N. Ohnishi, J. Minagawa, H. Nakanishi, T. Noguchi, and H. Fukumura, Development of a novel cryogenic microscope with numerical aperture of 0.9 and its application to photosynthesis research, *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 880-887 (2014)  
DOI: 10.1016/j.bbabi.2014.03.006 (査読有)  
C. Uno, R. Nagao, H. Suzuki, T. Tomo, and T. Noguchi, Structural coupling of extrinsic proteins with the oxygen evolving center in red algal photosystem II as revealed by light-induced FTIR difference spectroscopy, *Biochemistry* 52, 5705-5707 (2013)

DOI: 10.1021/bi4009787 (査読有)  
H. Suzuki, J. Yu, T. Kobayashi, H. Nakanishi, P. Nixon, and T. Noguchi, Functional roles of D2-Lys317 and the interacting chloride ion in the water oxidation reaction of photosystem II as revealed by Fourier transform infrared analysis, *Biochemistry* 52, 4748-4757 (2013)  
DOI: 10.1021/bi301699h (査読有)

[学会発表](計90件)

加藤 祐樹、石井 里奈、野口 巧、光合成光化学系IIにおけるMnクラスターと第一キノン電子受容体 Q<sub>A</sub> の長距離相互作用: ATR-FTIR による解析、日本化学会第96 春季年会、同志社大・京田辺キャンパス、2016年3月24-27日

長尾 遼、山口 元気、三富 達矢、野口 巧、光化学系IIの部位特異的変異導入による反応中心クロロフィルの電子構造の解明、日本植物生理学会年会、岩手大学、2016年3月18-20日

中村 伸、野口 巧、光化学系IIにおけるチロシン Y<sub>2</sub> 及び Y<sub>0</sub> の異なる機能の起源、日本植物生理学会年会、岩手大学、2016年3月18-20日

加藤 祐樹、石井 里奈、野口 巧、光化学系IIにおけるMnクラスターと第一キノン Q<sub>A</sub> の長距離相互作用: ATR-FTIR による解析、日本植物生理学会年会、岩手大学、2016年3月18-20日

Takumi Noguchi, Shin Nakamura, and Ryo Nagao, Role of Tyrosine Y<sub>2</sub> in proton-coupled electron transfer of water oxidizing reaction in photosystem II, The 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology, Academia Sinica, Taipei, November 15-18, 2015

Yuki Kato, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Redox potential of the secondary quinone electron acceptor Q<sub>B</sub> in photosystem II as revealed by FTIR spectroelectrochemistry,

International Meeting Photosynthesis Research for Sustainability - 2015, Crete, Greece, September 21-26, 2015

Shin Nakamura, Takumi Noguchi, FTIR evidence for proton release into the bulk upon photooxygenation of tyrosine D in photosystem II, International Meeting Photosynthesis Research for Sustainability - 2015, Crete, Greece, September 21-26, 2015

Yuki Kato, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, FTIR spectroelectrochemical measurement of the redox potential of the secondary quinone electron acceptor Q<sub>B</sub> in photosystem II, 日本生物物理学会年会、金沢、2015年9月13-15日

Motoki Yamaguchi, Ryo Nagao, and Takumi Noguchi, Electronic structure of the chlorophyll dimer P680 modified by site-directed mutation at a nearby amino acid residue in photosystem II, 日本生物物理学会年会、金沢、2015年9月13-15日

Shin Nakamura, Takumi Noguchi, FTIR detection of proton release from the redox-active tyrosine  $Y_D$  in photosystem II, 日本生物物理学会年会、金沢、2015年9月13-15日

Yuki Kato, Takumi Noguchi, FTIR Spectroelectrochemical study on long-range interaction between the  $Mn_4CaO_5$  cluster and the non-heme iron center in photosystem II, RIKEN Symposium series: "Metals in Biology" in Wako, Wako, June 16-17, 2015

加藤 祐樹、長尾 遼、野口 巧、光合成光化学系 II におけるキノン電子受容体  $Q_A \cdot Q_B$  間の電子伝達制御:  $Q_B$  の酸化還元電位計測に基づく解析、生体分子科学討論会、高崎、2015年6月12-13日

加藤 祐樹、長尾 遼、野口 巧、光合成における光化学系 II 第二キノン電子受容体  $Q_B$  の酸化還元電位計測、日本物理学会、早稲田大学、2015年3月21-24日

加藤 祐樹、長尾 遼、野口 巧、FTIR 分光電気化学法による光化学系 II 第二キノン  $Q_B$  の酸化還元電位計測 - $Q_A \cdot Q_B$  間の電位制御と光防御機構、日本植物生理学会年会、東京農業大学、2015年3月16-18日  
中村 伸、野口 巧、光合成水分分解反応におけるチロシン  $Y_2$  を経由する新規なプロトン移動機構、日本植物生理学会年会、東京農業大学、2015年3月16-18日

Takumi Noguchi and Shin Nakamura, Molecular mechanism of photosynthetic water oxidation revealed by infrared spectroscopy with quantum chemical calculations, International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability", June 2-7, 2014, Pushchino, Russia

Shin Nakamura and Takumi Noguchi, Vibrational analyses of the water oxidizing center in photosystem II using QM/MM calculations, International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability", June 2-7, 2014, Pushchino, Russia

Takumi Noguchi, Mechanism of photosynthetic water oxidation as studied by flash-induced FTIR difference and time-resolved IR spectroscopies, The XVIth International Conference on Time-Resolved Vibrational Spectroscopy,

May 19-24, 2013, Beppu, Oita, Japan

〔図書〕(計2件)

野口 巧、光合成の電子伝達系、光と生命の事典、朝倉書店、東京 pp. 64-65 (2016)

T. Noguchi, Spectroscopic analysis of the redox reactions of  $-$ -conjugated cofactors in photosynthetic reaction center, Chemical Science of  $-$ -Electron Systems (T. Akasaka, A. Osuka, S. Fukuzumi, H. Kandori, Y. Aso, Eds.), Chapter 40, pp. 675-694, Springer Japan (2015)

〔その他〕

名古屋大学理学研究科光生体エネルギー研究室ホームページ

<http://www.glab.phys.nagoya-u.ac.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

野口 巧 (NOGUCHI, Takumi)  
名古屋大学・大学院理学研究科・教授  
研究者番号: 60241246

### (2) 研究分担者

加藤 千尋 (KATO, Chihiro)  
神奈川県産業技術センター・化学技術部・  
専門研究員  
研究者番号: 50233804

### (3) 連携研究者

三野 広幸 (MINO, Hiroyuki)  
名古屋大学・大学院理学研究科・准教授  
研究者番号: 70300902

加藤 祐樹 (KATO, Yuki)  
名古屋大学・大学院理学研究科・助教  
研究者番号: 10376634