

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25410009

研究課題名(和文) 光合成水分解触媒マンガンクラスターの酸化還元特性の解明

研究課題名(英文) Redox property of water-oxidizing catalyst Mn cluster in photosynthesis

研究代表者

加藤 祐樹 (Kato, Yuki)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：10376634

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、光合成反応のうち最大の謎とされる水分解 酸素発生反応の分子メカニズムの解明を目的に、水分解触媒として機能するマンガンクラスターの酸化還元電位の計測に取り組んだ。フーリエ変換赤外差スペクトル法を分光電気化学法に適用した計測系を新たに構築して実測を行った。その結果、S0S1遷移の E_m はこれまでの予想に反して+200 mVよりも低いことを明らかにした。またこの測定に付随して、これまで実測例がなかった第二キノン電子受容体QBの E_m を初めて計測するに至り、第一還元電位は+93 mV、第二電位は+213 mVと決定した。これによりQAとの電位相関が明らかになり、電子伝達機構を解明した。

研究成果の概要(英文)：Photosystem II (PSII) extracts electrons from water at a Mn_4CaO_5 cluster using light energy and then transfers them to two plastoquinones, the primary quinone electron acceptor QA and the secondary quinone QB. This forward electron transfer is an essential process in light energy conversion. Meanwhile, backward electron transfer is also significant in photoprotection. Modulation of the redox potential (E_m) gap of QA and QB mainly regulates the forward and backward electron transfers in PSII. However, the full scheme of electron transfer regulation remains unresolved due to the unknown E_m value of QB. In this work, the E_m value of QB reduction was measured directly using spectroelectrochemistry in combination with light-induced Fourier transform infrared difference spectroscopy. The result explains the mechanism of PSII photoprotection with an impaired Mn_4CaO_5 cluster, in which a large decrease in the E_m gap between QA and QB promotes rapid charge recombination via QA⁻.

研究分野：生物物理化学

キーワード：光合成 水分解 酸素発生 電子伝達 光化学系 酸化還元電位 分光電気化学

1. 研究開始当初の背景

光合成における水分解反応は、光化学系 II 蛋白質複合体に結合したマンガクラーとよばれる機能分子が担う。マンガクラーは 4 つのマンガン原子と 1 つのカルシウム原子から構成され、2011 年に報告された分解能 1.9 Å の X 線結晶構造解析により、5 つの酸素原子で架橋された「ゆがんだ椅子」型の構造であることが明らかにされている (Umena et al., Nature 2011)。光化学系 II が捕集する光エネルギーにより一次電子供与体 P680 が光励起され、生じる P680⁺の酸化力が引き金となり、マンガクラーが駆動する。4 回の光照射(→光励起)で 2 分子の水が酸化され、酸素 1 分子が生じる。1 光子の照射ごとにマンガンの価数変化やプロトン放出が起き、5 つの(S₀ ~ S₄ と呼ばれる)中間状態を経て、最も不安定な S₄ から S₀ への遷移の際に酸素の発生が検出できる(S 状態サイクル)。分解能 1.9 Å で解析された構造は暗闇で安定な S₁ 状態のものと考えられ、今後この構造を基に、X 線構造解析だけでなく種々の分光法による各 S 状態の構造および基質水分子の位置決定などを通じて、動作機構の解明が進むと期待されるが、依然として反応機構には謎が多い。

物理化学的な観点からすると、マンガクラーが蓄える酸化力や各 S 状態遷移に伴う自由エネルギー変化など、水分解系のエネルギー論は全くの推測に留まる。酸化力のエネルギー的指標に酸化還元電位 E_m があるが、マンガクラーについては過去に誰も実測に成功していないからである。マンガクラーにおける水酸化に始まり、もう一つの光化学系 I 複合体での NADPH への還元に至るまで、種々の機能分子の E_m と自由エネルギー差 ΔG (ΔE_m × 素電荷) を基に電子伝達系を表すことができるが、マンガクラーを含め P680 や酸化還元活性のあるチロシン残基 Y_Z など高い電位領域にあるものは E_m 計測が困難なため、光励起した P680* から電子を受け取るフェオフィチン(Phe a) あるいは後続のプラストキノン Q_A の E_m から推測されてきたのである。

研究代表者は、このような状況を踏まえ、光合成電子伝達におけるエネルギー論を明らかにすべく、分光電気化学法を駆使して光化学系 I・II 機能分子の E_m の高精度計測に取り組んできた。光化学系 II においては従来の滴定法が抱える技術的な問題を指摘したうえで、分光電気化学法によりまず Phe a の生理的条件下における E_m 計測を目指した。電極系を用いることで還元力の問題などを払拭し、pH 6.5 で -505 ± 6 mV と高精度な計測に成功、30 年来の値より 100 mV ほど高いはずと主張した(Kato et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 2009)。続いて Q_A の電位計測にも着手し、-140 ± 2 mV と誤差を低減したうえで従来値より 60 mV 程度低いと結論付けた(Biochemistry, 2009)。長年「開きすぎている」

と問題視されてきた Phe a・Q_A 間の ΔE_m につき、熱化学的に見積もられる数値と近いことから本手法の有用性を論じたうえで、P680 の E_m は +1210 mV 程度にあることを提唱し、電子伝達系のエネルギー論を刷新した。

2. 研究の目的

本研究では、研究代表者がこれまでの研究で蓄積してきた分光電気化学計測技術のノウハウを最大限に活かし、連携研究者が展開してきた光誘起フーリエ変換赤外 (FTIR) 差スペクトル法を適用することで、新たに計測系を構築し、マンガクラーの E_m の実測に挑む。Phe a や P700 など機能分子の多くは、酸化還元状態を吸収分光法で容易に観測可能なのに対して、Q_A の光吸収帯は紫外領域にあり蛋白質の強い吸収と重なるものの酸化還元状態と蛍光強度に相関があることが知られ蛍光法が重用されてきたが、紫外領域に弱い吸収しか示さないマンガクラーはこうした分光法では観測できない。一方、分子の基準振動を検出する FTIR は、酸化還元反応に伴う分子あるいは分子周辺(蛋白質骨格やアミノ酸側鎖、基質、水分子など)のあらゆる構造変化を検出できる分光法であり、申請者はこの分光法により初めて各 S 状態遷移に伴う構造変化の分光的観測に成功しており(Noguchi et al, Biochemistry, 2001)、分光電気化学法に適用すれば実測が可能になるものと考えに至った。

3. 研究の方法

FTIR - 分光電気化学計測系の構築を第一に、厚さ 10 μm 程度の金メッシュ電極を用いた薄層電解セルを作製し、電子メディエーターと呼ばれる低分子化合物の可逆性評価・E_m 計測を通じて、計測基盤を確立する。光化学系 II 複合体標品は、安定性が高く酸素発生活性の高い標品が分画可能であり、Phe a の E_m 計測に唯一成功している、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 由来のものを用いて、マンガクラーの S₀/S₁ 遷移における E_m 計測を目指す。

4. 研究成果

電位を変化させながら光誘起差 FTIR スペクトルを測定した結果を図 1 に示す。この結果は +350 mV から +600 mV までの差スペクトルを示しているが、いずれの電位において 1400 cm⁻¹ 付近に見られるマンガクラーの COO⁻ の伸縮振動が見られ、このピークは S₁/S₂ 遷移に帰属されていることから、この電位領域においては、マンガクラーは S₁ 状態で存在していることを意味する。つまり S₀ には還元されないということである。これより還元していくと +200 mV 以下でこのピークが消失していくことが観測された。このことから +200 mV 以下で S₀ に還元されるといえる。ただし、ネルンスト応答にはならなかったため、現在その理由などにつ

いて解析中である。

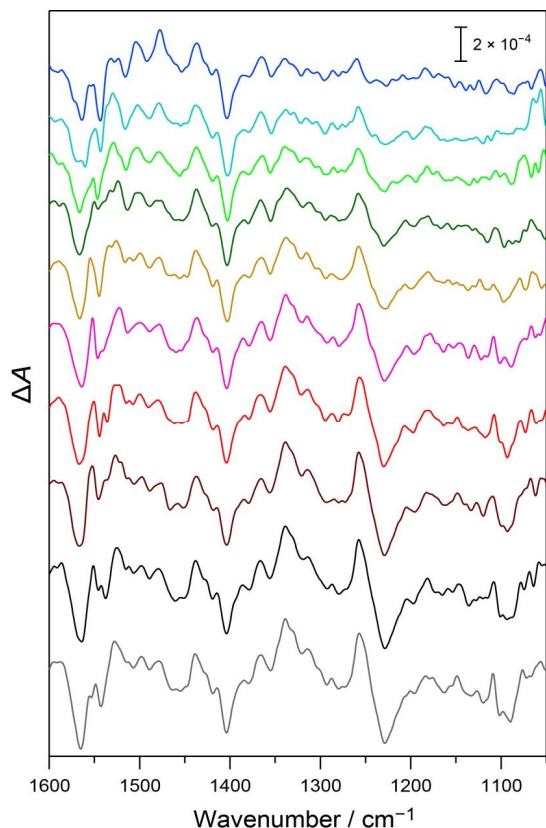


図 1 PSII を用いてさまざまな電位で測定した光誘起 FTIR 差スペクトル。上方から+350 mV, +400 mV, +420 mV, +440 mV, +460 mV, +480 mV, +500 mV, +520 mV, +550 mV, +600 mV で測定したもの。

また、+200 mV 以下で測定された FTIR 差スペクトルには第二キノン Q_B あるいは Q_A の光還元によるピークが観測された。従来、 Q_A と Q_B は同じプラストキノン分子であるがゆえ、分光法による両者の反応を識別することの難しさが Q_B の E_m 計測をさまたげてきた理由の一つと考えられる。その一方で、 Q_A と Q_B が異なる環境にあるなら、周辺環境との相互作用の違いを原子レベルで検出できる FTIR 法が有力な手法といえる。これまで、 Q_B と Q_A の FTIR 差スペクトルでは、 Q_B が還元されると 1745 cm^{-1} に、 Q_A の場合には 1721 cm^{-1} にピークが現れることが報告されている。これらのピークは、それぞれのキノンに近接する Phe(Q_A には Phe_{OD1}、 Q_B には Phe_{OD2} が近接) の 13^2 位のエステル C=O の伸縮振動によるものと帰属され、振動数の違いは両者の水素結合の有無を反映していると考えられる。そこで、電気化学的に PSII サンプルを還元しながらこれらのピーク強度の電位依存性を追跡することにより、 Q_B の酸化還元反応を観測した。

図 2 に、 intact な PSII 複合体を用いて、+250~+50 mV において測定した光誘起差 FTIR スペクトルを示す。高い電位領域 (+250~+160 mV) では 1745 cm^{-1} のピークが

明確に現れ、その強度が徐々に減少していくのが観測された。つまり、 Q_B を電気化学的に還元できていることを示す結果だといえる。さらに電位を低くしていくと、+120 mV あたりで 1745 cm^{-1} のピークは消失し、 1721 cm^{-1} にピークが現れた。このことは、 Q_B が還元された PSII に光を照射すると Q_A までしか電子が伝達されないことを観測した結果と考えられる。

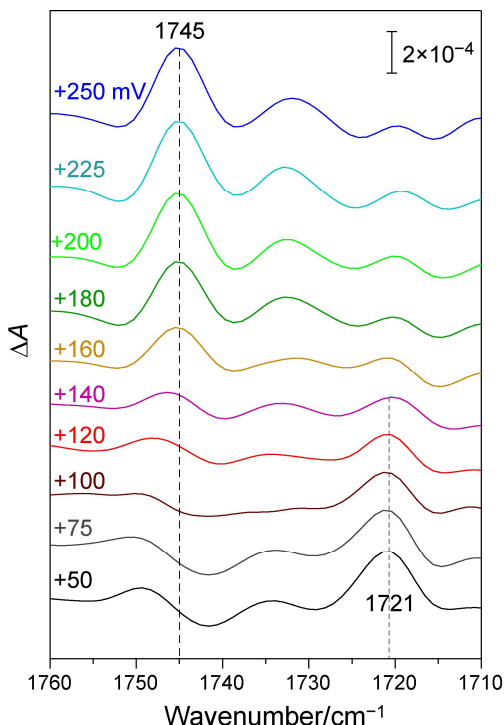


図 2 intact な PSII の様々な電位における光誘起 FTIR 差スペクトル

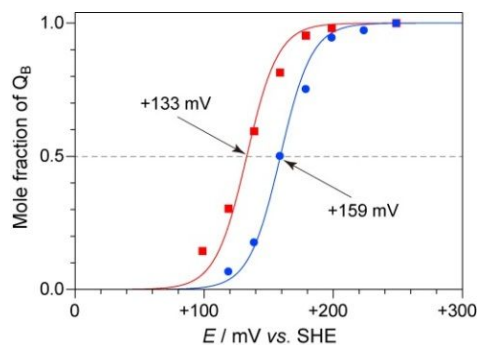


図 3 Q_B の酸化還元反応のネルンストプロット：青丸は intact な PSII、赤四角は Mn 除去したサンプルで得られたデータを示す。実線はそれぞれ 159 mV と 133 mV を E_m とする二電子酸化還元理論曲線を表す。

図 3 に 1745 cm^{-1} におけるピーク強度をネルンストプロットにより解析した結果を示す。これより、二電子還元反応が行われていることが分かり、 intact な PSII における Q_B の E_m は +159 mV と決定された。同様の測定から、Mn 除去した PSII における Q_B の E_m

は+133 mV と決定された。したがって、Mn クラスタが損傷すると、Q_B の E_m は 26 mV 負にシフトすることが判明し、Q_A の場合に比べて逆向きで、シフト量は約 1/6 と小さいことが分かった。

以上の結果と、既報による Q_A の E_m シフトから、Q_A と Q_B の E_m 差は通常 190 mV 程度であり、Mn クラスタが損傷した際には 40 mV 程度と小さくなっていることが分かった (図 4)。よって、Q_B の E_m を大きくは変動させないことで Q_A との E_m 差を小さくするような電子伝達制御がなされているものと結論づけた。そうしてもたらされる E_m 差の減少により、Q_B⁻ から Q_A への逆電子移動とそれに続く電荷再結合が促進され、Mn クラスタが損傷した際の光防御に寄与していると考えられる。

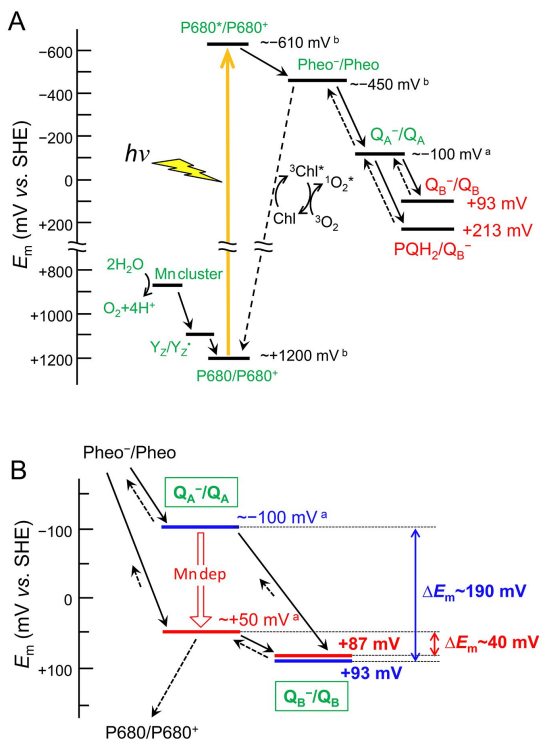


図 4 Q_B と Q_A の E_m を基にした PSII における電位相関図

また、この研究を推進するにあたり、FTIR 分光電気化学法は、PSII の補因子非ヘム鉄の酸化還元電位計測を通じて、確立することができた。非ヘム鉄の酸化還元電位については下記のような問題があったため、高精度測定に取り組んだ。

PSII において、マンガンイオンを還元してマンガンクラスターから外す処理を行うと、第一キノン Q_A の E_m が 150 mV ほどプラス側に変動することが知られている。これはマンガンクラスターが損傷した場合、通常の Q_A⁻ から Q_B への電子伝達のかわりに、Q_A⁻ から酸化体として留まる P680 への電荷再結合を促進することで、強力な酸化力である P680⁺ を消去するための保護機能だと考えられてい

る。しかし、Q_A はマンガンクラスターより 40 Å も離れていることから、マンガンクラスターの損傷という“ドナー側”の構造的損傷が“アクセプター側”にどのようにして作用しているのか不明である。本研究では、マンガン除去がアクセプター側に作用する機構の解明を目的に、FTIR を用いた分光電気化学計測法を確立し、Q_A に隣接する非ヘム鉄の E_m および周辺構造の変動を調べることにした。

FTIR - 分光電気化学計測を行った結果、マンガン除去により非ヘム鉄の E_m は 18 mV 程度変動することが分かり (図 5)、Q_A の E_m の変動に比べて 1/8 程度であることが明らかになった。さらに、非ヘム鉄の酸化還元 Fe²⁺/Fe³⁺ FTIR 差スペクトルを詳細に検証したところ、マンガン除去によって非ヘム鉄周辺の構造、特に非ヘム鉄と Q_B 間にあるヒスチジン残基(D1-His215) の構造に変化が生じているのが観測された。この結果と E_m の変動を踏まえて、マンガン除去がアクセプター側に作用する機構についてさらに現在解析中である。

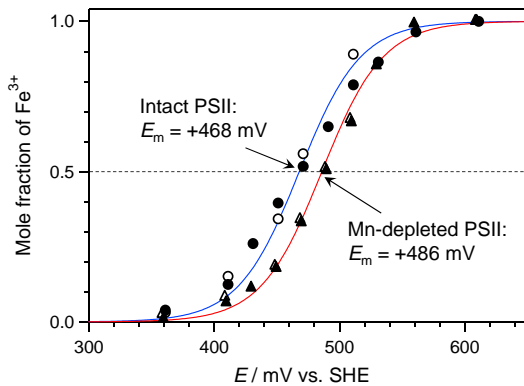


図 5 非ヘム鉄の酸化還元の本ネルストプロット：青丸はインタクトな PSII、赤四角は Mn 除去したサンプルで得られたデータを示す。

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 5 件)

Y. Kato and T. Noguchi, FTIR spectroelectrochemistry combined with a light-induced difference technique: Application to the iron-quinone electron acceptor in photosystem II. *Biomedical Spectroscopy and Imaging*, in press (2016), 審査有り。

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) 査読有 doi: 10.1038/srep19878.

Y. Kato, R. Nagao, and T. Noguchi, Redox potential of the terminal quinone electron acceptor Q_B in photosystem II revealing the mechanism of electron-transfer regulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 113, 620-625 (2016) 査読有 doi: 10.1073/pnas.1520211113.

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) 査読有 doi: 10.1002/anie.201502731.

Y. Kato and T. Noguchi, Long-range interaction between the Mn_4CaO_5 cluster and the non-heme iron center in photosystem II as revealed by FTIR spectroelectrochemistry, *Biochemistry* 53, 4914-4923 (2014) 査読有 doi: 10.1021/bi500549b.

[学会発表] (計 18 件)

Yuki Kato, Takumi Noguchi, Influence of the Mn-Depletion on the Redox Potential of the Non-Heme Iron in Photosystem II as revealed by FTIR-Spectroelectrochemistry, The 16th International Congress on Photosynthesis, 2013年8月12日, St. Louis Hyatt Regency at the Arch, St. Louis, MO, USA.

Yuki Kato, Takumi Noguchi, FTIR-Spectroelectrochemical Study on the Influence of the Mn-Depletion from Photosystem II on the Redox Potential of the Non-Heme Iron, Seventh International Conference on Advanced Vibrational Spectroscopy -7th ICAVS, 2013年8月26日, 神戸コンベンションセンター.

Yuki Kato, Takumi Noguchi, FTIR-Spectroelectrochemical Investigation into Whether the Mn-Depletion influences the Redox Potential of the Non-Heme Iron in Photosystem II, 第51回日本生物物理学会年会, 2013年10月28日, 国立京都国際会館.

Yuki Kato, Takumi Noguchi, Toward elucidation of regulation mechanism of the electron transfer induced by long-range interaction between the donor and acceptor sides in photosystem II -An approach by FTIR-spectroelectrochemistry on the non heme iron, The 2nd International Symposium "Dynamical ordering of biomolecular systems for creation of integrated functions", 2014年1月11日, キャンパスプラザ京都.

加藤 祐樹, 野口 巧, 光化学系 II における Mn クラスターの損傷がアクセプター側機能分子に及ぼす影響 - FTIR 分光電気化学計測による解析, 平成 25 年度生物物理

学会中部支部会講演会, 2014年3月6日, 岡崎コンファレンスセンター.

Yuki Kato, Takumi Noguchi, FTIR spectroelectrochemical study on whether the Mn-depletion shifts the redox potential of the non-heme iron in photosystem II, 第55回日本植物生理学会年会, 2014年3月18日, 富山大学.

加藤 祐樹, 野口 巧, 光合成光化学系 II における Mn クラスターの損傷が非ヘム鉄の酸化還元電位に及ぼす影響, 日本化学会第94春季年会, 2014年3月29日, 名古屋大学.

Yuki Kato, Takumi Noguchi (招待講演), FTIR spectroelectrochemical study on the influence of Mn-depletion on the redox potential of the non-heme iron and its surrounding structure in photosystem II, International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability", 2014年6月4日, RAS, Puschino, Russia.

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, 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月17日, 東京農業大学.

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, 日本物理学会第70回年次大会, 2015年3月21日, 早稲田大学.

加藤 祐樹, 長尾 遼, 野口 巧, 光合成光化学系 II 第二キノン Q_B の酸化還元電位測定 -FTIR 分光電気化学法によるアプローチ, 日本化学会第94春季年会, 2015年3月26日, 日本大学 理工学部船橋キャンパス.

加藤 祐樹, 長尾 遼, 野口 巧, Mn クラスターの損傷に対する光化学系 II キノン $Q_A \cdot Q_B$ 間の電子伝達制御と光防御機構 - Q_B の酸化還元電位計測による解析, 第6回日本光合成学会年会, 2015年5月22日, 岡山国際交流センター.

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, 第42回生体分子科学討論会, 2015年6月12日, 高崎シティーギャラリー.

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, "Metals in Biology" in Wako, 2015年6月16日, RIKEN Wako Campus.

加藤 祐樹, 長尾 遼, 野口 巧, 光化学系 II 第二キノン Q_B の二電子還元反応の解析, 第23回光合成セミナー2015, 2015年7月12日, 龍谷大学 大宮キャンパス.

Yuki Kato, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, FTIR spectroelectrochemical measurement of

the redox potential of the secondary quinone electron acceptor QB in photosystem II, 第 53 回日本生物物理学会年会, 2015 年 9 月 13 日, 金沢大学 角間キャンパス.

Yuki Kato, Ryo Nagao, Takumi Noguchi (招待講演), Redox potential of the secondary quinone electron acceptor QB in photosystem II as revealed by FTIR spectroelectrochemistry, International Meeting Photosynthesis Research for Sustainability -2015, 2015 年 9 月 24 日, Orthodox Academy of Crete (OAC), Chania, Crete, Greece.

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 QA の長距離相互作用, 日本化学会第 96 春季年会, 2016 年 3 月 26 日, 同志社大学 京田辺キャンパス.

〔図書〕(計 1 件)

加藤祐樹, 電子伝達分子の酸化還元電位計測法, 光合成のエネルギー変換と物質変換, 化学同人, 京都, pp79-80 (2015).

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

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

(2) 連携研究者

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