

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：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26840091

研究課題名(和文) 赤外分光法による光合成水分解反応機構の解明

研究課題名(英文) FTIR analysis of photosynthetic water oxidation

研究代表者

長尾 遼(Nagao, Ryo)

名古屋大学・理学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：30633961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：酸素発生光合成生物に普遍的な水分解反応の触媒部位であるマンガンクラスターは5つの反応中間状態を持つ。各反応において電子、プロトン、酸素分子が放出される。本研究は、水分解反応によるプロトン放出機構の解明を目的とし、Yzを経由する水素結合ネットワーク上のD1-Asn298に変異導入し、精製した光化学系IIを用いて赤外分光解析した。その結果、このネットワークがS2-S3およびS3-S0遷移においてプロトン移動経路として機能していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Photosynthetic water oxidation proceeds through five intermediates, which results in the release of four electrons, four protons, and one O₂ molecule by splitting two water molecules. To examine the role of the YZ network in water oxidation, we analyzed a site-directed mutant of D1-N298A using Fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy. FTIR analysis showed that the D1-N298A mutation decreased the efficiency of the S₂-S₃ transition and virtually blocked the S₃-S₀ transition, indicating that the hydrogen-bond network around YZ is employed as a proton transfer pathway during the S₂-S₃ and S₃-S₀ transitions.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：光合成 水分解反応 赤外分光 植物・藻類

1. 研究開始当初の背景

チラコイド膜内に存在する光化学系II複合体(PSII)は、マンガククラスターを活性中心とし、水分解反応を行う。この反応は5つの中間状態の光誘起サイクル(S状態サイクル)によって進み、結果として、二分子の水は一分子の酸素と4つの電子およびプロトンに分解される。マンガククラスターは、4つのMnイオン、1つのCa²⁺イオン、および5つの酸素原子から構成されており、周辺には水分子やアミノ酸が配位している。しかし、結晶構造解析ではPSIIの静的な情報しか含んでおらず、詳細な水分解反応機構、特に各反応中間状態におけるマンガククラスター周辺の詳細な構造変化やプロトン放出経路など、水分解反応の根幹をなすメカニズムは未だ明らかとなっていない。

2. 研究の目的

(1) PSIIの水分解反応に重要だと予想されているアミノ酸に部位特異的の変異を導入し、各S状態遷移におけるタンパク質の構造・水素結合相互作用・反応中心クロロフィルの電子構造に及ぼす影響を赤外分光法により明らかにすることを目的とする。

(2) マングククラスターの安定化に寄与する表在性タンパク質が、各S状態遷移においてPSII膜タンパク質の構造にどのような影響を及ぼすか赤外分光法により明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) *Synechocystis* sp. PCC 6803 に部位特異的の変異を導入し、得られた変異体からPSIIを精製した。細胞や調製した試料を用いて熱発光および遅延発光測定や光誘起フーリエ変換赤外 (FTIR) 分光測定を行った。

(2) *Thermosynechococcus elongatus* からPSIIと表在性タンパク質を精製した。表在性タンパク質を種々の組み合わせで再構成し、FTIR測定した。

4. 研究成果

(1) 部位特異的変異体の赤外分光解析

(a) 光合成水分解反応で生じるプロトン移動経路の特定

酸化還元活性を持つチロシンZ(Y_Z)の近傍に位置するD1-N298に水素結合相互作用が切断されるような部位特異的の変異を導入することにより、Y_Zを経由する水素結合ネットワーク(Y_Z経路)がプロトン移動経路として機能しているか調べた。変異体細胞を用いて遅延発光測定した結果、D1-N298A変異体では水分解反応由来の4閃光周期のオシレーションが観測されなかった。精製したPSIIを用いてFTIR測定した結果、D1-N298A変異体ではS₁→S₂遷移におけるタンパク質の大きな構造変化が観測された。また、S₂→S₃遷移効率の低下、S₃以降の反応阻害が観測された(図

1)。このことは、Y_Z周辺の水素結合相互作用がS状態遷移に関与することを示している。さらに、D1-N298A変異体では水素結合相互作用の変化も観測された。このことは、D1-N298A変異がY_Z経路の構造変化を引き起こすことを示している。これらの結果は、Y_Zを経由する水素結合ネットワークがS₂→S₃およびS₃→S₀遷移においてプロトン移動経路として機能していることを示唆している。

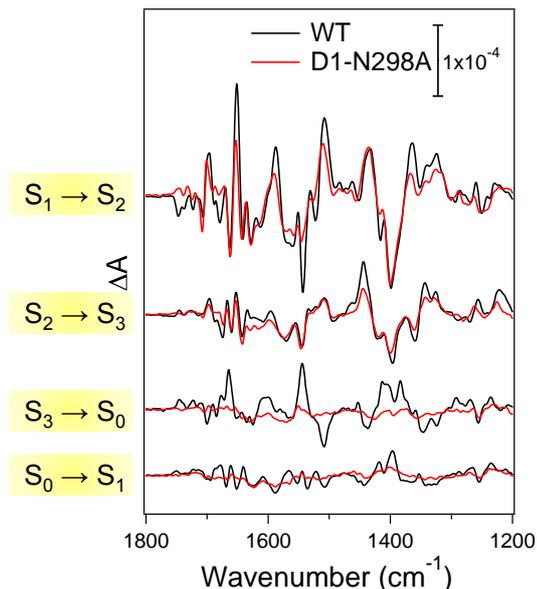


図1. S状態遷移のFTIR差スペクトル

(b) PSIIの電荷分離反応で生じる正電荷の局在

光エネルギーを利用し電荷分離反応を行う反応中心クロロフィルP680はクロロフィルの二量体構造(P_{D1}, P_{D2})をとる。P_{D1}およびP_{D2}のどちらに正電荷が多く局在するかを明らかにするために、P680近傍に位置するアミノ酸D1-V157, D2-V156に着目し、P_{D1}とD1-V157HおよびP_{D2}とD2-V156Hのそれぞれ間に水素結合が形成されるよう変異導入した。まず、変異体細胞を用いて熱発光測定した結果、D1-V157H変異体でのみ熱発光グローブのピーク温度が高温側にシフトした。このことは、D1-V157H変異によりP_{D1}の酸化還元電位が増加したことを示している。次にPSIIを精製し、FTIR測定した。D1-V157Hお

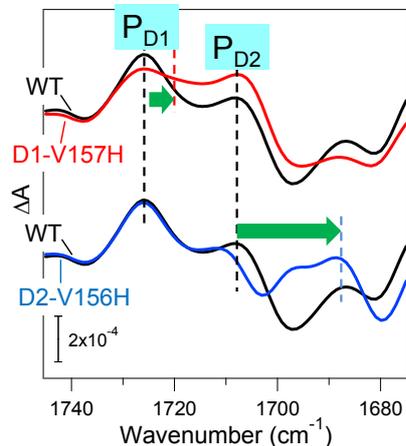


図2. P680+/P680FTIR差スペクトル

よび D2-V156H 変異体の FTIR スペクトルから、 P_{D1} および P_{D2} 由来のバンドをアサインすることができた(図2)。さらに、FTIR バンドの波数シフトから、P680 の正電荷のほとんどが P_{D1} に局在していることが明らかとなった。

(c) PSII で生じるクロロフィル励起三重項状態の局在

PSII に過剰な光エネルギーが照射されるとクロロフィルの励起三重項状態が形成される。 Chl_{D1} および Chl_{D2} のどちらに励起三重項状態が局在するかを明らかにするために、水分子を介して Chl_{D1} と水素結合しているアミノ酸 D2-H197 に変異導入し、精製した PSII を試料とし FTIR 測定した。その結果、励起三重項状態が Chl_{D1} に局在していることが明らかとなった。

(2) シアノバクテリア PSII に結合した表在性タンパク質の役割

Thermosynechococcus elongatus の PSII を用いて、 S_1 、 S_2 遷移における個々の表在性タンパク質 (Psb0, PsbV, PsbU) の膜タンパク質に及ぼす影響を FTIR 解析した。図3に示すように、すべての表在性タンパク質を除去 (-OVU) すると S_1 、 S_2 遷移特有の FTIR 差スペクトルが得られなかった。同様のスペクトルが PsbV 再構成試料で得られたが、一方、Psb0 再構成試料では S_1 、 S_2 遷移特有の FTIR 差スペクトルがある程度観測された。このことは、Psb0 がマンガクラーの安定化に主に寄与していることを示している。Psb0/PsbV を再構成することによりさらなるスペクトルの回復がみられ、Psb0/PsbV/PsbU の全てを再構成することにより元のスペクトルと一致した。これらの結果により、表在性タンパク質 Psb0, PsbV, PsbU のそれぞれがマンガクラー周辺の構造変化に寄与することが明らかとなった(図3)。このことは植物や紅藻の結果と異なるため、表在性タンパク質の機能が生物種により異なることを示唆している。

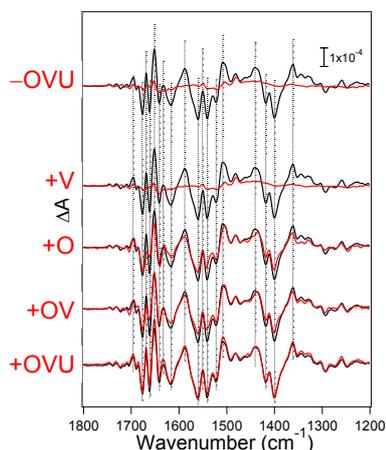


図3、表在性タンパク質の脱着による FTIR 差スペクトル

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

1、Nakamura, S., Nagao, R., Takahashi, R.,

Noguchi, T., FTIR detection of a polarizable proton trapped between photooxidized tyrosine Y_z and a coupled histidine in photosystem II: Relevance to the proton transfer mechanism of water oxidation., *Biochemistry* 53 (2014) 3131-3144, 査読有

2、Nagao, R., Tomo, T., Noguchi, T., 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 (2015) 2022-2031, 査読有

3、Kato, Y., Nagao, R., Noguchi, T., Redox potential of the terminal quinone electron acceptor Q_b in photosystem II reveals the mechanism of electron transfer regulation., *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113 (2016) 620-625, 査読有

4、Nishimura, T., Nagao, R., Noguchi, T., Nield, J., Sato, F., Ifuku, K., The N-terminal sequence of the extrinsic PsbP protein modulates the redox potential of $Cytb_{559}$ in photosystem II., *Scientific Reports* 6 (2016) 21490, 査読有

[学会発表](計27件)

1、坂本広樹、長尾遼、野口巧、時間分解赤外分光法による光合成水分解反応の解析、第5回日本光合成学会公開シンポジウム、2014年5月30日-31日

2、Nagao, R., Ueoka-Nakanishi, H., Noguchi, T., Site-directed mutagenesis study of amino acid residues relevant to photosynthetic water oxidation in photosystem II, 第52回日本生物物理学会、2014年9月25日-27日

3、Sakamoto, H., Nagao, R., Noguchi, T., Proton-coupled electron transfer mechanism of photosynthetic water oxidation as revealed by time-resolved infrared spectroscopy, 第52回日本生物物理学会、2014年9月25日-27日

4、Kondo, J., Nakamura, S., Nagao, R., Noguchi, T., Effect of the extrinsic proteins on the Cl-binding sites of the oxygen evolving center in photosystem II: Analysis by FTIR spectroscopy, 第52回日本生物物理学会、2014年9月25日-27日

5、中村伸、長尾遼、野口巧、光合成水分解反応におけるチロシン Y_z を経由するプロトン移動機構: FTIR 法及び量子化学計算による解析、2014年度生物物理学会中部支部講演会、2015年3月10日

- 6、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・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、2015 年 3 月 16-18 日
- 7、西村太志、長尾遼、富田めぐみ、野口巧、佐藤文彦、伊福健太郎、PsbP の N 末端ペプチド断片が光化学系 II の水分解酸素発生反応に及ぼす影響、第 56 回日本植物生理学会、2015 年 3 月 16-18 日
- 8、長尾遼、中西華代、野口巧、光化学系 II タンパク質への部位特異的変異導入による水分解反応機構の解析、第 56 回日本植物生理学会、2015 年 3 月 16-18 日
- 9、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、第 70 回物理学会、2015 年 3 月 21-24 日
- 10、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、第 95 回日本化学会、2015 年 3 月 26-29 日
- 11、西村太志、長尾遼、野口巧、佐藤文彦、伊福健太郎、PsbP の N 末端ペプチド断片が光化学系 II の水分解酸素発生反応に及ぼす影響、第 6 回日本光合成学会、2015 年 5 月 22-23 日
- 12、長尾遼、中西華代、野口巧、チロシン Z 周辺の水素結合ネットワークが光合成水分解反応に与える影響、第 6 回日本光合成学会、2015 年 5 月 22-23 日
- 13、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・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、2015 年 5 月 22-23 日
- 14、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・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 12-13 日
- 15、Nagao, R., Noguchi, T., Functional role of a hydrogen bond network around Y_Z during photosynthetic water oxidation, Gordon Research Conference on Photosynthesis, June 28-July 3 2015
- 16、長尾遼、中西華代、野口巧、チロシン Z が関与する水素結合ネットワークの光合成水分解反応における役割、第 23 回光合成セミナー2015: 反応中心と色素系の多様性、2015 年 7 月 11-12 日
- 17、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: 反応中心と色素系の多様性、2015 年 7 月 11-12 日
- 18、加藤祐樹、長尾遼、野口巧、光合成光化学系 II 複合体における第二キノン電子受容体 Q_B の酸化還元電位測定、2015 年電気化学会秋季大会、2015 年 9 月 11-12 日
- 19、Yamaguchi, M., Nagao, R., Noguchi, T., Electronic structure of the chlorophyll dimer P680 modified by site-directed mutation at a nearby amino acid residue in photosystem II, 第 53 回日本生物物理学会、2015 年 9 月 13 日-15 日
- 20、Shimizu, T., Nagao, R., Noguchi, T., Time-resolved infrared analysis of the S₀-to-S₁ transition of photosynthetic water oxidation, 第 53 回日本生物物理学会、2015 年 9 月 13 日-15 日
- 21、Kato, Y., Nagao, R., Noguchi, T., FTIR spectroelectrochemical measurement of the redox potential of the secondary quinone electron acceptor Q_B in photosystem II, 第 53 回日本生物物理学会、2015 年 9 月 13 日-15 日
- 22、Nagao, R., Ueoka-Nakanishi, H., Noguchi, T., FTIR study on the role of hydrogen bond network around Y_Z during photosynthetic water oxidation, 第 53 回日本生物物理学会、2015 年 9 月 13 日-15 日
- 23、Kato, Y., Nagao, R., Noguchi, T., Redox potential of the secondary quinone electron acceptor Q_B in photosystem II as revealed by FTIR spectroelectrochemistry, International Conference Photosynthesis Research for Sustainability, September 21-26 2015
- 24、Nagao, R., Ueoka-Nakanishi, H., Noguchi, T., Role of the hydrogen bond network around Y_Z in photosynthetic water oxidation, International Meeting Photosynthesis Research for Sustainability-2015, September 21-26 2015
- 25、Noguchi, T., Nakamura, S., Nagao, R., Role of Tyrosine Y_Z in proton-coupled electron transfer of water oxidizing reaction in photosystem II, The 7th Asia and Oceania Conference on Photobiology, November 15-18 2015
- 26、Nagao, R., Ueoka-Nakanishi, H., Noguchi, T., Hydrogen-bond network around Y_Z controls proton transfer in photosynthetic water oxidation, 7th OCARINA International Symposium, March 17-18 2016
- 27、長尾遼、山口元気、三富達也、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、第 57 回日本植物生理学会、2016 年 3 月 18-20 日

〔図書〕
該当なし。

〔その他〕
該当なし。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

長尾 遼 (NAGAO, Ryo)

名古屋大学・大学院理学研究科・特任助教

研究者番号：30633961

(2)研究分担者

該当なし。

(3)連携研究者

該当なし。