

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K17854

研究課題名(和文) 光合成光化学系IIにおける水分解および電子伝達反応の物理化学的解析

研究課題名(英文) Physical chemistry of water oxidation and electron transfer in photosystem II of oxygenic photosynthesis

研究代表者

加藤 祐樹 (Kato, Yuki)

名古屋大学・理学研究科・講師

研究者番号：10376634

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)：本研究では、申請者が最近確立したFTIR分光法を用いた分光電気化学計測技術を駆使して、マンガククラスターおよび電子伝達機能分子のEmの実測に挑み、水分解反応におけるエネルギー論の解明に取り組んだ。その結果、マンガククラスターと第一電子受容体QAの酸化還元電位の相関を解明し、従来の定説とは異なり、マンガククラスターが損傷してもQAの電位はシフトせず、電子伝達制御機構は存在しないことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The redox potential of the primary quinone QA, Em(QA), in PSII has been estimated to be -100 mV in intact samples and shown to be shifted by ca. +150 mV upon Mn depletion. These values have been obtained by a fluorescence method, which indirectly monitors the redox state of QA. In this work, we measured the Em(QA) in intact and Mn-depleted PSII preparations using FTIR spectroelectrochemistry, which can directly detect the redox reaction of QA. The Em(QA) in intact PSII was determined to be -100 mV in agreement with that by the fluorescence method. However, the Em(QA) value was little affected by Mn depletion. It is thus suggested that the large Em(QA) upshift by Mn depletion found in previous works can be an artifact due to the fluorescence method.

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 マングククラスター 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ンクラスターとよばれる機能分子が担う。マンガンクラスターは 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、近年 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示されている。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⁺の酸化力により、マンガンクラスターは駆動する。1 光子の照射ごとにマンガンの酸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、2 分子の水が酸化され 1 分子の酸素が生じる(S 状態サイクル: 図 2)。報告された構造は暗所で安定な S₁ 状態と考えられ、今後さらに、各 S 状態の構造や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、マンガンクラスターの酸化還元電位 E_m や各 S 状態遷移に伴う自由エネルギー変化など、水分解反応におけるエネルギー論は全くの推測に留まる。特にマンガンクラスターの E_m は未だ誰も実測に成功していないからである。図 3 に示すように、光化学系 II 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 ($\Delta E_m \times$ 素電荷)を基に電子伝達系は描像できるが、マンガンクラスターを含め 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 E_m は実測できていない。光励起した P680* から電子を受け取るフェオフィチン(Phe) a や後続の第一キノン Q_A、あるいは Y_D と呼ばれるチロシン残基など実測可能な E_m を基に、見積もられた ΔG を当てはめて推測されてきたのである。

光化学系 II における Phe a の E_m は 1979 年に初めて -610 ± 30 mV と測定され(Klimov et al., *DAN SSSR*)、さらに過度吸収分光による速度論的解析から P680* との ΔG を 150 meV 程度と見積もり、P680 の E_m は +1.1 V 程度と推測された。その後追試は一例に留まるが、以降 30 年に渡りこれらの値が Phe a と P680 の E_m として認識されてきた。しかし、Phe a の E_m 計測は酸化還元滴定法で行われ、誤差が数十 mV と大きいだけでなく、還元剤の還元力を高めるために生理的 pH よりも高くして (~11) 測定せざるを得ないことから、実態を反映する結果とは言い難いものであった。いずれにせよ、マンガンクラスターや P680 の E_m の議論は、このような Phe a の E_m 値を土台にしているだけでなく、マンガンクラスターの E_m は S 状態によって異なり 4 つとると考えられるが(Rappaport & Diner, *Coord. Chem. Rev.*, 2008)、状態によらず不変とする説もあり(Dau, *Coord. Chem. Rev.*, 2008)、不明瞭な部分が多いうえに統一した見解はない

まま今に至っている。

申請者は、このような状況も踏まえ、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、まず可視分光法を用いて Phe a の生理的条件における E_m 計測を行った。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 ほど高いことを明らかにし、さらに P680 の E_m は +1210 mV 程度にあることを提唱した(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2009)。続いて蛍光法を用いて Q_A の電位計測を行い、 -140 ± 2 mV と誤差を低減したうえで従来値より 60 mV 程度低いことを示し、従来「差が大きすぎる」と問題視されてきた Phe a との ΔE_m 値を刷新した(*Biochemistry*, 2009)。さらに最近では、FTIR 分光法を電気化学法と組み合わせることにより、これまで全く報告例がなかった第二キノン Q_B の E_m 計測に成功し(*Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2016)、光化学系 II 電子受容側におけるエネルギー論の全容を明らかにしつつある。

2. 研究の目的

本研究では、申請者が最近確立した FTIR 分光法を用いた分光電気化学計測技術を駆使して、マンガンクラスターおよび電子伝達機能分子の E_m の実測に挑み、水分解反応におけるエネルギー論の解明に取り組む。分子の基準振動を検出する FTIR は、酸化還元に伴う分子および分子周辺(蛋白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が検出可能であり、紫外・可視領域にほとんど吸収変化を示さないこれらの標的分子に対して、最も有用な分光法だといえる。予備的に、上述した Q_B の E_m 計測を通じて、マンガンクラスターの S₁/S₀ 遷移における E_m は +300 mV 付近と想定以上に低いことを見出し(*Proc. Natl. Acad. USA*, 2016)、従来の知見とはかけ離れた結果を得ている。一方で、Y_Z の E_m は近年 P680 の E_m 値を基に +1100 mV 程度と見なされてきている。その上で、Y_Z の E_m 付近まで網羅的にマンガンクラスターの E_m 計測を行うことにより、高電位側における電子伝達反応の ΔG を、平衡論的な実験結果のみに基づいて提示することが本研究の最終的な目的である。

3. 研究の方法

光化学系 I・II のような大型の蛋白質複合体(分子量 650 kDa ~)の場合、拡散係数が小さいため、電極電位を走査して電流を計測するというボルタンメトリーなど汎用的な電気化学法が適用できない。そこで、電流計測ではなく分子の酸化還元に伴う電子構造変化などを分光測定で調べる酸化還元滴定法あるいは分光電気化学法が用いられてきた。滴定法では、酸化・還元剤を添加して測定溶液の

電位を変化させ、系全体の平衡化をみはからって電位値を記録、分光測定を行う。電位の変動幅が添加剤の種類や濃度などに大きく依存するため誤差が生じやすく、測定者による結果のバラツキも生じやすいといえるが、特別な装置を必要としないので(分光器と電位差計さえあれば測定可能)、光合成研究者の間では重用されてきたといえる。一方、電気化学測定機器(ポテンショスタット)と電極系を用いれば、0.1 mVの精度で任意の電位に制御が可能となり、誤差の抑制につながるうえに、反応の可逆性が確認しやすいという利点がある。

光化学系 II 標品を FTIR 法で測定する場合、水の強い吸収が測定の妨げとなるため、測定溶液の層を 20 μm 以下に抑える必要がある。申請者は、厚さ 10 μm の金メッシュ電極 (Precision Eforming 社(米国)、オーダー品)を用いた薄層電解セルを作製し、測定系を確立してきている。ただし、蛋白質複体内に埋め込まれている機能分子と電極は直接電子授受を行うことができないので、電子授受を仲介する分子(メディエーター)を必要とし、この選択が測定の成否の鍵を握るといえる。メディエーターの望ましい特性は、自身の酸化還元応答が可逆で速いこと、目的とする機能分子との電子授受が速いこと、の2点にある。そこで、まずは S_1/S_0 遷移における E_m 領域に焦点を当て、メディエーターを選択しながら測定を試みることにした。

4. 研究成果

TMPD、PMS、ナフトキノン等を用いて Q_B の E_m よりも低電位領域を重点的に測定を行ったところ、Mn クラスタは徐々に還元されることが観測されたが(図1, 1400 cm^{-1} 付近のピーク)、どうやら Q_A の還元に伴って変化量が減少していることが分かった。つまり Q_A の E_m に依存しているものと考えられる。したがって、このスペクトル変化を詳細に追跡することによって、 Q_A の E_m 計測を試みた。

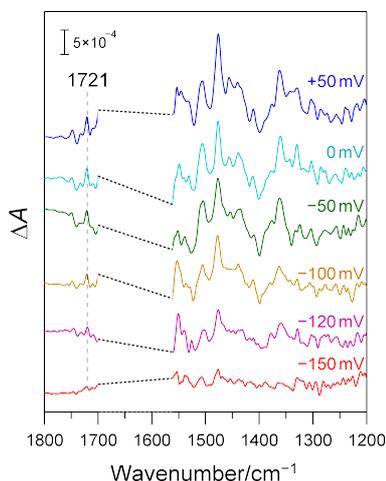


図1 PSII の様々な電位における光誘起 FTIR 差スペクトル

$E_m(Q_A^-/Q_A)$ の値は通常 -100 mV であるのに対し、Mn クラスタが損傷すると、150 mV ほどプラスにシフトすることが見出されている。一方、Mn クラスタが損傷した場合に Q_B の E_m はほとんどシフトしないことを最近我々は明らかにした。したがって、この $E_m(Q_A^-/Q_A)$ のシフトによって、 Q_B との E_m 差が減少し、 Q_A から Q_B への電子伝達の抑制が想定されるが、これまではこの抑制が水分解触媒である Mn クラスタが損傷した際の防御機構として働くと考えられてきた。しかし、過去の $E_m(Q_A^-/Q_A)$ 計測では、 Q_A の酸化還元状態を間接的に蛍光法で観測されており、この手法では Q_A の酸化還元状態のみを必ずしも反映していない、あるいは測定光により Q_A の酸化還元状態が乱される、などの問題があり、 Q_A の E_m が正確に得られていない可能性がある。したがって、直接的にキノンの酸化還元状態が観測可能であるフーリエ変換赤外 (FTIR) 分光法によって $E_m(Q_A^-/Q_A)$ を計測し、Mn クラスタの損傷が $E_m(Q_A^-/Q_A)$ に及ぼす影響を再検証した。

Q_A 由来のピークである 1721 cm^{-1} のピーク強度をネルンストプロットにより解析した結果が図2である。プロットの電位依存性はおおよそ一電子反応であることを示し、未処理の PSII における $E_m(Q_A^-/Q_A)$ は -109 mV と決定された。この $E_m(Q_A^-/Q_A)$ 値は、従来の蛍光法によって得られている値¹とおおよそ一致している。同様の分光電気化学測定を Mn 除去した PSII に対して行うと(図2赤)、 $E_m(Q_A^-/Q_A)$ は -112 mV と決定され、従来の結果とは異なり、FTIR 法では Mn 除去をしても $E_m(Q_A^-/Q_A)$ はほとんど変化しないことが示された。そこで、FTIR 法の条件では従来みられてきた $E_m(Q_A^-/Q_A)$ のシフトが起きていないことも考えられるため、Mn 除去 PSII サンプルに対して、蛍光法を用いた分光電気化学測定を行った。その結果、蛍光強度をネルンストプロットにより解析すると(図2橙)、 E_m を +29 mV とする電位依存性が観測され、従来の結果をおおよそ再現することが確認された。

以上の結果から、従来の蛍光法による

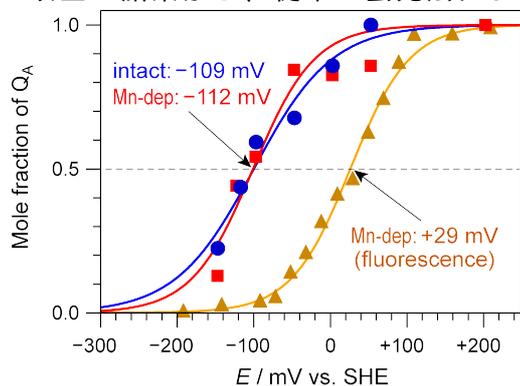


図2 Q_A の酸化還元反応のネルンストプロット: ●は未処理, ■は Mn 除去した PSII を用いて FTIR 法により得られたデータを示す, ▲は Mn 除去 PSII を用いた蛍光法によるデータ。

$E_m(Q_A^-/Q_A)$ 計測は、未処理の PSII に対しては問題がないと考えられるが、Mn除去したPSII に対して行くと、 $E_m(Q_A^-/Q_A)$ がシフトしたような結果を導いてしまう問題があることが明らかとなった。したがって、PSII において Mn クラスタを損傷した際に $E_m(Q_A^-/Q_A)$ がシフトすることはなく、それゆえ $E_m(Q_A^-/Q_A)$ のシフトによる防御機構は存在しないと考えられる。

さらに、この Mn クラスタの損傷による QA 周辺の構造変化を検証するべく、全反射 - フーリエ変換赤外分光法(ATR-FTR)を用いて調べることにした。

図 3 に測定の結果得られた光誘起 Q_A^-/Q_A 差スペクトルを示す。1477 cm^{-1} にみられる正のバンドは Q_A^- の CO 伸縮振動と CC 伸縮振動がカップルしたものであり、この正のバンドは Mn クラスタを除去しても変化しないことが示された。一方、ニュートラルな Q_A の CO 伸縮振動と CC 伸縮振動はアミド I 領域(1700~1600 cm^{-1})にあると考えられているが、この領域全体で両者のスペクトルはほぼ一致した。つまり、 Q_A の CO および CC 伸縮振動と Q_A 周辺の構造は、Mn クラスタによりほとんど変化していないものと考えられる。

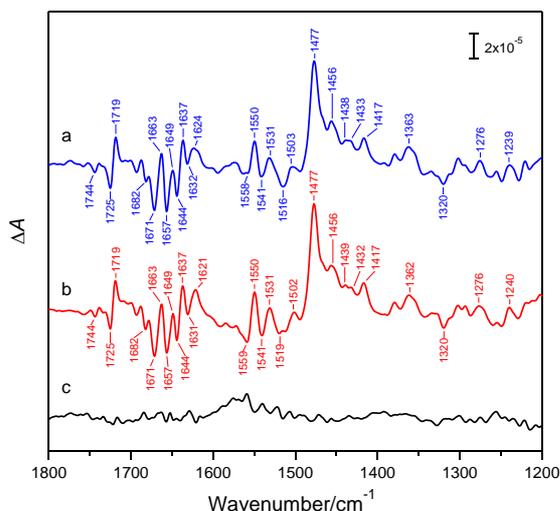


図 3. Flash-induced Q_A^-/Q_A FTIR difference spectra of intact (a) and Mn-depleted PSII (b). Trace c is the difference of the difference spectra a and b. Spectrum a of intact PSII was obtained by subtraction of the S_2/S_1 difference spectrum from the $S_2Q_A^-/S_1Q_A$ spectrum.

以上の結果から、 Q_A の水素結合構造や蛋白質との直接的な相互作用は Mn 除去によってほとんど影響を受けていないことが実験的に明らかになった。したがって、Mn クラスタが損傷した際に、 Q_A と直近のアミノ酸残基との水素結合や静電的相互作用が変わることはなく、 $E_m(Q_A^-/Q_A)$ が変化しないことを裏

付ける結果であるといえる。

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, F. Akita, Y. Nakajima, M. Suga, Y. Umena, J.-R. Shen, and T. Noguchi, Fourier transform infrared analysis of the S-state cycle of water oxidation in the microcrystals of photosystem II, *J. Phys. Chem. Lett.* 9, 2121-2126 (2018). 査読有 doi: 10.1021/acs.jpcllett.8b00638.

加藤祐樹, 光化学系 II における電子伝達制御機構の解明: 分光電気化学法による機能分子の分子の酸化還元電位計測, *化学と工業*, 70(10), 935-936 (2017). 査読有 M. Suga, F. Akita, M. Sugahara, M. Kubo, Y. Nakajima, T. Nakane, K. Yamashita, M. Nakabayashi, Y. Umena, T. Yamane, T. Nakano, M. Suzuki, T. Masuda, S. Inoue, T. Kimura, T. Nomura, S. Yonekura, L.-J. Yu, T. Sakamoto, T. Motomura, J.-H. Chen, Y. Kato, T. Noguchi, K. Tono, Y. Joti, T. Kameshima, T. Hatsui, E. Nango, R. Tanaka, H. Naitow, Y. Matsuura, A. Yamashita, M. Yamamoto, O. Nureki, M. Yabashi, T. Ishikawa, S. Iwata, J.-R. Shen, Light-induced structural changes and the site of O=O bond formation in PSII caught by XFEL, *Nature* 543, 131-135 (2017). 査読有 doi: 10.1038/nature21400.

K. Tahara, A. Mohamed, K. Kawahara, R. Nagao, Y. Kato, H. Fukumura, Y. Shibata, and T. Noguchi, Fluorescence property of photosystem II protein complexes bound to a gold nanoparticle, *Faraday Discuss.* 198, 121-134 (2017). 査読有 doi: 10.1039/c6fd00188b.

Y. Kato, R. Ishii, and T. Noguchi, Comparative analysis of the interaction of the primary quinone Q_A in intact and Mn-depleted photosystem II membranes using light-induced ATR-FTIR spectroscopy, *Biochemistry* 55, 6355-6358 (2016). 査読有 doi: 10.1021/acs.biochem.6b01052.

[学会発表](計 16 件)

加藤祐樹, 大平彩花, 長尾 遼, 野口 巧, FTIR 分光法による光化学系 II における第一キノン電子受容体 Q_A の酸化還元特性の解明, 日本物理学会第 73 回年次大会, 2018 年 3 月, 東京理科大学.

Yuki Kato, Ayaka Ohira, Ryo Nagao, and Takumi Noguchi, FTIR study on the redox property of the primary quinone Q_A in photosystem II, 8th International Conference Photosynthesis and Hydrogen Energy Research for Sustainability -2017, 2017 年 11 月, University of Hyderabad, India.

大平彩花, 長尾 遼, 野口 巧, 加藤祐樹, Influence of Mn depletion on the redox potential of the primary quinone QA in photosystem II as revealed by FTIR spectroelectrochemistry, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017 年 9 月, 熊本大学.

加藤祐樹, 秋田総理, 中島芳樹, 菅 倫寛, 梅名泰史, 沈 建仁, 野口 巧, ATR-FTIR analysis of the S-state transitions during water oxidation in photosystem II crystals, 第 55 回日本生物物理学会年会, 2017 年 9 月, 熊本大学.

岸真之輔, 齊藤圭亮, 加藤祐樹, 石北 央, ユビキノン・プラストキノンの水溶液中における酸化還元電位, 第 25 回光合成セミナー2017, 2017 年 7 月, 神戸大学.

大平彩花, 長尾 遼, 野口 巧, 加藤祐樹, 光化学系 II において Mn 除去しても QA の酸化還元電位は変動しない, 第 25 回光合成セミナー2017, 2017 年 7 月, 神戸大学.

加藤祐樹, 秋田総理, 中島芳樹, 菅 倫寛, 梅名泰史, 沈 建仁, 野口 巧, 光化学系 II 結晶における水分解反応の ATR-FTIR 解析, 2017 年 6 月, 第 44 回生体分子科学討論会, 2017 年 6 月, カレッジプラザ(秋田).

大平彩花, 長尾 遼, 野口 巧, 加藤祐樹, FTIR 分光電気化学法による光化学系 II 第一キノン QA の酸化還元電位計測: Mn 除去の効果, 第 8 回日本光合成学会年会, 2017 年 5 月, 龍谷大学.

加藤祐樹, 石井里奈, 野口 巧, ATR-FTIR 法を用いた光化学系 II における Mn クラスタと第一キノン QA の長距離相互作用の解析, 電気化学会第 84 回大会, 2017 年 3 月, 首都大学東京.

加藤祐樹, 分光電気化学法による光合成光化学系 II における電子伝達反応機構の解明, 日本化学会第 97 春季年会 第 31 回若い世代の特別講演会, 2017 年 3 月, 慶応大学.

加藤祐樹, 秋田総理, 中島芳樹, 菅 倫寛, 梅名泰史, 沈 建仁, 野口 巧, 光化学系 II 結晶の水分解系における S 状態遷移の赤外分光解析, 第 58 回日本植物生理学会年会, 2017 年 3 月, 鹿児島大学 郡元キャンパス.

Kazuki Tahara, Ahmed Mohamed, Kousuke Kawahara, Ryo Nagao, Yuki Kato, Hiroshi Fukumura, Yutaka Shibata, Takumi Noguchi, Fluorescence property of photosystem II protein complexes bound to a gold nanoparticle, Artificial Photosynthesis: Faraday Discussion, 2017 年 2 月, 立命館大学.

大平彩花, 長尾 遼, 野口 巧, 加藤祐樹, Measurement of the redox potential of the primary quinone electron acceptor QA in photosystem II by FTIR spectroelectrochemistry, 第 54 回日本生物物理学

会年会, 2016 年 11 月, つくば国際会議場. 加藤祐樹, 石井里奈, 野口 巧, 光化学系 II における Mn クラスタと第一キノン電子受容体 QA の長距離相互作用の解析, 日本物理学会 2016 年秋季大会, 2016 年 9 月, 金沢大学.

Yuki Kato, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Redox potential of the secondary quinone electron acceptor QB in photosystem II revealing the mechanism of electron transfer regulation, The 17th International Congress on Photosynthesis Research, 2016 年 8 月, MECC Maastricht, Maastricht, The Netherlands.

Yuki Kato, Ryo Nagao, Takumi Noguchi, Redox potential of the secondary quinone electron acceptor QB in photosystem II: Mechanism of electron transfer regulation, Photosynthetic electron and proton transport in plants and algae; operation, regulation and function ~Satellite Meeting of the 17th International Congress on Photosynthesis Research, 2016 年 8 月, Postillion Hotel Arnhem, Arnhem, The Netherlands.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.bio.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・講師

研究者番号: 10376634