

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2007～2010

課題番号：19370061

研究課題名(和文) 光化学系II Mnクラスターによる光合成水分解反応ケミストリーの研究

研究課題名(英文) Study on photosynthetic water oxidation chemistry in photosystem II

研究代表者

小野 高明 (ONO TAKAAKI)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号：10175268

研究成果の概要(和文)：

好熱性シアノバクテリア (*Thermocynechococcus elongatus*) とより調製した光化学系II コア標品を用い、酸素を安定同位体 (^{17}O , ^{18}O) 標識した水置換試料のフーリエ変換赤外スペクトルを測定した。反応機構解明に必要な、水(の酸素)及び、部分的に分解された水と Mn クラスターの相互作用に由来するバンドを同定し、さらに、部位特異変異を導入したシアノバクテリア (*Synechocystis* sp. PCC6803) を用い、D1 C-末端アラニン残基と Mn クラスターの配位に関する情報を得た。

研究成果の概要(英文)：

Fourier transform infrared (FTIR) spectra for reaction intermediates in photosynthetic water oxidation were measured at low frequency in ^{17}O and ^{18}O labeled water in PSII core samples prepared from thermophilic cyanobacterium *Thermocynechococcus elongatus* and the infrared bands responsible for direct interaction between Mn and substrate water were assigned in every reaction intermediate states of the water oxidation. FTIR spectra were also measured in site-directed mutants of *Synechocystis* sp. PCC6803. Based on the results, roles of D1 C-terminal alanine as a ligand were evaluated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,100,000	2,130,000	9,230,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：生物科学・生物物理学

キーワード：光生物

1. 研究開始当初の背景

光合成酸素発生反応は地球上で進行する最も規模の大きな、最重要の生物化学反応であるにもかかわらず、光合成酸素発生の反応機構の詳細は現在においてもほとんど未知のまま残されており、現代生物学研究において、最大・最重要の未解決課題の一つとなってい

る。水分解の触媒として機能する Mn クラスターの構造は 2.3 分解能 (2011 年 4 月、1.9 Å 高分解能の構造が報告された) で解析されていたが、構造を補完する、反応機構解明に必要な情報 (水分解過程における、水分子の化学的な変化、水分子と Mn クラスターとの化学的な相互作用の変化) は極めて限られていた。

間接的な生化学的手法が主に用いられており、反応機構に関する議論は仮説の域を出ないものとなっていた。反応機構の解明には、反応に伴う、基質である水分子とMnクラスターの化学結合とその変化の情報が必須である。これらの情報を得るための最も有力な手法は赤外分光法（特に、金属と酸素間相互作用の直接情報が得られる低波数領域）であるが、技術的な困難さのため、光合成試料への適応は、その端緒がつけられたばかりの状態であった。

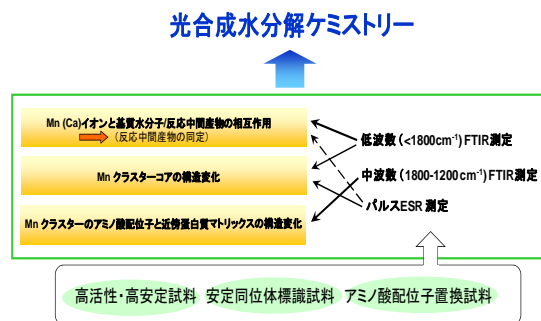
2. 研究の目的

植物による光合成酸素発生（水分解）反応は、植物の光化学系IIで生成した酸化型反応中心を、水からの電子供与により還元再生する反応である。この反応は植物にとって必須の反応であるばかりではなく、地球の生命進化に決定的な影響を与えた。また、可視光による酸素と水素（イオン）への水の効率的な分解機構の解明は、将来のエネルギー問題の解決に結びつき、人類の福祉にも大きく貢献しうると期待される。このように、酸素発生反応は地球上で進行する最も規模の大きな、最重要の生物化学反応であるにもかかわらず、光合成酸素発生の反応機構の詳細は現在においてもほとんど未知のまま残されており、現代生物学研究において、最大・最重要の未解決課題の一つとなっている。

本研究はフーリエ（FT-IR）変換赤外分光法を主な測定手法として用い、酸素発生反応過程のケミストリー（化学）を具体的に記述し、その機構を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

高活性・高安定な酸素発生コア標品、特異的安定同位体標識標品、Mnクラスターのアミノ酸配位子変異体標品、等を作成。これらの試料を用い、光合成水分解反応の化学反応過程を直接測定することにより、水分解反応のケミストリーを明らかとし、その反応機構を提案する。研究方法の全体スキーム（下図）と個々の方法を以下に示す。



(1) 好熱性シアノバクテリア

(*Thermocynechococcus. elongatus*) より、高活性かつ安定性の高系IIコア標品を調製する。

(2) シアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 を用い、配位子アミノ酸を部位特異変異により他のアミノ酸に置換する。

(3) 基質水分子を安定同位体置換した試料を得、低波数、中波数領域の FTIR 測定を行う。

4. 研究成果

(1) 好熱性シアノバクテリア (*Thermocynechococcus elongates*) のチラコイド膜を界面活性剤処理後、遠心分離することにより、酸素発生系IIコア粒子を調製した。界面活性剤 Zwittergent 3-12 で可溶化することにより、高い酸素発生活性を保持した標品を得ることが出来た。この標品はアロフィコシアニオンを保持していた。細胞に比べると、熱耐性が約10度低温側にシフトしていたが、室温で24時間放置しても高い活性を保持していた。

(2) 酸素発生系IIコア標品について Mn クラスターの光再構築系を確立した。NH₂OH 処理により Mn クラスターを破壊し、完全に酸素発生活性を失った試料を、二価の Mn イオン、Ca²⁺、電子受容体 (DCIP) 存在下において光照射 (光活性化) することにより NH₂OH 処理前の70%以上の酸素発生活性 (Mn クラスター) を再構築する条件を見出すことができた。再構築した試料は、無処理試料と同じ FTIR S₂/S₁ 差スペクトルを示した。

(3) *Thermocynechococcus elongates* より調製した安定な系IIコア標品を用い、基質である水 (H₂¹⁶O) を安定同位体酸素標識した水 (H₂¹⁷O, H₂¹⁸O) に置換した試料を得た。これらについて、酸素発生反応の全ての間状態間の FTIR 光誘起差スペクトルを低波数領域 (670cm⁻¹~370cm⁻¹) で測定した。

安定同位体置換により影響を受けるバンドは、酸素と Mn クラスターの直接の相互作用に由来する、基質水分子、その酸化中間産物、Mn クラスターの骨格のバンドである。低波数領域の測定は極めて困難であり、反応中間状態のスペクトル測定は研究代表者の研究室に置いてのみ報告されているが、スペクトルの品位は必ずしも高くなく、反応中間状態において、特定のバンドの変化を調べることは困難である。

Mn に直接結合した基質水の酸素に由来する赤外バンドは酸素同位体の質量 (¹⁶O、¹⁷O、¹⁸O) に応じて、バンドの位置が低波数側へ順次シフトすると考えられる。図1は実験結果を示したものであり、いくつかのバンドにおいて ¹⁶O、¹⁷O、¹⁸O に応じたシフトが明確に観

察された（代表的なものを図中に縦線で示してある）。

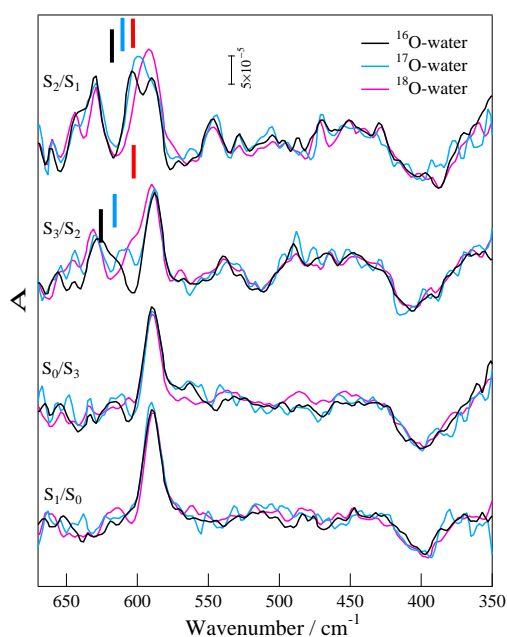


図1 酸素標識同位体水の影響

(4) Mn クラスターと基質水の相互作用を調べるため、核スピンを持つ ^{17}O で標識した同位体水による置換が、 S_2 状態のマルチライン ESR 信号に与える影響を、*Thermocynechococcus elongates* より調製した安定な系 II コア標品試料において測定した。 ^{17}O 同位体水置換は CW-ESR 信号と、そのマイクロ波強度依存性には全く影響を与えず、Mn クラスターにおける Mn イオン間に磁気相互作用及び、その緩和は ^{17}O の核スピンには影響されなかった。しかしながら、驚いたことに、パルス-ESR で見たマルチライン信号強度は ^{17}O 同位体水置換により大きく低下することを見出した。様々な割合で ^{17}O 同位体水を含む水で置換した場合、信号強度の低下は ^{17}O 同位体水の割合にほぼ比例していたので、結果はアーティファクトではないと考えられるが、現在のところ、見出した現象を理論的に説明することには成功していない。

(5) Mn クラスターの配位子となっている D1 タンパク質の C-末端アラニンのカルボキシル基周辺の構造が Mn クラスターの構造と機能にどのような影響を与えるか調べるために、アラニンをアスパラギン(Asn)、アスパラギン酸(Asp)、グルタミン(Gln)、グルタミン酸(Glu) に系統的に置換したシアノバクテリア *Synechocystis* sp. PCC6803 を作製し、以下の結果を得た。

① いずれの置換体も光独立栄養的に生育可能であり酸素発生能を保持していたが、側鎖

が短く、負電荷を持つほど生育・活性が低くなった。

② FTIR 測定より、置換によりカルボキ配位子、ヒスチジン配位子に由来するバンドが変化していた。

③ 熱発光測定より (図 2)、グルタミン置換体では S_2 状態の Mn クラスターが野生株より高くなる特異な変化が起こっていた。

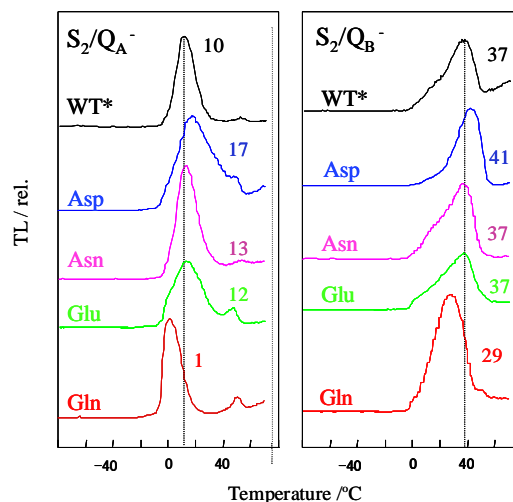


図2 D1 C-末端の側鎖が Mn クラスターの酸化還元電位に与える影響：熱発光

以上の結果より、負電荷を持ち、鎖長が短い側鎖を持つアミノ酸経の置換が Mn クラスターの機能・構造に大きな影響を与えることが示された。

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)

(1) Nakasone, Y., Ono, T., Ishi A., Masuda, S. and Terazima M. Temperature-sensitive reaction of a photo-sensor protein YcgF: Possibility of a role of temperature sensor. *Biochemistry*, 49, 2288-2296 (2010). [査読有]

(2) 小野高明 熱発光・遅延発光、低温科学 67, 453-463 (2009) [査読有]

(3) Mizusawa, N., Sakata, S., Sakurai, I., Sato N., Wada, H. Involvement of digalactosyldiacylglycerol in cellular thermotolerance of *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Arch. Microbiol.* 191, 595-601 (2009) [査読有]

(4) Masuda, S., Hasegawa, K., Ohta, H. and Ono, T.A. Crucial Role in light signal transduction for the conserved Met93 of

the BLUF protein PixD/Slr1694.
Plant Cell Physiol. 49, 1600-1606 (2008)
[査読有]

(5) Nakasone Yusuke, Ono Taka-aki, Ishii Asako, Shinji Masuda and Terazima Masahide
Transient dimerization and conformational change of a BLUF Protein: YcgF.
J. Am. Chem. Soc., 129, 7028-7035 (2007)
[査読有]

[学会発表] (計5件)

(1) 小野高明: 青色光BLUF受容体、第2回生体分子科学コロキウム(2009年6月24日、茨城量子ビームサイエンスセンター、那珂)

(2) 小野高明: フーリエ変換赤外分光法による光合成酸素発生研究、第6回茨城大学遺伝子実験施設公開シンポジウム(2009年3月10日、茨城大学、阿見)

(3) 中曽根祐介: 青色光センサー-BLUF蛋白質 YcgF の温度依存的会合とその光反応、2008光化学討論会(2008年9月11-13日、大阪府立大学 中百舌鳥キャンパス)

(4) 中曽根祐介: BLUF蛋白質 YcgF の温度依存的反応分子機構-温度センサーとしての可能性-、第35回生体分子科学討論会(2008年6月25-28日、兵庫県先端科学技術支援センター)

(5) 小野高明: FTIR studies on blue-light receptor using FAD (BLUF), Joint Symposium of 5th Japan-China Crossover Science Symposium (2008年2月28日、水戸・茨城大学)

[その他]

ホームページ等

<http://www.biochem.ibaraki.ac.jp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小野 高明 (ONO TAKA-aki)

茨城大学・工学部・教授

研究者番号: 10175268

(2) 研究分担者

三野 広幸 (MINO HIROYUKI)

名古屋大学・理学研究科・准教授

研究者番号: 70300902

水澤 直樹 (MIZUSAWA NAOKI)

東京大学・総合文化研究科・助教

研究者番号: 80342856