

平成 21年 6月 6日現在

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2007～2008

課題番号： 19614003

研究課題名(和文) 光合成反応中心機能分子群のレドックス電位計測

研究課題名(英文) Measurement of Redox potentials of Functional Molecules in Photosystem Core Complexes

研究代表者

渡辺 正(WATANABE TADASHI)

東京大学・生産技術研究所・教授

研究者番号：70092385

研究成果の概要：

酸素発生型光合成生物は、二つの光化学系の反応中心で一次電子供与体が電荷分離反応を引き起こし、続く一連の電子伝達により、光→化学エネルギー変換を行う。しかし、数十段階のエネルギー・電子伝達を経ながら量子収率 100%という驚異の効率を支える機能分子間の電子エネルギー準位チューニングと、強力な酸化力を生み水から電子を引き抜く仕組みは大半がブラックボックスにとどまる。本研究は、その全容解明を目的に、機能分子のレドックス電位の精密計測を行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野： 時限

科研費の分科・細目： 光生命科学

キーワード： 光合成、分光電気化学計測、レドックス電位、電子伝達、電荷分離

1. 研究開始当初の背景

光合成は生物が営む生理作用で、二酸化炭素と水を原料として、有機物を合成し酸素を発生する。現象として光合成反応は非常に明白であるが、しかし分子メカニズムはまだ解明されていない。とりわけ、酸素発生の分子レベルの機構には依然として不明な点が数多く残る。

酸素発生型光合成生物は、光化学系 I・II と呼ばれる色素-タンパク質複合体で光エネルギーを捕集し、そのエネルギーにより引

き起こされる光電荷分離によって光エネルギー→電子エネルギー変換を行う。光化学系 II では H₂O を酸化させるほど高い酸化力を、光化学系 I では高い還元力を生み出し化学エネルギー(NADPH)を産出するが、生物はこのような二つの光化学系を構築することで高い酸化力と還元力を同時に生み出す機構を獲得してきた。H₂O の酸化には理論上、標準水素電極(SHE)基準で +1.2～1.3 V もの高電位を必要とするが、過去数十年、その高電位は光化学系 II を構成する機能分子の

うち「有機分子のクロロフィル *a* から成る一次電子供与体 P680」が生むと推測されてきた。しかし、そこには大きな疑問がある。それは、クロロフィル *a* の一電子酸化のレドックス電位は、生体外で得られた過去の膨大な実測データに照らすと、平均 $+0.80 \pm 0.05$ V 程度でしかない。上記の P680 がクロロフィル *a* の二量体であるとするれば、レドックス電位はさらに低くなるはずであり、必要とされる $+1.2 \sim 1.3$ V からはさらに遠くなる。つまり従来の仮説は、エネルギー（電子エネルギー準位）の観点で、円滑な酸素発生（ H_2O の酸化）を合理的に説明できるものではないからである。

そもそも光合成系を構成する機能分子群のレドックス電位に関する知見は、古くからおおよその見積もりしかなく問題がある。例えば、光化学系 II を構成する機能分子群は 10 程度あるが、そのうち一次電子受容体であるフェオフィチン *a* と第一キノン（ Q_A ）、シトクロム *b559* の 3 種のレドックス電位しか実測されていない。しかも化学滴定法により得られたもので、誤差が大きく信頼性が低いのが実情である。特にフェオフィチン *a* については、1980 年頃に化学滴定法によって測定された報告例が 2 件あるのみで、再現性も非常に乏しい。このフェオフィチンの測定値と反応のエネルギーギャップ ΔG を元にして P680 のレドックス電位は逆算されているにすぎず、実測された研究例は一つも無い。しかし、光合成研究者の間では P680 のレドックス電位についてこの推測値を一般的な知見として認識しており、それを土台に酸素発生メカニズムの議論が展開されてきたのが実状である。

2. 研究の目的

本研究では、光化学系 II 反応中心を構成する機能分子群のレドックス電位を実測することで、物理化学的な知見を刷新し、光合成における酸素発生の分子メカニズムを明らかに出すことを目的とする。具体的には、一次電子供与体 P680、フェオフィチン *a* の酸化還元電位を分光電気化学的手法により精密に実測することを目的とする。

これまで光化学系 II 機能分子群のレドックス特性に関する理解が立ち遅れている理由には、P680 が生物が生み出す最強の酸化剤であることが挙げられる。ゆえに、光化学系 II を P680 が酸化・還元するほどの高電位にして挙動を観測すると、(i) 周囲のクロロフィルの不可逆酸化、(ii) サンプルの溶媒である水の酸化分解がオーバーラップされる。したがって本研究では、周囲のクロロフィルを極力除いた光化学系 II 反応中心複合体を調整してサンプルとし、水の酸化分解を抑制する能力に優れたダイヤモンドメッシュ電極を用い

ることで、未だ誰も成し遂げていない生物が生み出す高電位領域の分光電気化学計測に挑戦する。

3. 研究の方法

申請者がこれまでに培ってきた分光電気化学的手法を駆使することで、光化学系 II 反応中心機能分子のレドックス特性の計測を図る。しかし、光化学系 I の場合に比べて測定への障害となる問題として主に次の 2 つが挙げられる。

(a) P680 のレドックス電位は集光性クロロフィルのそれより高い

(b) P680 のレドックス電位は（従来の定説に従えば）水の酸化電位より高い

(a) に関しては、光化学系 I では単位ユニットあたり約 100 分子、光化学系 II では約 40 分子のクロロフィル *a* が光捕集を担うが（これらを一般に集光性クロロフィルと呼ぶ）、光電荷分離を担う P680 もクロロフィル *a* で構成されているため、分光的に見分けるのが難しい。さらに、P680 は集光性クロロフィルよりレドックス電位が高く、P680 を酸化させると、集光性クロロフィルも全てではないが酸化するため、それに伴いシグナル（吸収スペクトル変化）が重なることが懸念される。このことは予備実験により、光化学系 II を $+0.8 \sim 1.0$ V で酸化すると、集光性クロロフィルが酸化され、さらにこの反応が付加逆なため、P680 レドックス挙動を観測するのに支障をきたすことが明らかになっている。

(b) に関しては、電気化学的に P680 を酸化・還元させようとするれば、金や白金など従来の電極系ではサンプルの溶媒である水が酸化分解されてしまうため、そのような高電位領域で定常状態が得られず、分光電気化学測定に支障をきたす。

以上のことを鑑みて、本研究では次の 2 つの方策を図る。

(1) 集光性クロロフィルを極力除いた反応中心 D1/D2/Cytochrome *b559* 標品の調整

(2) 水を分解するための過電圧の大きいダイヤモンドメッシュ電極の適用

これらの方策を軸に、以下に示す方法で研究を推進した。

光化学系 II 反応中心 D1/D2/Cytochrome *b559* 標品の分画と定性定量

ダイヤモンドメッシュ電極の作成と評価

電子メディエーターの合成と評価

分光電気化学測定法の測定条件最適化

P680 および周囲クロロフィル *a* のレドックス挙動の観測

フェオフィチン *a* の電子受容電位計測

シトクロム *b559* のレドックス電位計測

4. 研究成果

(1) 光化学系II補因子シトクロム*b559*のレドックス電位計測

光化学系IIは不安的な複合体であり、特にその機能性から過剰な光照射下では構成タンパク質が分解されることが知られる。そこで、まず光化学系IIが分光電気化学計測に耐えられるかどうかを確かめるために、比較的計測しやすい電位領域にあるシトクロム*b559*のレドックス電位計測を試みることにした。

2つのタンパク質サブユニットとヘムからなるシトクロム(Cyt) *b559*は、光化学系(PS)IIを構成する補因子の1つであり、光合成明反応において光過剰などの環境ストレスからPS IIを保護するために電子伝達を行うと考えられているが、その機能は完全には明らかになっていない。電子伝達を考える上で重要なパラメーターである酸化還元電位についても、測定精度の低さのためか、過去の報告では+25 ~ +150 mV vs. SHE とばらついている。また、Cyt *b559*の酸化還元電位のpH依存性から、ヘムに配位している2つのヒスチジン(His)残基のうち1つの酸解離平衡がCyt *b559*の酸化還元反応に影響していると考えられてきたが、電位データのばらつきからすると検証が十分とはいえないのが現状である。そこで本研究では、Cyt *b559*の酸化還元特性を明らかにすることを目的として、当研究室で確立してきた分光電気化学測定法により、Cyt *b559*の酸化還元電位を測定し、さらにpH依存性について詳細に検討した。

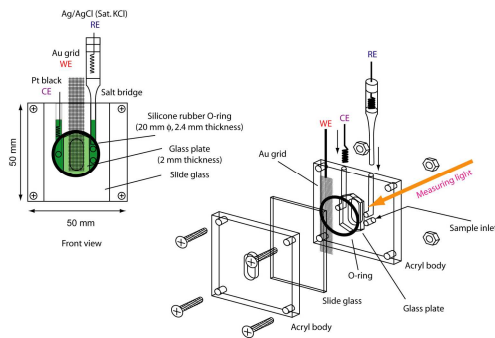


図1 薄層電解セル

ホウレンソウから分画したCyt *b559*を含むPS II反応中心複合体に、各種酸化還元メディエーター、支持電解質を加えた溶液をサンプルとし、温度を4°Cに制御して分光電気化学測定を行った。サンプルの酸化還元差スペクトルからCyt *b559*のみが吸収を示す559 nmにおいて、吸光度の時間変化測定を行った。-100 mVで60秒還元してから、各電位で180秒酸化した後、-100 mVで再還元すると、吸光度変化はきわめて良い可逆性を示し、また再現性も確認できた(図2)。各電極電位における吸光度変化をもとにネルンストプロ

ットを行ったところ、4°Cにおける一電子酸化還元反応の理論直線とよく一致し、pH = 6.0におけるCyt *b559*の酸化還元電位は $E^{o'} = +90 \pm 2$ mV ($N = 4$)と再現性の高い結果が得られた(図3)。

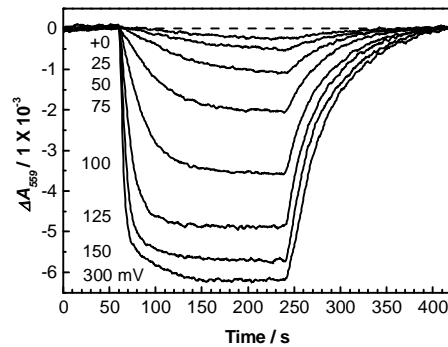


図2. PS II 反応中心複合体中のCyt *b559*を酸化還元した際の559 nmにおける吸光度の時間変化測定結果

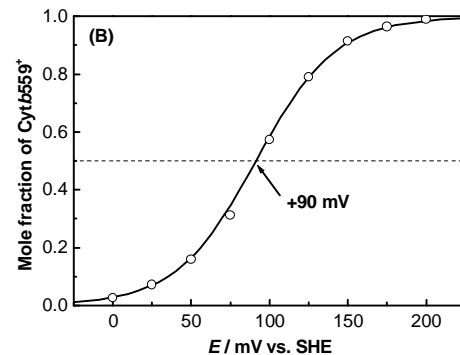


図3. pH 6.0におけるCyt *b559*の酸化還元反応をもとにしたネルンストプロット

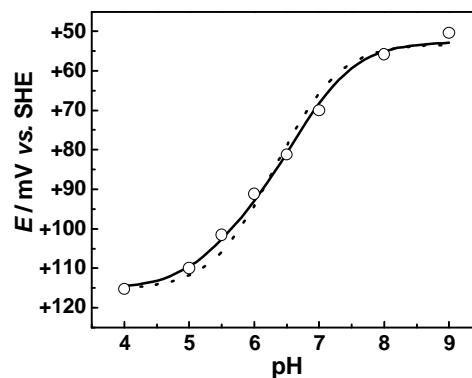


図4 Cyt *b559*の酸化還元電位のpH依存性。得られたプロットを次のモデル式により解析を行っている： $E = E^{o'}_{\text{pH}=4} - 54 \log \frac{K_{\text{ox}} + [\text{H}^+]}{K_{\text{red}} + [\text{H}^+]}$, $\text{p}K_{\text{ox}} = 5.7$ and $\text{p}K_{\text{red}} = 6.9$ (点線)； $E = E^{o'}_{\text{pH}=4} - 54 \log \frac{([\text{H}^+]^2 + K_{\text{ox1}}[\text{H}^+] + K_{\text{ox1}}K_{\text{ox2}})}{([\text{H}^+]^2 + K_{\text{red1}}[\text{H}^+] + K_{\text{red1}}K_{\text{red2}})}$, $\text{p}K_{\text{ox1}} = 5.3$, $\text{p}K_{\text{red1}} = 5.6$, $\text{p}K_{\text{ox2}} = 6.3$, $\text{p}K_{\text{red2}} = 7.1$ (実線)。

各 pH に調節した緩衝液に、ハウレンソウから分画した光化学系 II 反応中心複合体を懸濁させた溶液をサンプルとし、分光電気化学測定を行い Cyt b559 の酸化還元電位の pH 依存性を調べたところ、図 4 に示すような結果が得られた。プロトンの解離平衡がタンパク質などの酸化還元電位に及ぼす影響を想定したモデル式（図 4 キャプション参照）を用いて解析すると、2 つの His 残基の酸解離平衡が影響すると仮定した（図 4 実線）方が、1 つの His 残基が影響するとした場合（図 5 点線）よりも実験結果をより良く再現できることが分かった。したがって、Cyt b559 の酸化還元反応に 2 つの His 残基のプロトン解離平衡が影響を及ぼしていることが明らかとなり、従来知見に対して意義を唱えるものとなった（論文公表済）。

(2) 光化学系 II 一次電子受容体フェオフィチン a のレドックス電位計測

光化学系 II を構成する機能分子のうち、光励起した P680 から電子を受容するフェオフィチン (Pheo) a の酸化還元電位は、これまで 1979 年に化学酸化還元滴定法によって求められ、 $-610 \pm 30 \text{ mV vs. SHE}$ （以下すべて SHE 表記）と報告されたが、誤差も大きく、現在では信頼性が低いとされている。その理由は、滴定法だと、還元剤の還元力を高くするために pH 11.0 と生理的条件には程遠い条件で測定を行わなければならないうえに、それでも完全に Pheo a を還元するには不十分なため電位の見積もりが甘い、ということにある。しかしこの報告以降、より有効な計測手法が見出されず現在に至っている。このことに対し我々は、これまで P700 など光合成機能分子群に適用してきた分光電気化学的手法を応用すれば、生体内の環境に近い pH 領域でも Pheo a の酸化還元反応が観測可能と考えた。そこで、Pheo a のレドックス電位測定を可能とする実験手法の確立を図り、測定値を基に光化学系 II の電荷分離反応の機構解明を目指した。

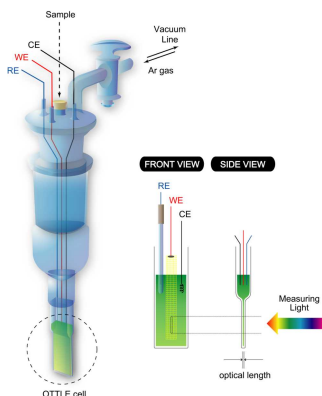


図 5 密封型薄層電解セル

Pheo a の酸化還元電位計測のために新たに開発した分光電気化学測定用セルを図 5 に示す。改良点としては、Pheo a の還元体（アニオンラジカル）を安定に生成するうえで障害となる酸素の完全除去のため密封型にしたことと、高い還元力を発生するために水素過電圧の高い水銀-金アマルガム網電極を用いたことにある。このセルを用いて、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* から分画・精製した光化学系 II につき分光電気化学測定を行ったところ、各電極電位における酸化還元反応 (Pheo a/Pheo a⁻) に伴う吸収スペクトル変化が観測に初めて成功した。吸光度変化と電極電位の相関をネルンスト式により解析したところ一電子酸化反応が観測できていることが明らかとなり、酸化還元電位は pH 6.5 において -505 mV と決定された。この結果から、生体内の環境に近い条件では従来認識されてきた電位 (-610 mV) よりも 100 mV ほど貴であることが明らかとなった。さらに、このことを基に P680 のレドックス電位を想定すると、これまでの推定値より $+100 \text{ mV}$ ほど高くあるはずであり、従来知見を刷新する結果だといえる（論文投稿済み、審査中）。

(3) 光化学系 II 一次電子供与体 P680 の酸化還元挙動観測

光合成生物による水の酸化（酸素発生）の源は、一次電子供与体 P680 の光励起によって生じる酸化力である。この酸化還元電位は、水の酸化に必要な電位と過電圧を考慮し $+1.2 \sim 1.3 \text{ V}$ 程度と考えられており、また (i) の結果と Pheo a と P680* のギブズ自由エネルギー差から $+1.25 \text{ V}$ 程度と見積られるが、実測された例はない。それは、P700 など他の機能分子の場合とは異なり、電位を調節しながら吸光度変化を調べようとすると、P680 サンプルの溶媒として用いる水が酸化されてしまい分光測定が不能となるからである。そこで、酸素過電圧（水の分解電圧）が高いダイヤモンドメッシュ電極を分光電気化学測定に使用することを図り、分光電気化学測定を行うこととした。

また、高電位で光化学系 II サンプルを保持すると周縁色素分子が酸化分解を受け、目的とする P680 の吸光度変化と重複する可能性が考えられる。そこで、周縁色素を極力除いた光化学系 II 反応中心を分画・精製し、それをサンプルに分光電気化学測定を行った。各電極電位におけるサンプルの吸収スペクトルを図 6 に示す。観測された吸光度変化と電位にはネルンストの関係には従わず、不可逆であった。それぞれの電位におけるスペクトルの差（差スペクトル）を調べた結果が図 9 であるが、高電位において $670 \sim 674 \text{ nm}$ に顕著な吸光度変化がみられるのみで、P680 のも

のと思われる(680 nmにおける吸光度)変化は見られなかった。現在、電極にチオール修飾を施すことや、より電気化学的に安定でかつ可逆性の高いメディエーターの模索などを行っており、P680の可逆な酸化還元応答を観測することを目指して、継続して研究を遂行している。

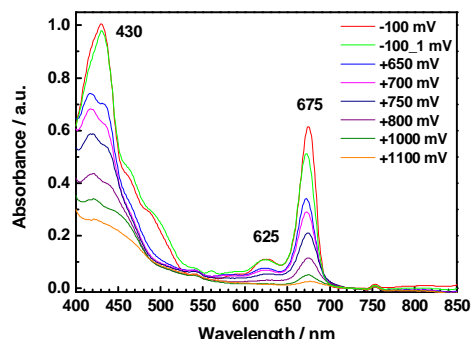


図6 各電極電位における光化学系IIの吸収スペクトル

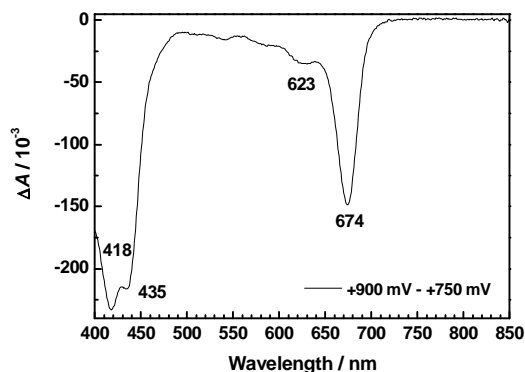
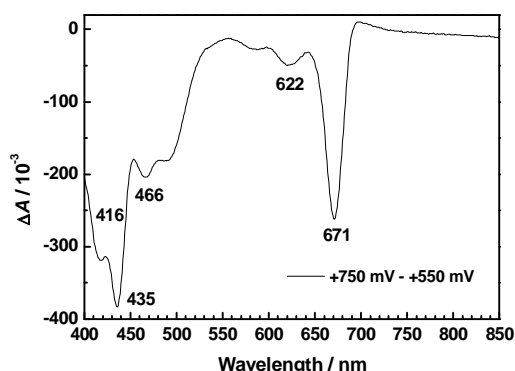


図7 電極電位を変化させた場合のPSIIの差吸収スペクトル

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8件)

Y. Kuroiwa, Y. Kato, T. Watanabe, Negative Shift of Chlorophyll *a* Oxidation Potential by Aggregation in Acetonitrile/Ionic Liquid Mixed Solvents, *J. Photochem. Photobiol. A*, 202, p191-195 (2009). (審査有)

M. Kobayashi, S. Ohashi, H. Miyashita, T. Watanabe: Unique Photosystems in *Acaryochloris marina*. *Photosynth. Res.*, 98, p141-149 (2008). (審査有)

加藤祐樹, 仲村亮正, 渡辺 正: 光合成初期過程を駆動する分子部品のレドックス電位精密計測. *光化学*, 39, p205-208 (2008). (審査無)

T. Tomo, Y. Kato, T. Watanabe (他10名、2, 12番目): Characterization of Highly Purified Photosystem I Complexes from the Chlorophyll *d*-dominated Cyanobacterium *Acaryochloris marina*, MBIC11017. *J. Biol. Chem.*, 283, p18198-18209 (2008). (審査有)

T. Shibamoto, Y. Kato, T. Watanabe: Spectroelectrochemistry of Cytochrome *b559* in the D1-D2-Cyt *b559* Complex from Spinach. *FEBS Lett.*, 582, p1490-1494 (2008). (審査有)

Y. Zhang, A. Nakamura, Y. Kuroiwa, Y. Kato, T. Watanabe: Spectro- electrochemistry of P700 in Native Photosystem I Particles and Diethyl Ether-Treated Thylakoid Membranes from Spinach and *Thermo- synechococcus elongatus*. *FEBS Lett.*, 582, p1123-1128 (2008). (審査有)

Y. Kato, A. Nakamura, T. Suzawa, T. Watanabe: Unexpected Difference in the P700 Redox Potential Among Oxygenic Photosynthetic Organisms Revealed by Spectroelectrochemistry. *Photosynthesis, Energy from the Sun, proceedings of 14th International Congress on Photosynthesis*, p109-112 (2008). (審査無)

加藤祐樹, 仲村亮正, 渡辺 正: 分光電気化学法を用いた光合成電子伝達成分の酸化還元電位計測. *光合成研究*, 17, p63-73 (2007). (審査無)

[学会発表](計16件)

Yuki Kato, Miwa Sugiura, Tadashi Watanabe, Spectroelectrochemical Measurement of the Redox Potential of the Primary Electron Acceptor Pheophytin *a* in Photosystem II, 215th Electrochemical Society Meeting, 26th May 2009, San Francisco.

Tadao Shibamoto, Yuki Kato, Tadashi Watanabe, Spectroelectrochemical investigation on the redox property of cytochrome *b559* in photosystem II reaction center, 215th Electrochemical Society

Meeting, 26th May 2009, San Francisco.

加藤祐樹, 杉浦美羽, 渡辺 正, 分光電気化学的手法による *Thermosynechococcus elongatus* 由来の光化学系 II 一次電子受容体フェオフィチン *a* の酸化還元電位計測, 第 50 回日本植物生理学会年会, 2009 年 3 月 21 日, 名古屋.

藤田 舞, 尾田晃伯, 芝本匡雄, 加藤祐樹, 渡辺 正, 光合成光化学系 II コア複合体における シトクロム *b559* の酸化還元挙動, 第 2 回日本化学会関東支部大会, 2008 年 9 月 18 日, 群馬大学 (2008).

尾田晃伯, 芝本匡雄, 加藤祐樹, 渡辺 正, 分光電気化学的手法による光化学系 II 一次電子受容体フェオフィチン *a* のアニオンラジカルの生成および観測, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 28 日, 立教大学.

芝本匡雄, 黒岩善徳, 加藤祐樹, 渡辺 正, 光化学系 II 反応中心複合体におけるシトクロム *b559* の酸化還元電位の pH 依存性, 日本化学会第 88 春季年会, 2008 年 3 月 27 日, 立教大学.

加藤祐樹, 鞆 達也, 仲村亮正, 土屋 徹, 三室 守, 渡辺 正, 分光電気化学的手法による *Acaryochloris marina* の光化学系 I 一次電子供与体の酸化還元電位計測, 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20 日, 札幌.

鞆 達也, 加藤祐樹, 鈴木健裕, 秋本誠志, 野口 巧, 土屋 徹, 堂前 直, 渡辺 正, 三室 守, クロロフィル *d* を主要色素としてもツシアノバクテリアの光化学系 I のサブユニット組成と光化学反応の解析, 第 49 回日本植物生理学会年会, 2008 年 3 月 20 日, 札幌.

Y. Kato, A. Nakamura, T. Suzawa, T. Watanabe, Differences in the Redox Potential and Spectroscopic Property of P700 in Oxygenic Photosynthetic Organisms, 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms, 2007.12.11, Kyoto.

T. Tomo, Y. Kato, S. Akimoto, T. Noguchi, T. Tsuchiya, T. Watanabe, M. Mimuro, The Characterization of Photosystems I and II in a Chlorophyll *d*-dominated Cyanobacterium, 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms, 2007.12.11, Kyoto.

S. Ohashi, M. Kasahara, S. Fukuyo, M. Nakazato, K. Iwamoto, Y. Shiraiwa, Y. Kato, T. Watanabe, M. Kobayashi, Redox Potential of Chl *d* *in vitro*, 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms, 2007.12.11 Kyoto.

Tadashi Watanabe, Fine Redox Potential Tuning among Chlorophylls and Metalloproteins for Attaining the 100% Quantum Yield in Charge Separation and Subsequent Electron Transfer of Photosynthetic Primary Processes, International Symposium on Metallomics 2007.11.25, Nagoya.

加藤祐樹, 仲村亮正, 須澤朋之, 山下麻美, 渡辺 正, さまざまな光合成生物の光化学系 I における P700 の酸化還元および分光特性, 第 22 回生体機能関連化学シンポジウム, 2007 年 9 月 28 日, 東北大学. 芝本匡雄, 黒岩善徳, 加藤祐樹, 渡辺 正, 光化学系 II を構成する補因子シトクロム *b559* の酸化還元特性, 第 22 回生体機能関連化学シンポジウム, 2007 年 9 月 28 日, 東北大学.

Y. Kato, A. Nakamura, T. Suzawa, T. Watanabe, Unexpected Difference in the P700 Redox Potential among Oxygenic Photosynthetic Organisms Revealed by Spectroelectrochemistry", 14th International Congress of Photosynthesis, 2007.7.14, Glasgow (England).

〔その他〕

ホームページ:

http://www.iis.u-tokyo.ac.jp/Labs/wata_lab/watanabej.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺 正 (Watanabe Tadashi)
東京大学・生産技術研究所・教授
研究者番号: 70092385

(2) 研究分担者

吉原 佐知雄 (Yoshihara Sachio)
宇都宮大学・工学研究科・准教授
研究者番号: 70220712

(3) 連携研究者

加藤 祐樹 (Kato Yuki)
東京大学・生産技術研究所・助教
研究者番号: 10376634