

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 6 日現在

機関番号： 32660

研究種目： 基盤研究(C)

研究期間： 2010~2012

課題番号： 22550146

研究課題名（和文） 光合成酸素発生メカニズムの計測化学的解明

研究課題名（英文） Analytical Chemical Study on the Mechanism of Photosynthetic Oxygen Evolution

研究代表者

渡辺 正 (WATANABE TADASHI)

東京理科大学・総合教育機構・教授

研究者番号： 70092385

研究成果の概要（和文）：本研究は、光合成機能のうちでブラックボックスにとどまる水分解（酸素発生）の分子機構の解明を目的に、重要機能分子である一次電子受容体フェオフィチン *a* とプラストキノン  $Q_A$  の酸化還元電位を分光電気化学的精密計測により実測した。部分変異導入体および主要金属イオンを交換した光化学系 II 標品における結果を基に電位相関を解明することで、酸化力の源とされる P680 の酸化還元電位を推定し、酸素発生速度との関連性を明らかにした。

研究成果の概要（英文）： To elucidate the energetics driving water oxidation by Photosystem II, in which redox properties of cofactors were obscure because of insufficient measurement technique, redox potentials of two key cofactors, the primary electron acceptor Pheophytin *a* and the primary quinone  $Q_A$ , were determined by spectroelectrochemistry using an optically-transparent thin-layer electrode cell. On the basis of the results of site-directed mutants and ion-exchanged PSII preparations, the redox potential of the primary electron donor P680, which is the source power for the water oxidation, and relationship between the oxygen-evolution activity and the cofactors' redox properties were elucidated.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野： 生体機能化学

科研費の分科・細目： 複合化学・生体関連化学

キーワード： 光合成・水分解・酸素発生・反応中心・酸化還元電位

## 1. 研究開始当初の背景

酸素発生型光合成生物は、光化学系 I・II と呼ばれる二つの色素タンパク質複合体が協働し、光エネルギーの捕集と電荷分離を行う。それを反応の駆動力として、光化学系 II では水を酸化するほどの高い酸化力を、光化学系 I では化学エネルギー(NADPH)を産出し炭素固定に備える高い還元力を生み出す。

しかし、水の酸化力の根源を、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* (Chl *a*) から成る一次電子供与体 P680」の光励起とみるのが定説だが、ここに大きな疑問が残っている。

生体内(pH 7.0 前後)で水を酸化するには、標準水素電極(SHE)基準で+0.8 V より貴な電位を要する。Mn-クラスターの S 状態サイク

ルを通じ水から引き抜かれた電子がチロシン残基 (Tyr<sub>z</sub>) を経て酸化型 P680 に供給される過程を考慮し、P680 の酸化還元電位は+1.1 ~ 1.3V と推定されてきた。P680 酸化還元電位の実測値がないのは、P680 は生物界最強ともいわれるほど酸化力が強く、水を溶媒に用いた実験系だと、系を分解することなく P680 の酸化還元挙動を観測する手段が見出せていないからである。しかし、そもそも Chl *a* の酸化還元電位は+0.8 V 程度でしかないから、どのようにしてそれほど高い酸化力を、またどれだけの酸化力を生み出しているのか、光合成研究において最大の謎となっている。

そこで、P680 の酸化還元電位の推測を支持する唯一の実験的証拠として、光励起状態にある P680\* から電子を受け取る一次電子受容体フェオフィチン *a* (Phe *a*) の電子受容電位が重視されてきた。1979 年に Phe *a* の電位は  $-610 \pm 30$  mV と報告され、以後の過度吸収分光法による速度論的解析から P680\* と Phe *a* の電位差が 150 mV 程度と見積もられたため、P680 → P680\* のエネルギー準位差が波長 680 nm の光励起分 ( $\approx 1.83$  eV) を差し引いて、P680 のレドックス電位は+1.1 V 程度と推算できる。しかし、Phe *a* の酸化還元電位は化学滴定法で求められており、誤差が  $\pm 30$  mV と大きいばかりか、還元剤の還元力を高めるため生理的条件にはほど遠い pH 11.0 で測定されているため、実態を正確に観測できているとはいえなかった。以後の追試も、pH 11.0 で  $-604$  mV と、1981 年に報告された一例にとどまる。

このような状況を鑑み、本研究代表者らは光化学系 II における酸素発生メカニズムの物理化学的側面を明らかにすべく、Phe *a* の酸化還元電位を精密かつ生理的条件における値を求めることを目的に、分光電気化学的手法を適用し測定条件の確立を図った。その結果、滴定法に起因する問題を払拭し、pH 6.5 で  $-505 \pm 6$  mV と高い精度で決定することに成功し、過去の値より 100 mV ほど貴であることを明らかにした。さらに P680 の酸化還元電位も暫定的にこれまでより 100 mV 貴にある+1210 mV 程度と結論づけ、物理化学的側面から酸素発生メカニズムの議論を刷新するに至った。

## 2. 研究の目的

代表者の最近の研究成果は、実測できない P680 の酸化還元電位の実態に可能な限り迫ったものといえるが、その結果から新たに下記のような疑問が浮かび上がってきた。

- (i) P680\* と Phe *a* の電位差を 150 mV 程度としているが、どれだけ正確なのだろうか
- (ii) P680・Phe *a* 間および Q<sub>A</sub> との電位差は電子伝達速度および酸素発生速度とはどのような関連があるのか

(i)については、現時点では速度論的解析か

ら弾き出された値をよりどころとする以外ないが、その値が正確に意味するところは、P680\* と Phe *a* の平衡電位の差ではなく、P680\* から Phe *a* に電子が伝達され (電荷分離)、その結果生じるラジカルペアー [P680<sup>+</sup> Phe *a*] と P680\* の自由エネルギー差であることに注意する必要がある。すなわち、電荷分離によって生じる P680<sup>+</sup> の正電荷が Phe *a* の電位に及ぼす影響を考慮に入れる必要があるということだが (図 2 参照)、最近までこのことは推測にとどまり重視されてこなかった。ラジカルペアーの状態を決定する一つの方法論として、Phe *a* から電子を受容するプラストキノン Q<sub>A</sub> の酸化還元電位を決定し、Phe *a* の電位との相関と速度論的解析から算出された自由エネルギー差とを照らし合わせる事が挙げられる。

(ii) に関して言えば、代表者らが Phe *a* の電位測定に用いたのはシアノバクテリアの一種 *Thermosynechococcus elongatus* から分画した光化学系 II であるが、その反応中心蛋白質は通常の培養条件下では *psbA1* が、強光などストレス条件下では *psbA3* が発現することが知られている。こうした発現の違いは、細胞増殖速度に影響を及ぼし、さらに、生成される PSII 複合体についても酸素発生活性に違いがみられ、PsbA3 の発現によって生成される PSII (PsbA3-PSII) の方が 1.8 倍ほど高いことが見出されている。PsbA1 と PsbA3 の間では 344 アミノ酸残基中 21 箇所が異なっており、このようなアミノ酸の違いが電子伝達分子の物性に影響を及ぼし、活性などに違いをもたらしていると考えられる。

そこで、まず Q<sub>A</sub> の電位計測法の確立を図り、さらに PsbA1 および PsbA3 だけをもつ PSII を研究対象とし、電位相関と酸素発生活性の相関を調べることにした。

## 3. 研究の方法

初年度は、Q<sub>A</sub> の分光電気化学計測の条件確立を図り、代表者が決定した Phe *a* の酸化還元電位との比較により、*T. elongatus* の光化学系 II における Phe *a* → Q<sub>A</sub> 電位相関を明らかにし、P680 の酸化還元電位の実態に迫ることを第一の目的とする。Q<sub>A</sub> の電位計測は、従来の滴定法では蛍光法を利用しているが、本研究でもこれまでの分光電気化学計測技術を蛍光法と組み合わせれば、十分に測定手法を確立できるものと考えられる。

さらに、確立した分光電気化学計測法を遺伝子工学的に発現させた PsbA3 だけを反応中心蛋白としてもつ PSII (以下、PsbA3-PSII) および、イオン置換した PSII に適用することで、電位を決定し、酸素発生活性の結果と比較検討することにより、その相関性を探った。

## 4. 研究成果

(1) 光化学系 II における反応中心タンパク PsbA1 と PsbA3 の違いが機能分子の酸化還元

電位および酸素発生活性に及ぼす影響

PsbA1 もしくは PsbA3 で構成される PSII の性質を調べると、PsbA3-PSII の方が酸素発生活性が 1.8 倍ほど高く、また阻害剤の結合やサブユニット間の相互作用の強さが違うことを見出した。両者間で異なる 21 アミノ酸残基のうち一次電子受容体フェオフィチン (Phe *a*) に近接する 130 番目のアミノ酸残基 (PsbA-130) が PsbA1 ではグルタミン、PsbA3 ではグルタミン酸と異なることに着目し、Phe *a* の分光電気化学測定を行ったところ、両者の酸化還元電位が 17 mV 異なることを明らかにした (図 1、*Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, 1797, 1491-1499 (2010))。したがって、この電位差が活性の違いをもたらす主要因として考えられるものの、熱化学的な分析 (熱発光測定) により、各電子伝達分子間の自由エネルギー差を調べると、Phe *a* の酸化還元電位以外にも異なることが示唆された。

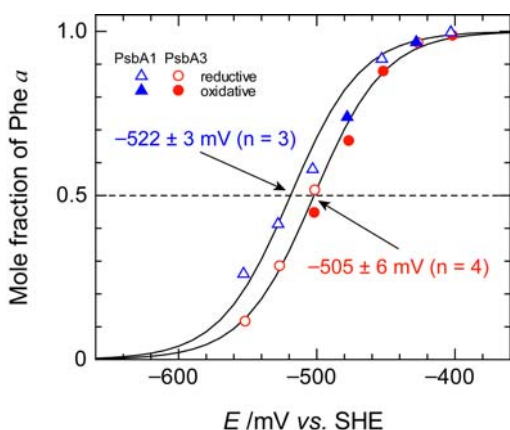


図 1 PsbA1-PSII あるいは PsbA3-PSII における Phe *a* の酸化還元反応のネルンストプロット。

そこで、次に蛍光法を用いた  $Q_A$  の電位計測法を確立させ、各電極電位における平衡状態の蛍光強度変化をもとにネルンストプロットを行ったところ、14°C における一電子酸化還元反応の理論的傾き 56.8 に近い傾き 56.5 を示し、独立した 4 回の測定から、 $Q_A$  の酸化還元電位は  $-101 \pm 2$  mV vs. SHE と決定できた (図 2)。

同条件下にて測定された PsbA1-PSII の場合と比べると、PsbA3-PSII では  $Q_A$  の電位が約 +40 mV シフトしているといえる。これまでは、 $Q_A$  が PsbD に存在するために PsbA の構成の違いによる影響は受けないと予測していたが、今回の結果から PsbA1-PSII と PsbA3-PSII の間で  $Q_A$  の電位は異なり、しかも Phe *a* の場合よりもその差は大きいことが明らかとなった。

P680 の電位については、熱発光測定によ

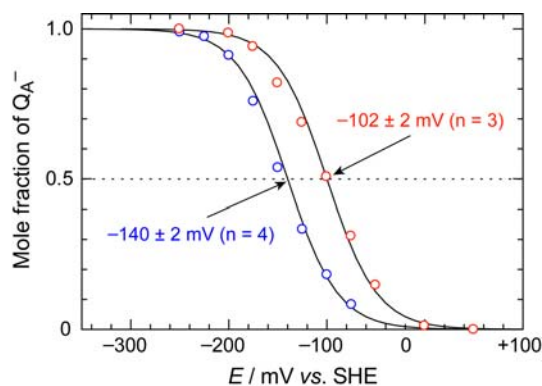


図 2 PsbA1-PSII あるいは PsbA3-PSII における  $Q_A$  の酸化還元反応のネルンストプロット。

り P680\* と Phe *a* の電位差をみつり検討したところ、PsbA1-PSII では +1190 mV 程度であるのに対し、PsbA3-PSII では +1210 mV 程度と異なり、この違いが最も酸素発生活性に影響を及ぼすと考えた (*Biochim. Biophys. Acta - Bioenergetics*, 1797, 1491-1499 (2010))。

(2) 酸素発生複合体における  $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  および Cl<sup>-</sup>/Br<sup>-</sup> 置換が光化学系 II の機能分子の酸化還元電位・酸素発生活性に及ぼす影響

光化学系 II における水分解→酸素発生を担う酸素発生複合体は、4 個の Mn イオンと 1 個の  $Ca^{2+}$  からなる MnCa クラスターが触媒中心となり、表在性タンパク質や Cl<sup>-</sup> などにより構成される。 $Ca^{2+}$  あるいは Cl<sup>-</sup> を取り除くと酸素発生活性が失われるが、 $Ca^{2+}$  の結合サイトには  $Sr^{2+}$  が、Cl<sup>-</sup> 結合サイトには Br<sup>-</sup> がそれぞれ取りこめられることが知られており、活性の度合いは低下するものの MnCa クラスターの S 状態サイクルは機能する。イオン置換による酸素発生活性の低下は、熱発光など熱化学的な分析から S3 状態の電子エネルギー準位の低下によるものと説明できるが (Ishida ら、2008)、さらに  $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  置換体では時間分解蛍光測定によりキノンの電子移動 ( $Q_A \rightarrow Q_B$ ) が遅くなっていること示唆されている (Kargul ら、2007)。そこで、本年度では、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* から、 $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  あるいは Cl<sup>-</sup>/Br<sup>-</sup> 置換された光化学系 II 標品を精製し、分光電気化学法により  $Q_A$  の酸化還元電位を調べることにより、イオン置換が酸素発生活性および電子伝達特性に及ぼす影響を調べることにした。結果、 $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  置換により +27 mV ほど  $Q_A$  の酸化還元電位がシフトするのにに対し、Cl<sup>-</sup>/Br<sup>-</sup> 置換ではほとんど変わらないことが分かった。本結果と既報の熱発光の結果から、 $S_2/S_3$  の電位変化は 5~7 mV 程度でしかないことが推察され、酸素発生活性は、Mn クラスターそのものの酸化還元電位ではなく、電子伝達に関与する機能分子の電

位に大きく影響を受けることが分かった (図 4; *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 1998-2004 (2012))。

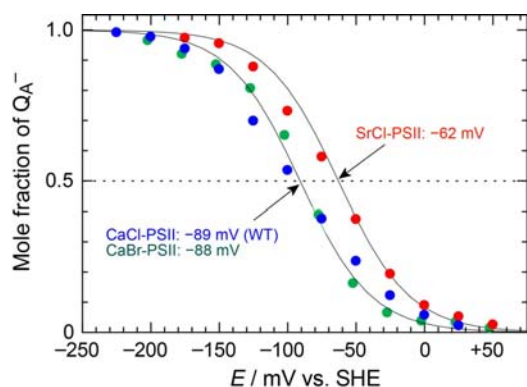


図 3 Ca/Sr 置換あるいは Cl/Br 置換した PSII における  $Q_A$  の酸化還元反応のネルストプロット。

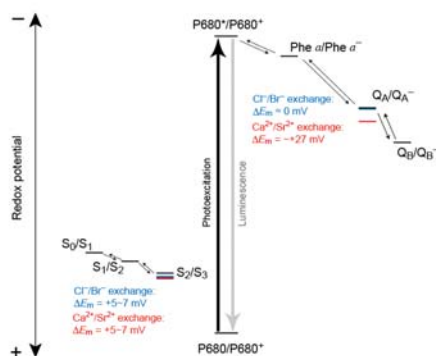


図 4  $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  置換あるいは  $Cl^-/Br^-$  置換した PSII における電位相関

## 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 4 件)

- ① Y. Kato, T. Shibamoto, S. Yamamoto, T. Watanabe, N. Ishida, M. Sugiura, F. Rappaport, A. Boussac, "Influence of the PsbA1/PsbA3,  $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  and  $Cl^-/Br^-$  exchanges on the redox potential of the primary quinone  $Q_A$  in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* as revealed by spectroelectrochemistry", *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, pp. 1998-2004 (2012), 審査有, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.06.006
- ② Y. Kato, M. Tsujii, T. Watanabe, "Photoelectrochemical Behavior of Photosystem I Complex in the Presence of a Viologen as Mediator at  $SnO_2$  Electrode", *Electrochemistry*, 79, pp.845-847 (2011), 審査有,

<http://journal.electrochem.jp/jpn/download.html?fn=v079m10p0845y2011.pdf>.

- ③ 加藤祐樹, 渡辺正, 「分光電気化学法による光合成光化学系 II 電子受容分子の酸化還元電位計測」, 生物物理, 51, 134-135 (2011), 審査有, [https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/51/3/51\\_3\\_134/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/biophys/51/3/51_3_134/_pdf)
- ④ M. Sugiura, Y. Kato, R. Takahashi, H. Suzuki, T. Watanabe, T. Noguchi, F. Rappaport, A. Boussac, "Energetics in Photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* with a D1 protein encoded by either the psbA1 or psbA3 gene", *Biochim. Biophys. Acta -Bioenergetics*, 1797, 1491-1499 (2010), 審査有, doi:10.1016/j.bbabi.2010.03.022.  
[学会発表] (計 11 件)
- ① Y. Kato, T. Shibamoto, S. Yamamoto, T. Watanabe, N. Ishida, M. Sugiura, F. Rappaport, A. Boussac, "Influences of modifications at the electron donor side on the redox properties of the acceptor side in photosystem II as revealed by spectroelectrochemistry", Gordon Research Conferences -2011 Photosynthesis, 2012年6月9日, Davidson College, Davidson, NC, USA.
- ② 山本昌一、芝本匡雄、加藤祐樹、杉浦美羽、Alain Boussac、渡辺正、酸素発生複合体における  $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  および  $Cl^-/Br^-$  置換が光化学系 II のエナジェティクスに及ぼす影響、第 53 回日本植物整理学会年会、2012年3月16日、京都産業大学
- ③ 加藤祐樹 (招待講演)、Energetics within photosystem II based on redox potentials revealed by spectroelectrochemistry、第 49 回日本生物物理学会、2011年9月16日、兵庫県立大学
- ④ 山本昌一、芝本匡雄、加藤祐樹、杉浦美羽、渡辺正、PsbA1 と PsbA3 で構成される光化学系 II 複合体における電子受容分子の酸化還元電位、第 19 回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー、2011年7月9日、大阪大学
- ⑤ Y. Kato, T. Shibamoto, A. Oda, S. Yamamoto, M. Sugiura, T. Watanabe, Spectroelectrochemical Study on Energetics within Photosystem II Composed of Either PsbA1 or PsbA3 from *Thermosynechococcus elongatus*, Gordon Research Conferences -2011 Photosynthesis, 2011年6月14日, Davidson College, Davidson, NC, USA.
- ⑥ Y. Kato, T. Watanabe (招待講演), Energetics within photosystem II based on the redox potentials of cofactors on the acceptor side determined by spectroelectrochemistry, Molecular Mechanism of Photosynthetic Energy Conversion: The Present Research and Future Prospects, 2010年

12月4日, 岡崎コンファレンスセンター

- ⑦ 加藤祐樹, 芝本匡雄, 長尾遼, 山崎拓也, 杉浦美羽, 鞆達也, 渡辺正, Spectroelectrochemical investigation of redox potential of the primary quinone electron acceptor  $Q_A$  in photosystem II for various species, 第48回日本生物物理学会年会, 2010年9月20日, 東北大学
- ⑧ Y. Kato, T. Shibamoto, A. Oda, M. Sugiura, T. Watanabe, Spectroelectrochemical determination of the redox potentials of electron acceptors, pheophytin *a* and primary quinone  $Q_A$ , in photosystem II, The 15th International Congress of Photosynthesis, 2010年8月23日, 中国・北京
- ⑨ Y. Kato, M. Sugiura, T. Watanabe, Energetics within photosystem II based on the redox potentials of pheophytin *a* and primary quinone  $Q_A$  determined by spectroelectrochemistry, Molecular Basis of Photosynthetic Energy and Electron Transfer and Related Respiratory Processes ~Satellite Meeting, 2010年8月18日, Nanyang Technical University, シンガポール
- ⑩ 加藤祐樹, 芝本匡雄, 杉浦美羽, 渡辺正, 分光電気化学法による光化学系 II 電子受容分子の酸化還元電位計測, 第37回生体分子科学討論会, 2010年6月18日, 山口大学
- ⑪ 加藤祐樹, 芝本匡雄, 杉浦美羽, 渡辺正, 分光電気化学計測でみる光化学系 II コファクターのエネルギー準位相関, 第1回日本光合成学会公開シンポジウム, 2010年6月4日, 第1回日本光合成学会公開シンポジウム, 東京大学

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

渡辺正 (Watanabe Tadashi)  
東京理科大学・総合教育機構・教授  
研究者番号: 70092385

### (2) 研究分担者

加藤祐樹 (Kato Yuki)  
名古屋大学・理学研究科・助教  
研究者番号: 10376634