

令和 7 年 6 月 17 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2022～2024

課題番号：22K06160

研究課題名（和文）光合成酸素発生系の基質水分子結合過程の追跡

研究課題名（英文）Water molecule binding process in the photosynthetic oxygen evolution

研究代表者

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

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）：光合成酸素発生をになう光化学系IIタンパク質複合体のマンガンクラスターには5つの中間酸化状態（ S_i ： $i = 0-4$ ）が存在し、サイクリックに状態遷移する。S2-S3状態間では水分子の挿入が行われると考えられている。S2状態はEPR法によって検出できる。通常安定な $g = 2$ （ $S = 1/2$ ）という状態に加え $g = 4$ （ $S = 5/2$ ）という異性体の存在が知られている。本研究では $g = 4$ 状態についてパルスEPR測定を行った。更に、量子化学計算との比較により分子構造を明らかにした。また、 $g = 5$ 状態についての解析を行いS2-S3状態の遷移機構の解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

光合成酸素発生は地球の生命活動において最も重要な反応過程のひとつである。酸素発生機構の解明は、生命活動の意義、原理の解明において基礎的な意味をもつ。また、量子効率の高い太陽エネルギーの化学エネルギー変換過程は工学的にも模範として学ぶべきものである。酸素発生はマンガンクラスターが構造を変化させることによって水分子を取り込み、4つの光子のエネルギーを吸収して酸素分子を創出する反応である。X線構造解析が進んだ現在でも、水分子の挿入過程は明らかになっていない。本研究では磁気構造から分子軌道を介して電子構造を明らかにし、この反応過程を解析している。

研究成果の概要（英文）：The Mn cluster in the photosystem II protein complex is responsible for oxygen evolution and contains five intermediate oxidation states (S_i : $i = 0-4$) during cyclic state transitions. The insertion of water molecules was believed to occur between the S2 and S3 states. The S2 state can be detected using the EPR method, which consists of a stable $g = 2$ ($S = 1/2$) state and an isomer with $g = 4$ ($S = 5/2$). Using pulse-EPR measurements, we investigated the properties of the $g = 4$ state. The molecular structure was clarified by comparison with quantum chemical calculations. Additionally, the $g = 5$ state was investigated, and a transition mechanism between the S2-S3 states was proposed.

研究分野：生物物理学

キーワード：光合成 酸素発生 EPR ESR 電子移動 マンガンクラスター

1. 研究開始当初の背景

酸素発生は、光合成研究最大の謎である。2011年に岡山大学らのグループによって X 線結晶解析により酸素発生をになうマンガンクラスターの構造が明らかになった (Umena et al. Nature (2011))。マンガンクラスターの構造は 3 つのマンガンと 1 つのカルシウムが酸素によって架橋された立方体部分が 1 つのマンガンと 1 つの酸素分子によって架橋された “ゆがんだ椅子構造” であった (図 1 右参照)。マンガンクラスターには 5 つの中間酸化状態 ($S_i; i=0-4$) が存在し、サイクリックに状態遷移することによって分子状酸素が生成する。最近の X 線フェムト秒レーザーでの構造解析では日本のグループと米国のグループから中間状態の構造が報告され S_2 - S_3 遷移においてマンガンクラスター内に酸素が挿入されることが提案されているが、結晶構造解析による分子構造と、磁気解析から得られる電子状態、そして量子化学計算に基づく反応モデルの三者は矛盾している。

マンガンクラスターのゆがみ構造の起源は Mn1, Mn3 と呼ばれるマンガンイオン間の距離が極端に長いことにある。そのため Mn1-Mn3 間を架橋する酸素イオンの位置によって酸素イオンが椅子の部分に近い “Closed cubane” と、背もたれの部分に近い “open cubane” 構造の 2 つが QM 計算からは提唱されていた (図 1)。ドイツの ESR グループは S_2 - S_3 状態の遷移の過程で Closed cubane 構造が open cubane 構造にスイッチする機構を提唱している。その一方で X 線解析のグループからは、Closed cubane に対応する構造が見つかっていないと指摘されていた。

これまでの議論では $g = 4$ ($S = 5/2$) という信号の状態が中間体であるか否かという議論が先行していた。これは現在でも続いている。しかし、我々は $g \sim 5$ というまったく別の信号の検出に成功し、この状態が S_2 - S_3 遷移の中間体であるとの見通しをたてて研究を開始した。

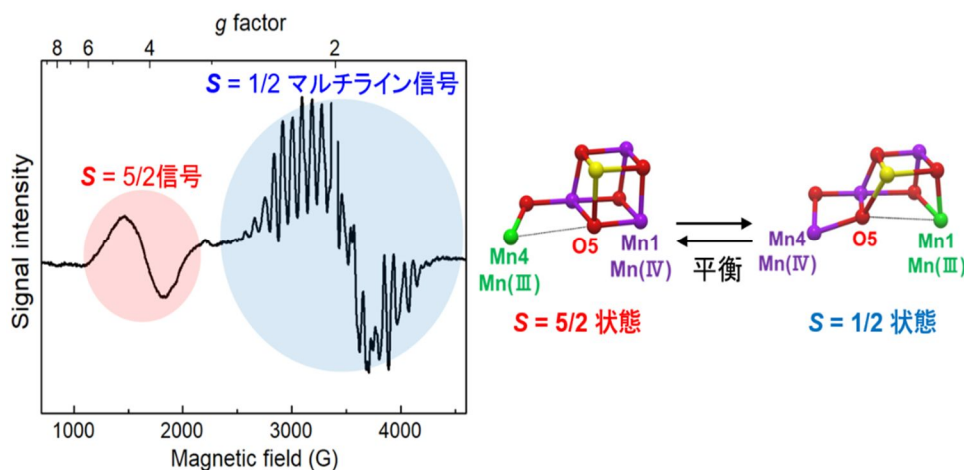


図 1 : S_2 状態の EPR 信号と構造モデル。2 つの異性体によって説明している。このモデルでは相対的に安定な $g = 2$ ($S = 1/2$) open-cubane structure が $g = 4$ ($S = 5/2$) closed-cubane structure を介して S_3 状態に遷移すると考えていた。

2. 研究の目的

本研究はマンガンクラスター中間体の電子状態を明らかにし、酸素発生の反応機構を解明することが目的である。分子構造だけでは酸素発生機構の解明は難しく、電子状態に基づいた反応機構の解明が必要である。現在の反応モデルの中心となっている量子化学計算では、プロトン 1 つの配置の違いで全く異なる電子状態、化学状態を導いてしまう。本申請研究では、磁気構造解析の結果と組み合わせることによりマンガンクラスターの分子構造、プロトン状態、電子状態の三者を統合し、酸素挿入メカニズムの解明を目指した。

3. 研究の方法

研究手法としては ESR (電子スピン共鳴法) により酸素発生系の中間状態を検出し、量子化学計算と比較することで反応機構を明らかにすることにある。研究計画段階では高スピンの中間体信号が Q-band パルス ESR で検出できることがわからなかった。高スピン状態でのパルス ESR は測定困難とされていてこれまで行われてこなかったからである。しかし、通常用いている X-band (9GHz) ではなく Q-band (35GHz) での測定を行ったところ、信号が検出でき、詳細な観測が可能であることがわかった。これにより当初計画を変更し、Q-band パルス ESR による高スピン状態の測定と解析に主眼において研究を開始した。

4. 研究成果

図 2 に Q-band パルス ESR により測定した $S = 5/2$ 高スピン(X-band では $g=4.1$) のスペクトルを示す。実は、この信号は X-band での測定例が古い文献に報告されている。しかし信号が弱く、それ以上の研究が困難と考えられていた。しかし、Q-band 帯をも用いることにより、解析可能な水準の測定ができることがわかり研究を進めた。X-band において $g = 4.1$ に観測されたこの信号は Q-band では主に $g = 3, 10$ を中心とした信号として観測された。さらに単一の遷移ではなく多くの遷移に分解することができた。同時に行った ESEEM (電子スピンエコーエンベロープ変調) 法による解析によりこの S_2 高スピン状態は closed cubane と呼ばれる構造であり、シアノバクテリアの X-線構造解析では見つからない構造であることがわかった。

また、スピン格子緩和時間 T_1 の温度変化からはこの状態が基底状態から生じており、およそ 30cm^{-1} 高い第 1 スピン励起状態があることを明らかにした(図 3)。(ここまでの実験結果は J.Phys.ChemB 誌に受理された。)

実験的に測定したエネルギー準位の定量的な値は量子化学計算を用いた解析と直接比較可能である。東大石北グループとの共同研究によりマンガニに配位している様々な水のプロトン化状態を比較することにより定量的な評価に耐えうる分子構造特定することができた(この結果は PNAS nexus 誌に受理された)。

更に $S = 7/2$ をもつ高スピン状態の信号について研究を進めてきた。 $S = 5/2$ で確立した実験手法を $S = 7/2$ スピンにおいても行った。その結果 S_2 中間状態から S_3 中間状態への遷移の中間状態となっているのは $S = 5/2$ ではなく $S = 7/2$ との結果を得た。ただし、 $S = 5/2$ 高スピン状態のケースとは異なり、 $S = 7/2$ スピン状態を十分に説明しうる量子化学計算による分子構造は現在のところ存在していない。

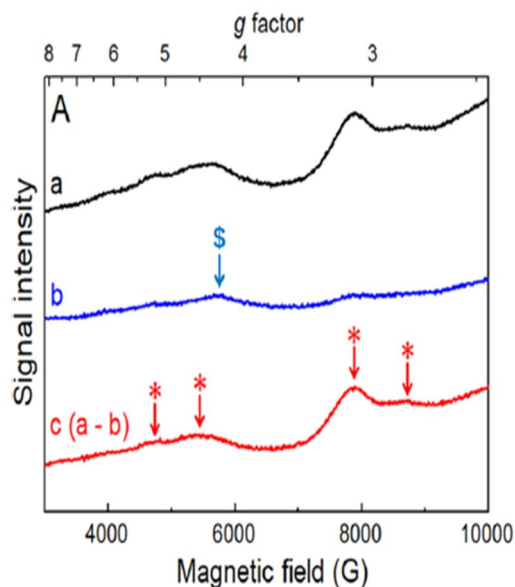


図 2 ホウレンソウ由来 PS 膜標品の ESE 磁場掃引スペクトル (a) 200 K で光照射後、(b)暗順応後、(c) 差スペクトル(a - b)。(*)は検出された $S = 5/2$ 信号

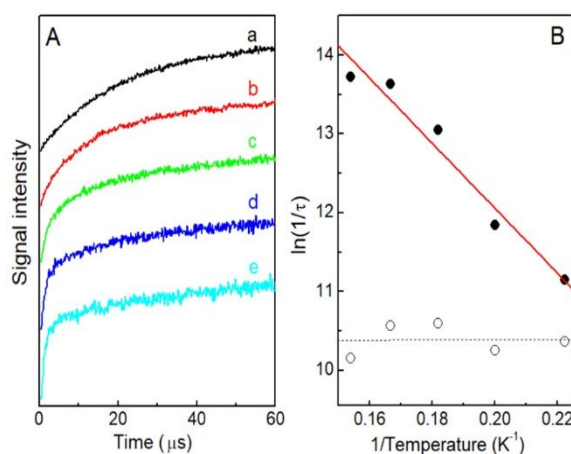


図 3 : Q-band パルス EPR 法でとらえたマンガングラスタ $S = 5/2$ S_2 中間状態の(A) スピン格子緩和時間の温度変化と(B) Orbach 過程 plot. ここで求めた励起状態をマンガングラスタの量子化学計算での計算結果と比較し分子構造を特定した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kosaki Shinya, Mino Hiroyuki	4. 巻 127
2. 論文標題 Molecular Structure Related to an S = 5/2 High-Spin S2 State Manganese Cluster of Photosystem II Investigated by Q-Band Pulse EPR Spectroscopy	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 The Journal of Physical Chemistry B	6. 最初と最後の頁 6441 ~ 6448
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jpccb.3c01656	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Saito Keisuke, Nishio Shunya, Asada Mizue, Mino Hiroyuki, Ishikita Hiroshi	4. 巻 2
2. 論文標題 Insights into the protonation state and spin structure for the g = 2 multiline electron paramagnetic resonance signal of the oxygen-evolving complex	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 pgad244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgad244	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Saito Keisuke, Mino Hiroyuki, Nishio Shunya, Ishikita Hiroshi	4. 巻 1
2. 論文標題 Protonation structure of the closed-cubane conformation of the O ₂ -evolving complex in photosystem II	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PNAS Nexus	6. 最初と最後の頁 221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pnasnexus/pgac221	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計17件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Shinya Kosaki, Yoshiki Nakajima, Jian-Ren Shen, Hiroyuki Mino.
2. 発表標題 Magnetic structural analysis of S2 high-spin states manganese cluster in photosystem II by multi-frequency electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy
3. 学会等名 2nd Asia-Oceania International Congress on Photosynthesis (AOICP) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shinya Kosaki, Yoshiki Nakajima, Jian-Ren Shen, Hiroyuki Mino.
2. 発表標題 Structure of S2 High-Spin State Manganese Cluster of Photosystem II by Multi-frequency Electron Paramagnetic Resonance (EPR) Spectroscopy
3. 学会等名 21st IUPAB (International Union of Pure and Applied Biophysics) (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Shinya Kosaki, Yoshiki Nakajima, Jian-Ren Shen, Hiroyuki Mino.
2. 発表標題 Insights into the Structure of the S2 High Spin State of the Mn Cluster in Photosystem II by electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy
3. 学会等名 Spin Chemistry Meeting 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Naohiko Nakamura, Shinya Kosaki, Hiroyuki Mino.
2. 発表標題 Coordination environment of manganese affinity sites in photosystem 2 measured by 14N HYSCORE
3. 学会等名 Spin Chemistry Meeting 2024 (国際学会)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小崎慎也, 中島 芳樹, 沈 建仁, 三野 広幸
2. 発表標題 多周波EPR法を用いた光化学系IIのMnクラスターにおけるS2 高スピン状態の平衡および構造解析
3. 学会等名 第63回電子スピンスイエンズ学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中村直彦,小崎慎也,三野 広幸
2. 発表標題 光合成光化学系IIのMn高親和性部位の配位環境
3. 学会等名 第63回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小崎慎也,三野広幸
2. 発表標題 Q-band パルス電子常磁性共鳴(EPR)法による 光化学系 マンガンクラスターのS2 High Spin状態の構造
3. 学会等名 量子生命科学会 第6回年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小崎慎也,, 中島 芳樹, 沈 建仁, 三野 広幸
2. 発表標題 多周波電子常磁性共鳴(EPR)法によるマンガンクラスター S2 g ~ 5状態の磁気構造解析
3. 学会等名 第66回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 中村直彦,小崎慎也,三野 広幸
2. 発表標題 光合成光化学系IIのMn高親和性部位の配位環境
3. 学会等名 第66回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2025年

1. 発表者名 小崎慎也, 三野広幸
2. 発表標題 Q-band パルス電子常磁性共鳴(EPR)法による光化学系 マンガンクラスターのS2 High Spin状態の構造
3. 学会等名 第61回生物物理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 三野広幸, 小崎慎也, 中島芳樹, 沈建仁
2. 発表標題 多周波EPRでとらえた酸素発生系高スピンS2状態の配位環境
3. 学会等名 日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小崎慎也, 三野広幸
2. 発表標題 Q-band パルス電子常磁性共鳴(EPR)法による光化学系 マンガンクラスターのS2 High Spin状態の構造の解明
3. 学会等名 生物物理学会中部支部会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroyuki Mino Shinya Kosaki
2. 発表標題 High Spin Structures of S2 State Manganese Cluster,
3. 学会等名 18th international congress on photosynthesis research (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三野広幸, 浅田瑞枝
2. 発表標題 PELDOR法により決定した光化学系 の2つのMn ²⁺ 親和サイト
3. 学会等名 第60回生物物理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三野広幸, 小崎慎也, 沈建仁
2. 発表標題 酸素発生系マンガククラスター g = 5状態の配位子場対称性のゆがみ
3. 学会等名 第60回電子スピンサイエンス学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 三野広幸, 小崎慎也, 中島芳樹, 沈建仁
2. 発表標題 多周波EPRでとらえた酸素発生系高スピンS ₂ 状態の配位環境
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小崎慎也, 三野広幸
2. 発表標題 Q-band パルス電子常磁性共鳴(EPR)法による光化学系 マングククラスター のS 2 High Spin状態の構造の解明
3. 学会等名 2022年度生物物理学会中部支部講演会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------