

光化学系 II 酸素発生系の形成過程における Mn^{2+} 親和サイトの位置決定(分子科学研究所¹、名古屋大学院・理²) ○浅田瑞枝^{1,2}、三野広幸²High-affinity site of Mn^{2+} at the elementary step of Photoactivation of oxygen evolving complex in photosystem II(Institute for Molecular Science¹, Nagoya University²)○Mizue Asada^{1,2} and Hiroyuki Mino²

【序】植物やシアノバクテリアの光化学系 (PS) II は、光合成反応において酸素発生反応を担うタンパク質複合体である。Mn クラスターは PS II の水分解反応の直接の触媒となる部分で、4 つの Mn、1 つの Ca、5 つの O 原子で構成される。Mn クラスターを除去した PS II では酸素発生活性が失われるが、Mn クラスターが除去された PS II を含む溶液に $MnCl_2$ と $CaCl_2$ を加え光照射すると、Mn クラスターが再構築され活性が戻る。PS II の形成時にも、同様の反応を経て Mn クラスターが構築されると考えられている (光活性化)。図 1 に光活性化の二量子反応モデルを示す。まず Mn クラスターがない PS II に 1 つの Mn^{2+} が結合する (IM_0)。PS II に結合した Mn^{2+} は光照射により酸化され Mn^{3+} になる (IM_1)。Ca²⁺ 存在下では構造変化が引き起こされ、2 つめの Mn^{2+} 、Ca²⁺ が PS II に結合する (IM_1^*)。さらなる光照射により 2 つの Mn^{3+} が結合した中間体が形成される (IM_2)。その後さらに 2 つの Mn^{2+} が結合し、最終的に酸素発生活性がある Mn クラスターが形成される。 IM_0 状態には、 Mn^{2+} が 1 つだけ特異的に結合する親和サイトが存在することが明らかになっているが、酸素発生系内のどの位置に Mn^{2+} が結合し、どのように光活性化反応が進むか、詳細なメカニズムは明らかになっていない。

ESR 測定法の一つであるパルス電子-電子二重共鳴 (PELDOR) 法は、2 つの異なる周波数のマイクロ波を用いて電子スピン間に働く双極子相互作用を測定し、10-100 Å の精度でスピン間距離を決定することができる。PS II には、光照射により形成される安定なチロシンラジカル $Y_D\cdot$ が存在し、PELDOR 法による電子スピン間距離測定の指標として用いることができる。本研究では特異的な親和サイトに結合した Mn^{2+} と $Y_D\cdot$ 間の距離測定を行い、光活性化 IM_0 状態における酸素発生系の構造を議論する。

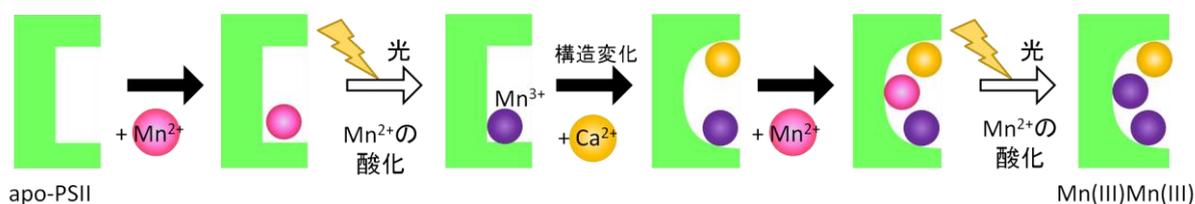


図 1 光活性化の二量子反応モデル

【実験】PS II 膜標品はハウレンソウから単離した。高濃度の NaCl を含む緩衝液で PS II を洗浄し表在性タンパク質 PsbP, PsbQ を除去後、 NH_2OH 溶液を添加し Mn クラスターを還元除去した。Mn クラスター除去 PS II に対し $MnCl_2$ を PS II: Mn^{2+} = 1:4 の割合で混合し、 Mn^{2+} を結合さ

せた。パルス ESR 測定では、遠心分離により濃縮した試料を用いた。CW-ESR 測定は室温、ESE 測定及び PELDOR 測定は 8 K で行った。

【結果と考察】 CW-ESR 測定により、PS II に結合する Mn^{2+} 濃度を定量した。遠心分離による濃縮前の緩衝液と、遠心分離後の上澄みに含まれる Mn^{2+} 濃度の比較から、 $MnCl_2$ のみ加えた場合、1 つの PS II あたり 1.4 個の Mn^{2+} が結合し、 $MnCl_2$ の他に 10 mM $CaCl_2$ を加えた場合、1 つの PS II あたり 0.4 個の Mn^{2+} が結合することがわかった。Mn クラスターを除去した PS II には、 Mn^{2+} が特異的に強く結合するサイトと、 Ca^{2+} により阻害される Mn^{2+} の非特異的な結合サイトが存在することを確認できた。

Mn^{2+} が結合した PS II のパルス ESR 磁場掃引スペクトルを図 2 に示す。 Ca^{2+} 存在下(b, c)、 Ca^{2+} 非存在下(a, d)ともに Mn^{2+} の信号強度が光照射により減少したことから、親和サイトに結合した Mn^{2+} が酸化され Mn^{3+} になったことが予想される。PELDOR 測定では Mn^{2+} イオンを観測し $Y_D\cdot$ を励起するため、図の矢印の位置でそれぞれ共鳴するマイクロ波周波数を用いた。

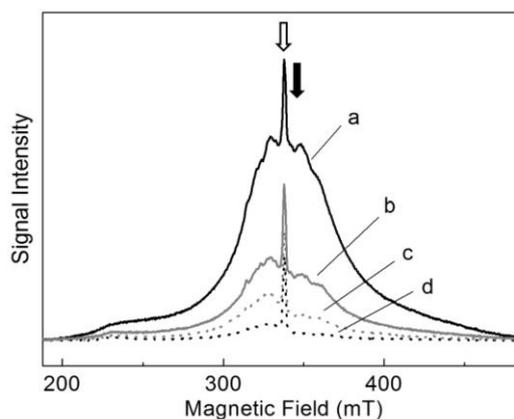


図 2 ESE 磁場掃引スペクトル

PS II の $Y_D\cdot$ - Mn^{2+} 間の PELDOR 測定結果を図 3 に示す。信号周期から Mn^{2+} - $Y_D\cdot$ 間距離は $30.5 \pm 1.6 \text{ \AA}$ であることがわかった。 Ca^{2+} 存在、非存在下で PELDOR 信号の周期が同じであることから、距離 30.5 \AA を示す信号は親和サイトに結合した Mn^{2+} 由来であると裏付けられた。距離の分布が小さいことから、親和サイトに結合した Mn^{2+} は周囲のアミノ酸残基に強く結合し、位置が固定されていると予想される。酸素発生系内の Mn^{2+} の親和サイト候補となる金属原子位置と $Y_D\cdot$ の原子位置、 $Y_D\cdot$ の電子密度分布を用いて PELDOR 信号を計算した (図 3)。Mn4 の原子位置に Mn^{2+} が結合すると仮定した場合のみ、信号の周期が実験値と一致した。さらに、酸素発生系近傍の任意の座標に範囲を拡張し、PELDOR 信号が実験値と一致する点を探った。その結果、実験値と一致する Mn^{2+} の座標は、 $Y_D\cdot$ を中心として Mn4 の位置を通過する球面上に分布した。Mn4 の位置は 2 つのアミノ酸残基 Asp170 と Glu333 が対角に配位するため、1 つのアミノ酸残基のみ配位する他の金属イオン位置に比べて強く結合位置が固定されると予想される。以上の結果から、光活性化反応過程の IM_0 状態では、1 つの Mn^{2+} イオンが Asp170 と Glu333 の間にある親和サイトに結合し、2 つのカルボキシル基の C=O 部分の向きを決定すると考えられる。この Mn^{2+} イオンは光照射により Mn^{3+} に酸化され次の中間状態 IM_1 を形成し、Mn クラスターの原型になると予想される。

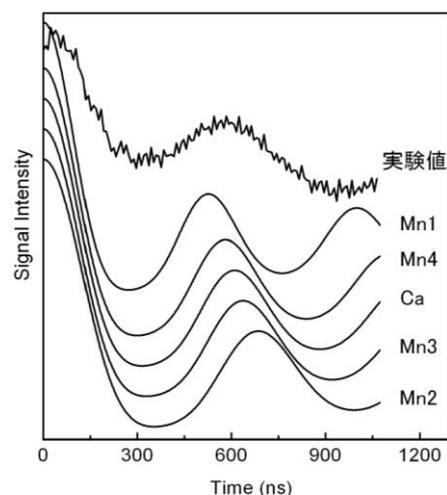


図 3 $Y_D\cdot$ - Mn^{2+} 間の PELDOR 測定と各原子位置を仮定した計算結果