

## 4A14 シアノバクテリア由来光化学系 II 複合体の多周波 EPR 研究

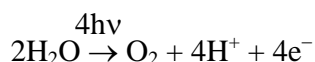
(分子研<sup>1</sup>, 岡山大院・自然<sup>2</sup>, JST さきがけ<sup>3</sup>, 総研大<sup>4</sup>, 関学大・理工<sup>5</sup>)  
松岡秀人<sup>1</sup>, 沈 建仁<sup>2,3</sup>, 中村敏和<sup>1,4</sup>, 河盛阿佐子<sup>5</sup>

【序】「酸素発生型光合成生物」は、光合成過程において太陽光のエネルギーを効率よく化学エネルギーに変換し、生命の活動維持に不可欠な酸素分子を反応の副産物として発生する。この酸素発生光合成は、光化学系 I (PSI: Photosystem I) および光化学系 II (PSII: Photosystem II) とよばれる直列にはたらく二つの光化学反応系 (電子伝達系) の協調により機能している。最近、酸素発生を担う PSII 反応中心複合体の 3 次元構造が 3.5–3.7 程度の空間分解能で明らかにされたが[1-3]、クロロフィルへの電子ドナー分子 (チロシン残基  $Y_Z$ ) など小分子の構造や分子配向の精確な決定には至っていない。そこで本研究では、シアノバクテリア由来 PSII 反応中心を対象に、常磁性分子種の電子・分子構造を選択的かつ微視的に明らかにできる EPR (Electron Paramagnetic Resonance) 分光法による研究を行った。

【実験】本研究では好熱性らん藻 *Thermosynechococcus vulcanus* から単離・精製した PS II 複合体を用いた[1, 4]。X-(9.5GHz)およびW-band (94GHz) EPR測定はそれぞれBruker社製 E500およびE680分光器を用いて行った。

### 【結果】

PSII では 4 核の Mn クラスタ、チロシン残基( $Y_Z$ )、反応中心クロロフィル (スペシャルペア)、フェオフィチン(Pheo)、プラストキノン( $Q_A$  と  $Q_B$ )が電子伝達系として存在している。ここで、反応中心クロロフィルは吸収極大が 680 nm であることから P680 と呼ばれている。図 1 は X 線結晶構造解析によって明らかにされた反応中心コアの立体構造を示す。一連の電子伝達反応は、まず P680 の光励起により開始される。P680 は光吸収後、電荷分離を起こし電子を Pheo に渡す。その電子は  $Q_A$  そして  $Q_B$  へと移動していき、 $Q_B$  は 2 個目の電子を受け取ると  $QH_2$  となって PS II から膜中に出る。一方、酸化された P680 は  $Y_Z$  より電子が供給され、さらに酸化された  $Y_Z$  は水分子から引き抜いた電子を Mn クラスタから受け取る。ここで、この水分解機構は



と表され、この過程で酸素分子が副産物として生成される。なお、水分解 - 酸素発生の詳細な機構および触媒としてはたらく Mn クラスタの構造に関しては、いまだ明らかとなっていない。

以下には、Mn クラスタおよびクラスタから電子を受け取る  $Y_Z$  に対して、これまでに得られた EPR 測定の結果を示す。

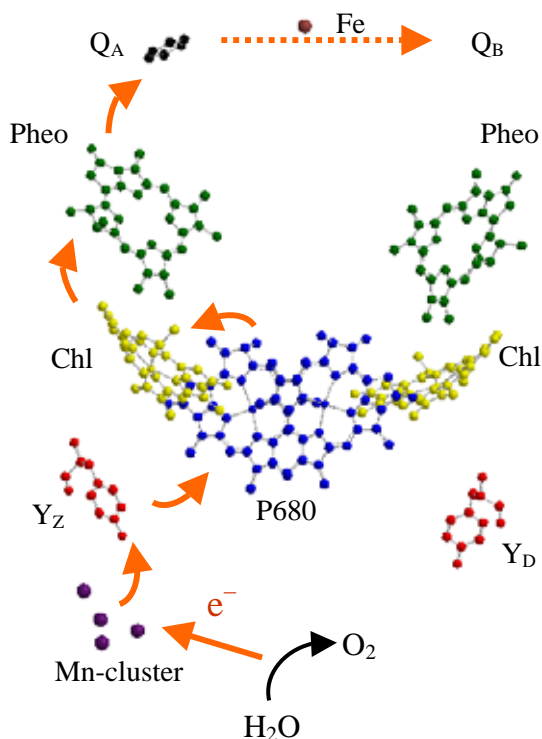


図 1 PSII 反応中心複合体における電子移動成分の立体配置[1].

### (a) Yz ラジカル

暗において非磁性分子である Yz は、P680 へ電子を供給すると、過渡的常磁性種となる。しかし、水分解系の Mn クラスタから電子を受け取ることで、再び非磁性分子となる。そこで本研究では、Yz ラジカル由来の EPR シグナルを検出するため、ヒドロキシルアミン ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ) を用いて Mn クラスタを取り除いた溶液試料を用いた。また、照射後ただちに液体窒素で試料を凍結させることで、Yz ラジカルを捕捉した。図 2 には照射前後に測定した X-band EPR スペクトルを示す。なお、照射は 100W ハロゲンランプを用い、263K で 20 秒間行った。照射前では暗中で安定なもう一つのチロシンラジカル  $\text{Y}\alpha$  (図 1) に由来する EPR スペクトルが観測されたが (図 2: dark) 照射により信号強度および共鳴磁場に変化が見られた (図 2: illumination)。この変化は Yz ラジカルの生成を反映したものであるが、X-band 測定ではその変化は小さく、より高周波・高磁場での測定が不可欠であることから、現在 W-band EPR 分光器を用いた測定を行っている。

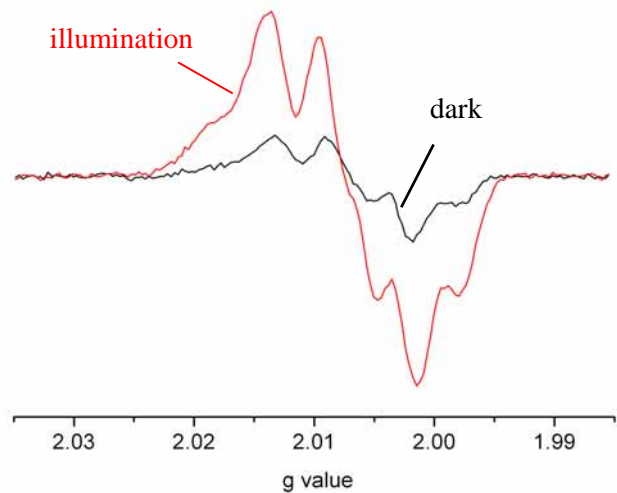


図 2  $\text{NH}_2\text{OH}$  により還元処理した PSII 溶液試料の光応答 EPR スペクトル (9.5GHz, 80K)。

### (b) Mn クラスタ

酸素発生を直接触媒する Mn クラスタは酸化の過程に応じて  $S_0, S_1, S_2, S_3, S_4$  と呼ばれる中間状態をとるが、ここでは特に  $S_2$  状態にある Mn クラスタに注目した。 $S=1/2$  の基底状態をとる  $S_2$  状態は 4 つの Mn イオンの磁氣的相互作用の結果、各 Mn 核の核スピン  $I=5/2$  との超微細相互結合により図 3 のような特徴的なマルチラインを示す。本研究では  $S_2$  状態の正確な  $g$  テンソルを決定すべく、W-band での実験を試みたところ、酸素発生中心 Mn クラスタの高周波 ( $\geq 95\text{GHz}$ ) EPR 信号観測に初めて成功した。なお、測定は凍結溶液および単結晶試料の両方に対して行ったが、特徴的なマルチラインは単結晶試料に対してのみ観測された。このことより高周波 EPR スペクトルの観測には単結晶試料を用いた実験が不可欠であることを明らかにした。現在、スペクトル解析を行うとともに、 $S_2$  状態にある Mn クラスタの分子構造に関する考察を行っている。

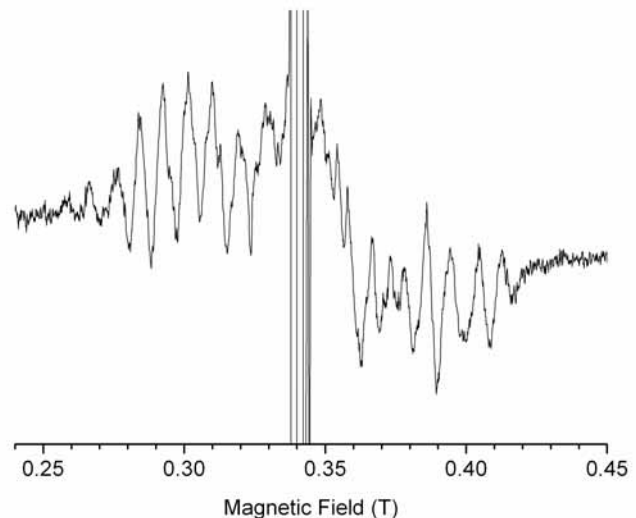


図 3  $S_2$  状態にある Mn クラスタの凍結溶液 EPR スペクトル (9.5GHz, 6K)。

- [1] Kamiya, N.; Shen, J-R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 98.
- [2] Ferreira, K. N.; Iverson, T.M.; Maghlaoui, K.; Barber, J.; Iwata, S. *Science* **2004**, *303*, 1831.
- [3] Zouni, A.; Witt, H. T.; Kern, J.; Fromme, P.; Krauss, N.; Saenger, W.; Orth, P. *Nature* **2001**, *409*, 739.
- [4] Shen, J. R.; Inoue, Y. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1825.