1PB049

光合成酸素発生マンガングラスターにおけるヒスチジン配位子の構造:FTIRによる解析

○野口 巧、井上頼直、Xiao-Song Tang¹ (理研・光合成科学、¹DuPont de Nemours & Co.)

光化学系IIにおける酸素発生Mnクラスターを形成するアミノ酸配位子としてヒスチジンが存在していることは、ESEEMの実験から示されていたが、その配位構造などの詳細は不明であった。我々はFTIRによるMnクラスターの構造の解析を進めてきたが、今回、ヒスチジン配位子のFTIRシグナルを同定し、そのプロトン化構造や水素結合状態などを明らかにした。

酸素発生系のS₂/S₁FTIR差スペクトルにおけるヒスチジンのバンドを同定するため、ホウレンソウの全¹⁵Nラベル及びラン藻 *Synechocystis* を用いたイミダゾール基のみの選択的¹⁵Nラベルを行った。いずれの¹⁵Nラベルにおいても、1113cm⁻¹に現われる負のバンドが7cm⁻¹の低波数シフトを示し、これがヒスチジン配位子のイミダゾール基の振動に由来することが示された。ヒスチジン側鎖のモデル化合物を用いた実験から、1100cm⁻¹付近のC-N伸縮振動の振動数及び重水素化シフトとヒスチジン側鎖のプロトン化構造との間には、一定の相関関係があることがわかった。この関係を用いることにより、S₂/S₁スペクトルの1113cm⁻¹のバンドを示すヒスチジンはN π 位のみがプロトン化されている構造をとっていることが示された。また、S₂/S₁スペクトルの2500-2850cm⁻¹の領域には、いくつかの小さなピーク群が観測されたが、これらはすべて、上記の¹⁵Nラベルで低波数シフトを示した。これらは水素結合したN-H伸縮振動上のフェルミ共鳴バンドであり、このバンド群の存在は、イミダゾールのN-H基が水素結合を形成していることを示している。以上の結果からMnクラスターに配位するヒスチジンは右図のような構造をとっていると結論される。

T. Noguchi, Y. Inoue, X.-S. Tang: Structure of the histidine ligand of the oxygen-evolving Mn-cluster: FTIR analysis

1PB050

酸素発生系Mnクラスター光生成(光活性化)の部分反応としてのMn(II)イオンの結合と酸化。

○小野高明、三野広幸 (理化学研究所・フォトダイナミクス研究センター・光生物研究チーム)

光合成酸素発生は光化学系IIに存在する4核Mn錯体(Mnクラスター)により水分子が酸化されることによって起こる。Mnクラスターは光化学系IIの蛋白質複合体がアセンブルされた後、系II反応中心の電荷分離反応で生じた酸化力により、系IIに結合したMn(II)イオンを酸化することにより生成する(光活性化)。系IIには複数のMn(II)イオン結合部位があり、Mn(II)イオンは部分的にクラスターを形成した状態で酸化されると考えられている。本研究ではMnクラスター生成の部分反応としてのMn(II)イオン酸化について、同一の実験条件下で結合Mn(II)イオンの個数、酸化反応、光活性化反応の測定を行い以下の結果を得た。

1) Mn抽出処理によりMn含量は系IIあたり0.1個以下まで減少し、酸素発生活性も2%以下となった。この標品に本実験条件下で光照射を行うと最適条件下で光活性化した場合の75%の酸素発生能が回復した。2) 本実験条件下では光照射前(暗条件下)系II当たり1個のMn(II)イオンが結合していた。3) 酸化型Y₂(Y₂⁺)は系II当たり1個のMn(II)イオンの結合によりほぼ完全に再還元を受けた。4) Mn(II)結合部位のMn(II)に対する親和性は明確なpH依存性を示し、依存性は中性付近にpK_aを持つ1つのアミノ酸残基により説明可能であった。

以上の結果はMnクラスター生成の第一ステップでは系IIあたり1個のMn(II)イオンのみが結合しており、このMn(II)イオンが特異的に酸化されることを示している。他の3つのMnイオンに対する結合部位はこの段階では存在せず、Mn(II)イオンの酸化により新たに生じると考えられる。

T. Ono, H. Mino: Unique binding site for Mn(II) ion responsible for photoactivation of the Mn-cluster in photosynthetic oxygen evolution.

1PB051

Ca²⁺-除去配向 PS II の ESR の磁氣的異方性

○三野広幸^a、河盛阿佐子^b、小野高明^a

(^a理研 フォトダイナミクス、^b関学大 理)

Ca²⁺を除去した光化学系II(PS II)は、酸素発生が阻害されるものの、酸素発生系を構成するマンガングラスターは保持しており、酸素発生能を持つ未処理のマンガングラスターとの比較によりCa²⁺のマンガングラスターに与える影響、及びマンガングラスター自身の性質の研究に用いられている。酸素の発生は5つの異なった酸化状態(S_i(i=0-4))で表わされる)を介して行われると考えられている。Ca²⁺を除去した試料のマンガングラスターの場合、通常では安定状態ではないS₂状態で安定な状態をとり、S₂状態を表す特徴的なESR信号“マルチライン”を生じる。Ca²⁺-除去試料では、更なる光照射によってマルチラインは消失し、かわりに新たなESR信号“doublet signal”が現れる。この信号の起源については10年来の論争が未だ決着していないが、我々は電子移動担体Tyr-Zと周辺有機ラジカルとの(主に)双極子相互作用に由来すると主張している。

今回我々は、PS II膜を乾燥配向した試料を用いて、doublet signalのESRにおける磁氣的異方性を観測した。得られた異方性からはdoublet signalが双極子相互作用を主とするという我々の主張を更に補強する結果を得た。doublet signalの異方性の測定に基づき、Tyr-Z—有機ラジカルを膜法線から65度と決定した。更にTyr.D—doublet signal間のELDORの異方性の測定からはTyr.D—doublet signalの方向をほぼ膜平面内(0-10度)、Tyr.D—doublet signalの方向とdoublet signal内のTyr-Z—有機ラジカルとの方向の間を70度と決定した。

H. Mino, A. Kawamori, T. Ono, "ESR anisotropy of doublet signal in oriented Ca²⁺-depleted PS II membrane"

1PB052

光合成電子伝達体配置のパルスEPRによる研究

○河盛阿佐子、東中資喜、吉井隆彦(関西学院大理)

光合成光化学系II(PS II)は不安定で単結晶作成が困難であるので、パルスEPR法により電子伝達分子の3次元配置を現在決めている途中で、これまで調べた方法と結果を報告する。

レーザー光で誘起されたスピン偏極したドナー(P680)とアクセプター(Q_A プラストキノン)の対は生成前は1重項で、その偏極はボルツマン平衡以前の分布によるもので、強いESEEM(Electron Spin Echo Envelope Modulation)信号を生じ、その周波数は2つのラジカル間の双極子相互作用 $\mu_1\mu_2(3\cos^2\theta - 1)/r^3$ を与える。これから無配向試料の77Kでの観測から距離rを導き、配向膜の磁場依存性より膜法線からのrベクトルの角度 θ_0 を導く。P680—Q_Aラジカル対の距離は27 ± 0.5 Åで膜法線に対して21 ± 5°と決定した。これは光合成バクテリアの *Rhodospira rubra* についてX線解析から得られた距離28 Åと鉄と反応中心を結ぶ膜法線からの角度20°に近く受容体側の構造類似性を反映している。

PS IIを253 Kで光照射して生じたラジカル対を77 Kでトラップして双極子相互作用を観測する他の方法、ELDOR(Electron Electron Double Resonance)または2+1パルス法で同じく距離と距離ベクトルの膜法線からの角度 Q_A—Y₀⁺ (38.5 ± 0.8 Å, 13 ± 4.0°), Y₀⁺—Chl₂⁺ (29.4 ± 0.5 Å, 50 ± 7°)を導いた。得られた2個の対(P680⁺—Q_A, Q_A—Y₀⁺)を組み合わせて、既に得られた別のラジカル対間の距離30 Å(Y₀⁺—Y₂⁺)を加えて他の電子伝達体の相対配置を導くことができる。この結果P680—Y₀の相対距離と法線に対する角度が20 Åと42°が得られている。

これまでこの他にも得られたPS II内電子伝達体間距離と方向の結果を述べる。

A. Kawamori, M. Tonaka, T. Yoshii: Pulsed EPR Studies of Configurations of Electron Transfer Components in Photosynthesis