2E1545

光化学系 II の Tyr-Z の ESR 信号と外部電荷効果

○長谷川 浩司、小野 高明、三野 広幸（理研・光生物 1）

光合成光化学系 II の D1 タンパク質の Tyr 残基 161(Tyr-Z) は、水分解酵素マンガンクラスターから反応中心 P680⁺ への電子移動の中間媒体として機能しており、酸化型は特徴的な ESR 信号を示す。Tyr-Z ラジカルは 30 μ s ~ 1 ms の寿命しかもたないため通常 ESR 信号を検出できないが、トリス処理あるいは Ca²⁺ 除去処理した光化学系 II 試料では Tyr-Z ラジカルをトラップすることが可能である。最近の CW-ESR および ENDOR による研究では、トラップされた Tyr-Z ラジカル ESR 信号は pH 依存性を示す [1]。すなわち、pH $\geq$ 7 ではチロシン側鎖のフェノール環の酸素のプロトンが解離した中性型の ESR 信号を示し、pH $\leq$ 5.5 では超微細結合定数が減少した ESR 信号を示す。pH $\leq$ 5.5 における Tyr-Z ラジカル ESR 信号はフェノール環の酸素にプロトンが結合したカチオン状態のものに類似している。しかし溶液中のチロシンラジカルは pK_a が -2 であることを考慮すると、Tyr-Z 近傍の極性電荷側鎖アミノ酸や H⁺、OH⁻ イオンなどの外部電荷により中性型のラジカルがカチオン型の ESR 信号を示す可能性も考えられる。本研究では、チロシンラジカルモデルであるフェノキシラジカル周辺に外部電荷 Q を配置し、非経験的分子軌道計算によって外部電荷 Q によるモデルラジカル分子の電子スピン密度の影響を調べた。この結果、Q = +1 および Q < 0 の場合はカチオン型 ESR 信号を説明できなかった。また Q $\geq$ +2 場合では、制限された領域に外部電荷がある場合にのみカチオン型信号を示すことがわかった。以上の結果より pH $\leq$ 5.5 で観測されるカチオン型 Tyr-Z ラジカル信号の起源について議論する。[1] Mino et al, Biochim. Biophys. Acta, **1457**, 157, 2000

K. Hasegawa, T. Ono and H. Mino : Evaluation of extra-charge effect on Tyr-Z ESR signal based on *ab initio* calculation.

2E1615

光化学系 II における水分分解系 S₀ 状態の生成

○荒尾 幸子、山内 啓嗣、勝田 延宏、河盛 阿佐子（関学大・理）

ほうれん草から抽出した光化学系 II (PSII) 中の酸素発生系において、水は分解され酸素が発生する。4 つのマンガン原子及び Ca、Cl 他から構成される酸素発生系 (S 系) は 5 つの酸化状態 (S₀、…、S₄) を持ち、光を当てると 1 段階ずつ酸化され、S₄ から S₀ に戻る際に酸素が放出される。Flash 光を 25 発以上当てた直後これを暗所中で放置すると、[S₀]:[S₁]:[S₂]:[S₃] = 0.25:0.75:0:0 ([S₀]/[S₁] = 1/3) に近づいていくことが知られている。今回は、暗置することによって生成した S₁ サンプルをヒドロキシルアミン処理により還元して人工的に S₀ 状態を作り出し、EPR を用いてその信号 (S₀ Multiline Signal) を観測することを目的とした。そこで、まず最適処理条件を決定するために Joliot 型電極を用いた酸素発生量の測定を行った。この方法を用いると 1 flash 毎に発生される酸素量が測定出来るため、光照射前の S 系の状態を知ることが出来る。これにより S₀ 状態の濃度を約 40 % まで上げることが可能だとわかった。さらに、観測された S₀ EPR 信号と光励起により生成した S₂ 信号 (S₂ Multiline Signal) との、hyperfine structure (超微細構造)、マイクロ波飽和特性の相違点について調べた。詳細は当日報告する。

S.Arao, K.Yamauchi, N.Katsuta and A.Kawamori : Detection of S₀ state EPR signal in photosystem II

2E1600

Ca²⁺-除去光化学系 II の doublet ESR signal の起源

○三野 広幸、小野 高明（理研・光生物）

光合成光化学系 II は酸素発生を行うことで知られている。酸素発生は光化学系 II のマンガンクラスターで行われている。マンガンクラスターの構造はほとんどわかっていないが Ca²⁺、Cl⁻ が酸素発生には必須であり、またクラスター近傍に存在すると考えられている。生化学処理によって Ca²⁺ を除去するとマンガンクラスターを保持したまま酸素発生能は可逆的に阻害されるとともにマンガンクラスター (Kok cycle の S₂ 状態) 由来の ESR 信号もまた影響をうける。Ca²⁺ を除去した光化学系 II ではより高い酸化状態で新たな ESR 信号 (doublet signal) が観測できる。この信号の起源については論争中であるが、基本的にはマンガンクラスターと周辺アミノ酸との相互作用と考えられてきた。これは doublet signal の生成に伴い S₂ マルチラインが消失することによっている。アミノ酸の種類についてはヒスチジン残基、チロシン残基 Y_Z 等が示唆され、現在ではマンガンクラスターとチロシン残基 Y_Z との主に交換相互作用由来との考え方が支持されている。しかし我々はマンガンクラスターと Y_Z の相互作用由来とは考えずに Y_Z と Y_Z 周辺アミノ酸との主に双極子相互作用由来との説をだしている。Doublet signal は Y_Z 由来とされているにもかかわらず比較的安定であり、Q_A⁻ の存在しない状態では 77 K 下で数ヶ月以上は安定に存在する。しかし DCMU 添加により Q_A⁻ が存在すると Q_A⁻ と電荷再結合をおこし doublet signal は消失する。この場合でも消失したマルチラインの出現は観測されなかった。これは doublet signal の起源として消失したマルチライン信号と Y_Z との間の磁気的相互作用による相関を否定するものである。これらの結果に基づきマンガンの酸化、チロシン残基 Y_Z の機能について議論する。

H. Mino, T. Ono : Origin of the doublet ESR signal in Ca²⁺-depleted photosystem II

2E1630

光化学系 II 電子供与体シントクローム b559 の位置

○河盛 阿佐子¹、東中 資喜¹、黒岩 繁樹²、赤堀 興造³ (¹ 関学大・理、² 東大院・総合文化、³ 広大・総合科学)

光化学系 II の Mn をトリス処理で除去した試料では Cytochrome b559 は暗状態でも低い酸化電位にありヘム鉄の EPR 信号が g_x = 1.46, g_y = 2.19, g_z = 3.01 の広範囲の磁場で観測される。これは P680⁺ の供与体チロシン Z (Y_Z) が働かない低温や阻害された状態でそれに代わる第一供与体となり、Chl_Z やカロテノイドを経て電子を P680⁺ へ渡す。精製された反応中心は D1, D2 とシントクローム b559 のサブユニットより成り、ヘム鉄は a と b サブユニットの Histidine により繋がれ、ストロマ側にあると考えられて来た。本研究ではヘム鉄の位置を第一供与体のキノン (Q_A) からとまた Chl_Z からの距離と距離ベクトルの膜法線からの方向をパルス電子-電子 2 重共鳴法 (PELDOR) で決定した。Q_A⁻-Cyt b559⁺ 常磁性対のトラップには非ヘム鉄を亜鉛に置換した光化学系 II コア粒子を摂氏 0 度で光照射した試料を用いた。Cyt b559⁺ の ESE を g = 1.98 の位置で w1 の周波数で第一と第三パルス 90° - t - 180° で観測し、Q_A⁻ のスピンを w2 の周波数で 180 度パルスをかけ、その位置を 0 から t ままで変化させることにより常磁性対の双極子相互作用を反映する振動スペクトルが得られ、これから無配向の試料からは距離が配向した試料からは膜法線からの距離ベクトルの方向が得られ、Q_A⁻-Cyt b559⁺ に対しては 40 ± 1 Å と 80 ± 5° が得られた。別のトリス処理して 200 K で光照射して Chl_Z⁺-Cyt b559⁺ については 34 ± 1 Å と 58 ± 5° が得られた。これらの結果より Cyt b559 はストロマ側にあり、Chl_Z はこれまでの推定とは異なり D2 タンパク内にあると結論される。

A.Kawamori, M. Tonaka, S. Kuroiwa and K. Akabori : The Position of Cytochrome b559 in Photosystem II