B709

低波数赤外分光法による酸素発生系マンガングラスターの構造に関する研究： ^{15}N 及び ^{13}C ラベリングの効果

○木村 行宏、水澤 直樹、石井 麻子、小野 高明（理研PDC・光生物1）

光合成酸素発生反応は光化学系IIに存在する4核Mnクラスターによって触媒される。光化学系II複合体のX線結晶構造解析からは4つのMnがTrimer-monomer的に配置していると提唱されているが、配位子を含めMnクラスターの構造については未だ明らかにされていない。低波数赤外分光はMnクラスターの骨格振動やMnと配位子（水分子、アミノ酸残基）間の振動を直接検出することが可能であり、Mnクラスターの構造及び機能の解明に有力な手法である。本研究では低波数領域（650～350 cm^{-1} ）の測定に最適化した分光システムを用いて、ラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803 光化学系IIコア標品の光誘起 S_2/S_1 赤外吸収差スペクトルを測定し、Mnクラスターの光酸化に伴って変化する低波数振動モードに対する ^{15}N 及び ^{13}C ラベリングの効果について調べた。 ^{15}N 及び ^{13}C ラベリングにより550-450 cm^{-1} 及び390 cm^{-1} 付近に5-8 cm^{-1} の同位体シフトが観測された。これらはMnクラスター近傍の窒素及び炭素を含む配位子の直接的、或いは水素結合を介した間接的相互作用に由来すると考えられる。606(+)/625(-) cm^{-1} は S_2/S_1 状態におけるMn-O-Mn骨格振動であることが提唱されている。600～650 cm^{-1} の領域では ^{15}N ラベリングによる効果はほとんど見られず、 ^{13}C ラベリングにより顕著な同位体シフトが観測された。このことはこの領域に炭素に由来するモードが含まれていることを強く示唆する結果である。また、577(-) cm^{-1} のバンドは ^{15}N 及び ^{13}C ラベリングの影響を受けなかった。このバンドは窒素及び炭素に関与しない振動モードであり、Mnクラスターの骨格振動、或いはMnと配位子（酸素）間の相互作用に由来するものであると推定された。

Y. Kimura, N. Mizusawa, A. Ishii and T. Ono : Effects of universal ^{15}N and ^{13}C isotope labeling on low-frequency FTIR spectrum of oxygen-evolving complex

B711

フーリエ変換赤外分光法による光合成酸素発生複合体のS状態遷移の観測

○小野 高明¹、山成 敏広²、木村 行宏¹、水澤 直樹¹、石井 麻子¹（¹理研PDC・光生物1、²広大・総合科学）

光化学系II複合体に存在する4核Mnクラスターは5つの反応中間状態（ $\text{S}_0 \sim \text{S}_4$ ）を経て光合成酸素発生反応を触媒する。近年、S状態間遷移（ $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ 、 $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ 、 $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ 、 $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ ）に対応する光誘起赤外吸収差スペクトル（3500～1200 cm^{-1} ）が観測され、反応に伴う基質水分子やタンパク質の構造変化に関する情報が得られている。今回、我々は形質転換が容易に行えるラン藻 *Synechocystis* sp. PCC6803を用いて、1700～1200 cm^{-1} に加え、新たに1200～800 cm^{-1} の領域において各S状態間遷移に伴う差スペクトルを測定し、これらに対する ^{15}N 及び ^{13}C 標識化の効果を検討した。1700～1200 cm^{-1} では各S状態間遷移に特徴的なカルボキシレートの対称（1450～1300 cm^{-1} ）、逆対称（1600～1500 cm^{-1} ）伸縮振動、及びアミドI（1700～1600 cm^{-1} ）、II（1600～1500 cm^{-1} ）の振動モードが観測された。 S_2/S_1 、 S_3/S_2 と S_0/S_3 、 S_1/S_0 で符号が反転するバンドは、酸素発生反応過程に密接に関与するタンパク質やアミノ酸配位子の構造変化に由来するバンドであると考えられる。 ^{15}N 標識化ではアミドII領域、 ^{13}C 標識化では全領域において顕著な同位体シフトが観測された。1200～1000 cm^{-1} ではヒスチジン配位子由来のバンドが確認されたが、このモードは見かけ上すべての差スペクトルにおいて負のバンドとして観測された。1000～900 cm^{-1} では ^{15}N 及び ^{13}C 標識化で同位体シフトが観測された。一方、880～820 cm^{-1} のバンドは ^{15}N 標識化では変化せず、 ^{13}C 標識化により6～12 cm^{-1} ダウンシフトした。これらはMnクラスターにカップルした炭素を含む部位の振動モードであると推定された。

T. Ono, T. Yamanari, Y. Kimura, N. Mizusawa and A. Ishii : Mid-to-low frequency FTIR spectrum for the S-state cycling of the photosynthetic oxygen-evolution

B710

光合成酸素発生反応の赤外分光法による解析： ^{13}C 、 ^{15}N 同位体置換による蛋白質バンドの同定

○野口 巧¹、杉浦 美羽²（¹筑波大・物質工学、²大阪府大・農・応用生物化学）

ラン藻及び植物の光化学系IIで行われる酸素発生反応の分子機構は、現在でもほとんど明らかとされていない。その解明のためには、酸素発生系における基質水分子や蛋白質の反応の詳細を分子レベルで知ることが必要である。我々は、光合成酸素発生反応の反応機構の解明を目指し、閃光誘起フーリエ変換赤外分光法（FTIR）を用いた解析を行った。本研究では、 ^{13}C 及び ^{15}N 同位体置換を行った光化学系IIコア蛋白質を用いることにより、閃光誘起S状態遷移のFTIR差スペクトルにおける蛋白質由来のバンドの帰属を行い、酸素発生反応に伴う蛋白質の反応や構造変化を調べた。CP43光化学系II蛋白質にヒスチジンを導入した好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* を、炭素源または窒素源を ^{13}C 、 ^{15}N に置き換えた培地で培養し、全 ^{13}C または全 ^{15}N 置換した系IIコア蛋白質を得た。このコア蛋白質の水和フィルムを用い、酸素発生S状態サイクルの際の閃光誘起FTIR差スペクトルを測定し、 $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ 、 $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ 、 $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ 、 $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ の各遷移に対応するスペクトルを得た。 ^{13}C 置換及び ^{15}N 置換によるバンドシフトから、FTIRバンドの帰属を行い、主に、アスパラギン酸、グルタミン酸、C末端由来の COO^- 対称（1450-1300 cm^{-1} ）及び逆対称（1600-1500 cm^{-1} ）伸縮振動や、骨格由来のアミドI（1700-1630 cm^{-1} ）、アミドII（1600-1500 cm^{-1} ）、NH伸縮振動（3450-3250 cm^{-1} ）などのバンドを同定した。各スペクトル間で対応するピークの符号（正または負）から、 $\text{S}_1 \rightarrow \text{S}_2$ 及び $\text{S}_2 \rightarrow \text{S}_3$ 遷移の際の蛋白質の構造変化は、主に、 $\text{S}_3 \rightarrow \text{S}_0$ 、 $\text{S}_0 \rightarrow \text{S}_1$ 遷移で逆戻りし、酵素としての反応サイクルを形成することが示された。

T. Noguchi and M. Sugiura : FTIR analysis of the photosynthetic oxygen-evolving reaction: Identification of protein bands by ^{13}C and ^{15}N isotope labeling

B712

光化学系IIにおけるチロシンY_Zの酸化還元反応の新メカニズム：Gln-165の役割

○安達 淳博、楠 正美（明大理工・物理）

光化学系II（PSII）は、光量子を利用して水を酸化し酸素を発生させる酵素であるが、その触媒サイトは、反応中心Chl-a、P680、チロシン（Y_Z）、Mn₄CaClクラスターから成る。この触媒反応は、P680の酸化とプラストキノンの還元をもたらす4つの間欠的な光誘起電荷分離反応を必要とする。そのとき生成するP680⁺は、Y_Zによって還元される。酸化されたY_Zは、最初カチオンラジカルY_Z⁺であるが、それは直ちに脱プロトン化されニュートラルラジカルY_Zになる。そのプロトンがどこに移動するかについて、従来は、D₂-蛋白における反応との類推から、His-190がプロトンのアクセプターであろうと考えられていた。最近、高熱性シアノバクテリアのPSIIの結晶が得られ、3.8～3.6 Åの分解能のX線構造が報告された。（A.Zouni et al., '01, '02; N.Kamiya and J.Shen, '03）我々は、マンガングラスターに関するEPR、EXAFSデータ及び、Y_Z、Y_Dに関する主要な酸化還元データが合理的に説明できるように、その構造を実験精度内で修正し、D₁、D₂蛋白の分子モデリングを行った。このモデルによれば、His-190は、Mnに配位しており、Y_Z⁺のプロトンアクセプターとはならない。従って、それに代わるプロトンアクセプターとしてY_Z-O原子から2.4～2.7 Å離れたGln-165のカルボニル基-O原子を提案する。実際、密度汎関数法（DFT）計算によれば、Gln-165Oのプロトン親和力は、Y_Zのものより約9 kcal/molほど高く、Hisのものより約7 kcal/molほど高い。ポスターでは、Y_Zの酸化還元過程に関する電子移動とプロトン移動の新しいメカニズムについてDFT計算の裏づけと共に報告する予定である。

A.Adachi and M.Kusunoki : DFT Studies on the Proton and Electron Transfers associated with Redox Reactions of Tyrosine Y_Z in PSII. Possible Roles of Gln-165