

光合成酸素発生反応におけるプロトン放出過程<sup>§</sup>東京理科大学 理学部  
鈴木 博行\*

## 1. はじめに

植物やシアノバクテリアに代表される酸素発生型光合成生物は、光エネルギーを用いて水分子を酸化することにより電子を取り出す。その結果として、水分子は、酸素分子とプロトンに分解される。この水分解反応は光化学系IIタンパク質複合体上に存在する水分解系で行われる<sup>1,2)</sup>。水分解系の活性中心は、4つのマンガニオンと1つのカルシウムイオンからなるマンガククラスターであり<sup>3-5)</sup>、その配位子や近傍アミノ酸が反応に関与すると考えられている。水分解反応は5つの中間状態 ( $S_0$ - $S_4$ ) のS状態サイクル (図1) により進行し、2分子の水が4つのプロトンと1分子の酸素に分解される。酸素分子は、不安定な中間状態である $S_4$ 状態と $S_0$ 状態の間で放出されることが知られている<sup>1-2)</sup>。しかしながら、プロトン放出過程の詳細は明らかとなっていない。

光合成水分解反応のプロトン放出過程の研究では、pH指示色素やガラス電極を用いて、各S状態遷移

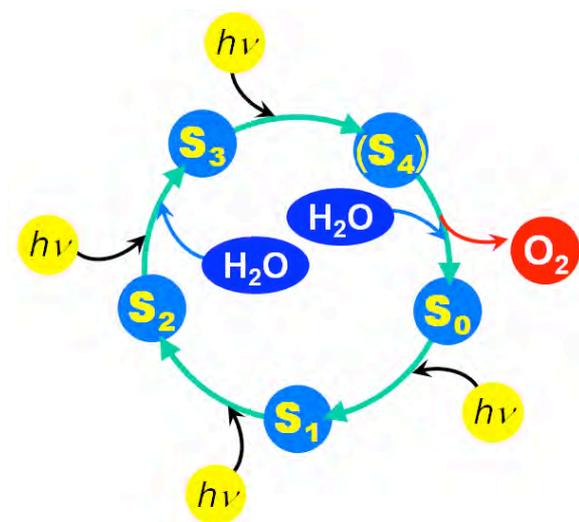


図1 S状態サイクル

におけるプロトン放出パターンが調べられてきた<sup>6,9)</sup>。チラコイド膜を用いた初期の研究では、 $S_0 \rightarrow S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0$ 遷移におけるプロトン放出パターンは1:0:1:2であると報告され、このパターンが基質水分子のプロトンに由来すると考えられた<sup>10-12)</sup>。しかしながら、その後の研究において、プロトン放出パターンはpHや試料形態に依存し、非整数値をとるという実験結果が報告された<sup>6,9,12-19)</sup>。さらに、高等植物由来の光化学系IIコア複合体では、グリセリン非存在下で1:1:1:1というパターンが報告された<sup>16,18)</sup>。このように、基質水分子に由来するプロトンの放出パターンについての最終的な結論は得られていなかった。

本稿では、フーリエ変換赤外(FTIR)分光法を利用した新規なプロトン検出法の開発と、それを用いた光合成水分解反応のプロトン放出過程の研究<sup>29)</sup>について解説する。

## 2. FTIR法による新規な放出プロトン検出法の概要

FTIR法を用いた新規なプロトン検出法では、光化学系IIの緩衝能を超える高濃度の緩衝液を使用する。このことにより、光化学系IIから放出されたプロトンは緩衝剤にすべてトラップされる。また、電子受容体としてフェリシアン化カリウムを用い、電子受容体によるプロトンの取り込みの寄与を除外する。

放出プロトンは、緩衝剤のプロトン化反応を光誘起FTIR差スペクトル法で測定することにより検出する。しかしながら、FTIR差スペクトル法では、緩衝剤のプロトン化のシグナルのほかに酸素発生反応に由来する蛋白質変化のシグナルも現れる。そこで、同位体ラベルされた緩衝剤を用いて蛋白質由来のシグナルを取り除き、緩衝剤のみのFTIRシグナルを得る。こ

<sup>§</sup> 第1回日本光合成学会シンポジウム ポスター賞受賞論文

\* 連絡先 E-mail: ookinasora@hotmail.com

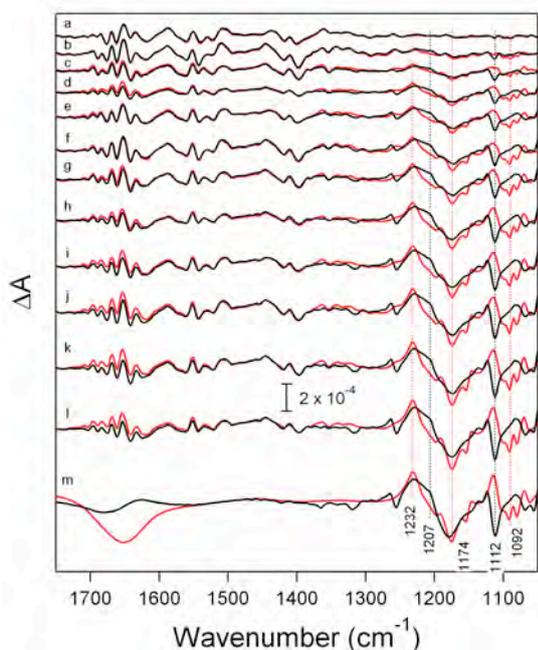


図2 光化学系IIタンパク質の閃光誘起FTIR差スペクトル、及びMes分子のプロトン化/脱プロトン化差スペクトル

(a)~(l) : H<sub>13</sub>-Mes (黒線) およびD<sub>13</sub>-Mes (赤線) 緩衝液中の1~12閃光の差スペクトル、(m) : H<sub>13</sub>-Mes (黒線) およびD<sub>13</sub>-Mes (赤線) 分子の脱プロトン化差スペクトル。

の緩衝剤のシグナル強度は、蛋白質から放出されたプロトン量と一致する。したがって、緩衝剤のシグナルの閃光数強度依存性から各S状態遷移のプロトン放出パターンを見積もることができる。また、副次的電子伝達コファクターの反応の有無や反応量は、各S状態遷移のFTIR差スペクトルから評価する。

### 3. 光化学系IIタンパク質複合体の閃光誘起FTIR差スペクトル

好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* 由来の光化学系 II コア試料を未置換 Mes (H<sub>13</sub>-Mes) 及び重水素化 Mes (D<sub>13</sub>-Mes) の高濃度緩衝液 (pH 6.0) に懸濁し、その試料に12回の閃光照射を施した。閃光誘起FTIR差スペクトルは、閃光照射前のスペクトルと各閃光照射後のスペクトルの差を計算することにより得られた。H<sub>13</sub>-MesおよびD<sub>13</sub>-Mes 緩衝液中における光化学系IIタンパク質の各閃光誘起FTIR差スペクトルを図2のa-lに示す。1700-1600 cm<sup>-1</sup>の領域では、タンパク質骨格のC O伸縮振動 (アミド I)、1600-1450 cm<sup>-1</sup>の領域では、タンパク質骨格のCN+NH振動 (アミドII) とカルボキシル基逆対称伸縮振動が、また、1450-1350 cm<sup>-1</sup>の領域では、カルボ

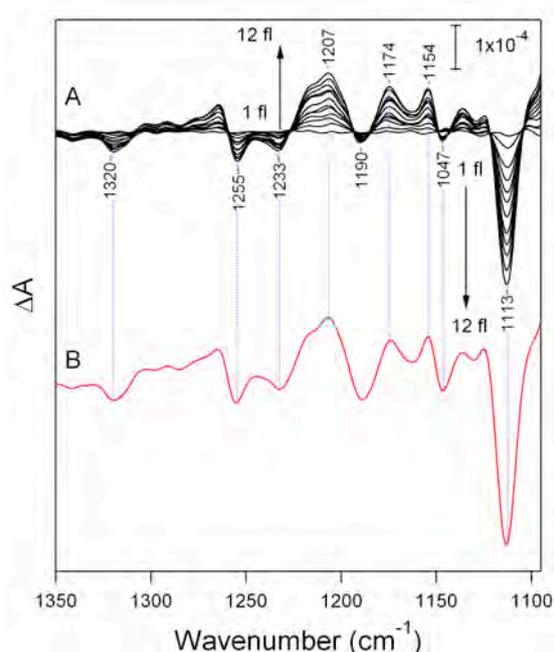


図3 (A) 光化学系IIタンパク質の閃光誘起FTIR差スペクトルおよび (B) Mes分子のプロトン化/脱プロトン化差スペクトルのH<sub>13</sub>-Mes /D<sub>13</sub>-Mes二重差スペクトル

キシル基対称伸縮振動が現れる<sup>23)</sup>。これらのシグナルは、マンガククラスター周辺の蛋白質構造や、マンガククラスターの配位子構造の変化を表している。

1700-1350 cm<sup>-1</sup>の領域では、両試料のスペクトルの形状は基本的に同じであった。一方、1300-1050 cm<sup>-1</sup>の領域では、両試料のスペクトルの形状は互いに異なり、閃光数に従ってそのスペクトルの強度が増大した。後者の領域のシグナルを帰属するために、高pHに調製したMes水溶液のFTIRスペクトルと低pHに調製したMes水溶液のFTIRスペクトルを測定した。Mes水溶液を高pHに調製することで、ほぼすべてのMes分子は脱プロトン化し、また、低pHに調製することで、ほぼすべてのMes分子がプロトン化する。したがって、それらのスペクトルの差スペクトルは、プロトン化したMesと脱プロトン化したMesのシグナル変化が現れる。そのH<sub>13</sub>-Mes及び、D<sub>13</sub>-Mes分子のプロトン化/脱プロトン化の差スペクトルを図2mに示す。これらの形状は、閃光誘起FTIR差スペクトル (図2a-l) において強度が増大するバンドと基本的に一致した。このことから、これらのバンドは、緩衝剤であるMes分子に由来すると考えられる。

### 4. プロトン放出パターンの見積もり

Mesのバンド強度を正確に見積もるために、H<sub>13</sub>-Mes緩衝液中のスペクトルからD<sub>13</sub>-Mes緩衝液中の差スペクトルの二重差スペクトルを計算した。各閃光における二重差スペクトルを図3Aに示す。これらのスペクトルは、D<sub>13</sub>-Mesのプロトン化/脱プロトン化の差スペクトルとH<sub>13</sub>-Mesの差スペクトルとの二重差スペクトル(図3B)と良く一致している。このことは、Mes緩衝剤がプロトンをトラップしている事を示している。また、これらの強度は、閃光数の増加に従って増大しており、プロトンが光化学系IIからバルク中に放出され、それをMes分子がトラップしていることを示している。

放出プロトン量はMes分子のプロトン化量と一致している。そこで、放出プロトン量を見積もるため各閃光におけるMesシグナルの強度を、標準スペクトル(12閃光の二重差スペクトル)でフィッティングした。見積もられた各閃光誘起Mesシグナル強度(プロトン放出数)の閃光数依存性では(図4赤丸)、3、7、11閃光目に最大値を、1、5、9閃光目に最小値を示す4閃光周期振動が観測された。このような周期振動は、酸素発生反応に典型的なものであることから、水分解系から放出されたプロトンが主に検出されたことを意味している。

プロトン放出パターンをKokパラメータのミスファクターと各遷移のプロトン放出数の関係式を用いてシミュレーションを行った。シミュレーションにより得

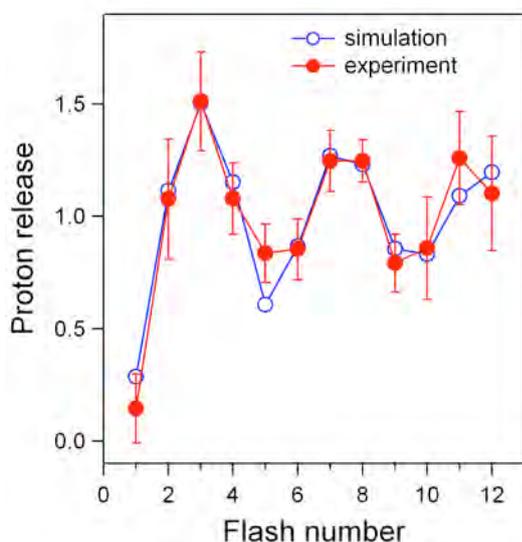


図4 プロトン放出数の閃光数依存性

赤丸は実験値、青白抜丸はシミュレーション値を示す。プロトン放出数は、1閃光あたりの平均値で規格化した。

られたプロット(図4青白抜丸)は、実測値を良く再現した。ミスファクターは12±3%、各遷移で放出されるプロトン数は、S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>、S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>、S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>、S<sub>3</sub>→S<sub>0</sub>遷移で、それぞれ、0.94±0.20、0.28±0.11、1.20±0.15、1.57±0.16と見積もられた。このプロトン放出パターンは、1:0:1:2のパターンに非常に近いと考えられる。

### 5. プロトン放出パターン

Scholdder と Witt は、pH 6.0 における光化学系IIコア試料(*T. elongatus*)のプロトン放出パターンをガラス電極で測定し、1.0:0.2:1.0:1.8というパターンを見積もった<sup>19)</sup>。このパターンは、本研究の新規プロトン検出法で得られたパターンとほぼ一致している。また、類似のパターンがpH 6-7の範囲で、チラコイド膜<sup>14,18)</sup>や光化学系II膜標品<sup>13)</sup>、グリセリン存在下の光化学系IIコア試料<sup>18)</sup>においても観測されている。これらのことから、基質水分子由来のプロトンは、S<sub>0</sub>→S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>→S<sub>3</sub>→S<sub>0</sub>遷移において1:0:1:2のパターンで放出されることが示唆される。これは、遷移効率がS<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>遷移ではpHに依存せず、その他の遷移では低pH側で低下するという結果<sup>27,28)</sup>と一致している。

*T. elongatus*のS<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>→S<sub>0</sub>におけるプロトン放出数は、整数値よりわずかに外れている。この原因のひとつにY<sub>D</sub>·/Y<sub>D</sub>、Fe<sup>2+</sup>/Fe<sup>3+</sup>の酸化還元反応のプロトン化・脱プロトン化<sup>21,22)</sup>が考えられるが、各S状態遷移のFTIR差スペクトルにこれらのシグナルが観測されないことから、これらの寄与はほとんどないと考えられる。

有力な原因として考えられるのは、水分解系のアミノ酸側鎖のプロトン化・脱プロトン化反応の寄与である。この反応は、各S状態のマンガンクラスターの正味の電荷量変化に対応して誘起されると考えられている<sup>9,19)</sup>。これらのアミノ酸側鎖の候補としてAsp、Glu、His、Cys、Arg、Lys、Tyr が挙げられる。本研究のFTIR解析では、S状態遷移に伴って、プロトン化・脱プロトン化するカルボキシル基はほとんど観測されなかった。それに加えて、これまでのFTIR研究において、S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>遷移に観測されたHisのイミダゾール基のCN伸縮振動バンドは、重水素置換によって影響を受けないことが報告されている<sup>24)</sup>。また、S<sub>3</sub>→S<sub>0</sub>遷移のスペクトルにはHisのCN伸縮振動バンドが観測されなかった<sup>25)</sup>。これらの結果は、His側鎖はS状態遷移に伴ってプロトン化や脱プロトン化を起こさないこと

を示している。さらに、CysのSH基のシグナルがS状態遷移のFTIR差スペクトルに現れないことから、Cysも除外できる。したがって、S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>遷移で脱プロトン化しS<sub>3</sub>→S<sub>0</sub>遷移でプロトン化するアミノ酸側鎖候補は、Arg、Lys、Tyrであると考えられる。

このように、プロトン放出と蛋白質の反応のFTIR解析から、S<sub>1</sub>→S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>→S<sub>0</sub>遷移におけるプロトン放出数の整数値からのずれは、Mnクラスター周辺のプロトン化可能なアミノ酸側鎖に由来することが強く示唆された。このことは、Mnクラスター近傍の正味の電荷量変化が0:1:0:-1<sup>26</sup>)であるという結果と一致している。

## 6. おわりに

FTIR法を利用した新規プロトン検出法を用いることで放出プロトンの検出だけでなく、その過程で起こる蛋白質やアミノ酸側鎖の反応も追跡が可能となった。今後は、試料形態やpHの違う試料に対してこの手法を適用し光合成プロトン放出過程の解明を目指していく予定である。

## 謝辞

本稿は、野口巧教授（名古屋大学）および杉浦美羽准教授（愛媛大学）との共同研究の一部である。ここに謝辞を申し上げる。

Received March 15, 2011, Accepted March 27, 2011,  
Published April 30, 2011

## 参考文献

1. Debus, R. J. (1992) The manganese and calcium ions of photosynthetic oxygen evolution, *Biochim. Biophys. Acta.* 1102, 269-352.
2. Renger, G. (2007) Oxidative photosynthetic water splitting: energetics, kinetics and mechanism, *Photosynth. Res.* 92, 407-425.
3. Ferreira, K. N., Iverson, T. M., Maghlaoui, K., Barber, J., and Iwata, S. (2004) Architecture of the Photosynthetic Oxygen-Evolving Center. *Science* 19, 1831-1838.
4. Loll, B., Kern, J., Saenger, W., Zouni, A., and Biesiadka, J. (2005) Towards complete cofactor arrangement in the 3.0 Å resolution structure of photosystem II, *Nature* 438, 1040-1044.
5. Yano, J., Kern, J., Sauer, K., Latimer, M. J., Pushkar, Y., Biesiadka, J., Loll, B., Saenger, W., Messinger, J., Zouni, A., and Yachandra, V. K. (2006) Where water is oxidized to dioxygen: structure of the photosynthetic Mn<sub>4</sub>Ca cluster. *Science* 314, 821-825.
6. Lavergne, J., and Junge, W. (1993) Proton release during the redox cycle of the water oxidase, *Photosynth. Res.* 38, 279-296.
7. Haumann, M., and Junge, W. (1996) Protons and charge indicators in oxygen evolution, in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions* (Ort, D. R., and Yocum, C. F., Eds) pp 165-192, Kluwer, Dordrecht, The Netherlands.
8. Junge, W., Haumann, M., Ahlbrink, R., Mulikidjanian, A., and Clausen, J. (2002) Electrostatics and proton transfer in photosynthetic water oxidation, *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.* 357, 1407-1417.
9. Rappaport, F., and Lavergne, J. (2001) Coupling of electron and proton transfer in the photosynthetic water oxidase, *Biochim. Biophys. Acta* 1503, 246-259.
10. Fowler, C. F. (1977) Proton evolution from photosystem II. Stoichiometry and mechanistic considerations, *Biochim. Biophys. Acta* 462, 414-421
11. Saphon, S., and Crofts, A. R. (1977) Protolytic reactions in photosystem II: a new model for the release of protons accompanying the photooxidation of water, *Z. Naturforsch.* 32C, 617-626.
12. Förster, V., and Junge, W. (1985) Stoichiometry and kinetics of proton release upon photosynthetic water oxidation, *Photochem. Photobiol.* 41, 183-190.
13. Rappaport, F., and Lavergne, J. (1991) Proton release during successive oxidation steps of the photosynthetic water oxidation process: stoichiometries and pH dependence, *Biochemistry* 30, 10004-10012.
14. Jahns, P., Lavergne, J., Rappaport, F., and Junge, W. (1991) Stoichiometry of proton release during photosynthetic water oxidation: a reinterpretation of the responses of Neutral red leads to a non-integer pattern *Biochim. Biophys. Acta* 1057, 313-319.
15. Jahns, P., and Junge, W. (1992) Proton release during the four steps of photosynthetic water oxidation: induction of 1:1:1:1 pattern due to lack of chlorophyll a/b binding proteins, *Biochemistry* 31, 7398-7403.
16. Lübbers, K., Haumann, M., and Junge, W. (1993) Photosynthetic water oxidation under flashing light. Oxygen release, proton release and absorption transients in the near ultraviolet — A comparison between thylakoids and a reaction-centre core preparation, *Biochim. Biophys. Acta* 1183, 210-214.
17. Haumann, M., and Junge, W. (1994) Extent and rate of proton release by photosynthetic water oxidation in thylakoids: electrostatic relaxation versus chemical production, *Biochemistry* 33, 864-872.
18. Haumann, M., Hundelt, M., Jahns, P., Chroni, S., Bgershausen, O., Ghanotakis, D., and Junge, W. (1997) Proton release from water oxidation by photosystem II: similar stoichiometries are stabilized in thylakoids and PSII core particles by glycerol, *FEBS Lett.* 410,

- 243-248.
19. Schlodder, E., and Witt, H. T. (1999) Stoichiometry of proton release from the catalytic center in photosynthetic water oxidation. Reexamination by a glass electrode study at pH 5.5-7.2. *J. Biol. Chem.* *274*, 30387-30392.
  20. Renger, G. (1987) Mechanistic aspects of photosynthetic water cleavage, *Photosynthetica* *21*, 203-224.
  21. Berthomieu, C., and Hienerwadel, R. (2001) Iron coordination in photosystem II: interaction between bicarbonate and the QB pocket studied by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* *40*, 4044-4052.
  22. Hienerwadel, R., Gourion-Arsiquaud, S., Ballottari, M., Bassi, R., Diner, B. A., and Berthomieu, C. (2005) Formate binding near the redox-active tyrosine D in photosystem II: consequences on the properties of tyrD. *Photosynth. Res.* *84*, 139-144.
  23. Noguchi, T., and Sugiura, M. (2003) Analysis of flash-induced FTIR difference spectra of the S-state cycle in the photosynthetic water-oxidizing complex by uniform <sup>15</sup>N and <sup>13</sup>C isotope labeling. *Biochemistry* *42*, 6035-6042.
  24. Noguchi, T., Inoue, Y., and Tang, X.-S. (1999) Structure of a histidine ligand in the photosynthetic oxygen-evolving complex as studied by light-induced fourier transform infrared difference spectroscopy. *Biochemistry* *38*, 10187-10195.
  25. Kimura, Y., Mizusawa, N., Ishii, A., and Ono, T. (2005) FTIR detection of structural changes in a histidine ligand during S-state cycling of photosynthetic oxygen-evolving complex. *Biochemistry*, *44*, 16072-16078.
  26. Saygin, Ö., and Witt, H. T. (1984) On the change of the charges in the four photo-induced oxidation steps of the water-splitting enzyme system S: Optical characterization at O<sub>2</sub>-evolving complexes isolated from *Synechococcus* *FEBS Lett.* *176*, 83-87.
  27. Bernát, G., Morvaridi, F., Feyziyev, Y., and Styring, S. (2002) pH dependence of the four individual transitions in the catalytic S-cycle during photosynthetic oxygen evolution. *Biochemistry* *41*, 5830-5843.
  28. Suzuki, H., Sugiura, M., and Noguchi, T. (2005) pH dependence of the flash-induced S-state transitions in the oxygen-evolving center of photosystem II from *Thermosynechococcus elongatus* as revealed by Fourier transform infrared spectroscopy. *Biochemistry* *44*, 1708-1718.
  29. Suzuki, H., Sugiura, M., and Noguchi, T. (2009) Monitoring Proton Release during Photosynthetic Water Oxidation in Photosystem II by Means of Isotope-Edited Infrared Spectroscopy *J. Am. Chem. Soc.* *131*, 7849-7857.

## FTIR Study on the Proton Release Pattern during Photosynthetic Water Oxidation

Hiroyuki Suzuki\*

Department of Biology, Faculty of Science, Tokyo University of Science