

論文の内容の要旨

論文題目 光化学系 II 反応中心機能分子の酸化還元電位に関する研究

氏名 芝本 匡雄

光エネルギーを化学エネルギーに変換する反応である光合成初期過程は、集光性色素分子と反応中心機能分子から構成されている二つの光化学系 (Photosystem: PS) I、II が協同的に働くことにより進行する。光合成初期過程の光変換効率は量子収率にしてほぼ 1 と驚異的に高いことで知られ、反応中心の機能分子群の酸化還元電位が巧妙に調節されていることにより実現しているとされているが、酸化還元電位の多くは推測にとどまる。PS II は、光合成初期過程の出発点である水の分解を引き起こし、電子を引き抜くという重要な役割を担っているが、詳細な電子伝達メカニズムは明らかになっていない。本論文は、PS II の電子伝達メカニズム解明を目指し、酸化還元電位を精密に測定可能な薄層電解セルを用いた分光電気化学的手法により、PS II 反応中心機能分子のうち、実測はされているがその値が大きくばらついているプラストキノン Q_A とヘムタンパク質シトクロム(Cyt) $b559$ の酸化還元電位を精密計測することにより、PS II の電子伝達メカニズムの一端の解明を試みた。

第1章では、光合成初期過程に関する概説とPS II反応中心機能分子の酸化還元電位に関する現状をまとめ、さらに本研究の目的とそれに対する方策についてまとめた。

第2章では、これまで酸化還元電位の報告値が $-300 \sim +100$ mV と非常に大きくばらついていた PS II 二次電子受容体 Q_A の酸化還元電位の精密計測を行った。 Q_A の酸化還元電位は、蛍光スペクトルの蛍光強度変化から求められている。しかし、当研究室で確立した機能分子の酸化還元電位の精密測定が可能な分光電気化学的手法は、吸収スペクトルの吸光度変化を元に Nernstian plots から求めているので、 Q_A の酸化還元電位計測に適用できない。そこで、分光電気化学的手法を用いて蛍光強度変化から Q_A の酸化還元電位が計測できるよう、セル室の再設計及び測定条件の最適化を行った。最適化した測定条件を用いて、好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の PS II 中 Q_A の酸化還元電位を求めた。結果、*T. elongatus* の PS II 中 Q_A の酸化還元電位を -140 ± 2 mV ($n = 4$) と精度良く測定することに成功した。

さらに、計測した Q_A の酸化還元電位もとに、速度論的解析により求められている各機能分子の自由エネルギー差から、水を酸化するほどの高い酸化力を有するため実測することができない PS II 反応中心一次電子供与体 P680 の酸化還元電位を +1190 mV と推測し、これまで考えられてきた P680 の酸化還元電位よりも約 100 mV 近く卑な値であることを明らかにした。推測された P680 の酸化還元電位は、当研究室で分光電気化学的手法を用いて計測した PS II 反応中心一次電子受容体フェオフィチン(Phe) *a* の酸化還元電位をもとに推測した P680 の酸化還元電位と非常に良く一致していることから、信頼性が高い値であることが裏付けられた。

第 3 章では、第 2 章で確立した Q_A の酸化還元電位を精密に測定可能な分光電気化学的手法を用いて Q_A の酸化還元電位の生物種依存性について検討した。結果、緑藻である *Chlamydomonas reinhardtii* では -167 mV、高等植物の spinach では -163 mV、シアノバクテリアの *T. elongatus* では -140 mV、紅藻の *Cyanidioschyzon merolae* では -110 mV となり、分光電気化学的手法を用いて Q_A の酸化還元電位を精密に計測することにより、明らかになっていなかった Q_A の酸化還元電位の生物種依存性を初めて明確にすることに成功した。

各生物種間で PS II 構成サブユニットなどを比較検討したところ、表在性タンパク質の相違が、 Q_A の酸化還元電位の生物種依存性を示す要因として考えられた。表在性タンパク質は、水を触媒的に酸化するマンガククラスターを安定化する機能を有するタンパク質サブユニットで、表在性タンパク質を構成するサブユニットは生物種によって異なり、緑藻と高等植物では PsbO, PsbP, PsbQ から、シアノバクテリアでは PsbO, PsbV, PsbU から、紅藻では PsbO, PsbV, PsbU, PsbQ' から構成される。表在性タンパク質を構成するサブユニットが同一な緑藻と高等植物では Q_A の酸化還元電位がほぼ同一であるのに対して、表在性タンパク質を構成するサブユニットが異なる生物種では Q_A の酸化還元電位が最大約 60 mV 異なる。表在性タンパク質は、 Q_A を含む反応中心サブユニット D1, D2 タンパク質と一部相互作用していることが PS II の X 線結晶構造解析の結果から明らかとなっており、表在性タンパク質の相違が、生物種間においてアミノ酸配列が高度に保持された D1, D2 タンパク質のコンフォメーションに影響を与えるため、 Q_A 近傍での静電相互作用や水素結合の強弱が生物種間で差異が生じると予測される。そのため、 Q_A の酸化還元電位が生物種依存性を示すのではないかと考えられる。この結果は、 Q_A と Q_A 近傍のアミノ酸との水素結合の強弱と Phe *a* と Q_A の相互作用が生物種によって異なるという Q_A の酸化還元差 FTIR スペクトルを生物種間で比較した結果からも示唆される。

第 4 章では、ヘムタンパク質 Cyt *b559* の酸化還元電位の精密計測を行った。当研究室で確立した機能分子の酸化還元電位を精密に測定可能な分光電気化学的手法を用いて、

spinach 由来の PS II 反応中心複合体中 Cyt b559 の酸化還元電位を計測するための測定条件を確立した。確立した条件を用いて、これまで+25 ~ +150 mV とばらついていた Cyt b559 の酸化還元電位を pH = 6 において $+90 \pm 2$ mV ($n = 4$) と非常に高精度に計測することに成功した。

第 5 章では、第 4 章で確立したヘムタンパク質 Cyt b559 の酸化還元電位を精密に計測可能な方法を用いて Cyt b559 酸化還元電位の pH 依存性について検討した。これまで、Cyt b559 の酸化還元電位の pH 依存性から、酸化還元反応するヘムに配位している 2 つのヒスチジン(His)残基の内、1 つの酸解離平衡がヘムの酸化還元反応に影響をしていると考えられてきた。しかし、近年の PS II の X 線結晶構造解析の結果から、2 つの His 残基とヘムとの距離が両者とも約 2 Å とほぼ同じであることが明らかとなり、2 つの His 残基の酸解離平衡が Cyt b559 の酸化還元反応に影響を与えている可能性が高い。計測した Cyt b559 酸化還元電位は、pH 4 ~ 9 の間で +115 mV から +50 mV と約 65 mV 単にシフトし pH 依存性を示した。pH 依存性をより詳細に解析するべく、ヘムの酸化還元電位の pH 依存性に関するモデル式を用いて解析を行った。結果、ヘムに配位している 2 つの His 残基のうちの 1 つが pH 依存性に影響を与えていると仮定した場合よりも、2 つの His 残基共に pH 依存性に影響を与えていると仮定した方が、より実験結果に一致していることが分かり、2 つの His 残基共に Cyt b559 の酸化還元反応に影響していることが示された。pH = 4.0 では His 残基のイミダゾール基は正に帯電しているが、pH の増加に伴いイミダゾール基の正電荷が徐々に消失し、Cyt b559⁺との静電相互作用が相対的に強まることで Cyt b559⁺が安定化しやすくなり、Cyt b559 の酸化還元電位が単にシフトするのではないかと考えられる。

第 6 章では、以上の結果を総括し、PS II の電子伝達メカニズムについて本研究で得られた結論をまとめ、今後の研究の展望について述べた。