

植物光合成初期機構のパルス電子常磁性共鳴
(E P R) による研究

関西学院大学理学部教授

河盛阿佐子

植物光合成初期機構のパルス電子常磁性共鳴 (EPR) による研究

1. 研究の背景と目的

地球の資源で最も効率の良い植物光合成のエネルギー利用機構はまだ十分わかっていない。一連の明反応である光合成の初期にはアンテナクロロフィルによる集光とエネルギーの伝達、それに続いて反応中心クロロフィルの励起、電子移動による電荷分離、最後に還元物質 NADPH としてエネルギーが貯蔵され、暗反応で炭水化物の合成に利用される。

本研究はその電荷分離に至る過程の電子移動の機構を明らかにするため、電子移動担体間の距離やそれぞれの局所構造を調べる。植物の光合成はよく知られた現象であるが、それに関与する蛋白質は複雑な構造で、まだ解明されていない。ようやく 1985 年頃、植物の進化前の光合成バクテリアの構造解析、また 1992 年頃植物の二つの光化学系のうち光化学系 I の構造が解析されたが、その分解能は 3 - 4 Å 程度であった。

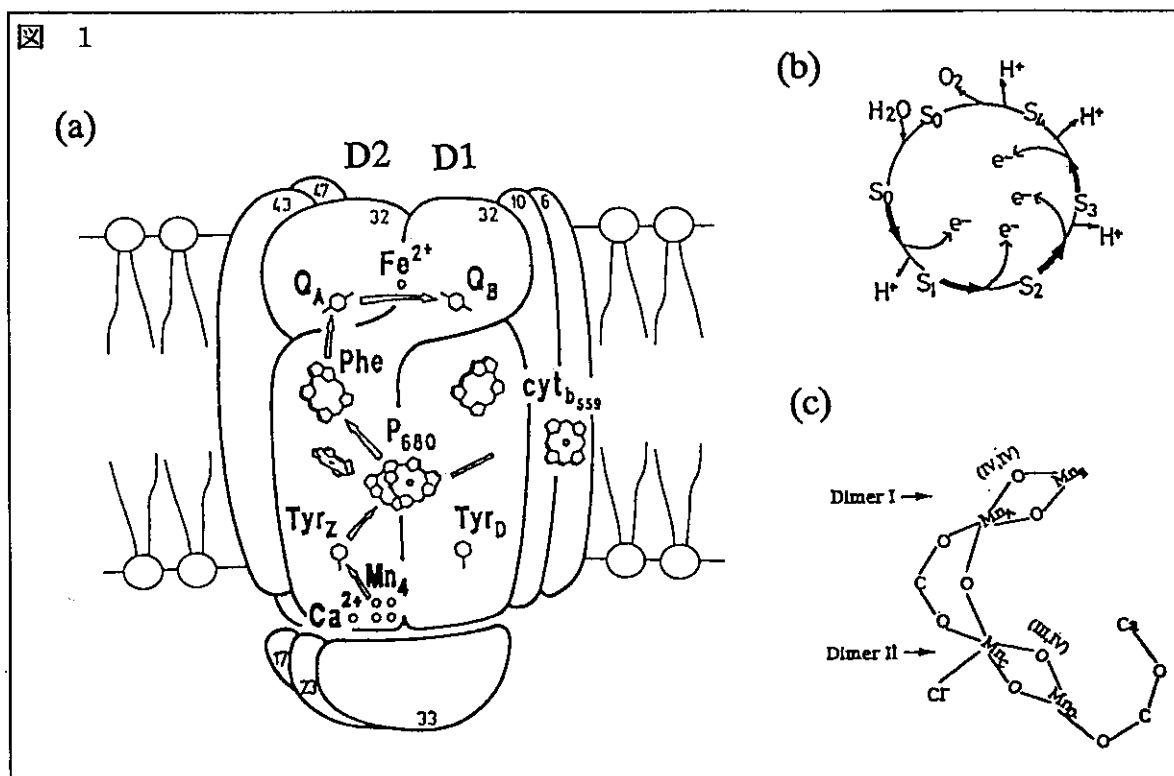
本研究者の主に研究している光化学系 II は波長 680 nm の光を吸収して水を分解する蛋白質を含み、これが不安定なため単結晶作製が困難で現在 X-線に代わる他の手段の一つとして電子常磁性共鳴 (EPR) が有効である。本研究者は新しいパルス EPR 観測と解析方法を提案し、これを光合成系の電子移動担体や水分解を触媒するマンガンなど常磁性イオン間の距離をそれら不対電子間の磁氣的相互作用を観測して求めるのに応用した。光合成のこのような方法の応用は世界でも例が少なく、この分野で独創的な仕事であると評価されて来た。

最近本研究者は寿命が短いため観測の困難な光化学系 II の反応中心クロロフィル P680 ラジカルと第一受容体キノン Q_A の距離を初めて決定した。ほかに P680 へのドナー・チロシン Z と水分解系のマンガンへの距離、チロシン D との距離。また反応中間体でトラップしてできる所在や正体不明のラジカル間の距離など ELDOR (電子電子 2 重共鳴) で求めた。電子スピンエコー振幅変調 (ESEEM) と電子核 2 重共鳴 (ENDOR) は電子移動体分子内の化学結合や周辺原子核との磁気相互作用を介して配置などの知識を与え、構造の不明な光化学系 II の貴重な基礎情報を提供する。

図 1 に光化学系 II (PSII) の推定図 (a) とマンガンが触媒として働く水分解系の酸化反応の周期 (Kok 酸素時計とも S-状態とも呼ぶ) (b), XANES より推定されたマンガン酵素の構造 (c) を示す。反応中心 P680 はクロロフィル 2 量体と考えられ D1 と D2 蛋白の対称心にある。これが光を吸収して励起され、電子伝達反応が進行する。最初 $P680^+Q_A^-$ と電荷分離を起こすが、ドナー側チロシン Z を経て水から電子が供給される。

本研究では大きく分けて ① ESEEM と ELDOR 法による光合成系の電子伝達体間の距離の正確決定: P680 と Q_A 他これまで距離の未決定の常磁性種間について行う。更に PSII 膜をマイラーシート上に配向してこれらの距離ベクトルの光合成膜に対する方向を決定するなど電子伝達機構解明に向けて電子伝達体の配置について構造的資料を提供する。② ESEEM と ENDOR 法により電子伝達に関与するラジカルや鉄、マンガンなどの局所構造を調べる等により光合成の効率のよい電子伝達体の微視的構造を確立する。③ 水分解酵素に含まれるマンガンの作用を知るためその局所構造をあきらかにする方法としてマイクロ波 2 重モード EPR 法で新しい信号を観測する。

図 1



2. 研究内容・研究方法

A. 試料調整

ほうれん草より生化学的手法により光化学系 I や光化学系 II (PS II) の単離, 精製, 各種処理を行う. PS II の水分解系の除去や, アクセプター側の鉄抜き亜鉛置換, 鉄の配位子のシアニ化などを必要に応じて行う.

周りの原子核との超微細相互作用による相互作用の大きさから化学結合状態, また核種を知るためには同位元素置換を行うとスペクトル解析が容易になる. ^{15}N , ^{13}C など同位元素置換培地でほうれん草を育て, 窒素や炭素の ESEEM や ENDOR を行う. これまで距離を決定した電子伝達体間の距離ベクトルの方向を決めるため光合成膜をマイラーシート上で乾燥配向する. 試料は観測用石英管に封じて液体窒素で保存する.

観測用試料に光を照射して PS II 内にラジカル対の生成と同時に液体窒素温度でトラップする. 時間と照射温度を制御するなどしてラジカル対の種類の選定や酸化状態設定など観測系を準備する. 水分解系 S 状態の選定には常温でフラッシュ光照射を行う. スピン偏極した信号を観測するためにはレーザー光を照射と同期した観測系を準備する.

B. 観測法

ラジカル電子磁気モーメント間および核との磁気相互作用を観測して, それより化学結合や距離の知識を求める.

B-① ESEEM (Electron Spin Echo Envelope Modulationⁿ, 電子スピンエコー振幅変調) 原子核による接触型超微細相互作用, 核 4 重極や双極子相互作用から化学結合や核種, 核との距離など微視的構造が解る. 別にスピン偏極した電子スピン同志の双極子相互作用も観測でき, かなり遠方にある電子伝達体

との距離もわかる．パルス系列は 磁気モーメントを共鳴周波数で回転する座標系で “90°-τ-180°” 倒す2パルスや3パルス法などある．

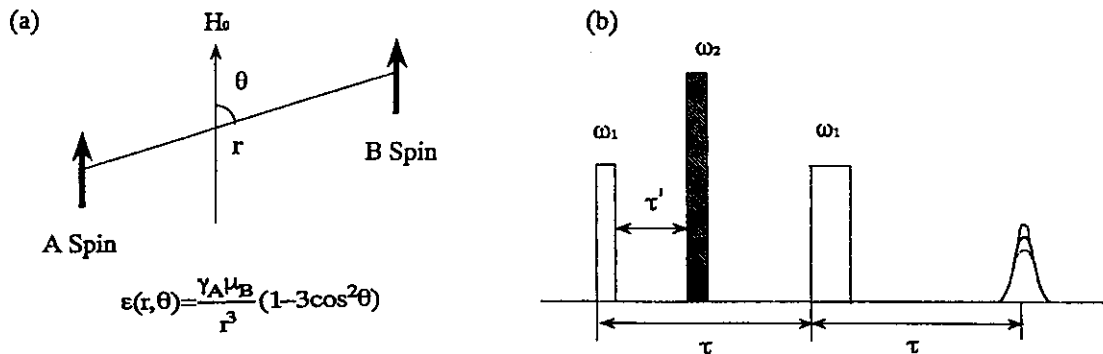


Fig. 2a Dipolar interaction between two spins A and B. The energy $\epsilon(r, \theta)$ is given by a function of the distance and its relative orientation to the applied magnetic field. $\gamma_A = 2\pi g_A \beta / \hbar$. The ESE signals of spins A are formed by the first and third m.w. pulses with the frequency ω_1 . The spins B are turned by the second m.w. pulse with the frequency ω_2 .

Fig. 2b The pulse sequence, $\pi/2(0) - \pi(\tau') - \pi(\tau)$ pulses and the spin echo signal $V(2\tau)$ appearing at 2τ .

B-② ELDOR (Electron eLEctron DObble Resonance) 2つのラジカルの共鳴周波数の近い場合にそのビート $V(\tau') \propto \cos \Delta\omega \tau'$ より双極子相互作用 $\Delta\omega = \gamma_A \mu_B / r^3 (3\cos^2\theta - 1)$ を決定し，更にラジカル間の距離を導く．2つの共鳴周波数が一致する場合を‘2+1’パルス法と名付けている．

B-③ ENDOR (Electron Nuclear Double Resonance) EPRを観測しながらラジオ波をかけEPR信号強度を借りてNMR（核磁気共鳴）信号を間接的に観測し，周りの核との相互作用を観測することになる．上述のESEEMと観測対象は同じであるが分解能があり，6 Å以内であれば，遠方の核も観測にかかる．特に水分解系のマンガンの周辺構造を知るのに有効である．

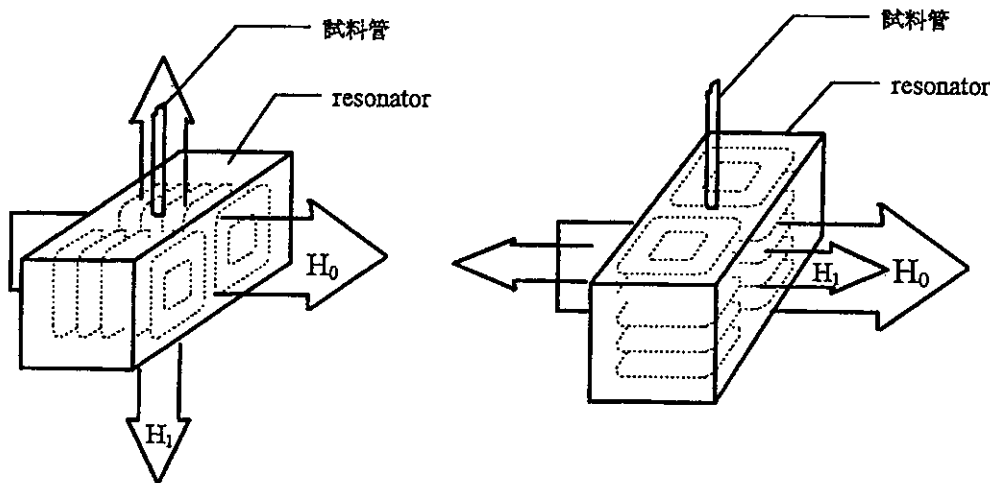


図 3 TE₁₀₂ ($H_1 \perp H_0$)
垂直モード EPR

TE₀₁₂ ($H_1 // H_0$)
平行偏向 EPR

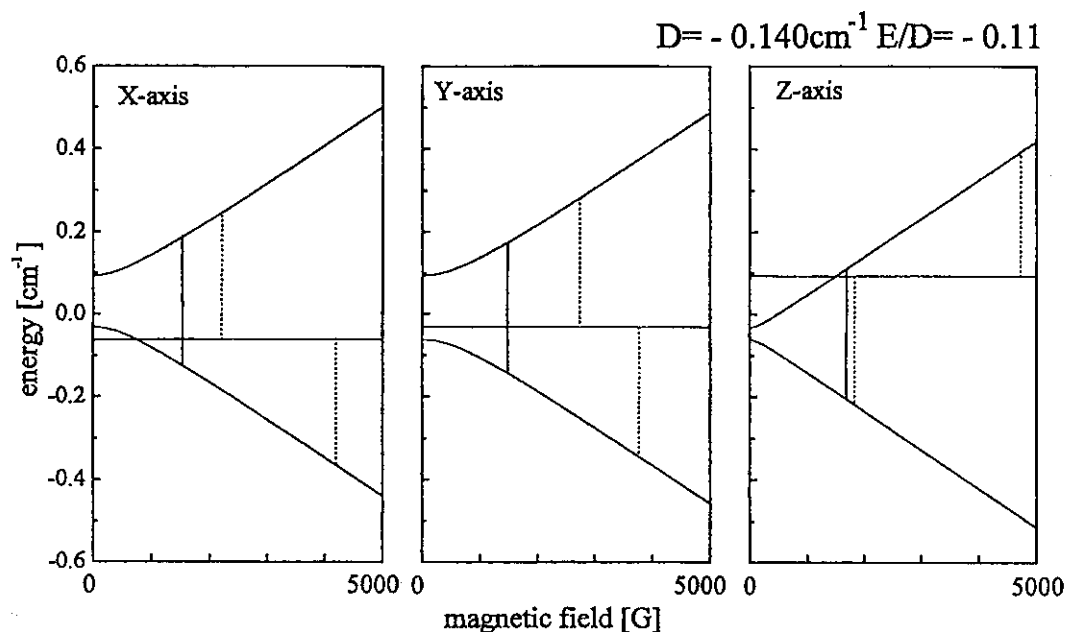


図 4 $S = 1$ スピン系 におけるエネルギー分裂。このとき生じる許容遷移は破線で、禁制遷移は実線で示してある。禁制遷移が生じるエネルギーレベルの磁場勾配は許容遷移のものの 2 倍あり、静磁場の方向に対する異方性も少ない。

B-④ Dual mode (2 重モード) EPR 通常の EPR では外部からかける静磁場 H_0 に垂直にマイクロ波磁場をかけいわゆる $\Delta M = \pm 1$ の遷移を観測するが、静磁場に平行なマイクロ波磁場で $\Delta M = 0$ の禁制遷移を観測する方法が可能のように 2 つの異なった共鳴周波数で共振する。いずれかの周波数を選択してモードを選択できる (図 3)。

これはスピンの数が整数で通常 EPR が共鳴範囲が広いが、その範囲から逸脱して観測されない場合、新しい情報が得られる (図 4)。現在は CW (連続波) でしか使えないが近い将来パルス EPR でも行いたい。

参考文献

A. Kawamori, H. Mino, H. Hara, A.V. Astashkin and Y.D. Tsvetkov
 "MULTIPLE RESONANCE IN PULSED EPR WITH APPLICATION TO PHOTOSYNTHESIS" Kwansei Gakuin University *Annual Studies* 44 (1995) 219-239

3. 研究結果

①. ESEEM によるラジカル間距離と方向決定

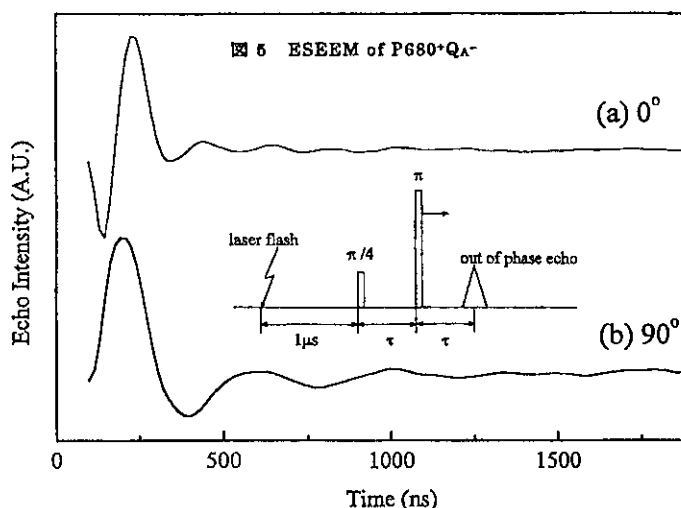
a). PSI のスピン偏極したラジカル対

最初光化学系 I (PSI) の $P700^+A_1^-$ について通常のボルツマン分布とは異なるラジカルスピンの強い信号を観測し距離を 25 Å と見積もった (文献 (Dzuba et al. Chem. Phys. Letts. 264 (1997) 238-244)). ついで USA のアルゴンヌ研究所の Tang 氏と共同でラジカルスピンの強い相関に起因する異常な信号の理論解析を行った (論文 1)。さらにその実験的検証を (論文 12) により行った。又光化学系 I の膜配向により反応中心 $P700$ からキノンアク

セプター A_1 への方向から膜法線と 11° という結果を得た。これはベルリンのグループのシアノバクテリアの単結晶で観測した値 27° と大きく異なり、この理由は今後の研究課題である（論文準備中 17）。他の電子伝達体については X 線解析で分解能 $4 \text{ \AA}$ で位置が決められているが、受容体キノンについては分子が小さいので不明であったので EPR によって初めて明らかになった。人工的に入れ換えた別のキノンについての新しい実験では通常はもとの結合位置に入るが、酸素が一個の fuluorenone については分子の向きが異なり、又動的特性も異なる複数の結合様式の存在が確認されている（論文準備中 16）。

b) 光化学系 II の $P680^+Q_A^-$

反応中心 $P680^+$ の寿命が低温でも 3 m秒 短く、観測が困難であったが、受容体側にある第一と第二キノンの橋渡しをしている非ヘム鉄をシアン処理したり亜鉛で置換することにより反磁性とする事が出来、この結果低温でレーザー照射して $P680^+$ と Q_A^- ラジカル対のスピン偏極した強い異常信号が観測出来(図 5)、その ESEEM 信号よりラジカル対の距離を $27 \text{ \AA}$ と決定できた(論文(8))。



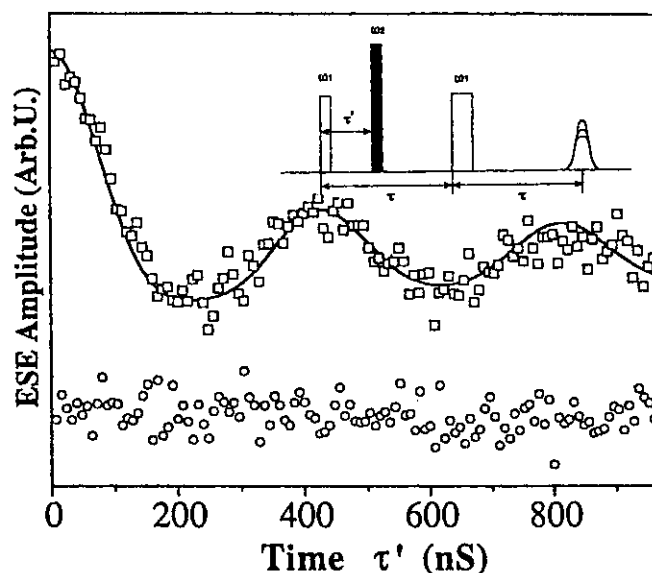
本年度は亜鉛置換した $PS II$ を膜配向し、膜法線に対する静磁場の角度変化より $P680$ から Q_A への方向を 15° と決定した。(上記 $PS I$ とあわせて論文準備中 17)。

② ELDOR 法による距離と方向決定

図 6 ELDOR of $Mn(S_2) Y_D^+$

a) チロシン D と Q_A^-

$PS II$ 内のドナー側にあり安定なチロシン D (Y_D) と受容体 Q_A の距離を上記シアナイド処理で反磁性とし、光を摂氏 0° で 8 分照射 20 分暗所に置いた後トラップして ELDOR 法でその距離 $39 \text{ \AA}$ と決定した(文献 10)。現在この方向を決定するべく膜配向の試料で観測中である。



b) Y_D と S_2 状態 Mn

ドナー側の水分解系を 200 K 光照射したものをトラップして S_2 状態とし、マンガンのマルチラインのスピンエコーを 9.7

9 MHz で観測し、チロシン D を異なる共鳴周波数 9.68 MHz で励起して ELDOR の観測から $27 \text{ \AA}$ の距離を観測している。(文献 H. Hara et al. Biochim. Biophys. Acta 1276 (1996) 140-146) (図 6)。本年は更に膜配向して、法線との角度を 110° と決定した。またトリス処理によりドナー側よりの電

子伝達を減速したP S IIにマイナス20度で光照射して液体窒素温度でトラップしてチロシンDとZのラジカル対をつくりこの距離を‘2+1’パルスEPRで29 Åと決めていたが、これについても膜配向を行った実験より膜法線との角度を100度と決定した(図7)(論文8)。これまで決定した距離に新たに決定した方向を加えてP S IIの構造を図8に示す。

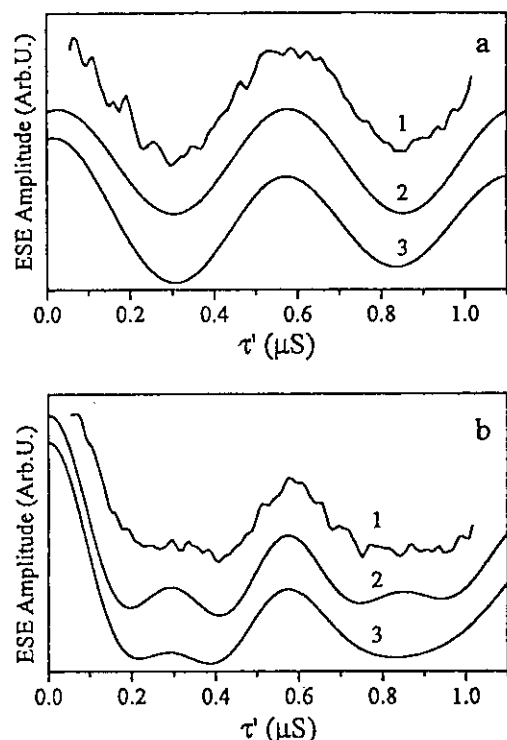


図7 (a), (b)は膜法線に磁場が平行と垂直の観測(1)とシミュレーション(2,3)

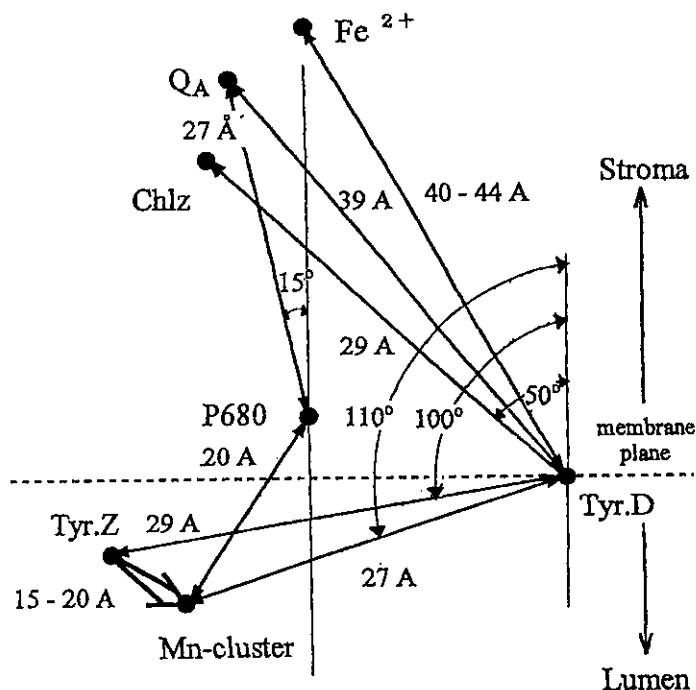


図8 光化学系IIの本研究グループで決めた電子伝達体の距離と方向

③その他

a) ESEEMによる受容体キノンの周辺構造

キノンの周辺構造を推定するためESEEMは化学結合に関連する情報を提供する。特に Q_A の周辺アミノ酸にどのようなものが結合しているか、2年前(文献 A.V. Astashkin et al. J. Chem. Phys. 102 (1995) 5583-5588)に観測したZn置換試料と新たにCN⁻処理試料を加え更に新しく2次元ESEEMによりスペクトルに帰属を詳細に調べ、 Q_A にヒスチジンとアラニンの窒素が化学結合していることを明らかにした。(論文13)。

b) マトリックスENDOR(電子核2重共鳴)の強度

一般にENDOR観測においてマトリックスと呼ばれるラジカルから比較的遠方においてフリープロトンの位置に出る陽子ENDOR信号が理論的に予測される以上の強度を示す原因を理論的に解明し、その実験的検証γ線照射したマロン酸ラジカル試料についてパルスENDORで行った。これは光合成系で電子伝達体からかなり離れた原子の核も検出可能であることを示唆し、今後の応用に有効である(論文15)。

④2重モードEPRで見た水分解系の磁気構造

電子スピン共鳴では1980年代に4個の酸化状態の2番目である S_2 状態のEPRが観測されて、ESR線形やXANESの結果から磁気構造や構造が推定されてきた。又昨年には S_0 酸化状態の信号が観測され、いずれも基底状態は $S = 1/2$ であることが解っている。 S_1 と S_3 は整数スピンで通常の垂直モードでは共鳴磁場が広い観測周波数の範囲からはみ出しているため信号は観測困難であった。EPR基底 S_1 状態については磁場に平行なマイクロ波モードではじめて1990年前後にその弱い信号が報告されて以後、誰もその信号を再現出来なかったところ昨年我々が信号を再現するとともに温度変化や試料の処理を行ってその起源を詳細に調べ、 $S = 1$ の第一励起状態であることを確認した。(論文2)

a) S_1 状態マンガンの磁氣的性質と方向性

本年はPSII膜を配向し、より詳細な実験から磁気構造に関連するEPRハミルトニアンにゼロ磁場相互作用の方向を決定した。これはそのままではまだ構造を決める資料とはならないが、モデル計算やモデル化合物のESR結果を併用して今後マンガンの相互位置を推定する資料となる(論文14)。

b) S_3 状態の新しいEPR信号

更に最近230 K光照射でトラップできた S_3 酸化状態にあると予測される配向試料で初めて新しい信号をマイクロ波平行と垂直両モードで観測し、その状態が S_3 に帰属されることを常温で2フラッシュのパルス光を照射した試料のESRにより確認した。又配向膜の角度変化より、結晶場軸が膜面法線方向にあり、酸化に伴う電子状態の変化で磁氣的相互作用の方向が S_1 より変わったことを現している(図9)

(論文18)。又信号強度の温度変化により基底1重項より2.7 K高い第一励起状態でスピンは $S = 1$ である(図10)。

c) $S=2$ のマンガン信号

別にPSIIから水分解に重要な Ca^{2+} イオンを抜き取ると S_2 状態のMnマルチラインのESRの構造が変化し、

図9 配向PSII膜のMn (S_3) EPR

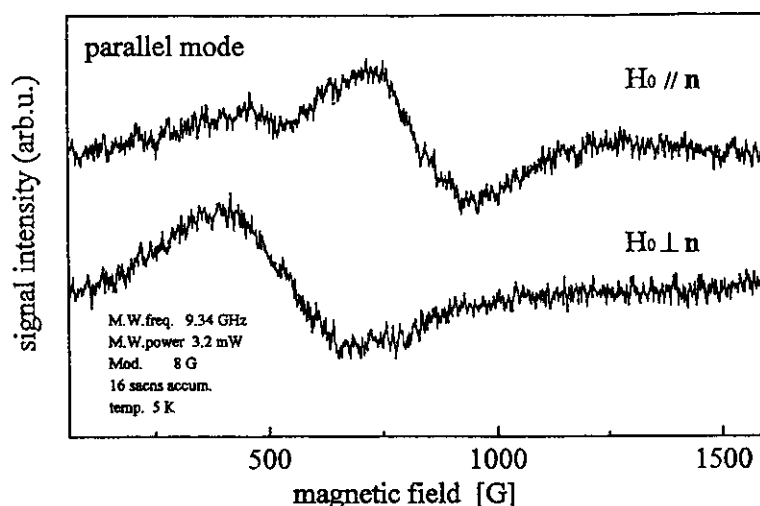
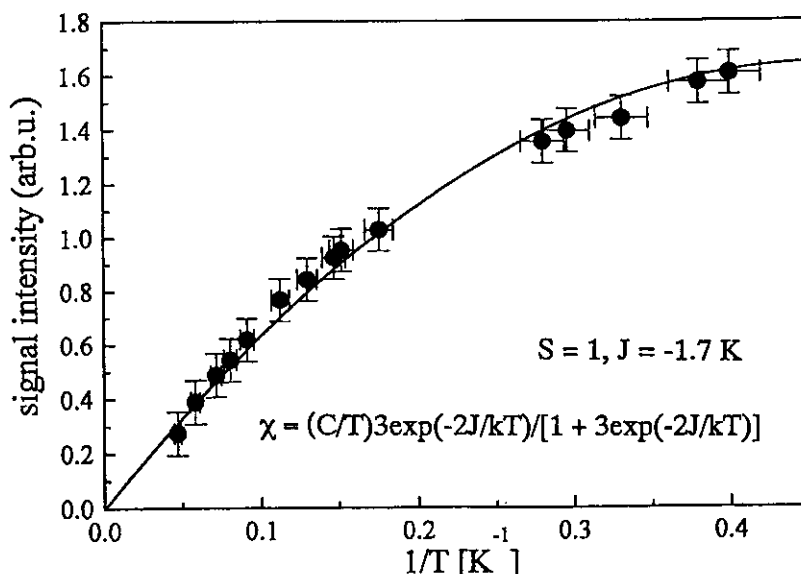


Fig.10 Temperature dependence of signal intensity



又新しい酸化状態の信号が観測されていることより構造が変化していることが示唆されており、加えて S_3 相当状態以上の酸化状態でマンガンの新しい信号が観測された。この信号は $S = 2$ の信号である。（論文11）

d) ^{15}N 置換PSIIのESEEM

これまでESEEMでマンガンの周辺に窒素原子が存在することがその ^{14}N の信号でわかっていたが、これを同位元素置換してより詳細なパラメータフィットによりマンガンの周辺アミノ酸の配置を知るためほうれん草を ^{15}N を99%含む肥料で水耕栽培をおこなっていたが成功し、PSII粒子を単離し、ESEEMで ^{15}N 置換を確認できた。現在これを解析中で間もなく日本植物生理学会（1998年5月3日 北海道大学）で発表する。

e) 水分解機能への蟻酸と重炭酸の効果

本年博士研究員としてアゼルバイジャンより、Yashar M. Feyzievを迎え、水分解系の機能に関して、重炭酸 HCO_3^- が重要であるというロシアのKlimovらのグループの提案を検証するため、これと競合して水分解系に結合すると見られる蟻酸の効果と酸素活性、 S_2 状態マンガン、受容体側のキノン鉄のEPR信号で蟻酸濃度を変えて極低温で観測した。その結果受容体側の障害がそのまま水分解系の障害となること、又蟻酸の結合は可逆的になることを見出した（論文準備中）。

このように現在まで水分解系の各 S -状態のマンガンの信号が出そろっており、今後これらを統括的に考察して構造と機能の関連を明らかにする基礎データの大部分を提供したことになる。

まとめ

- ①ESEEMとELDOR法によりこれまで不明のPSIとPSII電子伝達成分間の距離だけでなく、それらの配置の膜面に対する方向も決めた(図8)。
- ②水分解系の第一酸化状態の磁気構造と更に詳しく方向性も含めて決めた。
- ③Caを除去したPSIIで通常のKok状態と異なる酸化状態がマンガンの $S = 2$ の信号より示唆された。
- ④更に S_3 酸化状態のマンガンの信号を初めて観測した。
- ⑤同位元素置換 ^{15}N PSIIの調整と S_2 状態マンガンのESEEMの観測した。
- ⑥蟻酸処理により重炭酸の水分解への寄与は受容体の障害が原因であることがわかった。

4. 生活や産業への貢献および波及効果

最近、基礎研究としての物理化学的手法で光合成の蛋白構造と機能の解明が進むと同時に遺伝子操作による構成蛋白質の交換を併用する手法が進んで来た。このことは植物の品種改良や、特に地球環境の制御に向けて光合成の機構が構造と共にわかることは画期的な示唆をもたらすと期待できる。

光合成系パルスEPR研究成果を通して我々の考案した研究方法は他の生物体や固体物性の常磁性体間距離や電荷移動体の微視的構造の研究にも応用できること、また光合成系は複雑な系であるが物理現象のモデル系として教育的な系を出現できるので物理学の大学院学生の研究能力伸ばすのに好適な系であると確信した。国内の研究者が実際この研究方法をもっと活用するようになることが望まれる。

5. 発表論文 (1997 - 1998)

- (1) J. Tang, M.C. Thurnauer, A. Kubo, H. Hara and A. Kawamori: Anomalous pulse-angle dependence of Hahn's electron spin echo and multiple quantum echoes in a photoinduced spin-correlated pair, *J. Chem Phys.* **106** (1997) 7471-7478.
- (2) T. Yamauchi, H. Mino, T. Matsukawa, A. Kawamori and T. Ono: Parallel Polarization Electron Paramagnetic Resonance Studies of the Photosynthetic Oxygen-Evolving System, *Biochemistry*, **36** (1997), 7520-7526.
- (3) H. Mino, A.V. Astashkin and A. Kawamori: An EPR and pulsed ENDOR study of the structure of tyrosine Z in Tris-treated photosystem II, *Spectrochimica Acta Part A* **53** (1997), 1465-1483.
- (4) A.V. Astashkin, H. Mino, A. Kawamori and T. Ono: Pulsed EPR study of the S3' signal in the Ca²⁺ depleted photosystem II. *Chem. Phys. Lett.* **272** (1997), 506-516.
- (5) K. Shigemori, H. Mino and A. Kawamori: pH and Temperature Dependence EPR. *Plant Cell Physiol.* **38** (1997) 1007-1011.
- (6) H. Hara and A. Kawamori: A Selective Hole Burning Method to Determine Distances between Paramagnetic Species in Photosystems. *Applied Magn. Reson.* **13** (1997) 241-257
- (7) H. Hara, S.A. Dzuba, A. Kawamori, K. Akabori, T. Tomo, K. Satoh, M. Iwaki and S. Itoh: The distance between P680 and Q_A in Photosystem II determined by ESEEM spectroscopy. *Biochim. Biophys. Acta* **1322** (1997) 77-85.
- (8) A.V. Astashkin, H. Hara and A. Kawamori: The pulsed electron-electron double resonance and "2+1" electron spin echo study of the oriented oxygen-evolving and Mn-depleted preparations of photosystem II. *J. Chem. Phys.* **108** (1998) 3805-3812.
- (9) A. Kawamori, H. Hara, K. Shigemori and A.V. Astashkin: Pulsed electron double resonance to determine distances between paramagnetic species in photosystems, in *Modern Applications of EPR/ESR From Biophysics to Material Science*, ed. by C.Z. Rudowicz, K.N. Yu and H. Hiraoka, Springer-Verlag, Singapore (1998) pp 226-232.
- (10) K. Shigemori, H. Hara, A. Kawamori, K. Akabori: Determination of distances from tyrosine D to Q_A and chlorophyll_z in photosystem II studied by '2+1' pulsed EPR, *Biochim. Biophys. Acta* **1363** (1998) 187-198.
- (11)*H. Mino, A. Kawamori, T. Matsukawa and T. Ono: Light-induced High-Spin Signals from the Oxygen Evolving Center in Ca²⁺-depleted Photosystem II Studied by Dual Mode Electron Paramagnetic Resonance Spectroscopy, *Biochemistry* **37** (1998) 2794-2799.
- (12)*H. Hara, J. Tang, A. Kawamori, S. Itoh and M. Iwaki: Anomalous pulse-angle and phase dependence of Hahn's electron spin echo and multiple-quantum echoes of the spin correlated radical pair P700+A1- in Photosystem I, *Applied Magnetic Reson.* in press
- (13)*A.V. Astashkin, H. Hara, S. Kuroiwa, A. Kawamori and K. Akabori: A comparative electron spin echo envelope modulation study of the primary electron acceptor quinone in Zn-substituted and cyanide-treated preparation of

photosystem II, J. Chem. Phys. (1998) in press.

- (14)#T. Matsukawa, H. Mino and A. Kawamori: EPR study of magnetic structure of the S_1 - state in the oriented oxygen evolving photosystem II membranes, to be submitted to Chem. Phys. Lett.
- (15)*A.V. Astashkin and A. Kawamori: Matrix line in pulsed electron-nuclear double resonance spectra, submitted to J. Magn. Resonance.
- (16)# M. Iwaki, S. Itoh, H. Hara and A. Kawamori: Spin-polarized radical pair in Photosystem I reaction center that contains different quinones and fluorenones as the secondary electron acceptor.
- (17)# H. Hara, T. Yoshii, A. Kawamori, K. Akabori, M. Iwaki and S. Itoh: ESEEM study of spin polarized radical pair in membrane oriented chloroplast and reaction center of PS I and PS II.
- (18)# T. Matsukawa, A. Kawamori, and H. Mino: Dual mode EPR study of new signals from S_3 state in the oxygen evolving photosystem II.

* # は本研究援助によるものである。#は間もなく投稿の予定