

総説

光合成蛋白質における酸化還元電位制御の理論解析

石北 央 京都大学 生命科学系キャリアパス形成ユニット、科学技術振興機構 さきがけ「光エネルギーと物質変換」

Abstract

Atmospheric oxygen is generated by water oxidation at the MnCa cluster of the protein-pigment complex, photosystem II located in the thylakoid membrane. At the heart of photosynthetic reaction centers (RCs) are pairs of chlorophyll *a*, P680 in photosystem II and P700 in photosystem I of cyanobacteria, algae, or plants, and a pair of bacteriochlorophyll *a*, P870 in purple bacterial RCs. These pairs differ greatly in their redox potentials for one-electron oxidation, E_m . For P680, E_m is 1100–1200 mV, but for P700 and P870, E_m is only 500 mV. Calculations with the linearized Poisson-Boltzmann equation reproduce these measured E_m differences successfully.

Photosystem II/P680 chlorophylls/electron transfer/proton transfer/redox potential/ Poisson-Boltzmann equation

1. はじめに

光合成反応では、太陽光の光エネルギーを生物が利用しやすい電気化学エネルギーに変換する。この過程は、生体膜中の**光合成反応中心蛋白質**で行われる。シアノバクテリアから高等植物では、

Photosystem II (PSII) と **Photosystem I (PSI)** の二つの反応中心蛋白質が共役して行うのに対し、紅色光合成細菌では **PbRC (Purple bacterial photosynthetic Reaction Centers)** が行う。PSII, PSI, PbRC は詳細は異なるものの、蛋白質構造・機能には多くの共通点が見受けられる (図1)。

特に、PSII と PbRC はコファクターの配置が似ており、総称としてType II反応中心と呼ばれている。Type II反応中心ではクロロフィル (Chl) 二量体が一対 (PSIIではP680、PbRCではP870)、その近傍に単量体のChl (アクセサリー Chl) 1対、フェオフィチン (Pheo) 1対、キノン (Q) 1対、そして非ヘム鉄が存在する。これらは、Chl 二量体の中点と非ヘム鉄を結ぶ疑似 C_2 対称軸に配置されているため、二つの電子移動経路が存在するように見える。しかし、実際の電子移動は、一方の電子移動経路 (PSII : D1、PbRC : L) でのみ観測され、もう一方の電子移動経路 (PSII : D2、PbRC : M) は不活性である。

Type I反応中心と呼ばれている PSI でも同様なコファクター配置が見受けられる (例えばP700と呼ばれる Chl 二量体を持つ) が、Pheoの代わりに Chl、非ヘム鉄の代わりに3つの鉄・硫黄クラスターが存在する。さらに、疑似 C_2 対称軸に対して存在する二つの電子伝達経路共に電子移動活性がある^{1,2)}。

反応中心の電子移動に関する研究は、分光学的手法等の実験的手法を中心に世界中で行われている。しかし、コファクターの多い複雑な膜蛋白質であること、実験的手法による解析がしばしば困難であること (蛋白質中に存在する他の色素分子の分光吸収体が重なってしまう等) により、未解明の部分は多い。一方、近年のX線結晶構造解析の著しい進展により、PSI³⁾・PSII⁴⁻⁷⁾共に原子レベルで詳細な蛋白質構造が明らかになりつつある。ここでは、蛋白質の立体構造情報を用いた理論解析により、PSIIでの水分解を可能とする Chl 二量体P680の酸化力について述べる。なお、PSIIのP680は P_{D1} と P_{D2} 、PSIのP700は P_A と P_B 、PbRCのP870は P_L と P_M と呼ばれる Chl 単量体のペアである。(D1/D2、A/B、L/M は、各々の Chl 単量体が存在する蛋白質サブユニット名である。)

2. PSII での水分解とP680の酸化力

Computational analysis of the light-induced electron transfer reactions in photosynthetic reaction centers

Hiroshi Ishikita

¹ Career-Path Promotion Unit for Young Life Scientists, Kyoto University

² PRESTO, Japan Science and Technology Agency (JST)

水分解反応 $2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{O}_2 + 4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$ は PSII のマンガニウム・カルシウムクラスター (MnCa) 上で起こる⁴⁻⁸⁾。私たちが呼吸で消費する酸素は PSII による産物である。水分解には、水から 4 個のプロトンと 4 個の電子を引き抜く必要がある。引き抜かれたプロトンの行方に関しては諸説あるが、結晶構造解析とアミノ酸残基の $\text{p}K_a$ 値から、プロトン排出経路 (H^+ exit pathway) の存在が提唱されている⁹⁾。そこでは、MnCa からバルク水領域周辺までの蛋白質内を荷電・極性アミノ酸による H^+ exit pathway が走り、水分解の副産物であるプロトンは MnCa 近傍の反応場からバルク水領域へと速やかに除去される (図 2)。このように PSII では水の分解を効率よく行う工夫がある。

さて、水分子から電子を引き抜くにはどの程度の労力が必要なのだろうか？ 酸素発生部位は lumen 側 (pH 6-6.5) にあり、水分子の酸化反応を行うには、およそ +880 mV (pH 6) の酸化還元電位 (E_m) が必要である。すなわち、+880 mV よりも高い E_m の電子受容体が必要である。MnCa 近傍には、チロシン Z (Y_z) と呼ばれるアミノ酸 D1-Tyr161 が存在し (図 2)、その E_m は +900 mV 台であるため、水から電子を引き抜く電子受容体となり得る⁸⁾。

P680 の異常に高い電位

実は、 Y_z の隣に存在する Chl 二量体 P680 こそが、水から電子を引き抜く究極の電子受容体である。通常 Chl 単量体の E_m は +600 ~ 700 mV であり、水や Y_z の E_m よりも低いため、水分子や Y_z から電子を引き抜くことは不可能である¹⁰⁾。しかし、速度論的解析の結果から、P680 はおよそ +1100 mV 以上の E_m を持つと推定されている¹¹⁾。これは、P680 が水や Y_z からの電子受容体となる事実と矛盾しない。

ここで PSII と同じ Type II 反応中心である PbRC の Chl 二量体 P870 を見てみると、実験的手法によりその E_m は +500 mV 程度とずっと低いことがわかっている¹²⁾。また、Type I 反応中心である PSI の Chl 二量体 P700 の E_m も、P870 同様 +500 mV 程度と測定されている¹³⁾ ので、PSII の P680 の +1100 mV 以上という E_m は、異常に高い。「P680 だけなぜ異常に高い E_m を持つのか？」は光合成研究最大の謎の一つであった。近年 PSII の X 線結晶構造の解像度が上昇し蛋白質環境が明らかになってきたが⁶⁾、P680 近傍の蛋白質環境は一見、PbRC の P870 周辺と大きな差異なく、謎は深まるばかりであった。

静電エネルギー計算による P680 の電位計算

著者らは、PSII、PSI、PbRC の蛋白質の立体構造に対して誘電連続体モデルを適用しポアソン・ボルツマン方程式を解くことにより静電エネルギー計算を実施した。計算を進めるのに必要な原子の電荷 (atomic partial charge) は、アミノ酸・コファクター分子単体をそれぞれ量子化学計算することにより決定した。著者らの計算手法の利点は、蛋白質中の全サブユニット、全色素等を取り込めることである。また、アミノ酸残基の解離状態は常に系内で平衡状態にあるため、例えば、Chl 分子の酸化還元状態が変化して荷電状態が変化すると、周辺のアミノ酸の解離状態もそれに応じて変化する。

PbRC における P870 の電位

計算の結果、PbRC の P870 の E_m は P_L : +635 mV、 P_M : +660 mV であった¹⁴⁾。この値は、Chl 二量体としての P870 の実測値 +500 mV¹²⁾ より 135-160 mV ほど高い。P870 では $P_{L/M}$ 分子のそれぞれの π 軌道が完全に重なっている箇所があるため、Chl 同士のカップリングが強く、P870 が酸化するときを生じる正の電荷は $P_{L/M}$ 両分子全体に非局在化する。従って、P870 の E_m の実測値 +500 mV は、単量体 Chl ($P_{L/M}$) の計算値より 135-160 mV 低く抑えられていると考えられる。実際、P870 の一つの Chl 分子 P_M を Pheo に置換して正電荷の非局在化を起こらないようにした蛋白質では、P870 の E_m が +640 mV と実験的に測定されている¹⁵⁾。この値は、著者らの $P_{L/M}$ 計算値と一致し、蛋白質環境を適切に計算に取り込めていることがうかがえる。

PSI における P700 の電位

PSI の P700 の各 Chl ($P_{A/B}$) の E_m は +587、+599 mV であった¹⁴⁾。二量体 P700 の E_m (実測値 +500 mV¹³⁾) と単量体 $P_{A/B}$ の E_m のずれは 100 mV であるが、これは P870 の場合に見られたずれ 135-160 mV と比べて小さい。その理由は結晶構造を見ても明らかのように⁴⁾、二つの $P_{A/B}$ 分子の平面は非常に近い距離にあるものの π 軌道が完全に重なっていないので、P700 の $P_{A/B}$ のカップリングは P870 の $P_{L/M}$ とのカップリングに比べて弱いからである。

PSII における P680 の電位

一方、P680 の E_m は、 P_{D1} : +1206 mV、 P_{D2} : +1222 mV¹⁴⁾ であった。これほど高い値なら水から十分電子を奪えるし、 Y_z の電子受容体としても問題ない。以上、PbRC、PSI、PSII 全ての反応中心の Chl 二量体の E_m は、蛋白質の立体構造だけで決定されることが立証された。以下、なぜ P680 の E_m だけが

+1200 mVと高く、他のP870、P700より 600 mV も高いのか見ていきたい。

P680 ・ P700 クロロフィル間の電位差： 600 mV

1) 現時点での結晶構造解析の解像度によると、PSIIは20個のサブユニットから構成されている⁷⁾。先述したPSIIの計算値 P_{D1} : +1206 mV、 P_{D2} : +1222 mV¹⁴⁾はもちろん、結晶構造⁶⁾中の全サブユニット存在下で得られた値である。このうち、PSII反応中心(Chl、Pheo、Q等が存在する部分)はD1/D2の二つのサブユニットのみで構成されている。D1/D2以外の全てのサブユニットを外しても E_m は P_{D1} : +1020 mV、 P_{D2} : +1030 mVであり、依然として高い。この結果、D1/D2以外のサブユニットによるP680の E_m への寄与は、200 mV程度であることがわかる。

2) ここで、蛋白質の構成要素の電荷がそれぞれの程度Chlの E_m に影響を与えているかをまとめてみた(表1)。PSIIでは全コファクター分子によって $P_{D1/D2}$ の E_m が120-240 mV程度上昇している。このうち、ほとんどはMnCaからの寄与である。MnCaは4個のMn、1個のCaイオンから成り大きな正電荷を持つため、これら金属部位のChlの E_m への寄与は100-210 mVにもものぼる。しかし、蛋白質構造のエナジェティクスを考えると、局所的に正電荷が存在するのは非常に不安定である。現実では、クラスター金属部位の正電荷の影響を少しでも抑えようと、MnCa近傍には負電荷を持つアミノ酸が多く配置されており、そのいくつかはMnCaの配位子である。従って、MnCaによるChlの E_m の上昇は、アミノ酸側鎖の影響により引き下げられ、全体としてたかだか80 mV程度上昇に抑えられている。それでも、MnCaはPSIには存在しないため、PSIとPSIIの E_m 差を広げる要因の一つである。

3) 驚いたのは、蛋白質主鎖のChlの E_m に与える影響が、PSIとPSIIで150-180 mV程度も異なることである(表1)。PSI、PSIIのChl二量体は、ともに膜貫通ヘリックスのヒスチジン(His)に配位している(図3)。PSI、PSIIともにヘリックスの長さはほぼ同じである。しかし、このHis配位子を提供するヘリックスの主がChlの E_m に与える影響は、PSIとPSIIで130 mV程度も差がある。(PSIIの場合、このヘリックスは100 mV程度Chlの E_m を上げているのに対し、PSIでは逆に30 mVほど E_m を下げているのである¹⁴⁾。)PSIではHis配位子が、膜貫通ヘリックスのほぼ中央に存在するため、主鎖のカルボニル(CO)基のO原子が多数Chlに配向している。

CO基は強く分極しておりO側は大きな負電荷を持っている。そのため、PSIのP700酸化によって生じた正電荷は、大きく安定化される。一方、PSIIのHis配位子は、膜貫通ヘリックスの末端に存在しているために、PSIで得られるようなヘリックス上のCO基の配向による正電荷の安定化は起こらない。

以上のCO基の安定化効果の有無で、PSIIのChlの E_m はPSIのものより130 mV程度高い。ちなみに、正電荷を帯びたP680とP700への溶媒和の寄与は同程度であることから、溶媒環境による影響ではないことは明らかである。

P680 ・ P870 の電位差： 600 mV

1) PSIIは反応中心を構成するD1/D2サブユニットを複数のサブユニットに取り囲まれておりその相互作用のため、 E_m が200 mVほど上昇している。一方、PbRCの反応中心を構成するL/Mサブユニットでは、「PSIIでのD1/D2を取り囲むのに相当する」サブユニット群が存在しない。従って、P680、P870の E_m 差600 mVのうち、200 mVは「PbRCにおける反応中心を取り囲むサブユニットの欠如」に起因する。

2) さらに、PbRCのChlは正確にはバクテリオクロロフィルであり、そもそもPSI・PSIIのChlに比べて160 mV程度 E_m が低い¹⁰⁾。

3) 残りの E_m 差のうち、ほとんどは主鎖の E_m への寄与の違いで説明がつく(表1)。特筆すべきは、ほぼ同様に見えるPSIIとPbRCの構造も、 E_m 計算を実行して初めて、主鎖構造に重要な違いがあることが分かった。特にPSIIにおいては、MnCaに周辺のヘリックス側鎖が配位しているため、それに引きずられてPSIIの主鎖はPbRCの主鎖と比べて異なった配向をしており、その影響でP680の E_m が上昇している事実も指摘したい¹⁴⁾。

また、PSIIの Y_z に相当するアミノ酸がPbRCには存在しない事実も主鎖構造に差を与えている。 Y_z は近傍ヘリックス上のD1-His190と水素結合を形成するため⁸⁾、D1-His190は Y_z に引き寄せられ、PbRCとは異なった構造をとる¹⁴⁾。 Y_z 存在の有無も、PSII・PbRC間でのChlの E_m に差を生じる原因の一つである。

3. おわりに

PSIIでの水分解反応は、P680の光励起に始まり、アクセサリChl¹⁶⁾、Pheo¹⁷⁾を経由したQへの電子移動¹⁸⁾・プロトン移動^{19,20)}等と連動して可能となっ

ている。光合成反応中心だけでなく、巨大で複雑な膜蛋白質の実験的手法による解析は、しばしば困難に直面する。理論研究と実験研究とが協力しあい共通するサイエンスの困難な課題の解明を目指していくことが理想であり、さらなる研究連携に期待している。

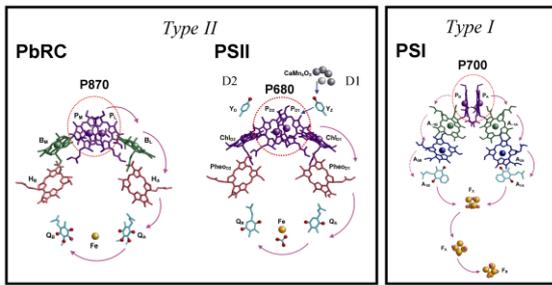


図1 光合成反応中心の Chl 二量体 P870 (PbRC) 、 P680 (PSII) 、 P700 (PSI) 及び電子伝達経路。

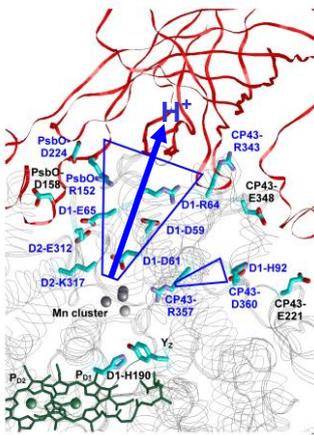


図2 PSII における H⁺ exit pathway 。20個ほど存在する PSII サブユニットのうち、D1、D2、CP43、PsbO と呼ばれるものが pathway を提供している。

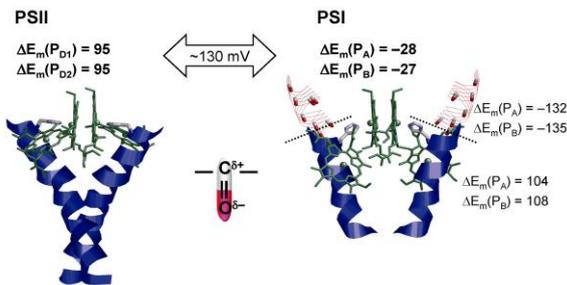
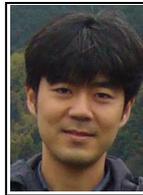


図3 PSII・PSI の Chl 二量体と配位子を提供する膜貫通ヘリックス。PSI の場合、点線部より上の領域に明示した主鎖 CO 基の O 原子の負電荷により、酸化状態の Chl 正電荷が安定化される。PSII では、これに相当する領域は存在しない。

- 3) Jordan, P. *et al.* (2001) *Nature* **411**, 909-917.
- 4) Ferreira, K.N. *et al.* (2004) *Science* **303**, 1831-1838.
- 5) Loll, B. *et al.* (2005) *Nature* **438**, 1040-1044.
- 6) Guskov, A. *et al.* (2009) *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 334-42.
- 7) Kawakami, K. *et al.* (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 8567-8572
- 8) Ishikita, H. Knapp, E.W. (2006) *Biophys. J.* **90**, 3886-3896.
- 9) Ishikita, H. *et al.* (2006) *Biochemistry* **45**, 2063-2071.
- 10) Watanabe, T., Kobayashi, M. (1991) in *Chlorophylls* (Scheer, H., Ed.), pp 287-303. CRC Press
- 11) Rappaport, F. *et al.* (2002) *Biochemistry* **41**, 8518-8527.
- 12) Williams, J.C. *et al.* (1992) *Biochemistry* **31**, 11029-11037.
- 13) Brettel, K. (1997) *Biochim. Biophys. Acta* **1318**, 322-373.
- 14) Ishikita, H. *et al.* (2006) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103**, 9855-9860
- 15) Allen, J.P. *et al.* (1996) *Biochemistry* **35**, 6612-6619.
- 16) Ishikita, H. *et al.* (2005) *FEBS Lett.* **579**, 712-716.
- 17) Ishikita, H. *et al.* (2006) *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **45**, 1964-1965.
- 18) Ishikita, H., Knapp, E.-W. (2005) *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 14714-14720.
- 19) Ishikita, H., Knapp, E.-W. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 12446-12450
- 20) Ishikita, H., Knapp, E.-W. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 16215-16220.



石北 央 (いしきた ひろし)

1) 京都大学 生命科学系キャリアパス形成ユニット グループリーダー (特定助教) 2) 科学技術振興機構 さきがけ研究員

略歴 2005年ベルリン自由大学にて博士号取得。ペンシルベニア州立大学・南カリフォルニア大学 (博士研究員・学術振興会海外特別研究員)、東京大学 (助教) を経て2009年より現職。

研究内容 蛋白質の理論化学計算
連絡先 〒606-8501 京都市左京区吉田近衛町 京都大学大学院医学研究科 E棟 202

E-mail: hiro@cp.kyoto-u.ac.jp

研究室 HP

<http://www.cp.kyoto-u.ac.jp/Ishikita/index.htm>

文 献

- 1) Ishikita, H., Knapp, E.-W. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 52002-52011
- 2) Ishikita, H. *et al.* (2006) *Biophys. J.* **90** 1081-1089