

2012 年度 修士論文

電子電子二重共鳴法を用いた  
酸素発生系  $S_2$  状態 Mn クラスターの  
磁気構造の解明

名古屋大学理学研究科  
物質理学専攻物理系  
光生体エネルギー研究室 (G 研)

浅田瑞枝  
学籍番号 261102010

## 要旨

光合成反応過程において、光化学系 II (PS II) タンパク質にある Mn クラスターは酸素発生の触媒として作用する。Mn クラスターは 4 つの Mn、5 つの O、1 つの Ca 原子と周辺のアミノ残基からなり、酸素発生において Mn クラスターは 5 つの循環的な酸化状態 ( $S_0, S_1, S_2, S_3, S_4$ ) をとる。 $S_1$  状態の構造は最近の X 線結晶構造解析により明らかになった。 $S_2$  状態における Mn の価数は (III, IV, IV, IV) の組み合わせとされているが、クラスター内の原子位置と価数は対応付けられていない。また、ENDOR 法による超微細構造の実験から、Mn 間に働く磁気相互作用が議論されているが、詳細は明らかになっていない。

PELDOR 法は、スピン間に働く双極子相互作用から、両者の距離を高い精度で測定するパルス ESR 法のひとつである。本研究では、Mn クラスターの  $S_2$  状態における磁気構造の解明を目的とし、 $S_2$  状態 Mn クラスターと PS II 内の安定なラジカル  $Y_D^\bullet$  間の距離を PELDOR 法により測定した。

PELDOR 信号の解析から、 $Y_D^\bullet$ - $S_2$  状態 Mn クラスター間の距離は点双極子近似を仮定すると  $R = 27 \text{ \AA}$  と求められた。しかし結晶構造からみた  $Y_D^\bullet$ -Mn 間の距離は  $Y_D$  の芳香環の中心から  $30 \text{ \AA}$  程度で、結果は一致しなかった。そこで我々は、 $Y_D^\bullet$  と Mn クラスターのそれぞれの原子位置と電子密度分布 (spin projection) を考慮して PELDOR 信号形のフィッティングを行った。さらに詳細な解析のため膜配向 PSII を用いて同様な PELDOR 測定を行い、双極子相互作用の磁場角度依存性から spin projection の範囲を特定できた。

これらの結果から、Mn クラスターの  $S_2$  状態における磁気構造と分子構造を対応付けることが可能になった。4 つの Mn 原子 Mn1, 2, 3, 4 の Spin projection の値はそれぞれ [1.97, -1.20, 1.19, -0.96] と求められた。これは、Mn 原子の価数がそれぞれ [III, IV, IV, IV] であることを示す。また、spin projection の符号の組み合わせから、Mn1-3 間に働く交換相互作用  $J_{13}$  の符号が正、その他の原子間の交換相互作用が負であるとの結論を得た。

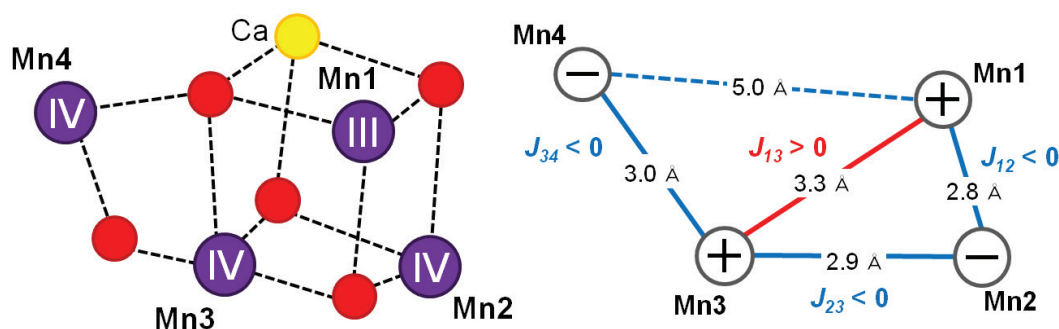


図 酸素発生系各 Mn 原子の価数 (左) と交換相互作用の符号 (右)

# 目次

<b>1 序論</b>	
1.1 光合成	4
1.2 光化学系 II	5
1.3 Mn クラスター	7
1.4 Mn クラスターの酸化サイクル	8
1.5 Mn クラスターの S <sub>2</sub> 状態	8
1.6 Spin projection	9
1.7 Mn クラスター-S <sub>2</sub> 状態の構造に関する過去の研究	10
1.8 本研究の目的	12
<b>2 試料と測定方法</b>	
2.1 試料	13
2.1.1 酸素発生活性のあるホウレンソウ由来の PS II 膜標品	13
2.1.2 酸素発生活性のある <i>T. vulcanus</i> 由来の PS II 標品	14
2.1.3 S <sub>1</sub> 状態を 100%含む PS II 標品	15
2.1.4 S <sub>2</sub> 状態を豊富に含む PS II 標品	16
2.1.5 PS II 標品の膜配向	17
2.2 測定方法	18
2.2.1 電子スピン共鳴 (ESR) 法	18
2.2.2 パルス ESR 法	21
2.2.3 パルス電子電子二重共鳴 (PELDOR) 法	22
2.3 PELDOR 信号の計算方法	23
<b>3 結果と考察</b>	
3.1 ESR 磁場掃引スペクトル	25
3.1.1 S <sub>2</sub> 状態 Mn クラスターの ESE 磁場掃引スペクトル	25
3.1.2 Y <sub>D</sub> <sup>•</sup> の CW-ESR 磁場掃引スペクトル	26
3.2 無配向 PS II の S <sub>2</sub> 状態 Mn クラスター-Y <sub>D</sub> <sup>•</sup> 間 PELDOR 測定	27
3.3 配向 PSII の S <sub>2</sub> 状態 Mn クラスター-Y <sub>D</sub> <sup>•</sup> 間 PELDOR 測定	32
<b>4 考察</b>	36
<b>5 まとめ</b>	37
<b>6 参考文献</b>	38
<b>7 謝辞</b>	40

# 1 序論

## 1.1 光合成

光合成反応は、光を利用して糖や ATP を合成する反応である。多くの光合成生物は電子源として水分子を利用し、副産物として酸素を放出する。光合成の反応過程は明反応と暗反応の 2 つに分けられる。前者には光エネルギーが利用され、この反応過程で水の酸化から NADPH の還元までが行われる。

明反応は細胞の脂質二重膜中にある 4 種類の膜タンパク質により進められる (図 1-1)。4 つの膜タンパク質はそれぞれ光化学系 II (PS II)、光化学系 I (PS I)、シトクロム b<sub>6</sub>f、ATP 合成酵素と呼ばれる。PS I と PS II の周囲には、クロロフィルやカロテノイドなどの色素を含むアンテナ色素タンパク質が結合している。

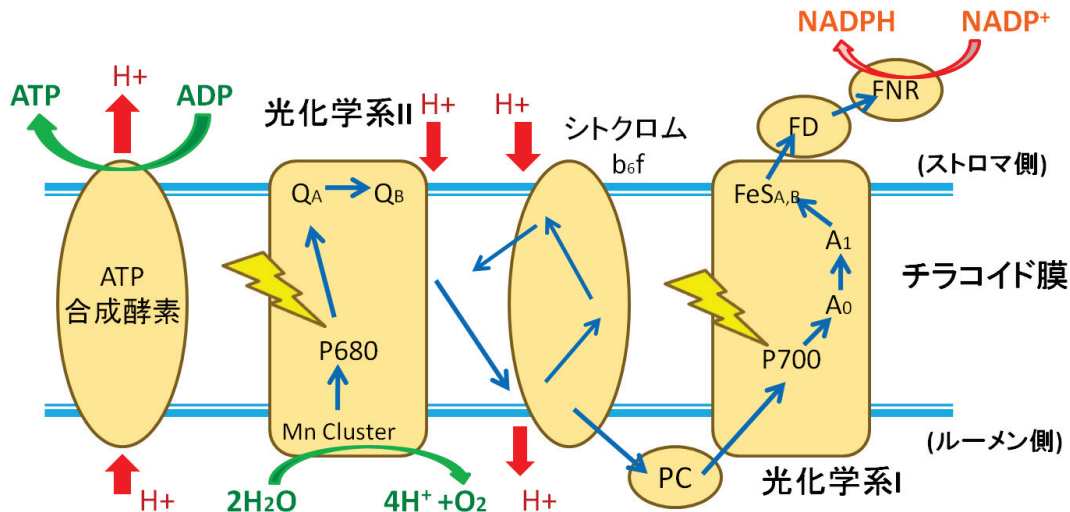


図 1-1 チラコイド膜上のタンパク質による電子とプロトンの移動経路  
青矢印は電子伝達経路、赤矢印はプロトン移動経路を示す。

光合成反応において、太陽光エネルギーは PSII を囲むアンテナ色素タンパク質に捕えられ、クロロフィルにより伝達され PS II 内の反応中心 P680 に集められる。P680 はクロロフィル二量体 (スペシャルペア) で構成され、光エネルギーを受けると励起状態となった後、電子を放出して酸化される。放出された電子は PS II 内の分子を伝達し、プラストキノン Q<sub>B</sub> に到達する。Q<sub>B</sub> は 2 回還元ごとに膜中の未還元プラストキノンと交換される [McEvoy and Brudvig 2006; Nelson and Yocum 2006; Messinger and Renger 2008]。詳細は 1.2 節に示す。

電子はシトクロム b<sub>6</sub>f 複合体を介してプラストシアニン (PC) によって PS I のスペシャルペア (P700) に到達する。P700 は P680 と同様にクロロフィル二量体で構成され、光を受

けて電子を放出する。電子は PS I のストロマ側にあるフェレドキシン (FD) を経てフェレドキシン-NADP レダクナーゼ (FNR) に到達して  $\text{NADP}^+$  を還元し、高エネルギー分子である NADPH を作る。NADPH はストロマで行われるカルビンサイクルに用いられ、糖の合成に利用される。チラコイド膜中にある ATP 合成酵素は、チラコイド膜間のプロトン勾配を利用してアデノシン 2 リン酸 (ADP) からアデノシン 3 リン酸 (ATP) を合成する。ATP は高エネルギー分子として NADPH と共にカルビンサイクルに寄与する。

## 1.2 光化学系 II

PSII は複数のサブユニットで構成される。主な PS II のサブユニットに反応中心 D1/D2、膜表在サブユニット、アンテナ色素タンパク質 CP43/47 などがある (図 1-2)。PS II の周囲はアンテナ色素タンパク質複合体 LHC(Light harvesting complex)II で囲まれる。CP43/47 は、周辺の LHC II からの光を P680 へ送る役割を果たしている。D1/D2 サブユニットは C2 対称軸を中心とした擬 2 回回転対称である。表在性サブユニットは種により異なるが、いずれも PSII 構造の安定化や酸素発生活性の向上に寄与するなど重要な役割を担っている。シアノバクテリア PS II には表在性サブユニット PsbO, PsbU, PsbV が結合し、高等植物 PS II には PsbO, PsbP, PsbQ が結合している[McEvoy and Brudvig 2006; Nelson and Yocum 2006; Messinger and Renger 2008]。

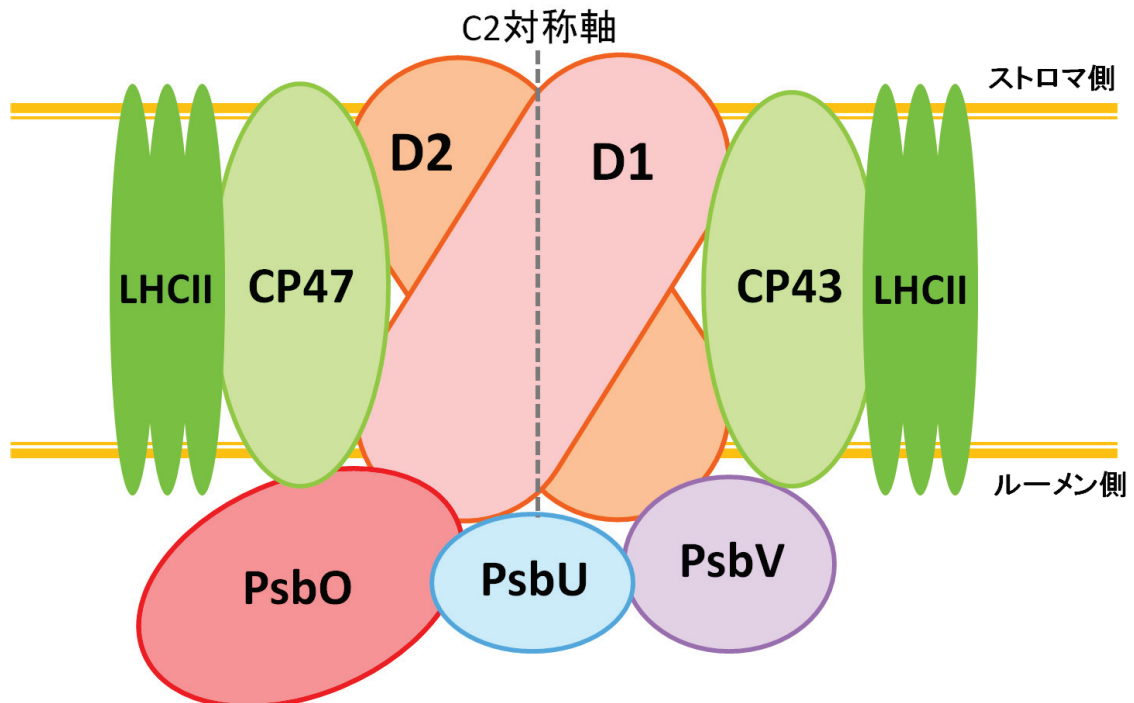


図 1-2 *T. vulcanus* PS II のサブユニット結合状態

D1/D2 サブユニット内には電子伝達系があり、アミノ酸タイロシン D/Z ( $Y_D/Y_Z$ )、P680、2つのクロロフィル a (Chl a)、フェオフィチン (Pheo)、プラストキノン  $Q_A/Q_B$  および非ヘム鉄 (Fe) から構成される。

P680 は光エネルギーを受けると励起され、電子を放出する。電子は D1 サブユニット内のフェオフィチン、D2 サブユニット内の  $Q_A$ 、 $Q_B$  の順に伝達される。酸化された P680 は、D1 サブユニットにあるアミノ酸残基  $Y_Z$  が電子を供給することで元の状態に還元される。 $Y_Z$  はマンガンクラスター (Mn クラスター) と呼ばれる部位から電子を受け取る。Mn クラスターは水分子を酸化して酸素を発生する。D1/D2 サブユニットは相同性の高いアミノ酸配列をもち、D2 サブユニットには D1 サブユニットの  $Y_Z$  に対応するアミノ酸残基として  $Y_D$  が存在する。 $Y_D$  は一連の電子伝達には直接関与しないが、数分かかる遅い反応で Mn クラスターから電子を受け取るなど、Mn クラスターと電子のやり取りを行っていることが分かっている。

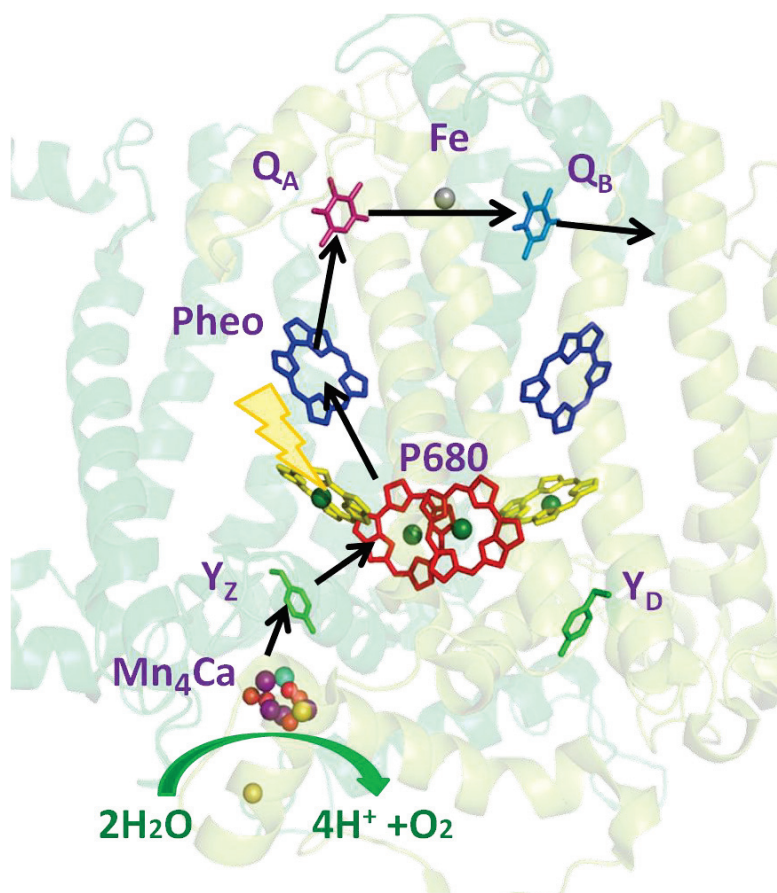


図 1-3 PS II 反応中心の電子伝達経路

### 1.3 Mn クラスター

Mn クラスターは水分子と直接電子のやり取りを行う触媒の役割をもつ。Mn クラスターとその周辺のタンパク質を含めた範囲は、酸素発生系(Oxygen evolving complex)と呼ばれる。図 1-4 は酸素発生系の構造で、近年 X 線結晶構造解析により 1.9 Å の分解能で解析された [Umena et al. 2011]。Mn クラスターは 4 つの Mn 原子と Ca イオン、Cl イオンで構成される。PS II から Mn クラスターを除去すると、酸素発生が行われなくなる。Ca、Cl どちらか一方を除去した場合にも酸素発生は阻害される。

酸素発生系の 4 つの Mn 原子 (Mn1、Mn2、Mn3、Mn4) と Ca 原子は互いに酸素架橋により結合し、ゆがんだ椅子型の構造になっている。Mn1 に His332、D342、Mn2 に D342、A344、D2-E354、Mn3 に E333、D2-E354、Mn4 に E333、D170 のアミノ酸残基がそれぞれ配位している。

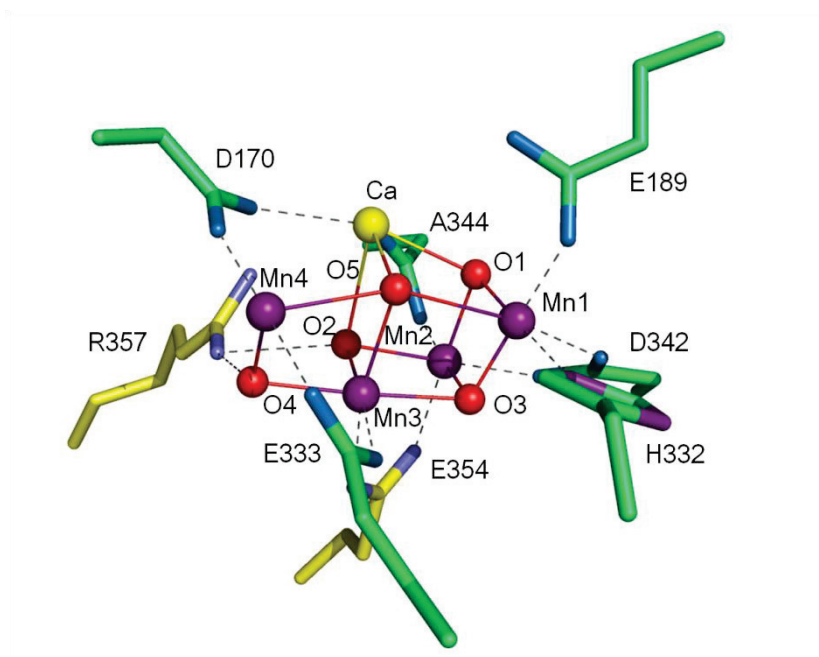


図 1-4 X 線結晶構造解析により得られた PS II 酸素発生系の分子構造 [Umena et al. 2011]

#### 1.4 Mn クラスターの酸化サイクル

Mn クラスターは酸化状態の異なる 5 つの中間状態 ( $S_{0-4}$ ) を循環的にとる [Kok et al. 1970] (図 1-5)。 $S_0$  状態から 1 閃光照射毎に Mn クラスターの酸化状態が 1 つずつ上がり、その過程で水分子から電子を引き抜く反応が起こる。 $S_3$  状態で照射されると、Mn クラスターは不安定な  $S_4$  状態を経て  $S_0$  状態に戻る。このとき、2 つのプロトンと 1 つの酸素分子が放出される。暗状態では  $S_1$  状態が最も安定である。最も高い酸化状態の  $S_4$  状態は、非常に不安定で酸素分子を放出した後、直ちに  $S_0$  状態に遷移する。

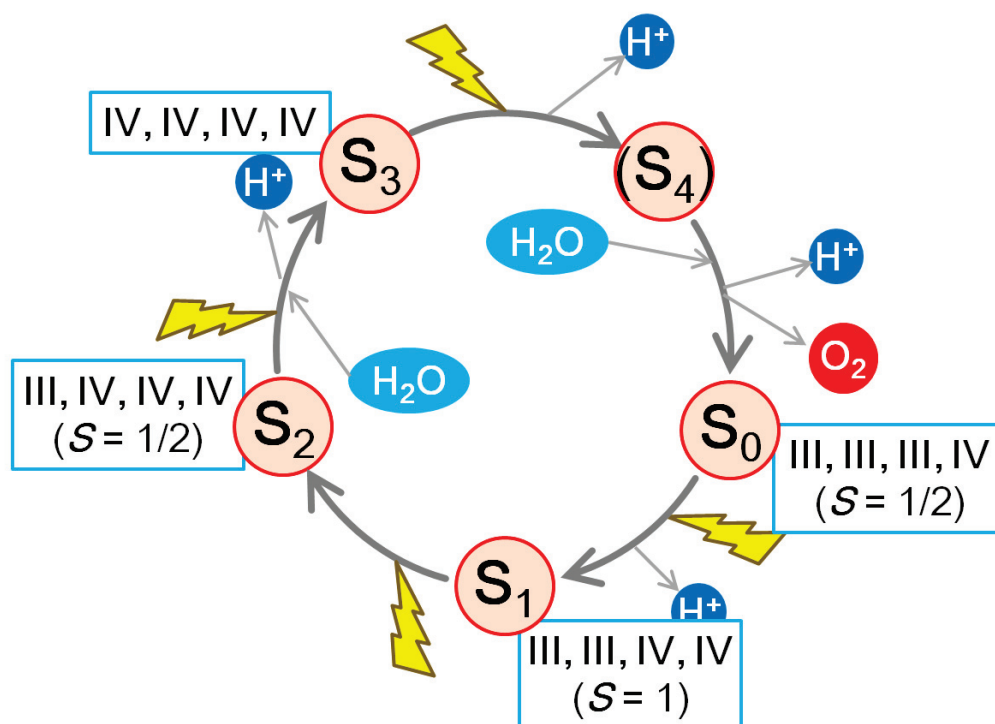


図 1-5 Mn クラスターの酸化サイクル

水色枠内は S 状態における 4 つの Mn 原子の価数とスピン基底状態である。

#### 1.5 Mn クラスターの $S_2$ 状態

$S_2$  状態の Mn クラスターは、1 つの III 価、3 つの IV 価 Mn 原子で構成されると考えられている (図 1-5 枠内)。III、IV 価の Mn 原子のもつ電子スピンはそれぞれ  $S = 2, 3/2$  であるが、Mn クラスター内では Mn 間距離が近いこと磁気的に結合し、電子スピン状態の総和は  $S_T = 1/2$  となる。電子スピンの半整数であるため、電子スピン共鳴 (ESR) 法で検出することができる。 $S_2$  状態における Mn クラスターの ESR 信号は特徴的で、 $g = 2$  を中心としたマルチライン信号となる [Dismukes and Siderer 1981]。



## 1.6 Spin projection

Mn クラスターのスピンのハミルトニアンは以下の式で表わされる。

$$H = \sum_i [\mathbf{B} \cdot \mathbf{g}_i \cdot \mathbf{S}_i + \mathbf{I}_i \cdot \mathbf{a}_i \cdot \mathbf{S}_i + \mathbf{S}_i \cdot \mathbf{D}_i \cdot \mathbf{S}_i] - \sum_{i < j} J_{ij} \mathbf{S}_i \cdot \mathbf{S}_j \quad (1)$$

$\mathbf{S}_i$ 、 $\mathbf{I}_i$ はそれぞれ  $i$  番目 Mn 原子の電子スピンと核スピン演算子で、 $\mathbf{D}_i$ はゼロ磁場分離(ZFS)テンソル、 $\mathbf{g}_i$ は  $\mathbf{g}$  テンソル、 $\mathbf{a}$ は超微細テンソルである。 $J_{ij}$ は  $i$  番目と  $j$  番目の原子間に働く交換相互作用である。

ZFS の効果が無視できるとき、式1は

$$H = \mu_B \mathbf{B} \cdot \mathbf{g} \cdot \mathbf{S}_T + \sum_i \mathbf{I}_i \cdot \mathbf{A}_i \cdot \mathbf{S}_T - \sum_{i < j} J_{ij} \mathbf{S}_i \cdot \mathbf{S}_j \quad (2)$$

と書き換えられる。ただし合成スピンは  $\mathbf{S}_T = \sum_i \mathbf{S}_i$  とする。 $\mathbf{A}_i$ は  $i$  番目の有効超微細テンソル、 $\mathbf{a}_i$ は局所超微細テンソルである。 $\mathbf{A}_i$ と  $\mathbf{a}_i$ には以下の関係がある。

$$\mathbf{A}_i = \rho_i \mathbf{a}_i \quad (3)$$

$\rho_i$ は  $i$  番目の原子のスピン密度である。ZFS が無視できるとき、 $\rho_i$ の異方性成分は無視できる。このとき、式3の等方性成分には以下の関係がなりたつ。

$$A_{i,iso} = \rho_{i,iso} a_{i,iso} \quad (4)$$

$\rho_{i,iso}$ は spin projection と呼ばれ、 $\mathbf{S}_T$ と  $\mathbf{S}_i$ を用いて以下の式で表わされる。

$$\rho_{i,iso} = \frac{S_i S_T}{S_T(S_T + 1)} \quad (5)$$

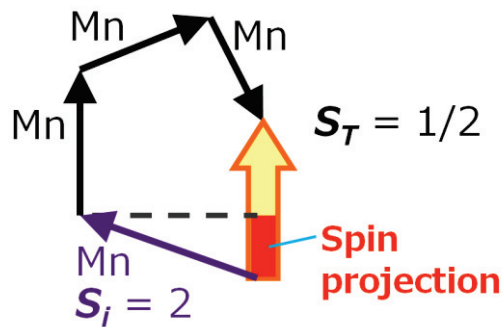


図 1-6 Spin projection と  $S_T$ 、 $S_i$  のベクトルを用いた概念図

$i$  番目の Mn 原子の Spin projection  $\rho_i$ は、 $\mathbf{S}_T$ ベクトルに対する  $\mathbf{S}_i$ ベクトルの投影 (projection) である。

$\mathbf{S}_i$ が  $\mathbf{S}_T$ に対して逆向き ( $>90^\circ$ ) のとき、 $\rho_i$ は負の値をとる。

1.7 Mn クラスタ-S<sub>2</sub> 状態の構造に関する過去の研究

ESR 法は遷移金属のもつスピンを直接観測できることから、Mn クラスタ電子状態の解析に用いられてきた。

S<sub>2</sub> 状態の各 Mn 原子のスピン値  $S_i$  と各 Mn 間の交換相互作用  $J$  の値は実験的に得られていないが、各 Mn 核の超微細定数  $A_{i,iso}$  は X-, Q-バンド <sup>55</sup>Mn-Pulsed ENDOR 実験で得られている。 $a_{i,iso}$  は Mn(III) で -165 ~ -225 MHz、Mn(IV) では -187 ~ -253 MHz と見積もられており [Peloquin et al. 2000; Charlot et al. 2005; Kulik et al. 2005; Cox et al. 2011]、これより各 Mn 核の spin projection は表 1 に示すように計算されている。

表 1 Pulsed ENDOR により求められた各 Mn の spin projection の値

Mn(III)	Mn(IV)	Mn(IV)	Mn(IV)	
1.70	1.27	-1.0	-0.99	[Peloquin et al. 2000]
1.73	1.10	-1.04	-0.79	[Kulik et al. 2005]
1.73	1.12	-0.95	-0.90	[Cox et al. 2011]
<sup>a</sup> 1.39 ~ 1.89	<sup>a</sup> 0.99 ~ 1.34	<sup>a</sup> -1.11 ~ -0.82	<sup>a</sup> -1.02 ~ -0.75	[Cox et al. 2011]

<sup>a</sup> 単核の Mn(III)、Mn(IV) の  $A_{i,iso}$  値 165 ~ 225、187 ~ 253 MHz から計算された範囲

Mn 間の交換相互作用の値  $J$  は実験的に得られていないが、モデル計算が行われている (図 1-7)。Peloquin らは Mn クラスタの S<sub>2</sub> 状態が 4 核の相互作用であることを初めて示した [Peloquin et al. 2000]。Peloquin らは、4 つの Mn 原子が反強磁性結合したモデルを提唱した。その後 Kulik らは 3 つの Mn 原子 Mn<sub>B</sub>(IV)、Mn<sub>C</sub>(III)、Mn<sub>D</sub>(IV) が、反強磁性結合した三角形を作り Mn<sub>B</sub> に Mn<sub>A</sub> が弱く結合した Y 字モデルを提唱した [Kulik et al. 2005]。Siegbahn らは、EXAFS により得られた Mn 原子間距離を元に理論計算を行い、Mn<sub>B</sub>(IV) を中心として 4 つの Mn 原子が互いに結合したモデルを立てた [Pantazis et al. 2009]。Cox らは Q バンド <sup>55</sup>Mn-ENDOR 結果を元に DFT 計算を行い、Siegbahn モデルを支持している [Siegbahn 2008; Siegbahn 2009; Siegbahn 2009; Cox et al. 2011]。

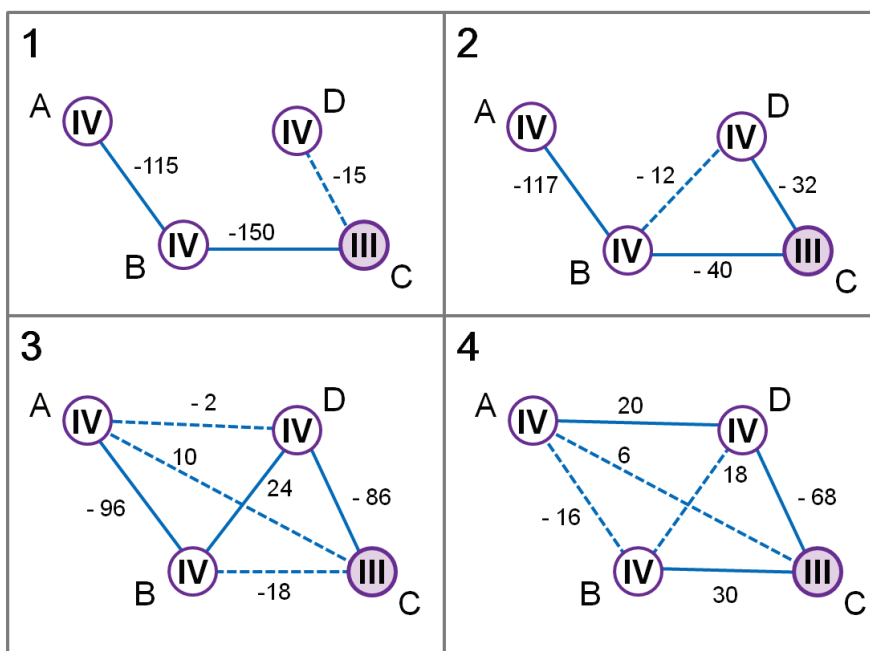


図 1-7  $S_2$  状態 Mn クラスターの磁気構造モデル

1) Peloquin ら、2) Kulik らによる DFT 計算モデル

3) Pantazis らによる EXAFS モデル

4) Siegbahn モデルを元にした Pantazis らの DFT 計算モデル

図中の値は結合強度[ $\text{cm}^{-1}$ ]である。

1-3 は  $\text{Mn}_{\text{A-B}}$  間の結合が強いが、4 では弱い。2-4 は  $\text{Mn}_{\text{C-D}}$  間の結合が強い。

3 と 4 の大きな違いは  $\text{Mn}_{\text{A}}$  と他の原子間の結合強度である。

電子スピンエコー振幅変調 (ESEEM) 法は ENDOR 法とほぼ同じように、電子スピン近傍の核スピンの情報を得ることができる。これまで ESEEM により、 $\text{Mn(III)}$  の近傍に  $^{14}\text{N}$  核が結合していることが知られている[Yeagle et al. 2008; Stich et al. 2011]。最近の X 線結晶構造と比較すると、Mn 原子に配位しかつ N 核をもつアミノ酸残基は His332 だけである。この残基を Glu に変異導入した実験結果からも、 $\text{Mn(III)}$  と His332 の結合が支持されている。

電子電子二重共鳴 (PELDOR) 法は、電子スピン間の距離を良い精度で検出できる手法である (2.2.4 節参照)。これまで  $S_2$  状態 Mn クラスタと  $Y_D$  間の距離が PELDOR 法により測定されており、その結果スピン間の距離は  $27 \text{ \AA}$  と見積もられている [Hara et al. 1996] (図 1-8)。しかし X 線結晶構造解析からみた  $Y_D$  の芳香環中心から Mn 原子までの距離は  $29 - 32 \text{ \AA}$  であり、PELDOR 測定結果と矛盾する。これは、Mn クラスタの 4 つの Mn 原子がそれぞれ異なる Spin projection をもつことが原因である。

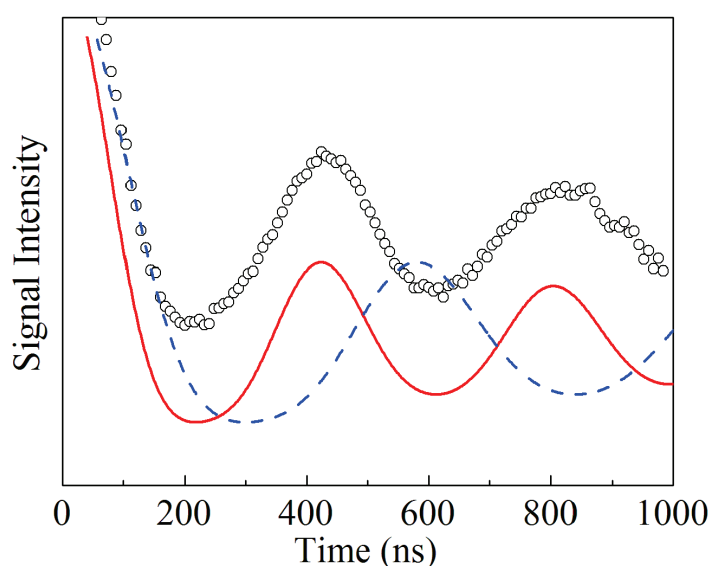


図 1-8  $Y_D$ - $S_2$  状態 Mn クラスタ間の PELDOR 測定

○ : 実験値 赤線 :  $27 \text{ \AA}$ 、青線 :  $30 \text{ \AA}$  の点双極子近似計算

### 1.8 本研究の目的

これまで Mn クラスタ- $S_2$  状態の研究は盛んに行われてきたが、各 Mn 原子の Spin projection は未だ実験的に求められていない。本研究では  $Y_D$ - $S_2$  状態 Mn クラスタ間の PELDOR 測定を行い、Mn クラスタ- $S_2$  状態における磁気構造を明らかにする。さらに X 線結晶構造をもとにした計算により、各 Mn 原子の Spin projection の値を直接計算し、Mn 位置と価数を対応付ける。

## 2 試料と測定方法

### 2.1 試料

#### 2.1.1 酸素発生活性のあるホウレンソウ由来の PS II 膜標品

BBY 調製法と呼ばれる手法に一部修正を加え、市販のホウレンソウから PS II 膜を単離する[Ono and Inoue 1986; Banham et al. 2008]。調製は暗所にて温度 0°C で行った。

<酸素活性のある PSII 膜標品の調製法>

・使用した試料調整液

#### (1)調整液 A

0.4 M sucrose, 15 mM NaCl, 2 mM EDTA, 40 mM Hepes/NaOH (pH=7.5), 3 %BSA

#### (2)調整液 B

0.4 M sucrose, 15 mM NaCl, 5 mM MgCl, 40 mM Mes/NaOH (pH=6.5)

#### (3)ストック用の調整液 C

0.4 M sucrose, 15 mM NaCl, 40 mM Mes/NaOH (pH=6.5), 30 % ethylene glycol

市販のホウレンソウ

調整液 A と共にミキサーで粉碎し、ガーゼで液体部分を絞り取る

↓

5,500 ×g (R9A、7,000 rpm) で 25 分間遠心分離

↓

沈殿を調整液 B で懸濁

↓

100 ×g (R20A2、1,000 rpm) で 4 分間遠心分離

↓

上澄みを回収

↓

30,000 ×g (R20A2、17,000 rpm) で 5 分間遠心分離

↓

沈殿を回収し、調整液 B でクロロフィル濃度 [Chl] = 約 5 mgChl/ml に合わせる

クロロフィル濃度 [Chl] = 3 mgChl/ml、6.3 % Triton-X となるように調整液 B で希釈

その後、暗所で 20 分間攪拌

↓

32,600 ×g (R20A2、18,000 rpm) で 25 分間遠心分離  
↓  
沈殿を調整液 B で懸濁  
↓  
7,300 ×g (R20A2、8,500 rpm) で 15 分間遠心分離  
↓  
上澄みを回収  
↓  
32,600 ×g (R20A2、18,000 rpm) で 25 分間遠心分離  
↓  
沈殿を調整液 B で懸濁  
↓  
32,600 ×g (R20A2、18,000 rpm) で 25 分間遠心分離  
↓  
沈殿が PSII 膜標品  
調整液 C で約 5 mgChl/ml に希釈し液体窒素温度で保存

#### 2.1.2 酸素発生活性のある *T. vulcanus* 由来の PS II 標品

好熱性シアノバクテリア *T. vulcanus* 由来の PS II 標品は、参考文献[Shen and Inoue 1993; Shen and Kamiya 2000]の手法を用いて単離した。(本研究で用いた *T. vulcanus* PS II 標品は岡山大学理学研究科の沈建仁教授から頂いた。)

### 2.1.3 S<sub>1</sub>状態を100%含むPS II 標品

PS II の Mn クラスターの酸化状態は必ずしも揃っているわけではないため、測定を始める前に酸化状態を暗状態で安定な S<sub>1</sub> 状態に揃える必要がある。PS II 標品に 273°C で定常光照射すると、S<sub>0</sub>-S<sub>3</sub> の各状態が均等 (25%ずつ) になる。光照射された PS II を暗状態でおくと、S<sub>0</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub> 状態は S<sub>1</sub> 状態になるため S<sub>0</sub>:S<sub>1</sub> 状態の比率は 25:75 になる。その後 S<sub>0</sub> 状態はゆっくりとした反応で Y<sub>D</sub>• と反応し S<sub>1</sub> 状態となる (S<sub>0</sub>Y<sub>D</sub>• → S<sub>1</sub>Y<sub>D</sub>) [Styring and Rutherford 1987]。

これのようにして、以下のように S<sub>1</sub> 状態 100% の PS II 標品を作成した。

#### <S<sub>1</sub> 状態を 100%含む PS II 標品の作成法>

使用した調製液

・調製液 D

0.4 M Sucrose, 20 mM NaCl, 1 mM EDTA, 50 mM Mes/NaOH (pH = 6.5)

BBY 法により精製した PS II 標品

D buffer でクロロフィル濃度 [Chl] = 約 1 mgChl/ml に合わせる

↓

273 K で 1 分間光照射後、暗所で 2 時間静置

↓

S<sub>1</sub> 状態 100% の PS II 標品

↓

32,600 ×g (R20A2, 18,000 rpm) で 20 分間遠心分離

↓

ペレット状の沈殿を葉さじで回収し、注射器で ESR 試料管に詰める

↓

液体窒素温度で保存

#### 2.1.4 S<sub>2</sub> 状態を豊富に含む PS II 標品

200 K 以下の温度では、S<sub>2</sub> から S<sub>1</sub> 状態へ戻る反応が阻害される。また、250 K 以下では Q<sub>A</sub> から Q<sub>B</sub> への電子移動が阻害されるため、結果的に S<sub>2</sub> から S<sub>3</sub> 状態に遷移しなくなる。このことを利用して、200 K 下で試料に光照射し S<sub>2</sub> 状態を豊富に含む PS II 標品を作成した。

##### <ESR 試料管中の PS II 標品への光照射方法>

真空デュワーにエタノールとドライアイス（または液体窒素）を入れて 200 K に冷やす

↓

S<sub>1</sub> 状態 100%の PS II 標品を詰めた試料管を、真空デュワーに入れ 200 K に安定させる

↓

光源の LED ランプを集光し、試料に光を当てる（光強度約 150 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>）

↓

5 分間光照射

試料に偏りなく光が当たるよう、光照射中は ESR 試料管を回転させる

↓

光照射後、即座に液体窒素温度まで冷却する

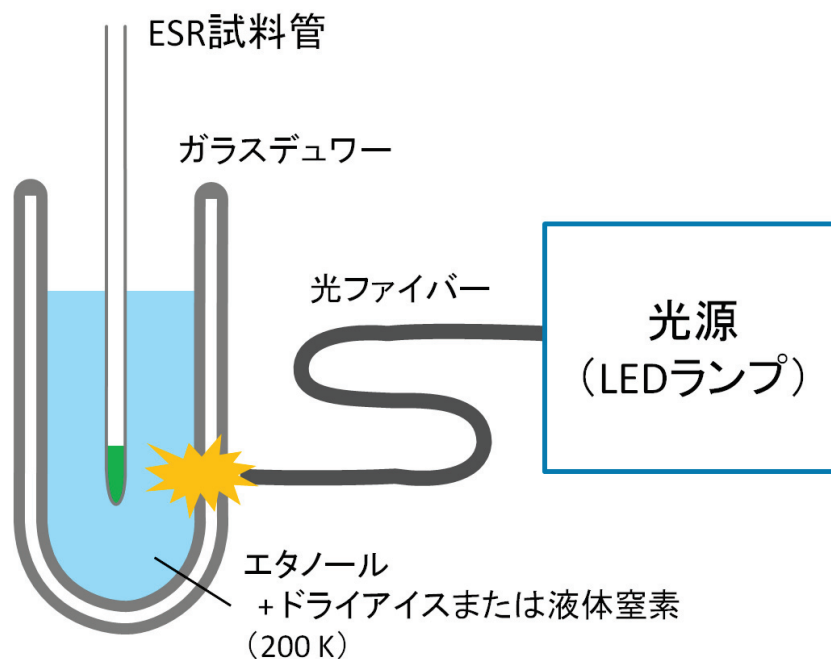


図 2-1 ESR チューブ内試料への光照射方法



### 2.1.5 PS II 標品の膜配向

BBY 調製法により単離した PS II 膜標品は、シート上で乾燥させることで自然に配向することが知られている。本研究では以下の方法で PS II 膜標品を配向させた。

#### <PS II 膜標品の配向方法>

ペレット状態のホウレンソウ PS II 膜標品を OHP シートに広げる

↓

湿度の高い空気を送風し、4℃で 15 時間ゆっくり乾燥させる

↓

OHP シートを 2.5 mm×25 mm に切り、6 枚重ねて接着する

↓

グリセロールを満たした ESR 試料管に詰める (試料管内の熱伝導度を上げるため)

↓

窒素ガスを封入し試料管の上端を閉じる

↓

液体窒素温度で保存

なお、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub> 状態の PS II 標品の作成は、無配向試料の場合と同様の操作を行った。

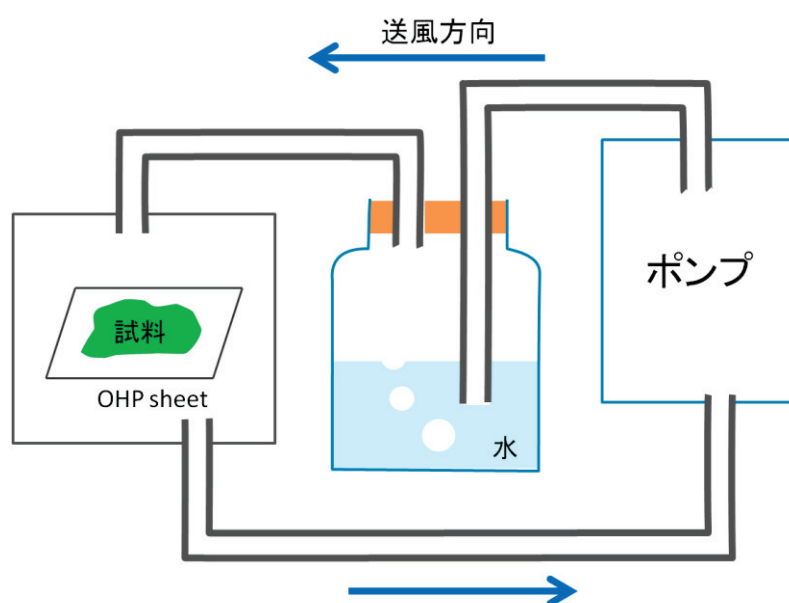


図 2-2 配向試料作成の乾燥方法

## 2.2 測定方法

### 2.2.1 電子スピン共鳴 (ESR) 法

電子スピン共鳴 (ESR) 法は、試料中の不対電子や遷移金属がもつ電子スピンの状態を解明するのに有効な測定手法である。電子スピンと周囲の様々な相互作用を検出することで、電子スピン周辺の磁気構造を知ることができる。

1つの不対電子について考える。電子のもつ磁気モーメント  $\mu$  は次のように書ける。

$$\mu = -g\mu_B \mathbf{S} \quad (6)$$

ここで  $g$  は電子スピンのもつ  $g$  因子であり、自由電子の場合は  $g = 2.0000231$  である。 $\mu_B$  はボーア磁子で、以下の式で記述される。

$$\mu_B = \frac{e\hbar}{2mc} \quad (7)$$

ただし、 $m$  は電子の静止質量であり  $m = 9.109534 \times 10^{-31} \text{ kg}$ 、 $c$  は真空中の光速で  $c = 2.99792458 \times 10^8 \text{ kg} \cdot \text{s}^{-1}$ 、 $e$  は電子の電荷素量で  $e = 1.602189 \times 10^{-19} \text{ C}$ 、 $\hbar$  はプランク定数で、 $\hbar = 1.54588 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$  である。 $\mathbf{S}$  はスピン角運動量演算子であり、自由電子の場合、2つの固有状態  $|\alpha_e\rangle$ ,  $|\beta_e\rangle$ 、2つの固有値  $m_S = +\frac{1}{2}$  ( $\alpha$  スピン),  $-\frac{1}{2}$  ( $\beta$  スピン) を持つ。

電子が  $z$  軸方向の外部磁場  $\mathbf{H} = (0, 0, H_z)$  と相互作用するとき、この系のハミルトニアン  $\mathcal{H}$  は以下ようになる。

$$\mathcal{H} = -\mu \cdot \mathbf{H} = g\mu_B H_z m_z \quad (8)$$

$\alpha, \beta$  スピンのエネルギーはそれぞれ以下の式で表わされる。

$$\mathcal{H} = \frac{1}{2} g\mu_B H_z \quad (\alpha \text{ スピン}) \quad (9)$$

$$\mathcal{H} = -\frac{1}{2} g\mu_B H_z \quad (\beta \text{ スピン}) \quad (10)$$

電子の2つのスピン状態  $\alpha, \beta$  のエネルギー差は  $g\mu_B H_z$  となる (Zeeman 相互作用)。マイクロ波を照射すると、マイクロ波のもつエネルギーとスピン状態間エネルギー差が等しければスピン状態が遷移する。熱平衡状態ではエネルギーの低い  $\beta$  スピン状態にある電子の数の方が多いため、マイクロ波が電子スピンに吸収され、以下の共鳴条件が成立する。

$$h\nu = g\mu_B H_z \quad (11)$$

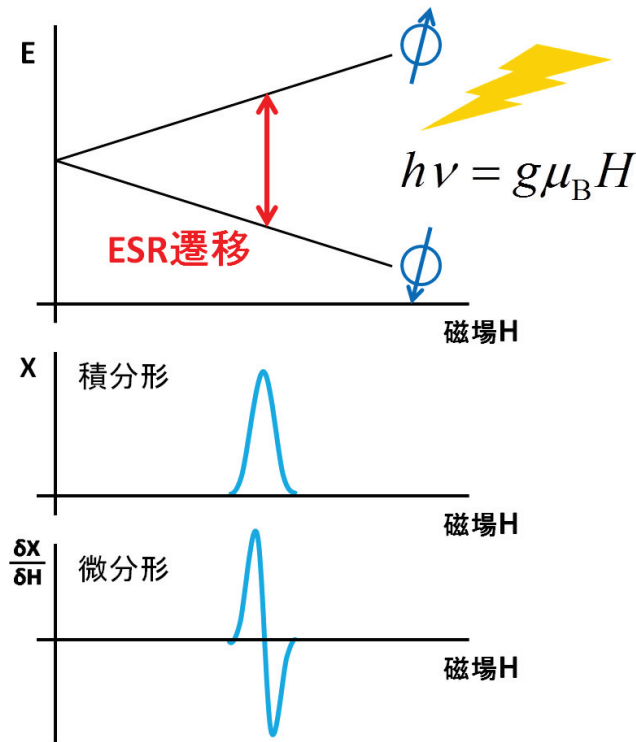


図 2-3 電子スピンとマイクロ波の共鳴

実際の ESR 測定ではマイクロ波周波数を固定し外部磁場を掃引するため、図 2-3 中段の吸収形が観測される。CW-ESR 法では変調磁場を用いるため、信号が微分形で記録される。

電子スピンは原子核の核スピンの影響を受ける。ここでは、1 個の電子スピンと 1 個のプロトンの核スピンの相互作用する場合を考える。電子とプロトンが外部磁場  $H$  と相互作用するとき、系のハミルトニアンは以下の式で表わされる。

$$\begin{aligned} \mathcal{H} &= g\mu_B H S_z - g_N \beta_N H I_z + \hat{\mathcal{H}}_{iso} + \hat{\mathcal{H}}_{aniso} \\ &= g\mu_B H S_z - g_N \beta_N H I_z + a \vec{I} \cdot \vec{S} + g\mu_B g_N \beta_N \left( \frac{\vec{I} \cdot \vec{S}}{r^3} - \frac{(\vec{I} \cdot \vec{r})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{r^5} \right) \end{aligned} \quad (12)$$

ここで  $g_N$  はプロトンの  $g$  因子、 $\beta_N$  はプロトンの核磁気能率で、 $\beta_N = 5.050824 \times 10^{-27} \text{ J} \cdot \text{T}^{-1}$  である。第一項は電子スピンの Zeeman 項、第二項はプロトンの Zeeman 項である。第三項以降は超微細相互作用と呼ばれる。第三項は等方的な超微細相互作用と呼ばれ、核スピンの上に電子スピンの波動関数が重なることにより発生する相互作用である。内積を計算して書き下すと第三項は下記のように変換される。

$$\begin{aligned} a \vec{I} \cdot \vec{S} &= a(I_x S_x + I_y S_y + I_z S_z) \\ &= a I_z S_z + \frac{1}{2} a (I_+ S_- + I_- S_+) \end{aligned} \quad (13)$$

$a$  は超微細結合定数とよばれ、共鳴吸収を 2 つに分離する主な要因となる。

第四項は、異方的な超微細相互作用と呼ばれる電子スピンとプロトンとの磁気的雙極子相互作用である。ここで、 $\vec{r} = (x, y, z)$ は電子スピンと核スピンの中心を結ぶベクトルである。前段と同様に計算すると、以下ようになる。

$$\begin{aligned} g\mu_B g_N \beta_N \left( \frac{\vec{I} \cdot \vec{S}}{R^3} - \frac{(\vec{I} \cdot \vec{r})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{R^5} \right) \\ = \frac{g\mu_B g_N \beta_N}{R^5} \{ I_x S_x (R^2 - 3x^2) + I_y S_y (R^2 - 3y^2) + I_z S_z (R^2 - 3z^2) \\ - (I_x S_y + I_y S_x) 3xy - (I_y S_z + I_z S_y) 3yz - (I_z S_x + I_x S_z) 3zx \} \end{aligned} \quad (14)$$

この式を以下の球面極座標を用いて書き換える。

$$\begin{cases} x = R \sin \theta \cos \phi \\ y = R \sin \theta \sin \phi \\ z = R \cos \theta \end{cases}$$

$R$  はスピンの中心の距離、 $\theta$  は  $\vec{r}$  と外部磁場の向きのなす角である。

$$g\mu_B g_N \beta_N \left( \frac{\vec{I} \cdot \vec{S}}{R^3} - \frac{(\vec{I} \cdot \vec{r})(\vec{S} \cdot \vec{r})}{R^5} \right) = \frac{g\mu_B g_N \beta_N}{R^3} (A + B + C + D + E + F) \quad (15)$$

$$\begin{cases} A = (1 - 3 \cos^2 \theta) I_z S_z \\ B = -\frac{1}{4} (1 - 3 \cos^2 \theta) (I^+ S^- + I^- S^+) \\ C = -\frac{3}{2} \sin \theta \cos \theta \cdot e^{-i\phi} (I_z S^+ + I^+ S_z) \\ D = -\frac{3}{2} \sin \theta \cos \theta \cdot e^{i\phi} (I_z S^- + I^- S_z) \\ E = -\frac{3}{4} \sin^2 \theta \cdot e^{-2i\theta} I^+ S^+ \\ F = -\frac{3}{4} \sin^2 \theta \cdot e^{2i\theta} I^- S^- \end{cases}$$

ただし、演算子  $I^+, S^+, I^-, S^-$  の定義は以下である。

$$\begin{aligned} I^+ &= I_x + iI_y, & S^+ &= S_x + iS_y \\ I^- &= I_x - iI_y, & S^- &= S_x - iS_y \end{aligned} \quad (16)$$

A 項は全体のエネルギーを変化させずスピン状態の遷移もさせない演算子、B 項は全体のエネルギーを変化させずスピン状態を入れ替える演算子、C, D 項は片方のスピン状態を遷移させる演算子、E, F 項は両方のスピン状態を遷移させる演算子を意味する。

### 2.2.2 パルス ESR 法

CW-ESR は弱いマイクロ波を定常的に照射して、マイクロ波の吸収を信号として観測する手法である。これに対してパルス ESR は非常に強いマイクロ波を短時間  $t_p$  だけ照射して、時間分解法で信号を観測する手法である。パルス法は時間分解能に優れ、ns オーダーでのスペクトルの測定が可能である。

スピンエコー法について図 2-4 を用いて説明する。回転座標系の  $z$  軸方向へ外部磁場がかけているとき、スピンは磁場に沿って向きが揃っている状態である(a)。ここへマイクロ波パルスを  $x$  軸方向から  $t_p$  時間照射すると、スピンの磁化の向きが  $z$  軸から  $y$  軸方向へ回転し  $xy$  平面上へ倒れる(b)。  $xy$  平面上に向いたスピンは、個々に異なる局所磁場を受け、  $xy$  平面上を拡散する(c)。  $90^\circ$  パルス照射から  $\tau$  時間後に  $t_p$  の倍の長さをもつ  $180^\circ$  パルスを照射すると、スピンはさらに  $yz$  平面上を回転し、  $xy$  平面上で反転する(d)。スピンは再び局所磁場の効果を受けて  $\tau$  時間後に  $y$  軸方向に収束し、エコー信号が検出される(e)。

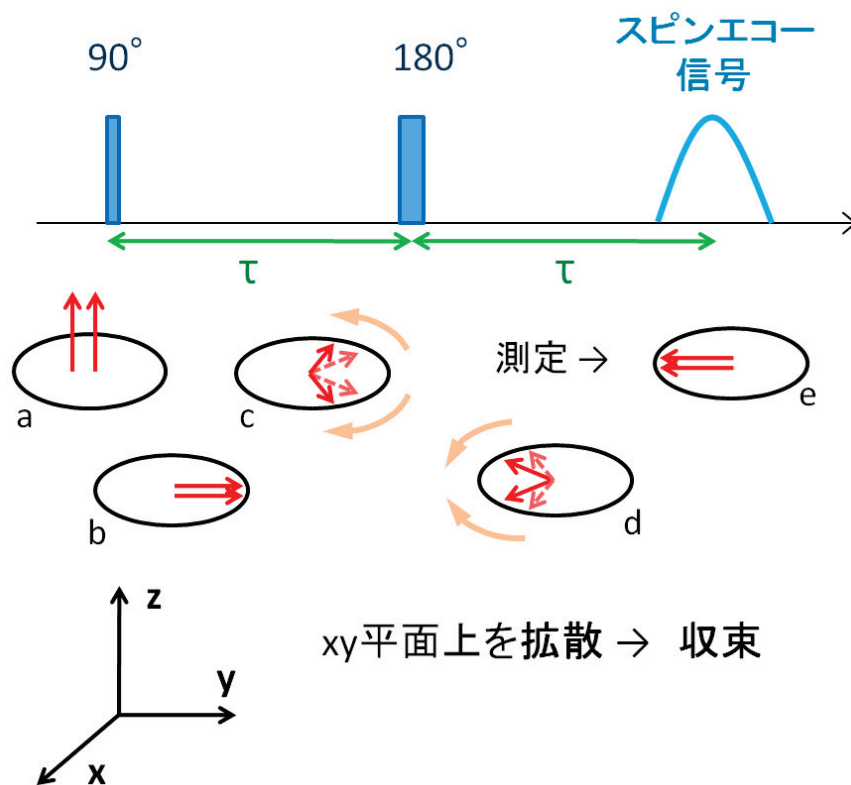


図 2-4 ESE パルス系列とスピン反転の古典的モデル

### 2.2.3 パルス電子電子二重共鳴 (PELDOR) 法

パルス電子電子二重共鳴 (PELDOR) 法は、2つの電子スピンの間に働く双極子相互作用を検出する手法である。以下、共鳴周波数の異なる2つのスピン1,2について考える。電子スピンの遷移を考えるとき、式15中ではA, B項のみ有効なので、双極子相互作用  $D'$  は以下の式で表わされる。 $g_1, g_2$  はスピン1, 2それぞれのg値、 $\theta$  は2つのスピンを結ぶ直線と外部磁場  $H$  のなす角度である。

$$D' = \frac{g_1 \mu_B g_2 \mu_B}{R^3} (A + B)$$

$$= \frac{3 g_1 g_2 \mu_B^2}{2 h R^3} (1 - 3 \cos^2 \theta) \quad (17)$$

図2-5にPELDOR法で用いるパルス系列を示す。 $\nu_{1,2}$  はそれぞれスピン1,2と共鳴する周波数である。スピン1を観測する場合を考える。 $\nu_1$ を用いた  $90^\circ$  パルス(1st)と  $180^\circ$  パルス(3rd)のあいだに周波数  $\nu_2$  の  $180^\circ$  パルス(2nd)を照射しスピン2を遷移させる。このときスピン1のエコー信号はスピン2からの双極子相互作用を受けて信号強度が減少する。1st、2ndパルスの間隔  $T$  の変化に伴い、スピン1のESE強度は以下のように変化する。

$$X(T) \propto 1 - p[1 - \cos(2\pi D'T)] \quad (18)$$

$p$  は2ndパルス照射によって状態遷移するスピン量の割合である。

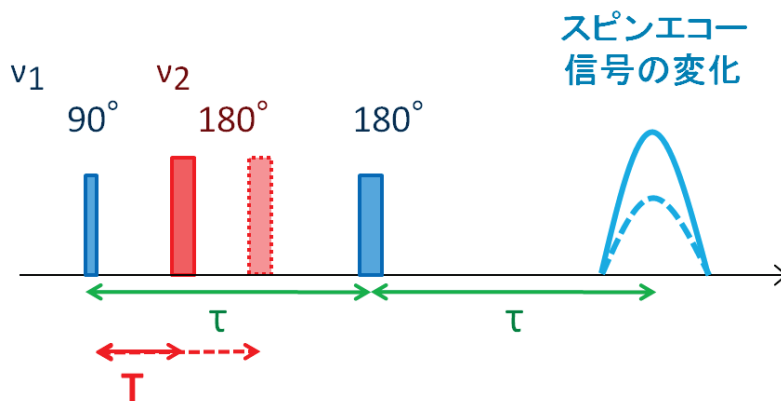


図2-5 PELDOR パルス系列

### 2.3 PELDOR 信号の計算方法

PS II の  $Y_D$ -Mn クラスタ間に働く双極子相互作用について考える。 $Y_D$ 上の電子スピンは芳香環の6つのCとO原子上に分布している。Mn クラスタも同様に4つのMn原子の位置と spin projection の値が異なる。個々の原子の中心に電子スピンの局在すると仮定するとき、1対の  $Y_D$ -Mn クラスタ間双極子相互作用の総和  $D_T$  は式 17 を書き換えて以下のようになる。

$$D_T = \sum_{i,j} \rho_i \rho_j \frac{3 g_i g_j \mu_B^2}{2 h R_{ij}^3} (1 - 3 \cos^2 \theta_{ij}) \quad (19)$$

$\rho_i, \rho_j$  はそれぞれ  $Y_D$  の  $i$  番目 ( $i = 1-7$ ) 原子の電子密度分布と Mn クラスタの  $j$  番目 ( $j = 1-4$ ) 原子の spin projection である。 $R_{ij}$  は  $Y_D$ -Mn クラスタの  $i$ - $j$  番目原子間の距離、 $\theta_{ij}$  は  $D$  の向きと外部磁場  $H$  のなす角度を表わす。

無配向試料では、 $D$  と外部磁場のなす角度がばらばらの向きになる。そのため、試料全体の PELDOR 信号強度  $I(T)$  は、式 18 を全角度で積分したものとなる。

$$I(T) = \iint X(T) \sin \theta d\theta d\varphi \quad (20)$$

配向試料中の PS II は、 $C_2$  対称軸が膜法線  $n$  方向に揃っている。 $n$  方向を  $z$  軸とすると、膜配向 PS II の PELDOR 信号は以下の式で表わされる。

$$I(T) = \iint X(T) G(\theta - \theta_0) \sin \theta d\theta d\varphi \quad (21)$$

$$G(\theta - \theta_0) = \exp \left[ -\frac{1}{2} \left( \frac{\theta - \theta_0}{\Delta} \right)^2 \right] \quad (22)$$

$G(\theta - \theta_0)$  は Gauss 関数であり、配向 PS II に配向度  $\Delta$  の角度分布があることを示す。 $\theta_0$  は  $n$  と外部磁場  $H$  のなす角度で、測定時は  $0^\circ$  または  $90^\circ$  に固定されている。

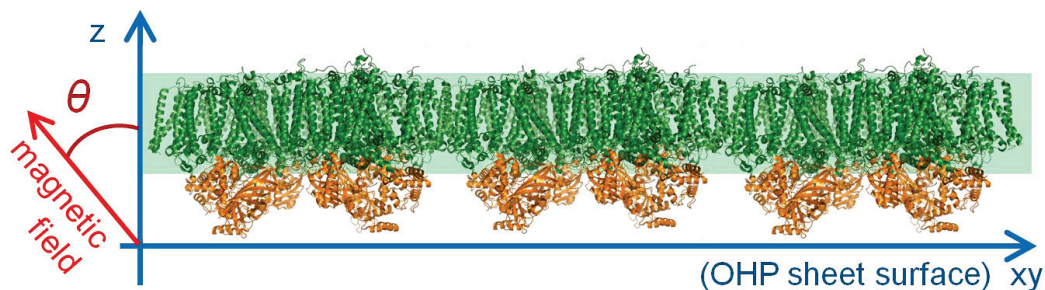


図 2-6 膜配向 PS II の模式図

本研究では、X線結晶構造解析で  $1.9 \text{ \AA}$  の分解能で得られた各原子の座標を用いて PELDOR の計算を行った[Umena et al. 2011]。 $Y_Z$  と  $Y_D$  の芳香環の中心を結ぶ線分の中点と、Fe 原子を通る直線を PS II の  $C_2$  対称軸とした。タンパク質中の Tyr 残基の電子密度分布には ENDOR で求められている値を用い (図 2-7)、4 つの Mn 原子の spin projection 値は表 1 の範囲で変化させた[Mino et al. 1997; Nagai et al. 2008; Kessen et al. 2010]。

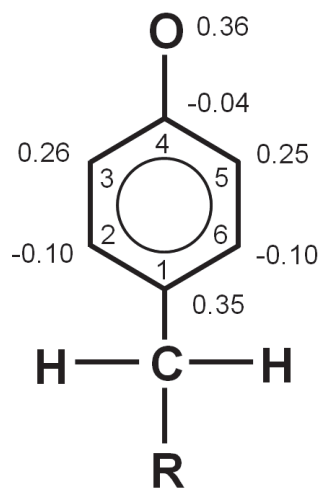


図 2-7  $Y_D$  の電子密度分布  
[Nagai et al. 2008]



### 3 結果と考察

#### 3.1 ESR 磁場掃引スペクトル

##### 3.1.1 $S_2$ 状態 Mn クラスターの ESE 磁場掃引スペクトル

図 3-1 は *T. vulcanus* から単離した PS II (A :  $S_2$ 、B :  $S_1$  状態) の ESE 磁場掃引スペクトルである。 $g=2$  を中心とした幅 60 mT の広いスペクトルは、スピン  $S_T=1/2$  の  $S_2$  状態 Mn クラスターに由来し、 $S_2$  マルチライン信号と呼ばれる。中央の狭いスペクトルは  $Y_D'$  に由来する。 $Y_D'$  由来の信号は強度が大きいので上部を切り取っている。ホウレンソウの PS II 膜標品は、無配向、配向状態に関わらずどちらも *T. vulcanus* と同様なスペクトルであった。後述の PELDOR 測定では、 $S_2$  マルチライン信号 (黒矢印) と共鳴するマイクロ波周波数を観測パルス、 $Y_D'$  信号 (白矢印) と共鳴する周波数を励起パルスとして用いた。

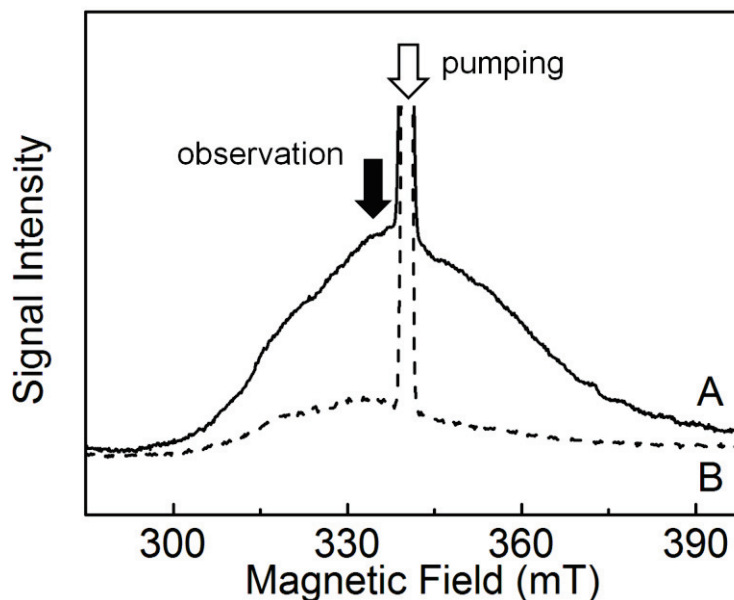


図 3-1 無配向 *T. vulcanus* PS II の ESE 磁場掃引スペクトル  
(A) $S_2$  状態、(B) $S_1$  状態

#### 測定条件

マイクロ波周波数 : 9.60 GHz

パルス間隔  $\tau$  : 200 ns

繰り返し時間 : 2 ms

温度 : 5 K

### 3.1.2 $Y_D^{\bullet}$ の CW-ESR 磁場掃引スペクトル

図 3-2 は、 $Y_D^{\bullet}$ 近傍 ( $g=2$  周辺) の CW-ESR 磁場掃引スペクトルである。ホウレンソウと *T. vulcanus* の PS II について、 $S_1$ 、 $S_2$  状態のスペクトルを比較した。 $S_2$  状態では 340 mT を中心とした幅 3 mT の  $Chl_Z^+$  の信号が重なっている。 $Chl_Z^+$  は  $S_2$  状態形成時の過剰な光照射によって形成されたと考えられる。信号強度は  $Chl_Z^+$  が重ならない 338.5 mT の位置で規格化した。光照射により増加した  $Chl_Z^+$  量はホウレンソウ PS II で 8%、*T. vulcanus* PS II では 15% 程度であった。

$Chl_Z$  と Mn クラスターの距離は  $Y_D$  よりも長い。そのため  $Chl_Z$ - $S_2$  状態 Mn クラスター間の PELDOR スペクトルは  $Y_D$  と異なるパターンを示す。さらに  $Chl_Z^+$  のスピンの量は少ないため、今回の PELDOR 測定にはあまり影響しないと考えてよい。

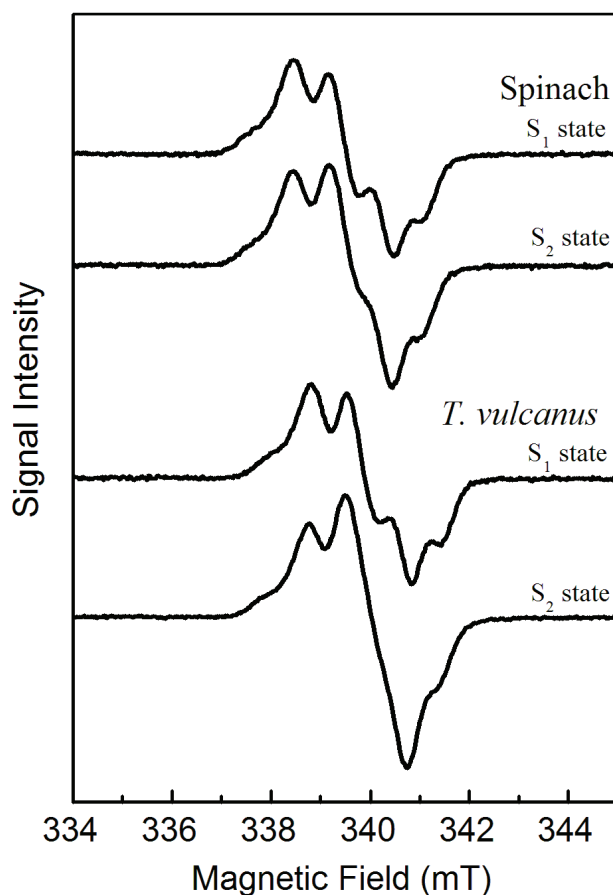


図 3-2  $Y_D^{\bullet}$ の CW-ESR スペクトル

測定条件 マイクロ波周波数：9.592 GHz

マイクロ波強度：50.5  $\mu$ W

磁場変調：4 G

温度：170 K

### 3.2 無配向 PS II の $S_2$ 状態 Mn クラスター- $Y_D$ 間 PELDOR 測定

図 3-3 は無配向 PS II の  $S_2$  状態 Mn クラスター- $Y_D$  間 PELDOR 測定結果である。試料はそれぞれ *T. vulcanus* (A) とホウレンソウ (B) から単離した PS II を用いた。ホウレンソウ PS II の結果は以前報告されているものと同様な結果となり、再現性が得られた。これら A, B の結果は一致しているため、PS II 酸素発生系側の構造はホウレンソウと *T. vulcanus* ではほぼ同じであることがわかった。

#### 3.2.1 点双極子近似計算

点双極子近似による PELDOR 計算から、 $S_2$  状態 Mn クラスター- $Y_D$  間距離は  $27 \text{ \AA}$  と予想された。しかし X 線結晶構造解析から得られた Mn- $Y_D$  間距離は、 $Y_D$  の芳香環の中心から Mn1-4 までそれぞれ  $29.1$ 、 $31.9$ 、 $31.1$ 、 $30.1 \text{ \AA}$  であり、一致しない。図 3-3 中の信号形は点双極子近似で  $27$  (C)、 $30 \text{ \AA}$  (D) とした計算値で、大きなずれがある。Mn- $Y_D$  周辺の分子構造と磁気構造が一致しないのは、Mn クラスターの 4 つの Mn 原子がそれぞれ異なる Spin projection をもつことが原因と考えられる。そのため、実験値と一致するスペクトルの計算には  $Y_D$  と Mn クラスターそれぞれの原子座標と電子密度分布を考慮する必要がある。

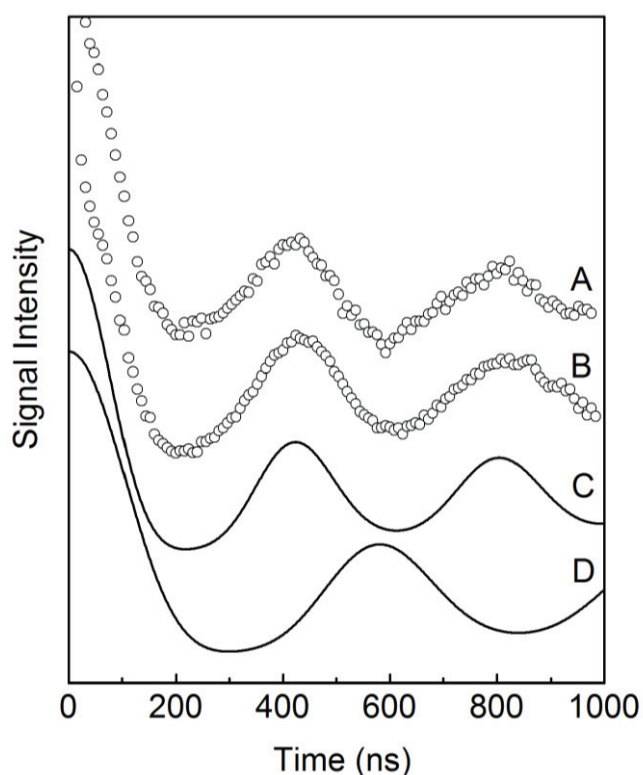


図 3-3  $S_2$  状態 Mn クラスター- $Y_D$  間の磁気構造比較

(A)*T. vulcanus*、(B)ホウレンソウの PELDOR 測定値、  
(C) $27 \text{ \AA}$ 、(D) $30 \text{ \AA}$  と仮定した点双極子近似計算

測定条件  $\nu_1 = 9.61 \text{ GHz}$ 、 $\nu_2 = 9.73 \text{ GHz}$ 、 $\tau = 1000 \text{ ns}$ 、

磁場： $348 \text{ mT}$ 、繰り返し時間： $2 \text{ ms}$ 、温度： $5 \text{ K}$

### 3.2.2 原子の電子密度分布を考慮した計算

$Y_D^*$ と  $S_2$  状態 Mn クラスターの電子スピンは、実際には芳香環上と 4 つの Mn 原子上にそれぞれ分布している。

$S_2$  状態 Mn クラスターの spin projection は、これまで ENDOR、DFT 計算で求められている (1.7 節参照)。どの Mn 原子がどの spin projection をもつかわからないため、Mn 原子と spin projection のすべての組み合わせを計算した。Peloquin らは Mn 原子の spin projection 値を 1.7, 1.27, -1, -0.99 と計算している[Peloquin et al. 2000]。これらのうち-1 と-0.99 をほぼ-1 で等しいと仮定すると、Mn 原子位置と spin projection 値は、12 通りの組み合わせが可能である。

Peloquin の spin projection 値を用いた計算結果を図 3-4 に示す。図で用いられた Mn 位置と spin projection の組み合わせは表 2 にまとめた。図中の点線は実験で得られたピーク位置 (図 3-3 A) である。b2、c2、d2 など実験値から大きく外れていることがわかる。Mn1 を spin projection 1.7 と仮定した計算値 (a1-3) と、Mn4 を 1.7、Mn1 を 1.27 と仮定した計算値 (d1) は比較的实验値に近い信号形となった。しかし実験値に完全に一致はしないため、spin projection を変えた計算を行い、一致する信号形を探った。

表 2 図 3-4 の計算に用いた Mn 位置と spin projection の組み合わせ

	Mn1	Mn2	Mn3	Mn4
<b>a1</b>	1.7	1.27	-1	-1
<b>a2</b>	1.7	-1	1.27	-1
<b>a3</b>	1.7	-1	-1	1.27
<b>b1</b>	1.27	1.7	-1	-1
<b>b2</b>	-1	1.7	1.27	-1
<b>b3</b>	-1	1.7	-1	1.27
<b>c1</b>	1.27	-1	1.7	-1
<b>c2</b>	-1	1.27	1.7	-1
<b>c3</b>	-1	-1	1.7	1.27
<b>d1</b>	1.27	-1	-1	1.7
<b>d2</b>	-1	1.27	-1	1.7
<b>d3</b>	-1	-1	1.27	1.7

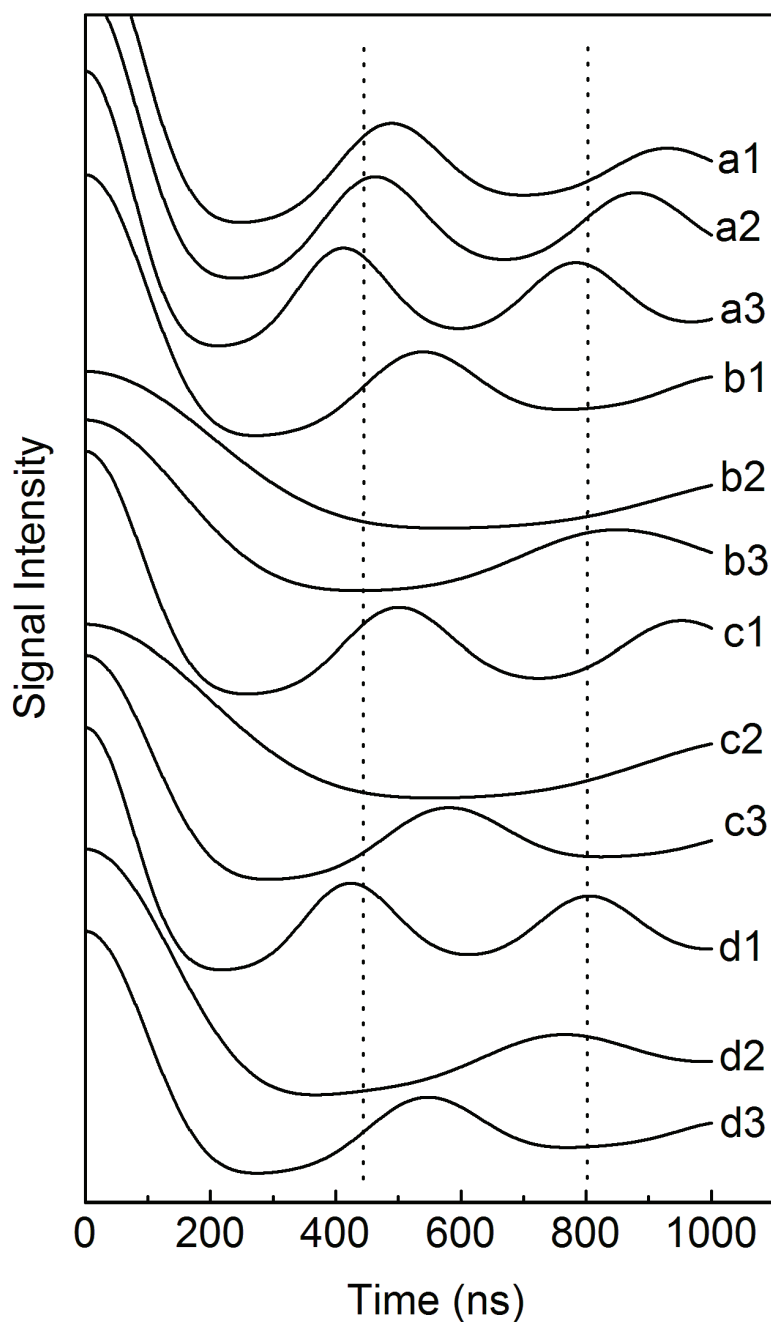


図 3-4  $S_2$  状態 Mn クラスタ- $Y_D$  間 PELDOR 測定の実験値

Mn 原子の Spin projection として 1.7、1.27、-1.0、-1 を用いた[Peloquin et al. 2000]。

最大の Spin projection 1.7 をもつ Mn(III) を、a1-3 では Mn1、b1-3 では Mn2、c1-3 では Mn3、d1-3 では Mn4 と仮定した。2 番目に大きな Spin projection 1.27 をもつ Mn 原子を、a1-3 では Mn2-4、b1-3 では Mn1,3,4、c1-3 では Mn1,2,4、d1-3 では Mn1-3 と仮定した。

点線は図 3-2 の正のピーク位置 ( $\tau' = 440, 800$  ns) に等しい。

単核の Mn(III)と Mn(IV)の超微細結合定数の等方成分  $A_{iso}$  は、化合物中でそれぞれ 165 ~ 225、187 ~ 253 MHz の範囲をとる。このことから、Cox らは Mn クラスターの spin projection が[1.39 ~ 1.89, 0.99 ~ 1.34, -1.11 ~ -0.82, -1.02 ~ -0.75]の範囲にあることを導いた[Cox et al. 2011] (表 1)。今回、この値を 10%程度拡大した範囲[1.2 ~ 2.0, 0.9 ~ 1.5, -1.2 ~ -0.65, -1.2 ~ -0.65]を用いて、Mn 位置と spin projection の 12 通りの組み合わせについて計算を行った。4 つの spin projection の和を 1.00 と仮定し、それぞれの値を 0.01 ずつ変化させてピーク位置が最も近い信号形を探った。

図 3-5 B, C, D は、実験で得られた正負のピーク位置  $\tau' = 200, 440, 800$  ns と最もよく合った計算結果で、図 3-4 の a2、a3、d1 に対応する。それぞれ誤差 5%以内で一致した (表 3)。本研究では、大きな正符号の spin projection を[++], 小さな正符号の spin projection を[+], 負符号の spin projection を[-]と表記する。図 3-5 B, C, D の Mn 原子位置と spin projection の組み合わせのモデルを、それぞれ Mn1, 2, 3, 4 = [++, -, +, -], [++, -, -, +], [+ , -, -, ++]と表わす。図 3-5 には最も誤差が小さい spin projection の組み合わせがプロットされている。

どの組み合わせも Mn1 の spin projection が正、Mn2 が負、さらに Mn3 と 4 が逆の符号をもつことから、Mn1-2 間と Mn3-4 間の交換相互作用が反強磁性結合であることが示された。

表 3 無配向試料のフィッティングで得られた spin projection の範囲

Mn1	Mn2	Mn3	Mn4	Combinations	Error range
1.68 ~ 2.00	-1.20 ~ -0.65	0.90 ~ 1.50	-1.20 ~ -0.65	[++, -, +, -]	< 5%
1.20 ~ 1.71	-1.09 ~ -0.65	-1.20 ~ -0.65	0.90 ~ 1.50	[++, -, -, +]	< 5%
0.90 ~ 1.50	-1.19 ~ -0.65	-1.20 ~ -0.65	1.20 ~ 2.00	[+ , -, -, ++]	< 5%

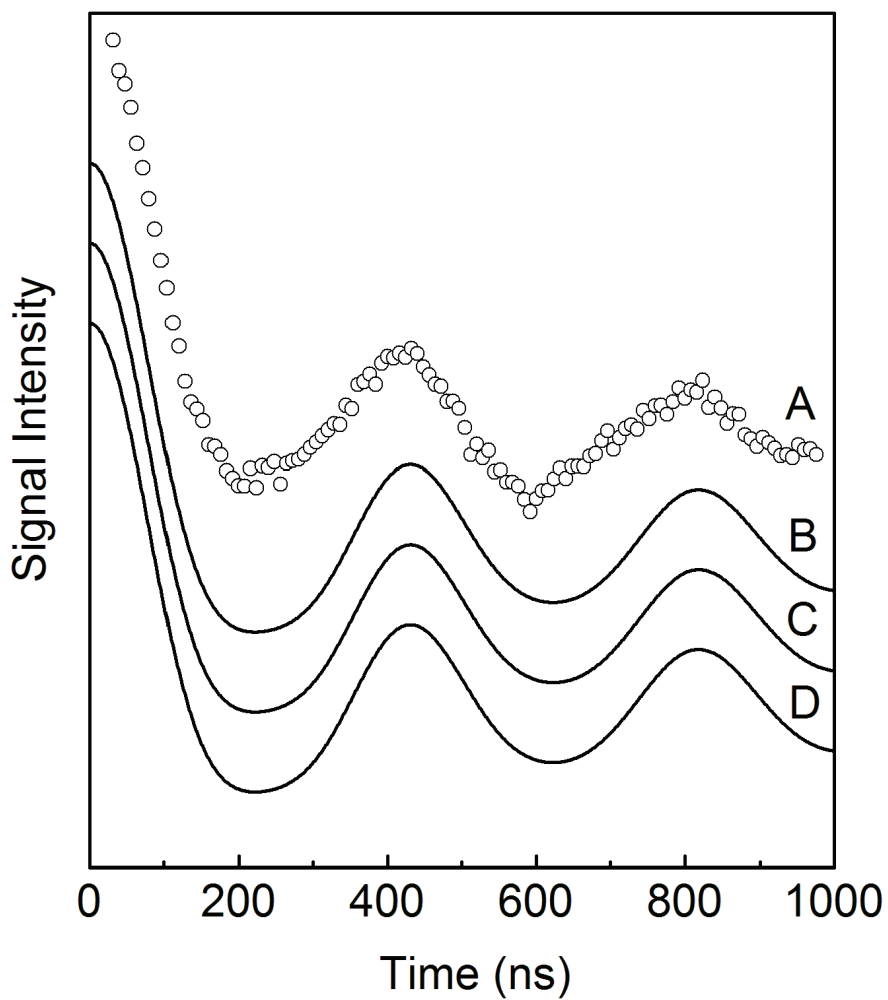


図 3-5 実験値と一致した PELDOR 計算値

A: 実験値 (図 3-3 A)、B-D: 計算値

計算に用いた Mn クラスターの Mn1-4 それぞれの spin projection の値 :

B: 1.77, -1.07, 1.09, -0.75

C: 1.39, -0.75, -1.05, 1.01

D: 1.17, -0.77, -0.77, 1.39

### 3.3 配向 PSII の $S_2$ 状態 Mn クラスター- $Y_D^*$ 間 PELDOR 測定

3.2 節では Mn 原子位置と spin projection の組み合わせを仮定した計算から、各 Mn 原子の spin projection の符号が  $[+, +, -, +, -]$ ,  $[+, +, -, -, +]$ ,  $[+, -, -, ++]$  のいずれかであることがわかった。しかしこれら 3 種類の信号形はほぼ同じで、区別することはできない。そこで、PS II を膜配向させた試料を用いて同様の PELDOR 測定を行った。

図 3-6 は PS II 配向試料の  $Cyt_{b559}$  の磁場角度依存性である。配向試料の  $Cyt_{b559}$  の  $g_Z$  ピークは、膜法線  $n$  と外部磁場  $H_0$  が垂直 ( $\theta = 90^\circ$ ) のとき強度が最大になる。Gauss 関数によるフィッティングから、配向度  $\Delta = 17 \pm 0.5^\circ$  が見積もられた。

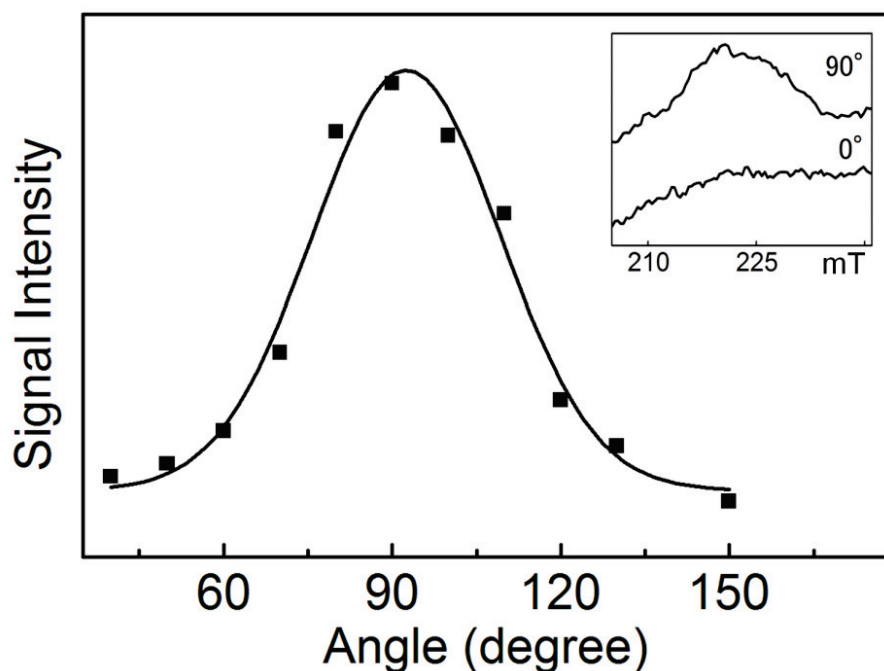


図 3-6 配向試料中  $Cyt_{b559}$  の磁場角度依存性の CW-ESR 測定  
右上:  $Cyt_{b559}$   $g_Z$  ピーク位置の CW-ESR 磁場掃引スペクトル

#### 測定条件

マイクロ波周波数: 9.44 GHz

マイクロ波強度: 201  $\mu$ W

測定温度: 5 K



図 3-7 は PS II 配向試料  $\theta = 0^\circ$  (A)、 $\theta = 90^\circ$  (B) のときの  $Y_D^*$ -Mn クラスタ間 PELDOR 測定結果である。 $\theta = 0^\circ$  では双極子相互作用の向き  $\mathbf{R}$  と  $\mathbf{H}_0$  の角度が 1 つに決まるため、信号は 1 つの周波数で構成されたような形になる。 $\theta = 0^\circ$  の負ピーク  $\tau' = 220, 620$  ns は、 $\theta = 90^\circ$  で  $\tau' = 180, 580$  ns にシフトした。また、 $\theta = 90^\circ$  では  $\tau' = 300$  ns に変曲点がみられた。 $\theta = 0^\circ$  の正ピーク  $\tau' = 430, 810$  ns は、 $\theta = 90^\circ$  でも同様にみられた。

計算値は、 $\theta = 0^\circ$  の  $\tau' = 220, 430, 810$  ns と  $\theta = 90^\circ$  の  $\tau' = 180, 430, 810$  ns のピーク位置でフィッティングした。図 3-7 A、B 赤の実線は最もよくフィットした計算値で、Mn1 が大きな正、Mn3 が小さな正の spin projection をもつ組み合わせ (モデル[+, -, +, -]) である。Mn1-4 の spin projection はそれぞれ[1.97, -1.20, 1.19, -0.96]としてプロットした。

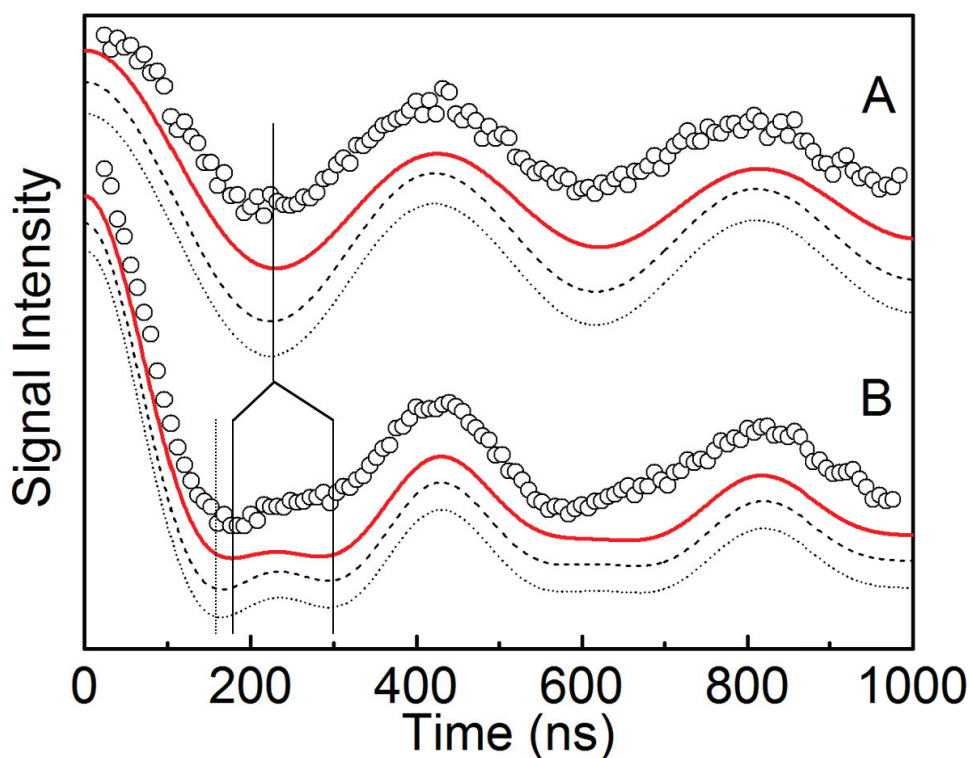


図 3-7 配向試料の  $S_2$  状態 Mn クラスタ- $Y_D^*$ 間 PELDOR 磁場角度依存性

A: 外部磁場  $\mathbf{H}_0$  と膜法線  $\mathbf{n}$  のなす角度  $\theta = 0^\circ$ 、B:  $\theta = 90^\circ$

白丸：測定値、実線：[+, -, +, -]、破線：[+, -, -, +]、点線：[+, -, -, +]の計算値

測定条件  $\nu_1 = 9.61$  GHz、 $\nu_2 = 9.73$  GHz、 $\tau = 1000$  ns、  
磁場：348 mT、繰り返し時間：2 ms、温度：5 K

フィッティングで得られた spin projection の範囲を表 4 にまとめた。ピーク位置がすべて 5%以内の誤差で一致したのは[+, -, +, -]の計算値のみであり、他のモデルでは 5%以上の誤差があった。5%以上誤差のあるモデルでは、最も誤差の小さくなる spin projection の組み合わせが示されている。[+, -, +, -]モデルでは大きな正の spin projection [++]値が 1.87-2.00 の範囲で実験値と一致するピークをもった。

表 4 配向試料のフィッティングで得られた spin projection の範囲

Mn1	Mn2	Mn3	Mn4	Combinations	Error range
1.87~2.00	-1.20~-1.03	0.90~1.25	-1.05~-0.65	[+, -, +, -]	< 5%
1.38~1.41	-0.66~-0.65	-0.67~-0.65	0.90~0.94	[+, -, -, +]	> 5%
1.06~1.25	-0.65~-0.80	-0.92~-0.65	1.21~1.50	[+, -, -, ++]	> 5%

各モデルの PELDOR 信号形は、最初の負ピーク位置 ( $\tau' = 180$  付近) の大きな差がみられた。図 3-8 は最初の負ピーク位置と各モデルの spin projection 値の関係である。網かけ部分  $\tau' = 175 - 185$  ns は実験値から 5% のフィッティング範囲である。○は  $[+, -, +, -]$ 、×は  $[+, -, -, +]$ 、□は  $[+, -, -, ++]$  モデルを示す。A、B はそれぞれ正の spin projection  $[++]$ 、 $[+]$  値とピーク位置の関係を示す。C、D はともに負の spin projection  $[-]$  値とピーク位置の関係が示されており、C は Mn2、D はそれ以外の spin projection  $[-]$  値 ( $[+, -, +, -]$  では Mn4、 $[+, -, -, +]$  と  $[+, -, -, ++]$  では Mn3) がプロットされている。 $[+, -, -, +]$ 、 $[+, -, -, ++]$  モデルでは 5% 以上の誤差があった。最も実験値に近い信号形が得られたときの  $[++]$  値はそれぞれ 1.38-1.41、1.21-1.5 と比較的低い値になった (表 4、図 3-8A)。図 3-7 の破線と点線はそれぞれモデル  $[+, -, -, +]$ 、 $[+, -, -, ++]$  の最も実験値に近い信号形がプロットされている。

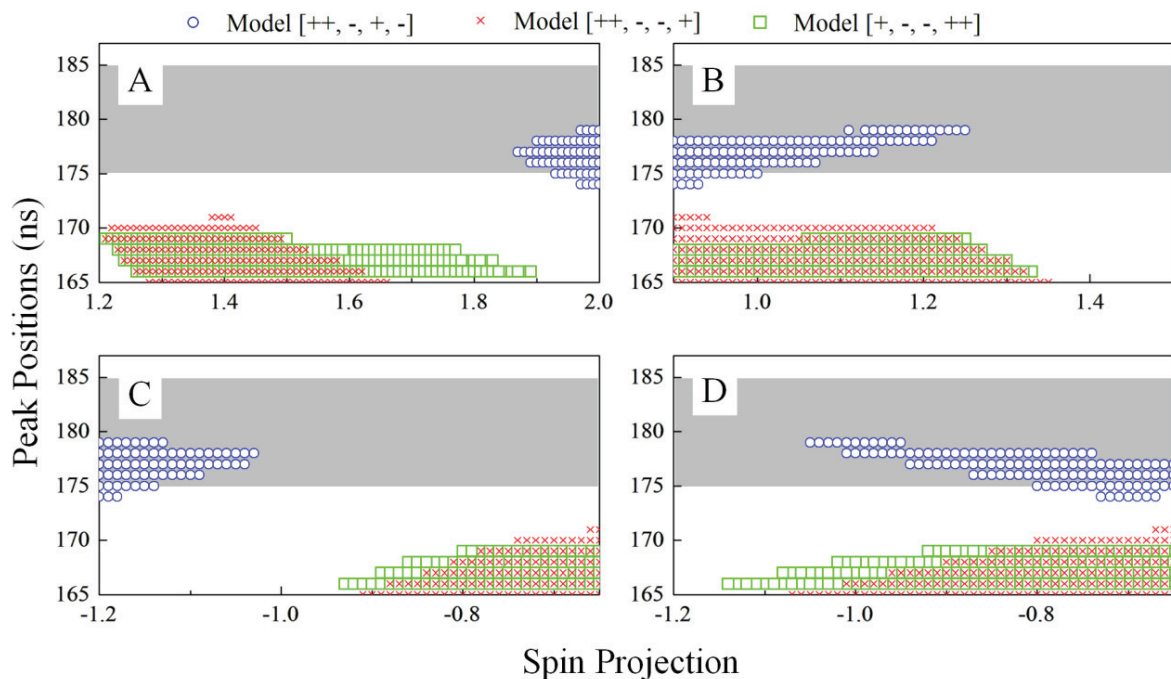


図 3-8 計算に用いた spin projection 値と PELDOR 計算値の負ピーク位置の関係

A : 大きな正の spin projection、B : 小さな正の spin projection

C : Mn2 の負の spin projection、

D : Mn3 ( $[+, -, -, +]$ 、 $[+, -, -, ++]$ )、Mn4 ( $[+, -, +, -]$ ) の負の spin projection

## 4 考察

これまで、Mn クラスターの ESR 測定から、 $S_2$  状態 Mn クラスターの磁気構造モデルが提唱されている。 $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR の結果からは、 $S_2$  状態での 4 つの Mn 価数が(III, IV, IV, IV)であると結論付けられている。

PELDOR 実験結果から、 $[+, -, +, -]$ モデルが最も実験結果に近いスピン状態であることがわかった。 $[+, -, +, -]$ モデルで実験値と一致した最大の spin projection の範囲は 1.87-2.0 で、他のモデルでの範囲 ( $[+, -, -, +]$ で 1.38-1.41、 $[+, -, -, +]$ で 1.21-1.5) よりも大きな値となった。

過去の  $^{14}\text{N}$  ESEEM 実験では、His332 に結合する Mn 原子が Mn(III)であると結論付けている。His332 に結合する Mn 原子は Mn1 であり、PELDOR 結果の $[+, -, +, -]$ 、 $[+, -, -, +]$ モデルと一致する。また、ESEEM 実験結果では Mn(III)の spin projection が約 2 であると結論付けている。 $[+, -, +, -]$ モデルは他のモデルよりも大きく 2 に近い spin projection をもつため、ESEEM 実験結果と一致する。

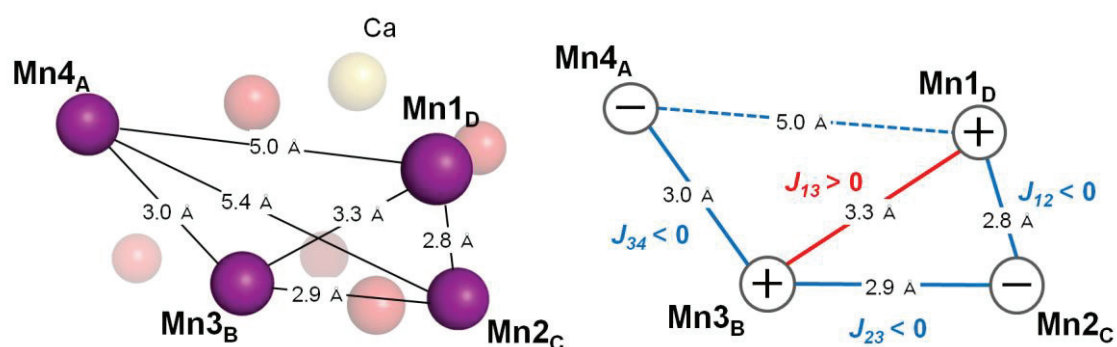


図 4-1 X 線結晶構造解析の構造 (左) と予想される交換相互作用の符号 (右)

得られたスピン状態のモデル $[+, -, +, -]$ から、Mn 原子間の交換相互作用  $J$  の符号が図 4-1 のように決められる。Mn1-2 間と Mn3-4 間は反強磁性結合である。X 線結晶構造解析の座標によると Mn1-2 と Mn2-3 間の距離は 2.8-2.9 Å であり、これは他の Mn 間距離に比べて最も近い組み合わせである。距離が近い電子スピン同士の交換相互作用は強磁性よりも反強磁性である方が安定なため、矛盾しない結論であると予想される。

最近の DFT 計算では、Mn1,4 が同符号 spin projection をもつ[+, -, -, +]モデルが  $S_2$  状態の Mn クラスターのスピン状態であるといわれている[Ames et al. 2011; Cox et al. 2011]。これは今回の PELDOR 実験結果で得られたモデル[+, -, +, -]とは矛盾する。この矛盾の原因として、以下の 2 つの可能性が考えられる。

- (1) PELDOR 計算に用いた Mn 原子座標のずれ
- (2) Spin projection の異方性成分の効果

- (1) PELDOR 計算に用いた Mn 原子座標のずれ

X 線結晶構造解析で得られた PS II 酸素発生系の構造は、安定な  $S_1$  状態のものである。 $S_1$  から  $S_2$  状態への遷移では Mn クラスターの構造が最大で  $0.3 \text{ \AA}$  変化することが Ames らの DFT 計算によって明らかになっている[Ames et al. 2011]。そこで、PELDOR 計算に用いた X 線結晶構造解析の Mn 原子座標を  $0.3 \text{ \AA}$  だけ移動させ、PELDOR 信号の計算を行った。モデル[+, -, +, -]と[+, -, -, +]ではピーク位置の変化が最大で 5%、モデル[+, -, -, +]では最大で 10%程度の変化であった。

Mn 原子の位置が多少変化しても実験値に最も近いモデルは[+, -, +, -]であり、Mn 原子位置の少しの変化は PELDOR 信号に大きくは影響を及ぼさないといえる。

- (2) Spin projection の異方性成分の効果

Ames らによる  $^{55}\text{Mn}$ -ENDOR を元にした DFT 計算では、Mn の超微細構造の異方性成分は等方成分に比べて小さくないとしている。DFT 計算では Mn 原子の異方性成分を考慮したモデルを立てているが、今回の PELDOR 信号の計算には、異方性の効果は含まれていない。Mn の超微細構造の異方性成分により spin projection が修正されるため、異方性を含めた計算により PELDOR 計算値が変化する可能性がある。異方性を考慮した計算には、DFT 計算により得られる各 Mn 原子の座標とスピンのテンソル成分が必要であるため、今回は計算ができなかった。今後、異方性成分を考慮することで DFT モデルとして提唱されている[+, -, -, +]モデルが実験と対応するかどうかについては検討する必要がある。

## 5 まとめ

本研究では  $S_2$  状態 Mn クラスター- $Y_D^\bullet$  間の PELDOR 測定を行った。X 線結晶構造解析より得られた原子位置を考慮したスペクトルの計算から、spin projection の値を直接得ることができた。Mn1 と Mn3 が正符号の spin projection をもち、Mn1-4 の spin projection [1.97, -1.19, 1.17, -0.95]が得られた。Mn1 の原子が Mn クラスターの  $S_2$  状態で Mn(III)であることが導かれた。また、Mn1-2 と Mn3-4 間に働く交換相互作用が反磁性結合、Mn1-3 間が強磁性結合であることがわかった[Asada et al. 2013]。

## 6 参考文献

- Ames W., Pantazis D. A., Krewald V., Cox N., Messinger J., Lubitz W. and Neese F., Theoretical Evaluation of Structural Models of the  $S_2$  State in the Oxygen Evolving Complex of Photosystem II: Protonation States and Magnetic Interactions, **Journal of the American Chemical Society**, 133 (2011) 19743-19757.
- Asada M., Nagashima H., Koua F. H. M., Shen J-R., Kawamori A. and Mino H., Electronic Structure of  $S_2$  state of the oxygen-evolving complex of Photosystem II studied by PELDOR, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1827 (2013) 438-445.
- Banham J. E., Baker C. M., Ceola S., Day I. J., Grant G. H., Groenen E. J. J., Rodgers C. T., Jeschke G. and Timmel C. R., Distance measurements in the borderline region of applicability of CW EPR and DEER: A model study on a homologous series of spin-labelled peptides, **Journal of Magnetic Resonance**, 191 (2008) 202-218.
- Charlot M. F., Boussac A. and Blondin G., Towards a spin coupling model for the  $Mn_4$  cluster in photosystem II, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1708 (2005) 120-132.
- Cox N., Rapatskiy L., Su J. H., Pantazis D. A., Sugiura M., Kulik L., Dorlet P., Rutherford A. W., Neese F., Boussac A., Lubitz W. and Messinger J., Effect of  $Ca^{2+}/Sr^{2+}$  Substitution on the Electronic Structure of the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem II: A Combined Multifrequency EPR,  $^{55}Mn$ -ENDOR, and DFT Study of the  $S_2$  State, **Journal of the American Chemical Society**, 133 (2011) 3635-3648.
- Dismukes G. C. and Siderer Y., Intermediates of a Polynuclear Manganese Center Involved in Photosynthetic Oxidation of Water, **Proceedings of the National Academy of Sciences** 78 (1981) 274-278.
- Hara H., Kawamori A., Astashkin A. V. and Ono T., The distances from tyrosine D to redox-active components on the donor side of Photosystem II determined by pulsed electron-electron double resonance, **Biochimica et Biophysica Acta**, 1276 (1996) 140-146.
- Kessen S., Teutloff C., Kern J., Zouni A. and Bittl R., High-Field  $^2H$ -Mims-ENDOR Spectroscopy on PSII Single Crystals: Hydrogen Bonding of  $Y_D^\bullet$ , **Chemphyschem**, 11 (2010) 1275-1282.
- Kok B., Forbush B. and Mcgloin M., Cooperation of Charges in Photosynthetic O<sub>2</sub> Evolution .1. A Linear 4step Mechanism, **Photochemistry and Photobiology**, 11 (1970) 457-&.
- Kulik L. V., Epel B., Lubitz W. and Messinger J.,  $^{55}Mn$  pulse ENDOR at 34 GHz of the  $S_0$  and  $S_2$  states of the oxygen-evolving complex in photosystem II, **Journal of the American Chemical Society**, 127 (2005) 2392-2393.
- McEvoy J. P. and Brudvig G. W., Water-splitting chemistry of photosystem II, **Chemical Reviews**, 106 (2006) 4455-4483.
- Messinger J. and Renger G., Eds. Photosynthetic water-splitting Primary processes of photosynthesis-part2: basic principles and apparatus. Cambridge, (2008). Royal Society of Chemistry.

- Mino H., Astashkin A. V. and Kawamori A., An EPR and pulsed ENDOR study of the structure of tyrosine Z<sup>•</sup> in Tris-treated photosystem II, **Spectrochimica Acta A**, 53 (1997) 1465-1483.
- Nagai H., Fukushima Y., Okajima K., Ikeuchi M. and Mino H., Formation of Interacting Spins on Flavosemiquinone and Tyrosine Radical in Photoreaction of a Blue Light Sensor BLUF Protein TePixD, **Biochemistry**, 47 (2008) 12574-12582.
- Nelson N. and Yocum C. F., Structure and function of photosystems I and II, **Annual Review of Plant Biology**, 57 (2006) 521-565.
- Ono T. and Inoue Y., Effects of Removal and Reconstitution of the Extrinsic 33-Kda, 24-Kda and 16-Kda Proteins on Flash Oxygen Yield in Photosystem-Ii Particles, **Biochimica Et Biophysica Acta**, 850 (1986) 380-389.
- Pantazis D. A., Orio M., Petrenko T., Zein S., Lubitz W., Messinger J. and Neese F., Structure of the oxygen-evolving complex of photosystem II: information on the S<sub>2</sub> state through quantum chemical calculation of its magnetic properties, **Physical Chemistry Chemical Physics**, 11 (2009) 6788-6798.
- Peloquin J. M., Campbell K. A., Randall D. W., Evanchik M. A., Pecoraro V. L., Armstrong W. H. and Britt R. D., <sup>55</sup>Mn ENDOR of the S<sub>2</sub>-state multiline EPR signal of photosystem II: Implications on the structure of the tetranuclear Mn cluster, **Journal of the American Chemical Society**, 122 (2000) 10926-10942.
- Shen J. R. and Inoue Y., Binding and Functional-Properties of Two New Extrinsic Components, Cytochrome-C-550 and a 12-kDa Protein, in Cyanobacterial Photosystem II, **Biochemistry**, 32 (1993) 1825-1832.
- Shen J. R. and Kamiya N., Crystallization and the crystal properties of the oxygen-evolving photosystem II from *Synechococcus vulcanus*, **Biochemistry**, 39 (2000) 14739-14744.
- Siegbahn P. E. M., A Structure-Consistent Mechanism for Dioxygen Formation in Photosystem II, **Chemistry-a European Journal**, 14 (2008) 8290-8302.
- Siegbahn P. E. M., An Energetic Comparison of Different Models for the Oxygen Evolving Complex of Photosystem II, **Journal of the American Chemical Society**, 131 (2009) 18238-18239.
- Siegbahn P. E. M., Structures and Energetics for O<sub>2</sub> Formation in Photosystem II, **Accounts of Chemical Research**, 42 (2009) 1871-1880.
- Stich T. A., Yeagle G. J., Service R. J., Debus R. J. and Britt R. D., Ligation of D1-His332 and D1-Asp170 to the Manganese Cluster of Photosystem II from *Synechocystis* Assessed by Multifrequency Pulse EPR Spectroscopy, **Biochemistry**, 50 (2011) 7390-7404.
- Styring S. and Rutherford A. W., In the Oxygen-Evolving Complex of Photosystem-Ii the S<sub>0</sub> State Is Oxidized to the S<sub>1</sub> State by D<sup>+</sup> (Signal-Iislow), **Biochemistry**, 26 (1987) 2401-2405.
- Umena Y., Kawakami K., Shen J. R. and Kamiya N., Crystal structure of oxygen-evolving photosystem II at a resolution of 1.9 Å, **Nature**, 473 (2011) 55-U65.
- Yeagle G. J., Gilchrist M. L., McCarrick R. M. and Britt R. D., Multifrequency pulsed electron paramagnetic resonance study of the S<sub>2</sub> state of the photosystem II manganese cluster, **Inorganic Chemistry**, 47 (2008) 1803-1814.

## 7 謝辞

本研究を行うにあたって、指導教官の三野広幸准教授には研究全般に渡って親身にご指導、助言頂き、たいへんお世話になりました。岡山大学理学部の沈建仁教授、博士後期課程の Faisal Hammad Mekky Koua さんには、貴重な試料をご提供頂き、また研究について助言頂きました。野口巧教授、加藤祐樹助教には、議論を通じて多くの知識や示唆、助言を頂きました。博士前期課程 1 年の長嶋宏樹君には試料作製に多大な助力を頂き、また議論を通じて多くの示唆を頂きました。博士前期課程 1 年の田鹿良平君、学部 4 年の越沼渉君、G 研究室の他の先輩方、同期、後輩の皆様には何度も実験を手伝って頂き、お世話になりました。この場を借りて皆様に心から御礼申し上げます。