【128】

氏　名（本籍）	鈴　木　博　行（大 阪 府）
学 位 の 種 類	博　　士（工　　学）
学 位 記 番 号	博　甲　第　4591　号
学位授与年月日	平成 20 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
審 査 研 究 科	数理物質科学研究科
学 位 論 文 題 目	**Fourier Transform Infrared Study on the Molecular Mechanism of Photosynthetic Oxygen Evolution** （フーリエ変換赤外分光法による光合成酸素発生反応の分子メカニズムの研究）

主　査	筑波大学教授	博士（工学）	鈴　木　博　章
副　査	東京大学准教授	理学博士	園　池　公　毅
副　査	筑波大学准教授	博士（理学）	白　木　賢太郎
副　査	筑波大学准教授	理学博士	野　口　　巧

論 文 の 内 容 の 要 旨

植物やシアノバクテリアが行う光合成酸素発生反応は，チラコイド膜上に存在する光化学系Ⅱ蛋白質複合体において行われる。触媒中心（酸素発生系）は，4 つの Mn イオンと 1 つの Ca^{2+} イオンからなる，いわゆるマンガンクラスターであり，そこで 2 分子の水が酸化され，4 つのプロトンと 1 つの酸素分子に分解する。反応は 5 つの中間状態（S_0-S_4）の光誘起サイクル（S 状態サイクル）により進行することが知られているが，プロトンの放出過程など反応の詳細は，未だ明らかにされていない。また，マンガンクラスターの骨格構造や配位子構造などついても未解決である。本研究では，光合成酸素発生反応の分子メカニズムの解明を目指し，フーリエ変換赤外分光法（FTIR）を用いて，酸素発生反応におけるプロトン放出メカニズム，及びマンガンクラスターの配位子構造について詳細な解析を行った。

まず，プロトン放出遷移を同定するため，各中間状態遷移の pH 依存性を調べた。好熱性シアノバクテリア *Thermosynechococcus elongatus* の光化学系Ⅱコア蛋白質複合体を用い，pH4.0-10.0 の範囲で S 状態サイクルの閃光誘起 FTIR 差スペクトルを測定した。pH6.0 における FTIR スペクトルを各遷移の標準スペクトルとし，各 pH における差スペクトルをこれらの標準スペクトルの線形結合としてフィッティングを行うことにより，それぞれの pH での各 S 状態遷移の効率を見積もった。その結果，$S_1 \rightarrow S_2$ 遷移は pH 依存性を示さず，常に高い遷移効率を維持することが示された。一方，$S_2 \rightarrow S_3$，$S_3 \rightarrow S_0$，及び $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移においては，酸性側で著しい pH 低下が観測された。これらの結果から，S 状態サイクルにおいて，$S_1 \rightarrow S_2$ 遷移ではプロトンが放出されず，他の三つの遷移（$S_2 \rightarrow S_3$，$S_3 \rightarrow S_0$ 及び $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移）において，少なくとも 1 個以上のプロトンが放出されることが示された。

pH 依存性の実験ではプロトン放出が起こる遷移が同定されたものの，その放出プロトン数を明らかにすることはできない。そこで，各中間状態遷移における実際のプロトン放出パターンを FTIR 法を用いて見積もった。光化学系Ⅱの酸化側では，マンガンクラスターと競合する副次的電子供与体である Y_D からもプロトンが放出される。Y_D 由来のプロトンによる妨害を防ぐため，*T. elongatus* の Y_D 欠損変異体（D2-Y160F）

より調製した光化学系Ⅱコア複合体を用いて実験を行った。試料を高濃度 Mes 緩衝液に懸濁し，S 状態遷移の閃光誘起 FTIR 差スペクトルを測定した。このとき，マンガンクラスターから放出されたプロトンは，Mes 緩衝剤にトラップされ，Mes のプロトン化反応のシグナルとして観測される。スペクトルから蛋白質由来のバンドを除去し Mes のバンドだけを抽出するため，重水素化 Mes（D_{13}-Mes）を用いて同様の測定を行い，Mes/D_{13}-Mes 二重差スペクトルを計算した。そこに現れる Mes バンドの強度増加を閃光数に対してプロットすると，光合成水分解反応に特徴的な 4 閃光周期振動を示した。この振動プロットをシミュレーション解析することにより，各遷移のプロトン放出数を見積もった。その結果，$S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0 \rightarrow S_1$ 遷移に対し，0.3：1.0：1.6：1.1 のプロトン放出パターンが得られた。非整数値の結果は，各遷移効率をすべて同一であると仮定した解析法に由来していると考えられる。このことを考慮することにより，$S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0 \rightarrow S_1$ 遷移でのプロトン放出パターンは，0：1：2：1 であることが示された。

次に，マンガンクラスターの構造を明らかにするために，Ca^{2+} イオン近傍に存在するカルボキシル配位子の構造について調べた。Ca^{2+} を Sr^{2+} に置換した試料（酸素発生活性は保たれる）について，各 S 状態遷移の際の FTIR スペクトルを測定し，未処理試料スペクトルから差し引いた Ca^{2+}-Sr^{2+} 二重差スペクトルから Sr^{2+} 置換の効果を詳細に解析した。特に，カルボキシル配位子の伸縮振動バンドに注目して解析を行った。その結果，Sr^{2+} 置換により影響を受けるカルボキシル配位子について以下のことが示された。1）S_1 と S_0 状態において 1417cm^{-1} に対称伸縮振動を持つカルボキシル基は，キレートまたは架橋構造を持ち，$S_1 \rightarrow S_2$ 及び $S_3 \rightarrow S_0$ 遷移で構造変化する。2）S_2 と S_3 状態において 1362-1363cm^{-1} に対称伸縮振動を持つカルボキシル基は架橋または単座構造を取り，$S_1 \rightarrow S_2$ 及び $S_3 \rightarrow S_0$ 遷移において構造変化する。3）S_3 と S_1 状態において 1437-1439cm^{-1} に振動数を持つカルボキシル基はキレート構造をとり，$S_2 \rightarrow S_3$ 及び $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移で構造変化する。これらのカルボキシル基は，直接 Ca^{2+} イオンに配位しているか，或いは，Ca^{2+} イオンと強く相互作用している Mn イオンに配位していると考えられる。

上記の研究結果から，光合成酸素発生反応の分子メカニズムについて以下の知見が導かれた。① $S_1 \rightarrow S_2$ 遷移ではプロトンは放出されず，$S_2 \rightarrow S_3$，$S_3 \rightarrow S_0$ 及び $S_0 \rightarrow S_1$ 遷移において，少なくとも一個以上のプロトンが放出される。② $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0 \rightarrow S_1$ 遷移における，プロトン放出パターンは 0：1：2：1 と見積もられた。③少なくとも 3 つのカルボキシル基が，直接 Ca^{2+} イオンに配位しているか，或いは，Ca^{2+} イオンと強く相互作用している Mn イオンに配位しており，酸素発生反応においてその構造を変化させる。

審 査 の 結 果 の 要 旨

本論文は，植物およびシアノバクテリアにおいて行われる光合成酸素発生（水分解）反応の分子メカニズムを，光誘起フーリエ変換赤外（FTIR）分光法を用いて研究した結果を報告したものである。筆者はまず，水分解の際のプロトン放出反応について解析し，各中間状態遷移の遷移効率の pH 依存性を調べることにより，プロトンが放出される遷移を同定した。さらに，放出されたプロトンを緩衝剤の赤外バンドによって検出し，プロトン放出パターンが $S_1 \rightarrow S_2 \rightarrow S_3 \rightarrow S_0 \rightarrow S_1$ 遷移において，0：1：2：1 であると見積もった。これらの研究は，FTIR 法を用いて光合成水分解反応におけるプロトン放出過程を解析した初めての例であり，特に，緩衝剤のバンドの同位体シフトを用いたプロトンの直接検出は全く独自の新規な手法である。同手法を用いて水分解におけるプロトン放出パターンを精密に見積もった意義は極めて大きく，水分解反応メカニズムの分子レベルでの解明に重要な貢献を与えたといえる。さらに筆者は，酸素発生に必須な Ca^{2+} イオンを Sr^{2+} イオンに置換し，そのマンガンクラスターの構造や反応への影響を FTIR 法を用いて調べ，Ca^{2+} に関与するカルボキシル配位子に関する知見を得た。マンガンクラスターにおける Ca^{2+} イオンの構造的関係や反応における役割については未だ謎が多く，FTIR 法を用いた詳細な解析によって，Ca^{2+} イオンがカルボキ

シル基を介して Mn イオンと直接相互作用していることを明らかにしたことは，非常に重要な成果である。以上のように，本論文は，光合成酸素発生反応の分子メカニズムの解明とその解析方法に関し，極めて重要な結果を報告しており，博士論文として十分に値するものであると考える。

よって，著者は博士（工学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。