

X線吸収，発光および共鳴非弾性散乱による光合成酸素発生錯体（ Mn_4Ca ）の電子状態に関する研究

矢野淳子

Lawrence Berkeley National Laboratory, Physical Biosciences Division,
1 Cyclotron Rd., Berkeley, CA 94720, USA

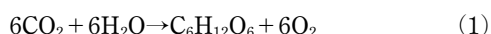
V. K. Yachandra

Lawrence Berkeley National Laboratory, Physical Biosciences Division,
1 Cyclotron Rd., Berkeley, CA 94720, USA

要旨 光合成酸素発生反応は生物が生きていく上で最も大切な反応の一つである。この反応は光化学系II酸素発生複合体（Photosystem II）に存在する4つのMnと1つのCaからなるクラスターの触媒反応によることがわかっている。しかし、その触媒機能の分子レベルでの詳細に関しては未だ解明されていない。本稿では、水分解過程で生ずる Mn_4Ca クラスターの酸化状態変化に焦点を絞って、様々なX線分光法により得られた最新の成果を紹介する。

1. はじめに

今からおよそ30億年前、酸素発生型ラン藻（cyanobacteria）の出現により地球誕生以来嫌気状態にあった大気中の酸素濃度が次第に上昇し始めた。それに伴って上空にオゾン層が形成され、地上に到達する紫外線が弱まるとともに酸素呼吸生命の進化を促した。我々の生命活動は植物、ラン藻などが行う光合成反応によって成り立っている。



上記の一連の光合成反応のうち、酸素発生反応は光合成系II複合体（Photosystem II、以下PSII）と呼ばれる膜タンパク質複合体においておこる。PSIIは、太陽光エネルギーを吸収して生物が利用可能な化学エネルギーに変換する。我々が生きていく上で不可欠な酸素はこの反応の2次の産物である。PSIIはおよそ19種類のサブユニットを含む巨大な膜タンパク質であり、酸素発生は触媒中心である Mn_4Ca クラスターとその配位子を含む近傍アミノ酸残基により構成される酸素発生中心（OEC: oxygen evolving center）でおこる（Fig. 1）¹⁻⁵⁾。

光合成反応では外来的な電子の供給源（電子供与体）として最初に水が用いられ、 Mn_4Ca クラスターにおいて2つの水分子が4電子酸化されることによって1分子の酸素が放出される。ここで用いる“酸化”とは、水分子から電子が放出されるということを意味する。

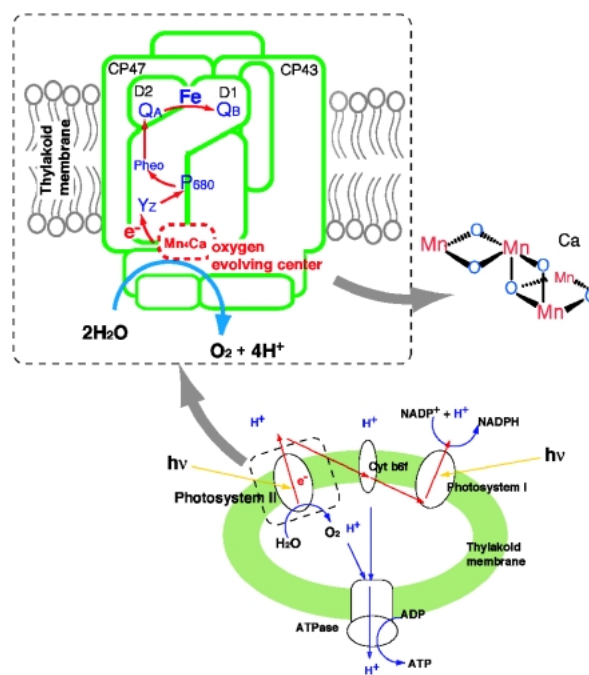
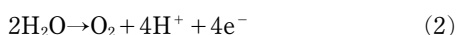


Fig. 1 Photosystem II in the thylakoid membrane.

上記の反応は、 Mn_4Ca クラスターにおける反応中間体 S_n ($n=0\sim 4$)の光駆動サイクルによることがわかっている（Fig. 2）。 n が大きいほどより酸化が進んだ状態を表し、PSIIが1光量子を吸収するごとに1ステップずつ酸化反応が進行する（ $S_n \rightarrow S_{n+1}$ ）。まずPSIIを暗順応させると S_1 状態で安定化される。 S_1 状態は、反応中心であるクロロフィル a 二量体P680の光誘起に伴って S_2 、 S_3 へと1電子ずつ酸化される。そして3回目の光励起後に寿命の短

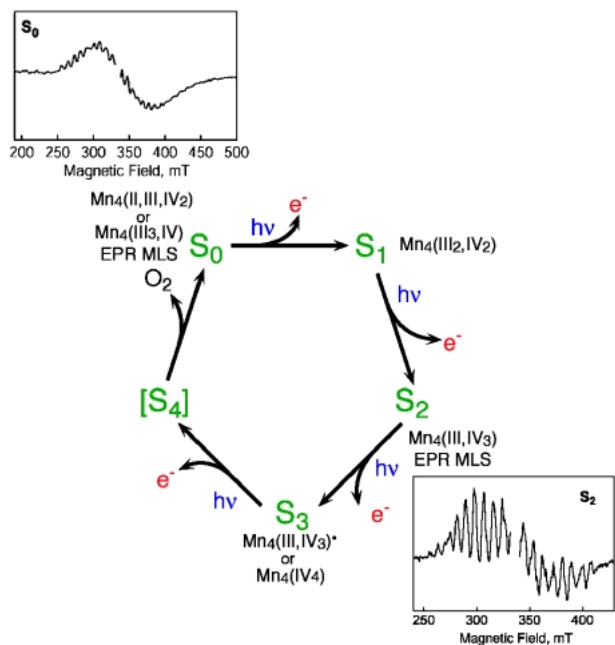


Fig. 2 The S-state cycle and the proposed oxidation states of the Mn cluster in the S-states. The multiline EPR signals for the S₀ and S₂ states are also shown.

いS₄状態を経て1酸素分子を遊離した後、S₀状態へ戻る。酸化状態変化に伴い、Fig. 2に示すようにS₀とS₂状態はスピンS=1/2に対応するMnのEPR (Electron Paramagnetic Resonance) multiline シグナル⁶⁻¹⁰、S₁およびS₃状態ではS=1に相当するparallel polarization EPRシグナルが観測される¹¹⁻¹⁴。これまでのEPR、X線吸収法を用いた研究から、S₀→S₁、S₁→S₂過程ではMnイオンが酸化され、その形式的な酸化状態はS₁がMn(III)₂Mn(IV)₂ (3価のMn 2つと4価のMn 2つ)、S₂がMn(III)(IV)₃ (3価のMn 1つと4価のMn 3つ)であることが現在ほぼ共通の認識として通っている¹。一方で、S₀とS₃状態においてはFig. 2に示した通り未だ議論が分かれる。S₀状態では、2価のMnが存在するかどうか⁹、S₂→S₃転移過程ではMnが酸化される可能性と、Mnイオン以外のリガンドから主として1電子がはじき出される可能性とが示唆されている¹⁵⁻¹⁸。このような酸化状態変化の詳細を理解することは、Mn₄Caクラスターを介して起こる水分解反応の化学過程を知る上で重要である¹⁹。

筆者らのグループは、様々なX線分光法を用いてMn₄Caクラスターの構造と機能解明に関する研究を行っている。本寄稿では、Mn₄Caクラスターの酸化状態変化に関する研究に焦点を絞り、これまでに我々のグループで行ったXANES、Kβ発光スペクトル法、および共鳴非弾性X線散乱法に関する研究結果をまとめる。

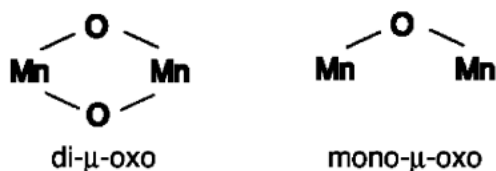
2. Mn₄Ca クラスターの構造

前述の通り、本稿では酸化状態変化に焦点を当てるが、

分子構造変化と酸化状態変化は言うまでもなく密接に関連している。従って、Mn₄Caクラスターの構造に関してこれまでわかっていることを以下に簡単にまとめる。

光合成系II酸素発生複合体の立体構造はいくつかのグループによって報告されており、その複雑な構造と機能が明らかになりつつある。しかし触媒を担うMn₄Caクラスターの構造に関しては、未だ分解能が低い点と(～3.0 Å)²⁻⁵、Mn₄Caクラスターが非常にX線損傷を受けやすい理由からその活性型構造は今だ議論的である。結晶構造解析に必要な高強度のX線照射条件においては、Mnの酸化状態の変化および構造変化が起こることが最近の研究で示されている²⁰。

Mn₄Ca錯体の構造を知る別の手法として、EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) が用いられている。これまでのEXAFS研究からいくつかのMn₄Caクラスターモデルが提案されており、これらは基本的に4つのMn間が以下のようなdi-μ-あるいはmono-μ-oxo架橋でつながった構造をもつ。



そして基質水分子はMnイオンに配位した状態をとると考えられている。

PSIIのMn EXAFS測定においては、従来EXAFSの分解能に限界があった。これは、PSIIのようにその分子中にMnと周期律表で隣り合うFeを合わせ持ったサンプルのEXAFS測定では、Feからの吸収の寄与により測定可能なEXAFSエネルギー領域が限られるためである。最近我々のグループでは高分解能分光器を用いてFeからの吸収の寄与を取り除き、より高エネルギー領域までのEXAFS測定を行うことによってPSII Mn EXAFSの距離分解能の改善を図った²⁰。このRange-extended EXAFS測定からは、3つのdi-μ-oxo構造をもつクラスター構造を支持するデータが得られている。さらに、PSII S₁状態の単結晶を用いてEXAFSの偏光特性からMn₄Caクラスターモデルの構築を試みた。こうして得られたモデルと結晶構造解析で得られているアミノ酸側鎖の情報をもとにMn₄Caクラスターのリガンド環境下における構造を得た²¹。一連の研究から得られたMn₄Caクラスターの化学構造モデルをFig. 1に示す。

現在、同様の手法を用いて他のS状態の構造についても研究を進めているが、これまでのEXAFS研究からはS₁およびS₂状態は非常に類似した構造をもつこと、そしてS₃およびS₀状態ではdi-μ-oxo結合距離が大幅に変わるような構造変化が起きることが示唆されている^{22,23}。

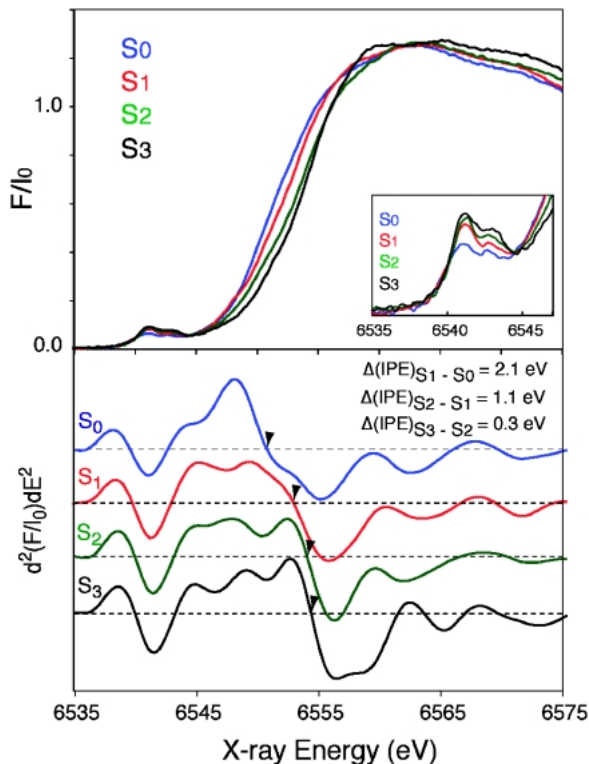


Fig. 3 The Mn K-edge spectra and their 2nd derivative spectra of spinach PSII, from the S₀ through S₃ state¹⁸. The magnitude of the inflection point energy shift for S₀ to S₁ (2.1 eV) and S₁ and S₂ (1.1 eV) is much larger than the shift for the S₂ to S₃ transition (0.3 eV). The pre-edge spectra (1s to 3d transition) from the S-states are enlarged and shown below the Mn K-edge spectra.

3. Mn XANES

Mn の 1s から 4p 軌道への遷移に対応する K main-edge エネルギーは、PSII Mn₄Ca クラスターの酸化還元状態の変化の指標としてしばしば用いられてきた。**Fig. 3** に各 S 状態の XANES スペクトルとその 2 次微分曲線を示す¹⁸。様々な Mn モデル化合物の研究から、Mn が 1 電子酸化される場合、類似したリガンド環境下では 2 次微分曲線のゼロ点交差エネルギー値 (IPE, Inflection Point Energy) は 1~2 eV 程度高エネルギー側にシフトすることが知られている。PSII の場合、S₀→S₁ および S₁→S₂ 転移過程で IPE はそれぞれ 2.1 eV, 1.1 eV ほど高エネルギー側にシフトする。従って、これらの過程では Mn の酸化状態が変化することが裏付けられる (Mn-centered oxidation)。一方 S₂ から S₃ 状態へ移行する過程においては、IPE シフトはわずか 0.3 eV と小さい。PSII の S 状態サイクルにおいて大幅なりガンド環境の変化がないものと仮定すると、S₂ から S₃ 状態転移においては Mn の酸化は起きていないのではないかと考えられる。つまり、他の過程とは化学的に性質の異なる変化が起きていることを示唆している。しかしながら 1s から 4p 軌道への遷移であ

る K main edge は、Mn の酸化状態だけでなく、例えばリガンド 3p 軌道との相互作用によってリガンド環境、構造変化等の様々な要素に大きく影響をうける。従って、そのエネルギー位置を一概に酸化状態変化の有無と結びつけることはできない。

一方で、K main edge の低エネルギー側 (~6540e 付近) に現れる弱い Mn pre-edge (1s→3d 遷移) スペクトルは 1s 軌道から lowest unoccupied 3d 軌道への遷移による。このため Mn 近傍のより局所的な電子構造を反映しており、酸化状態変化のより明確な指標となりうる。pre-edge ピークは電気四重極遷移に相当するため本来強度が非常に弱い、リガンド環境の中心対称性が歪んだ場合 (例えば八面体型から四面体型への変化)、金属の 4p 軌道と 3d 軌道の混成により強度が増すことが知られている。**Fig. 3** にみられるように、PSII の場合、S₀ から S₃ への転移においてピーク強度はわずかに増加するこれらのスペクトル形状変化、ひいてはリガンド環境変化を理解するにはモデル構造に基づいた DFT 計算がさらに必要である。

4. Kβ emission spectroscopy

Fig. 4(a) にいくつかの蛍光 X 線放出のダイアグラムを示す。Kα スペクトルは 2p から 1s への緩和に伴う発光によるのに対し、Kβ スペクトルは 3p 電子の 1s 軌道への緩和 (遷移) に相当する。従って、Kα スペクトルの形状はスピン軌道相互作用を受けた内殻 2p 電子の状態を反映するのに対して、Kβ スペクトルは外殻電子の状態を反映する。それゆえ、Kα 線に比べてスピン状態の違い、つまり不對 3d 電子密度をより敏感に反映する。Mn のような 3d 遷移金属の Kβ スペクトルでは、Kβ_{1,3} 主線の低エネルギー側に不對 3d 電子と 3p 正孔の交換相互作用に伴う Kβ' 線が観測される。この交換相互作用の大きさは 3d と 3p 軌道の不對電子の数に依存する。従って、Kβ スペクトルは前述の XANES とは異なった理由で Mn の酸化状態変化の指標となりうる。簡略化して述べると、Kβ_{1,3} が 3d と 3p 不對電子間の “constructive” (同方向) なスピン交換作用であるのに対して Kβ' 線は “destructive” (逆方向) な交換作用といえる (**Fig. 4(b)**)。

Mn の酸化状態と Kβ 発光スペクトルとの関係を示すため、**Fig. 5** に 2 価から 4 価の Mn 酸化物 (Mn(IV)O₂, Mn₂(III)O₃, および Mn(II)O) の Kβ 発光スペクトルを示す。Kβ' と Kβ_{1,3} ピークはそれぞれ 6475 と 6490 eV 付近に現れる²⁴。これら 2 つのピークのエネルギー間隔は 3p から 1s への発光遷移の終状態における不對 3d 電子と 3p 正孔との交換相互作用によって決まる。Mn の酸化状態が 2 価、3 価、4 価と増加するにつれて 3p 正孔と相互作用可能な不對 3d 電子数が減少する。結果として、3p-3d スピン交換相互作用が小さくなり、Kβ_{1,3} 遷移は高エネルギー側へ、Kβ' 遷移は低エネルギー側へシフトするため、Kβ'

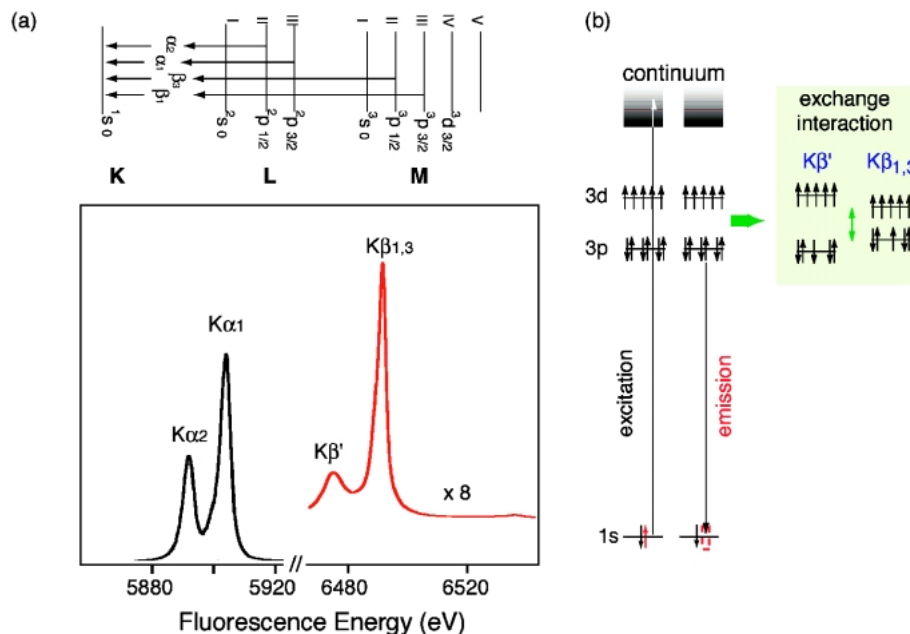


Fig. 4 (a) X-ray K-emission from the 2p levels ($^2p_{3/2}$ and $^2p_{1/2}$), known as $K\alpha_1$ and $K\alpha_2$ emission, and from the 3p levels ($^3p_{3/2}$ and $^3p_{1/2}$) known as $K\beta_1$ and $K\beta_3$ emission. The $K\beta$ lines are approximately 1/8 as intense as the $K\alpha$ lines. (b) The electronic states and the transitions for Mn $K\beta$ XES. On the right is the exchange interaction between the 3p and 3d levels that gives rise to the $K\beta_{1,3}$ and $K\beta'$ states.

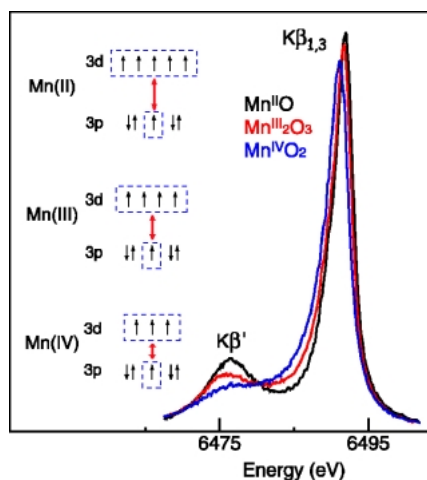


Fig. 5 The Mn $K\beta$ emission spectra of Mn oxides in formal oxidation states, II, III and IV (adapted from ref.¹⁸). The exchange coupling for each of oxidation states II, III and IV, showing how the splitting between the $K\beta_{1,3}$ and $K\beta'$ depends on the number of unpaired 3d electrons. The increase in splitting increases as the number of unpaired electrons in the 3d states increases. This has the effect of the more intense $K\beta_{1,3}$ peak being at a higher energy for lower oxidation states of Mn.

- $K\beta_{1,3}$ ピーク間の分離幅は狭くなる。

4p 軌道と比較して、3p 軌道はリガンドの軌道との重なりが小さい。このため、 $K\beta$ 発光スペクトルは XANES (1s から 4p 軌道への遷移) と比較するとリガンド環境にそれほど敏感ではないといえる。 $K\beta_{1,3}$ 遷移はその緩和過

程の違いにより $K\beta'$ 遷移よりも分解能が高いことから、以下では $K\beta_{1,3}$ ピークを指標として PSII の Mn サイトの酸化状態を議論する。

Fig. 6 に PSII の S_0 から S_3 状態の $K\beta$ スペクトルと、その差スペクトルを示す¹⁸⁾。PSII では各 S 状態転移において、最大でも、4つの Mn のうちのただ1つの Mn が酸化される。このため、各 S 状態間で観察されるピークシフトは Mn 酸化物の変化と比較すると明らかに小さい。しかし差スペクトルにみられる変化は明らかで、 S_0 から S_1 , S_1 から S_2 状態への転移で見られる差スペクトルの形状は $K\beta_{1,3}$ ピークが低エネルギー側へシフトしていることを示している。逆に S_3 から S_0 転移においては高エネルギー側へのシフトを示し、系が元の酸化状態に還元されていることを示す。これらの状態間のスペクトル変化と比較すると、 S_2 から S_3 への転移に伴うピークシフトは明確ではない。言い換えれば、Mn の電荷密度変化 (形式的な表記である“酸化数変化”あるいは“電子数変化”と厳密に区別するため“電荷密度変化”を用いた) は他の S 状態間の変化と比較するとごく小さいといえる。

$K\beta$ 発光スペクトルの S 転移に伴う変化を XANES スペクトル (IPE 値) の変化とともに **Fig. 7** にまとめた。横軸はレーザー照射数を表しており、暗状態である S_1 (0 flash) からスタートして各レーザー照射ごとに次の S 状態への転移が進行する (**Fig. 2** 参照)。 $K\beta$ スペクトルの変化に関しては、ピークトップのエネルギー値ではなく以下の式から導いた 1 次モーメントの値を用いた。つまり、小さな変化を正確に求めるため $K\beta_{1,3}$ ピーク全体の統計を

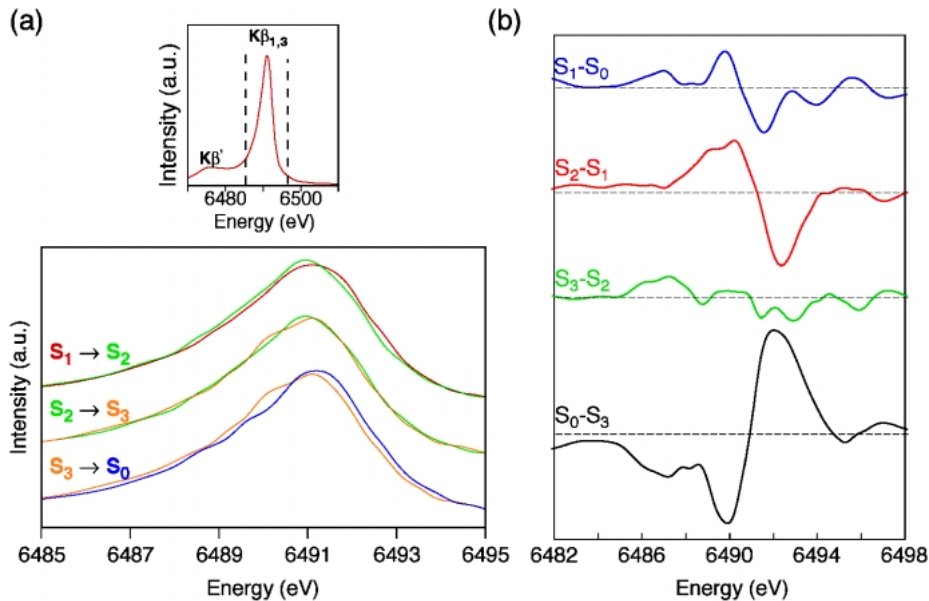


Fig. 6 (a) The Mn K β emission spectra of the spinach PS II S states and (b) their difference spectra. The difference spectra between the S₁ and S₀, S₂ and S₁ states, and S₀ and S₃ are derivative shaped, indicating that the spectral peaks shift in energy. The derivative shape for the S₁ and S₀, S₂ and S₁ is the reverse of that for the S₀ and S₃ indicating oxidation in the first two cases and reduction for the latter case. The difference spectrum between the S₃ and S₂ states shows the lack of such a derivative shape, indicating the similarities of the S₂ and S₃ state spectra and lack of a predominantly metal-centered oxidation during the S₂ to S₃ transition. The figure was adapted from ref.¹⁸⁾.

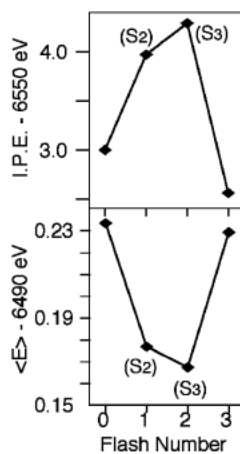


Fig. 7 (top) Oscillation of XANES inflection point energies (I.P.E.) and (bottom) first moments (E) of the K β emission spectra from the 0 flash to 3 flash samples. The figure was adapted from ref.¹⁸⁾.

考慮している。

$$1^{\text{st}} \text{ モーメント} = \frac{\sum E_j I_j}{\sum I_j} \quad (3)$$

E_j と I_j は、それぞれ j 番目のデータポイントのエネルギーと蛍光強度に相当する。図に見られるように、XANES, K β スペクトルともに 1 flash (S₂) から 2 flash (S₃) 間のスペクトル変化は他の状態間の変化と比較して小さい。つまり、Mn の明確な酸化状態変化は起きていな

いと見える。

ここで注意しなければならないのは、結合状態、つまりリガンド環境が変わるような構造変化を伴う転移の場合、構造変化によっておこるスペクトル形状変化のために K β スペクトルのシフトが見かけ上、隠されてしまう可能性があるかどうかということである。K β スペクトルの詳細な解釈にはスピナー軌道分裂、結晶場分裂、Jahn-Teller 効果、Mn 原子間のスピナースピナー相互作用などを考慮する必要がある。つまり、3p 軌道からの情報である K β スペクトルにおいてもリガンド環境下の影響を無視することはできないことになる。

そこで、K β スペクトルにおいてどの程度リガンドの影響が見られるかを確認するため、構造の異なる 2 種類の Mn モデル化合物 (trimer 型および butterfly 型) の K β スペクトルと XANES スペクトルを比較した (Fig. 8)²⁵⁾。まず、XANES スペクトルにおいて酸化状態変化は IPE シフトに明確に現れており、Mn₃O で 1.64 eV, Mn₄O₂ で 2.2 eV ほどシフトする。しかしながら、そのシフトの大きさと XANES スペクトルの形状は各化合物とその酸化状態に独特であり、情報量が多い分、Mn₄Ca クラスターのような構造の不明確な化合物の酸化状態変化と直接結びつけるのには更なる根拠が必要である。これに対して、K β スペクトルの形状は分子の骨格構造およびリガンド環境の違いをそれほど反映しない。そして K β エネルギーシフトの割合は Mn₃O で 0.12 eV (1Mn oxidation/3Mn), Mn₄O₂ で 0.09 eV (1Mn oxidation/4Mn) と、2 つの異なる

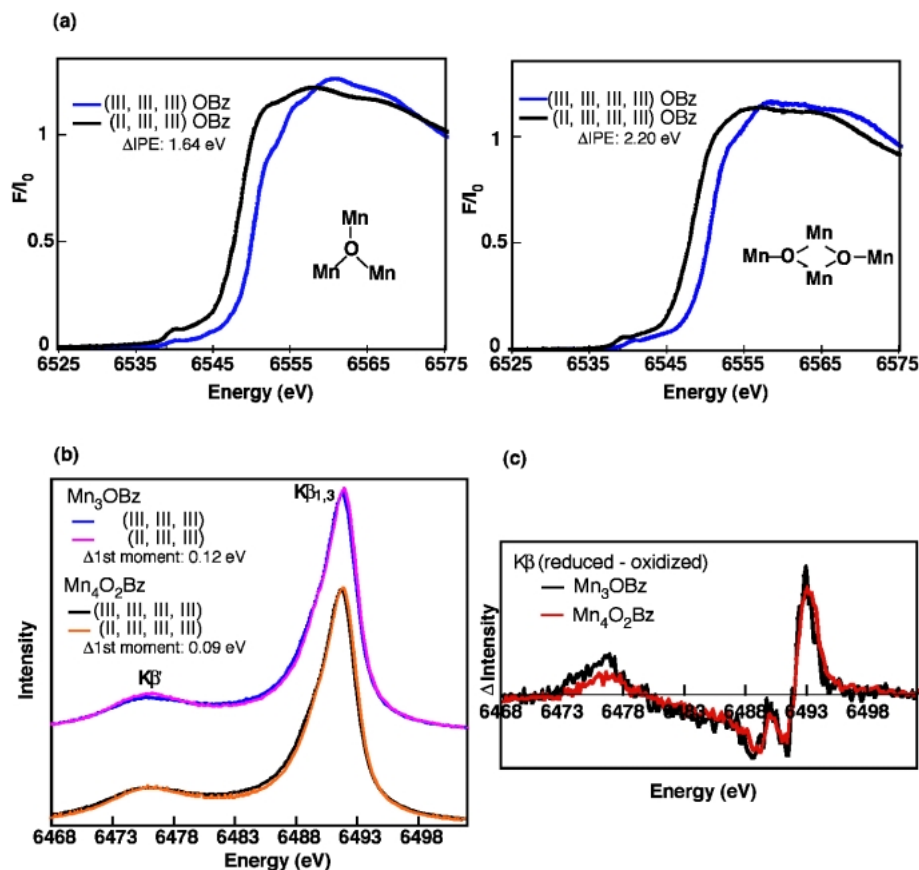


Fig. 8 (a) Mn K-edge XANES of Mn₃O (trimers, [Mn(III, III, III)₃O(O₂Cph)₆(ImH)₃](ClO₄)₂(NBu₄) and [Mn(II, III, III)₃O(O₂Cph)₆(py)₂(H₂O)]0.5CH₃CN) and Mn₄O₂ (butterflies, [Mn₄(III, III, III, III)O₂(O₂Cph)₇(bipy)₂](ClO₄) and [Mn₄(II, III, III, III)O₂(O₂Cph)₇(bipy)₂]) compounds. b) Kβ X-ray emission spectra (XES) for the Mn₃O and Mn₄O₂, and c) Kβ XES difference spectra, the reduced minus oxidized species in each set of compounds. The figure was adapted from ref.³⁰.

化合物で同程度である。これらの結果は、Kβ スペクトルが XANES と比較してリガンド環境よりはむしろ酸化状態により敏感であることを示唆している。

5. 共鳴非弾性 X 線散乱法 (RIXS)

PSII における Mn クラスターのより詳細な電子構造を調べるため、共鳴非弾性 X 線散乱法 (Resonant Inelastic X-ray scattering, 以下 RIXS) を用いた^{26,27}。Fig. 9(a) に 1s2p RIXS のダイアグラムを K-edge, L-edge spectroscopy との比較とともに示す。実験では Mn の 1s から 3d 軌道への吸収に続く 2p から 1s への緩和過程の、2 次光学過程を利用する (中間状態と終状態の空孔の軌道 (1s と 2p) を示すうえで 1s2pRIXS と呼ばれる)。Fig. 9(b) の概略図に示すように、入射光 X 線 (6535–6575 eV 領域) によって励起 (1s→3d) された Mn からの発光 X 線は Roland 円上に配置した 5 つの結晶アナライザー (Ge (333)) によって Ge 検出器に集光される。1s2pRIXS において、始状態から中間状態への電子配置の変化は K-edge spectroscopy の pre-edge スペクトルのそれと一致

し、終状態と始状態との差は L-edge spectroscopy の過程と類似する。L-edge spectroscopy は 2p–3d 多重項相互作用のため遷移金属のスピン状態に非常に敏感である。従って、RIXS においてもスペクトルは Mn の電荷密度だけでなく、そのスピン状態にも敏感であるといえる。

RIXS は、これまでに無機材料の研究にしばしば用いられているが、生物試料に応用された例はまだ数少ない。生物試料は一般的に試料が希薄であるため、強度の弱い 2 次光学過程を用いる RIXS の測定には多くの積算を必要とする。しかし、それにまして、以下に述べるようないくつかの利点があげられる。PSII のように水を多く含む生物試料の場合、Mn のような 3d 遷移金属の L-edge spectroscopy では低エネルギー領域での著しい X 線吸収のため試料の X 線損傷が著しく、測定は非常に困難である。加えて、L-edge 測定は低エネルギー X 線の空気による吸収を避けるため高真空状態で行う必要がある。これに対して、RIXS は L-edge に類似した情報を得ることができるが、その励起エネルギーは硬 X 線領域であるためサンプルの X 線損傷は K-edge spectroscopy に等しい。さらに大気圧下で測定を行うことが可能である。最近の放射光源

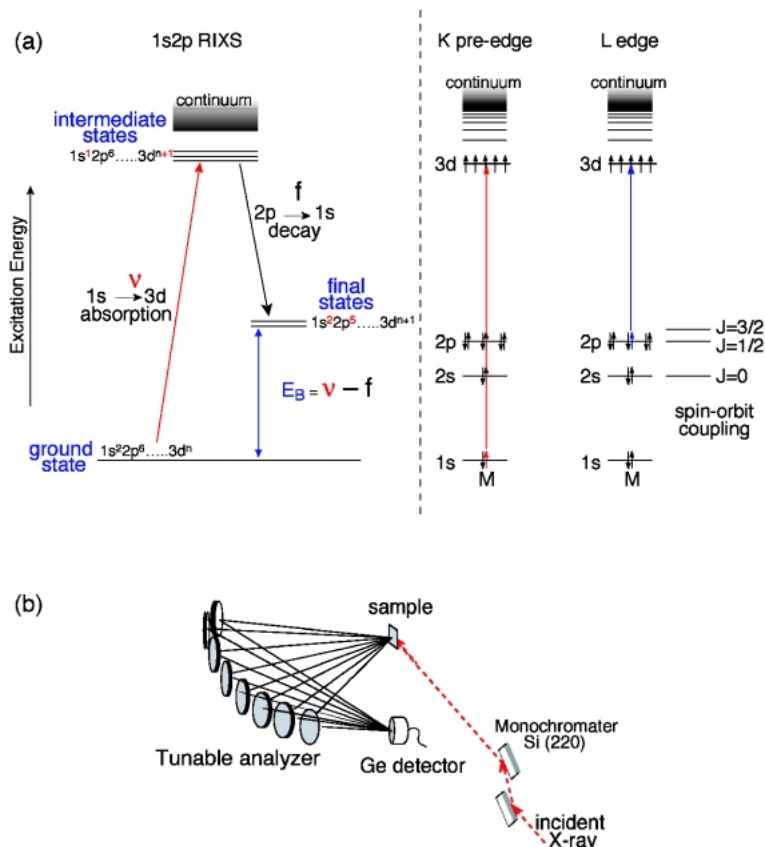


Fig. 9 (a) The energy level diagram for the RIXS experiment. The energy level diagrams for the K-preedge (1s to 3d) and L-edge (2p to 3d) absorption spectra are also shown on the right. In RIXS, the excitation is from a 1s to 3d level, and the emission detected is from a 2p to 1s level. The difference in the energy between the intermediate and final states is equivalent to the L-edge energy levels. Thus by using K-edge X-ray energies one can collect L-edge-like (2p to 3d) spectra. (b) The experimental setup used for the $K\beta$ emission experiments where the excitation energy is fixed and the emission spectrometer is scanned through the $K\beta$ (3p to 1s) emission energies. In RIXS, which is two-dimensional spectroscopy, the excitation energy is scanned (1s to 3d) using the beamline monochromator and the emission energy is scanned across the $K\alpha$ lines (2p to 1s). Both monochromator and analyzer have ~ 1 eV bandwidth.

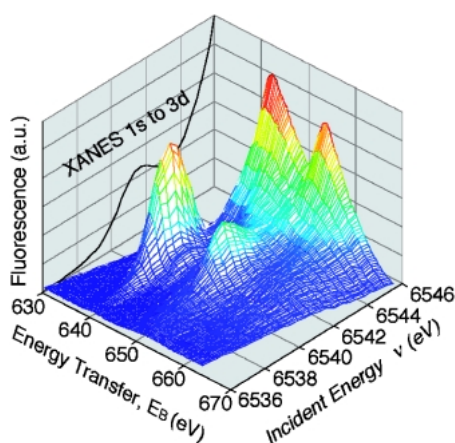


Fig. 10 A three-dimensional plot showing the Mn(II)O resonant inelastic X-ray spectrum. Abscissa is the excitation energy across the 1s-3d energy range of the spectrum. The 1s-3d K-edge fluorescence excitation spectrum is plotted in the back of the three dimensional spectrum for reference. Ordinate is the difference between the excitation and emission energy. The figure was adapted from ref.²⁸.

の進歩によって、希薄な生物試料 ~ 400 ppm (PSII におけるおよそ Mn 濃度) であっても複数の結晶アナライザーを利用することによって半日程度の積算である程度の signal to noise データが得られる。

RIXS スペクトルは **Fig. 10** に示すような 3 次元プロットとして表すことができる。例として Mn(II)O のスペクトルを示す。3 次元プロットでは、X 軸が入射光エネルギー、Y 軸が始状態と終状態とのエネルギー差 (transfer energy 軸)、Z 軸が蛍光 X 線強度に相当する。横軸に入射高エネルギーをとってスペクトル強度を energy transfer 軸方向に積算すると、K pre-edge に相当するスペクトルが得られる (CET, constant energy transfer plot)。また、横軸に energy transfer 軸をとって入射光エネルギー軸方向に強度を積算すると、L-edge スペクトルに類似したデータが得られる (CIE, constant incident energy plot)。

まず、**Fig. 11** に一連の Mn モデル化合物 (酸化物と配位化合物) の RIXS スペクトル (等高線プロット) を示

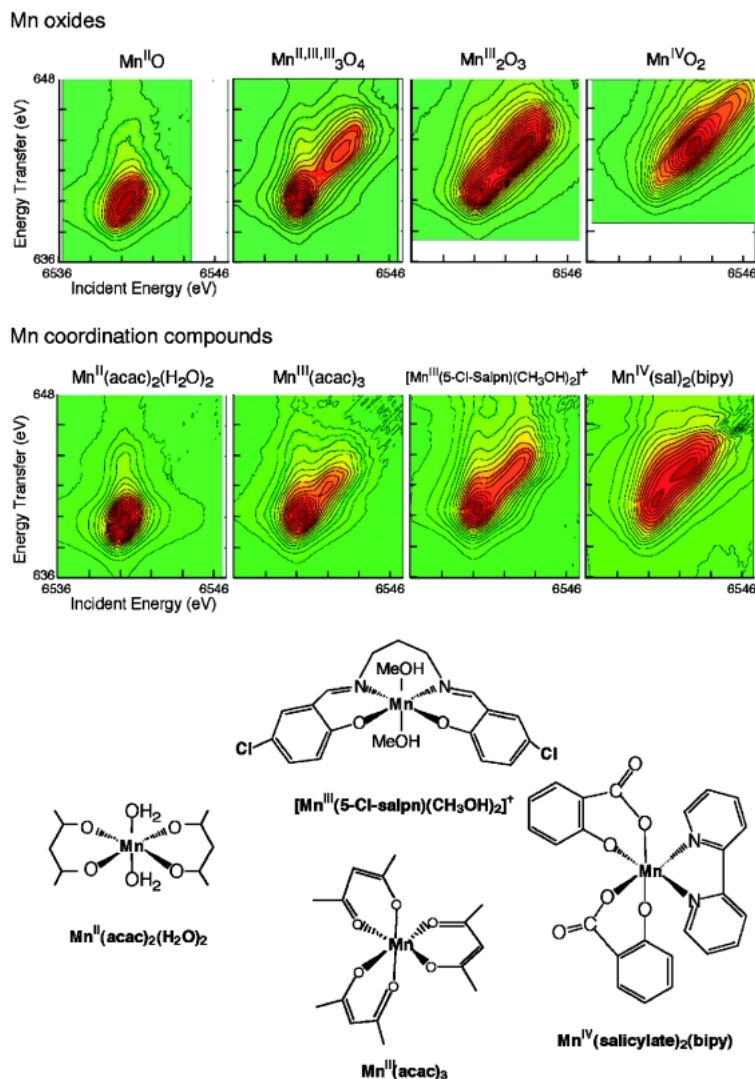


Fig. 11 Contour plots of the $1s2p_{3/2}$ RIXS planes for four Mn oxides (top) in oxidation states II, III and IV and the four coordination complexes (middle) $\text{Mn}^{\text{II}}(\text{acac})_2(\text{H}_2\text{O})_2$, $\text{Mn}^{\text{III}}(\text{acac})_3$, $[\text{Mn}^{\text{III}}(5\text{-Cl-salpn})(\text{CH}_3\text{OH})_2]^+$ and $\text{Mn}^{\text{IV}}(\text{sal})_2(\text{bipy})$. Abscissa is the excitation energy and ordinate is the energy transfer axis. The figure was adapted from ref.²⁸⁾. The chemical structures of the coordination complexes are shown in the bottom.

す^{28,29)}。Mn 配位化合物は、いずれも Mn の周囲に 6 個のリガンドを持つ。Mn(II)O のスペクトルには、6540 eV に中心をもつブロードなピークが観察される。このピークは Mn3d の t_{2g} と e_g 軌道間の結晶場分裂によって説明される。より酸化状態の高い Mn においては、主に 2 つのブロードなピークが観察されるが (6540, 6543 eV)、これらは (3d, 3d) 多重項相互作用 (電子-電子間の相互作用) による。酸化物よりも配位化合物の方が (3d, 3d) 相互作用が小さい分、これら 2 つのピークの間隔も狭くなる傾向を示す。

PSII の S_1 と S_2 の RIXS スペクトルにおいては、Mn(III) と Mn(IV) 化合物の特徴である 2 つのメインピークが観測される (Fig. 12 (a))。比較のため S_1 と S_2 状態の CIE, CET プロットを Mn 配位化合物のスペクトルとともに Fig. 12 (b) に示す。PSII の場合、6541 eV 付近の低エ

ネルギーピークはモデル化合物よりもよりブロードで、2 つのピークの境界がはっきりしない。これは、PSII においてはリガンド環境と酸化状態の異なる 4 つの Mn が存在するためである。

Mn モデル化合物および PSII S_1 , S_2 状態の RIXS スペクトルの 1 次モーメントエネルギーを Fig. 13 に示す。入射光エネルギー軸、energy transfer 軸それぞれの 1 次モーメント変化は $K\beta$ 発光スペクトル解析と同様に式 (3) を用いて求めた。一連の Mn 酸化物の場合、入射光エネルギーにそった 1 次モーメントの値は Mn の酸化状態の変化とともに増加する。つまり、Mn3d 上の電荷密度の増加を反映している。一方 energy transfer 方向の変化の解釈は、終状態相互作用による影響を受けるためより複雑である。これは 2p, 3d 電子間相互作用、つまりパラレルなスピン間の交換エネルギーに依存する。Fig. 13 (a) におい

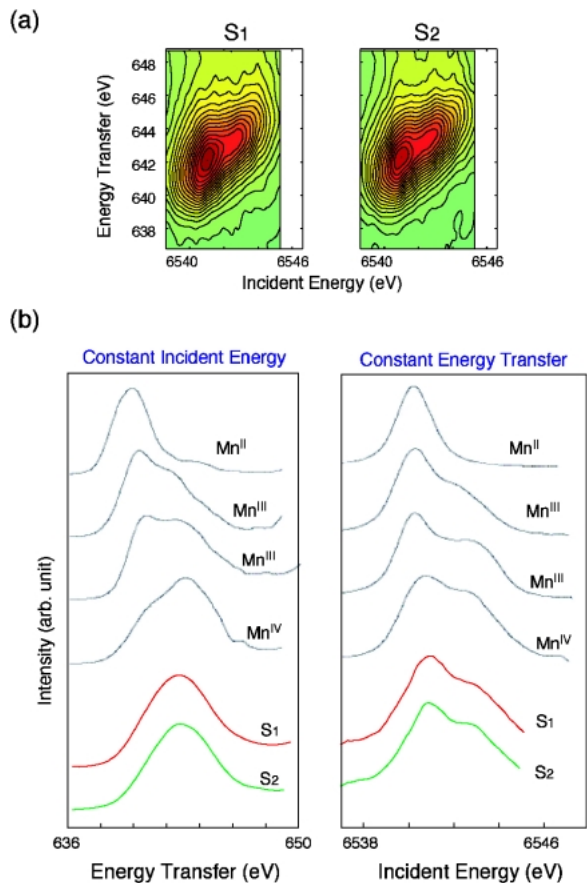


Fig. 12 (a) Contour plots of the $1s2p_{3/2}$ RIXS planes for PSII S_1 and S_2 states, and (b) line plots extracted from the RIXS planes for the four coordination complexes and the S_1 and S_2 states of PS II. The line plots were obtained by integrating the spectral intensity along the incident energy (constant energy transfer (CET) plot) or along the energy transfer axis (constant incident energy (CIE) plot).

て、Mn 酸化物の 1 次モーメントシフトは形式的な酸化数変化に伴い直線的に変化している。これは、有効 3d 電子数が直接 3d 電子 (スピン) 数に対応することを意味する。

一方、Mn 配位化合物の 1 次モーメントは一連の Mn 酸化物のものと比較してより低エネルギー側へシフトしている。つまり、Mn 上の有効 3d 電荷密度は小さく、Mn 配位化合物はより強い共有結合性をもつことを示唆している。別の言い方をすると、酸化状態変化あたりの電荷密度変化は酸化物において大きく、共有結合性の高い化合物で小さくなる。さらに **Fig. 13 (b)** に見られるように、同じ Mn(III) 配位化合物であっても 1 次モーメントの値は大きく異なる。Mn(III) (Cl-salp) はより高エネルギー側にピークをもつが、これはこの化合物がカウンターイオン (non-coordinated ion) を 1 個もっているためと解釈できる²⁸⁾。カウンターイオンをもつことによって形式的な酸化状態よりも実際には“より酸化した”状態であるといえる。それゆえ、Mn(III) (Cl-salp) 化合物の 1 次モーメントは Mn

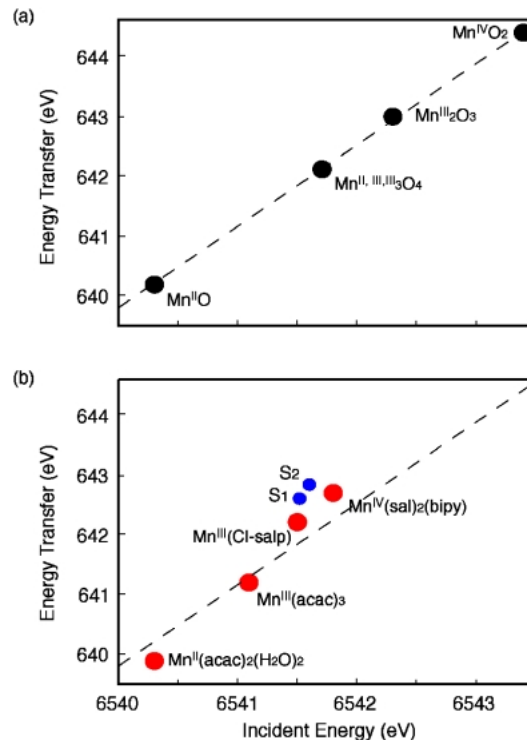


Fig. 13 First moment positions in the $1s2p_{3/2}$ RIXS plane for (a) the Mn oxides and (b) the coordination complexes and PS II S_1 and S_2 states. A linear fit for the Mn oxides is shown as a dotted line in both (a) and (b). Along the incident energy axis the plot gives an ordering of the systems in terms of the effective number of 3d electrons. The figure was adapted from²⁸⁾.

(III) $(acac)_3$ は Mn(IV) $(sal)_2(bipy)$ と Mn(III) $(acac)_3$ の中間に位置する。このことは、1 次モーメント解析が Mn の有効電子数を反映することを証明している。ひいては、酸化数は非常に形式的なものであり、酸化状態変化を議論するには有効 3d 電荷密度を知る必要があることを示している。

PSII の一次モーメントは Mn(IV) と Mn(III) 配位化合物の中間付近に位置し、EPR や XANES による結果からもわかるように S_1 および S_2 状態が Mn(III)Mn(IV) の混ざった酸化状態であることを証明している。 S_1 と S_2 間の酸化状態変化に伴うスペクトル変化は非常に小さい。これは前述の通り、4 つあるうちの最大でも 1 つの Mn の酸化状態変化を反映するためである。 S_1 、 S_2 間の 1 次モーメント変化は Mn(III) $(acac)_3$ 、Mn(IV) $(sal)_2(bipy)$ 間の変化の $1/7$ – $1/8$ 程度、Mn(III) (Cl-salp) と Mn(IV) $(sal)_2(bipy)$ 間の変化と比較すると $1/3$ 程度である。一方で、Mn イオンあたりの変化に換算すると、 S_1 と S_2 間の変化は Mn(III) $(acac)_3$ 、Mn(IV) $(sal)_2(bipy)$ 間の変化にほぼ等しい。

上記の結果から、我々は PSII の S_1 から S_2 への転移過程で Mn_4Ca クラスタから抽出される電子はかなり非局在化しており、つまり Mn_4Ca クラスタは強い共有結合

性をもった電子構造をとると結論づけた。現在 S₀ および S₃ 状態の RIXS 測定が進行中である。しかし残念ながら、現時点で Mn₄Ca クラスターのような多核で、しかも構造のはっきりと定まっていない化合物の RIXS スペクトルの詳細を理論的に議論することは困難である。今後、さらに様々な Mn モデル化合物の結果に基づいた解析が必要不可欠である。

6. まとめと今後の展望

本稿に述べたように、我々は様々な X 線分光法を用いて Mn₄Ca クラスターの酸化状態変化に関する研究を行っている。ここでふれた 3 つの分光法, XANES, K β 発光スペクトルの結果, そして 1s2p RIXS の予備実験においても, S₂, S₃ 間の酸化状態変化の特異性を示す結果が得られている。つまり, S₀→S₁, S₁→S₂ においては Mn3d 軌道上の電荷密度変化を伴う酸化状態変化が起きるのに対して, S₂→S₃ 間の変化は明確ではない。これが Mn を中心とした酸化状態変化でないとすると, 考えられるのはリガンドの酸化である。しかし酸化数に関する議論はあくまでも形式的なもので, 電子が大きく非局在化しているクラスターの場合, 実際 1 つの電子を 1 つの原子に帰属することは妥当ではない。金属タンパク質の触媒中心のようなアミノ酸側鎖もふまえてリガンド環境が, 無機化合物だけでは得られない複雑でしかも安定な触媒機能を造りだしているといえる。

PSII のより詳細な電子構造に関しては, 単結晶 EX-AFS から提案されているクラスター構造をもとに今後理論解析を行う予定である。さらに, 1s3p RIXS 測定を行うことによって, 先に述べた K β emission spectroscopy でみられるような 3d-3p 相互作用により敏感な, つまりスピン状態をより反映した情報が得られることが期待される。

謝辞

本研究は DOE (Director, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences, Contract: DE-AC02-05CH11231), NIH (National Institute of Health, GM 55302) によって支援されています。共同研究者である Drs. John Robblee, Johannes Messinger, Uwe Bergmann, Pieter Glatzel, Henk Visser, Carmen Fernandez, Shelly Pizarro, Elodie Anxolabehere-Mallart, Wen Liang, Theo Roelofs, Yulia Pushkar, Stephen Cramer, Kenneth Sauer に感謝いたします。放射光施設は Stanford Synchrotron Radiation Laboratory (SSRL), Advanced Photon Source (APS), および Advanced Light Source (ALS) の共同利用実験課題として行われました。

参考文献

- 1) *Photosystem II: The Light-Driven Water: Plastoquinone Oxidoreductase; Vol.*, edited by T. Wydrzynski and S. Satoh (Springer, Dordrecht, 2005).
- 2) A. Zouni, R. Jordan, E. Schlodder, P. Fromme and H. T. Witt: *Biochim. Biophys. Acta* **1457**, 103-105 (2000).
- 3) N. Kamiya and J. R. Shen: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 98-103 (2003).
- 4) K. N. Ferreira, T. M. Iverson, K. Maghlaoui, J. Barber and S. Iwata: *Science* **303**, 1831-1838 (2004).
- 5) B. Loll, J. Kern, W. Saenger, A. Zouni and J. Biesiadka: *Nature* **438**, 1040-1044 (2005).
- 6) G. C. Dismukes and Y. Siderer: *FEBS Lett.* **121**, 78-80 (1980).
- 7) Ö. Hansson and L.-E. Andreasson: *Biochim. Biophys. Acta* **679**, 261-268 (1982).
- 8) J. Messinger, J. H. A. Nugent and M. C. W. Evans: *Biochemistry* **36**, 11055-11060 (1997).
- 9) J. Messinger, J. Robblee, W. O. Yu, K. Sauer, V. K. Yachandra and M. P. Klein: *J. Am. Chem. Soc.* **119**, 11349-11350 (1997).
- 10) K. A. Ahrling, S. Peterson and S. Styring: *Biochemistry* **37**, 8115-8120 (1998).
- 11) S. L. Dexheimer and M. P. Klein: *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 2821-2826 (1992).
- 12) T. Yamauchi, H. Mino, T. Matsukawa, A. Kawamori and T. Ono: *Biochemistry* **36**, 7520-7526 (1997).
- 13) K. A. Campbell, W. Gregor, D. Pham, J. M. Peloquin, R. J. Debus and R. D. Britt: *Biochemistry* **37**, 5039-5045 (1998).
- 14) T. Matsukawa, A. Kawamori and H. Mino: *Spectrochim. Acta, Part A* **55A**, 895-901 (1999).
- 15) S. Styring and A. W. Rutherford: *Biochemistry* **27**, 4915 (1988).
- 16) T. A. Roelofs, M. C. Liang, M. J. Latimer, R. M. Cinco, A. Rompel, J. C. Andrews, K. Sauer, V. K. Yachandra and M. P. Klein: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 3335-3340 (1996).
- 17) L. Iuzzolino, J. Dittmer, W. Dörner, W. Meyer-Klaucke and H. Dau: *Biochemistry* **37**, 17112-17119 (1998).
- 18) J. Messinger, J. H. Robblee, U. Bergmann, C. Fernandez, P. Glatzel, H. Visser, R. M. Cinco, K. L. McFarlane, E. Bellacchio, S. A. Pizarro, S. P. Cramer, K. Sauer, M. P. Klein and V. K. Yachandra: *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 7804-7820 (2001).
- 19) J. Messinger: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 4764-4771 (2004).
- 20) J. Yano, J. Kern, K.-D. Irrgang, M. J. Latimer, U. Bergmann, P. Glatzel, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, K. Sauer, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 12047-12052 (2005).
- 21) J. Yano, J. Kern, K. Sauer, M. J. Latimer, Y. Pushkar, J. Biesiadka, B. Loll, W. Saenger, J. Messinger, A. Zouni and V. K. Yachandra: *Science* **314**, 821-825 (2006).
- 22) W. Liang, T. A. Roelofs, R. M. Cinco, A. Rompel, M. J. Latimer, W. O. Yu, K. Sauer, M. P. Klein and V. K. Yachandra: *J. Am. Chem. Soc.* **122**, 3399-3412 (2000).
- 23) J. H. Robblee, J. Messinger, R. M. Cinco, K. L. McFarlane, C. Fernandez, S. A. Pizarro, K. Sauer and V. K. Yachandra: *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 7459-7471 (2002).
- 24) U. Bergmann, M. M. Grush, C. R. Horne, P. DeMarois, J. E. Penner-Hahn, C. F. Yocum, D. W. Wright, C. E. Dube, W. H. Armstrong, G. Christou, H. J. Eppley and S. P. Cramer: *J. Phys. Chem. B* **102**, 8350-8352 (1998).
- 25) S. A. Pizarro, H. Visser, R. M. Cinco, J. H. Robblee, S. Pal, S. Mukhopadhyay, H. J. Mok, K. Sauer, K. Wieghardt, W. H. Armstrong and V. K. Yachandra: *J. Biol. Inorg. Chem.* **9**,

- 247–255 (2004).
- 26) A. Kotani and S. Shin: *Rev. Mod. Phys.* **73**, 203–246 (2001).
- 27) P. Glatzel and U. Bergmann: *Coord. Chem. Rev.* **249**, 65–95 (2005).
- 28) P. Glatzel, U. Bergmann, J. Yano, H. Visser, J. H. Robblee, W. W. Gu, F. M. F. de Groot, G. Christou, V. L. Pecoraro, S. P. Cramer and V. K. Yachandra: *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9946–9959 (2004).
- 29) P. Glatzel, J. Yano, U. Bergmann, H. Visser, J. H. Robblee, W. W. Gu, F. M. F. de Groot, S. P. Cramer and V. K. Yachandra: *J. Phys. Chem. Solids* **66**, 2163–2167 (2005).
- 30) S. A. Pizarro, P. Glatzel, H. Visser, J. H. Robblee, G. Christou, U. Bergmann and V. K. Yachandra: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **6**, 4864–4870 (2004).

● 著者紹介 ●



矢野淳子

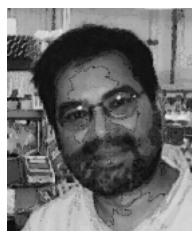
Lawrence Berkeley National Laboratory, Scientist

E-mail: JYano@lbl.gov

専門：放射線科学，振動分光，生物物理化学

【略歴】

1993年広島大学生物圏科学研究科博士課程前期修了，1993年より広島大学生物生産学部助手，1999年大阪大学理学部高分子学科論文博士（理学），2001年Lawrence Berkeley National Laboratory研究員をへて2004年より現職。



Vittal K. Yachandra

Lawrence Berkeley National Laboratory, Senior Scientist

E-mail: VKYachandra@lbl.gov

専門：放射線科学，振動分光，生物物理化学

【略歴】

1977年 Chicago 大学 (M. S. in Chemistry)，1982年 Princeton 大学 (Ph.D. in Chemistry)，1982年より Lawrence Berkeley National Laboratory。

Oxidation State Changes of the Mn₄Ca Cluster in Photosystem II Studied by X-ray Absorption, Emission, and Resonant Inelastic X-ray Scattering Methods

Junko YANO

Physical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA

Vittal K. YACHANDRA

Physical Biosciences Division, Lawrence Berkeley National Laboratory, Berkeley, CA 94720, USA

Abstract A detailed electronic structure of the Mn₄Ca cluster is required before two key questions for understanding the mechanism of photosynthetic water oxidation can be addressed. They are whether all four oxidizing equivalents necessary to oxidize water to O₂ accumulate on the four Mn ions of the OEC, or do some ligand-centered oxidations take place before the formation and release of O₂ during the S₃→[S₄]→S₀ transition, and what are the oxidation state assignments for the Mn during S-state advancement. X-ray absorption and emission spectroscopy of Mn, including the newly introduced resonant inelastic X-ray scattering spectroscopy have been used to address these questions. The present state of understanding of the electronic structure and oxidation states of the Mn₄Ca cluster, in all the S-states, derived from these techniques is described here.