

## 光合作用中氧形成的新机理

朱浩然<sup>1</sup>, 李中焯<sup>1</sup>, 许篷元<sup>2</sup>, 鄢奕昭<sup>1</sup>, 卞江<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> 北京大学化学与分子工程学院, 北京 100871

<sup>2</sup> 北京大学地球与空间科学学院, 北京 100871

**摘要:** 光合作用是地球上最重要的化学反应之一, 但有关光合作用中氧气的形成机理至今尚未得到清晰阐述。Greife等人及Bhowmick等人最新的研究成果揭示了Kok循环中 $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ 的反应细节, 为理解光合作用机理提供了新的证据和视角。

**关键词:** 光合作用; 光合放氧反应; 放氧中心; Kok循环;  $S_4$

**中图分类号:** G64; O6

## New Mechanism of Oxygen Formation in Photosynthesis

Haoran Zhu<sup>1</sup>, Zhongye Li<sup>1</sup>, Pengyuan Xu<sup>2</sup>, Yizhao Yan<sup>1</sup>, Jiang Bian<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Chemistry and Molecular Engineering, Peking University, Beijing 100871, China.

<sup>2</sup> School of Earth and Space Sciences, Peking University, Beijing 100871, China.

**Abstract:** Photosynthesis is one of the most crucial chemical reactions on Earth, yet the exact mechanism of oxygen formation during this process remains unclear. Recent studies by Greife *et al.* and Bhowmick *et al.* revealed specific details about  $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$  in the Kok cycle, providing new evidences and perspectives for our understanding of the mechanism in photosynthesis.

**Key Words:** Photosynthesis; Photosynthetic oxygen evolution; Oxygen-evolving complex (OEC); Kok cycle;  $S_4$

光合作用是地球上至关重要的合成反应之一, 它为人类和其他生物提供了生命所需的大量氧气, 使得这个星球生机勃勃。人们在很早以前便注意到阳光、空气和水对植物生长的影响, 但直到18世纪, 人们才真正发现了光合作用<sup>[1,2]</sup>。随着研究的不断深入, 人们发现, 对于大部分光合生物来说, 光合作用分为两个阶段——光反应阶段和暗反应阶段。其中, 光反应中主要进行水的光解以及腺苷三磷酸(ATP)和还原型辅酶II (NADPH)的合成; 而暗反应则主要进行由 $CO_2$ 向糖类的转变。对上述光反应机理的深入研究有助于寻找简便易行的水裂解制氧途径, 为其他氧形成反应的设计提供新的思路。

生氧光合生物类囊体的薄膜上存在两种光系统PS I和PS II, 其由蛋白质和叶绿素等光合色素组成, 起到吸收、传递、转化光能的作用。PS II上主要进行水的光解和放氧, 释放的电子被传递至PS I将氧化型辅酶II (NADP<sup>+</sup>)还原为NADPH。P680是PS II的反应中心色素。1970年, Kok基于实验结果对光合作用中氧形成途径提出了一种循环的反应机理<sup>[3]</sup>。该机理认为产生氧气的活性中心在五氧化态(依次用 $S_0$ 到 $S_4$ 表示)中不断循环, 并最终在 $S_4 \rightarrow S_0$ 步释放出氧气。这个循环被称为Kok循环

(如图1所示)。但Kok并没能够指出各种S态对应的具体结构，也未能明确指出相应的反应。因此，Kok循环的具体机理成为后续研究的重点。

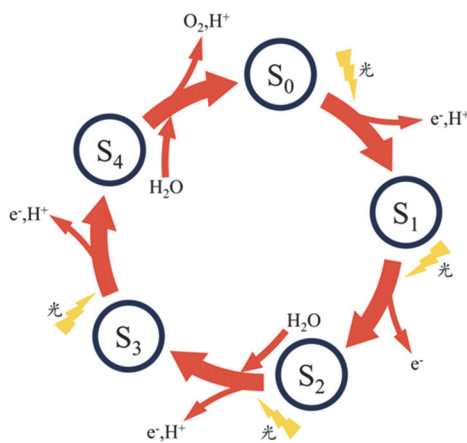


图1 Kok循环示意图

## 1 Kok循环

Kok循环提出后，Sauer等人<sup>[4]</sup>发现PS II中的Mn会发生周期性的价态变化，由此推测Mn参与了Kok循环。后来，进一步确认PS II中活性中心放氧复合物OEC中的Mn<sub>4</sub>Ca簇起到了“S”的作用。在这个循环中，Mn<sub>4</sub>Ca簇的正电荷依次增加，形成[Mn<sub>4</sub>Ca]<sup>4+</sup> (S<sub>4</sub>)。循环中，两个H<sub>2</sub>O分子裂解，最终释放质子和氧气并恢复为[Mn<sub>4</sub>Ca]<sup>0</sup> (S<sub>0</sub>)。进一步的实验观察使得人们对OEC的认识越来越清晰、深入<sup>[5,6]</sup>。2011年，Umena等人<sup>[7]</sup>报道了1.9 Å (1 Å = 0.1 nm)分辨率的PS II晶体结构，揭示了活性中心放氧复合物OEC的分子结构，取得重要的进展<sup>[8]</sup>。图2中展示了PS II的空间结构(图2a)及OEC附近在S<sub>3</sub>和S<sub>0</sub>态下不同的空间结构(图2c, d)。由此，人们基本上确认了光合作用反应中心OEC的分子结构，但对于其在Kok循环中的化学变化还所知甚少。

于是后续的研究工作围绕OEC经历的5个状态(S<sub>0</sub>、S<sub>1</sub>、S<sub>2</sub>、S<sub>3</sub>、S<sub>4</sub>态)<sup>[9,10]</sup>展开。在这五个状态中，S<sub>0</sub>是起始态，S<sub>1</sub>是黑暗稳定态，S<sub>2</sub>和S<sub>3</sub>是高氧化态，这4个状态均可以被捕获并研究，业已取得很多成果<sup>[11-17]</sup>，反映出了OEC在这些状态间相互转化时的结构转变，为深入理解光合反应奠定了基础。与另外4个状态不同，S<sub>4</sub>态为瞬态，难以捕捉，为S<sub>4</sub>态的结构测定制造了障碍。因此，与S<sub>4</sub>态有关的过程S<sub>3</sub> → S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub>没有显著进展。直到2023年，Greife等人<sup>[18]</sup>和Bhowmick等人<sup>[19]</sup>的研究工作为理解这些过程的机理提供了重要线索。

## 2 S<sub>3</sub> → S<sub>4</sub> → S<sub>0</sub>的转变

### 2.1 锰氧复合体结构变化

Bhowmick等人采用了X射线自由电子激光(XFEL)技术测定了光合作用中锰氧复合体的结构变化，阐述了氧气形成的过程。

#### 2.1.1 OEC和Y<sub>2</sub>区域

Bhowmick小组跟踪了OEC数个区域的变化：Y<sub>2</sub>和D1-H190(图3a, b)，O<sub>x</sub>和O5(图3c)，以及水分子配体W1-W4(图3d)，还有连接Mn和Ca的Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>/Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>-O<sub>x</sub>簇的两个羧酸配体(图3e)。

数据表明Y<sub>2</sub>在第一个时间点(50 μs)之前已经被完全氧化(图4)。在约500 μs之后，Y<sub>2</sub>氧化态才开始被Mn<sub>4</sub>CaO<sub>5</sub>-O<sub>x</sub>簇还原，并最终在1200 μs时完成。O<sub>x</sub>的强度变化随着Y<sub>2</sub>氧化态的还原出现，这说明氧氧键的形成出现在500-1200 μs之间。在氧氧键形成的开端(500-730 μs基于观察到的Y<sub>2</sub>和O<sub>x</sub>的变化)和Mn与Mn间距的减小(1200 μs)之间存在延迟，表明在氧气释放之前可能存在水氧化中间体。

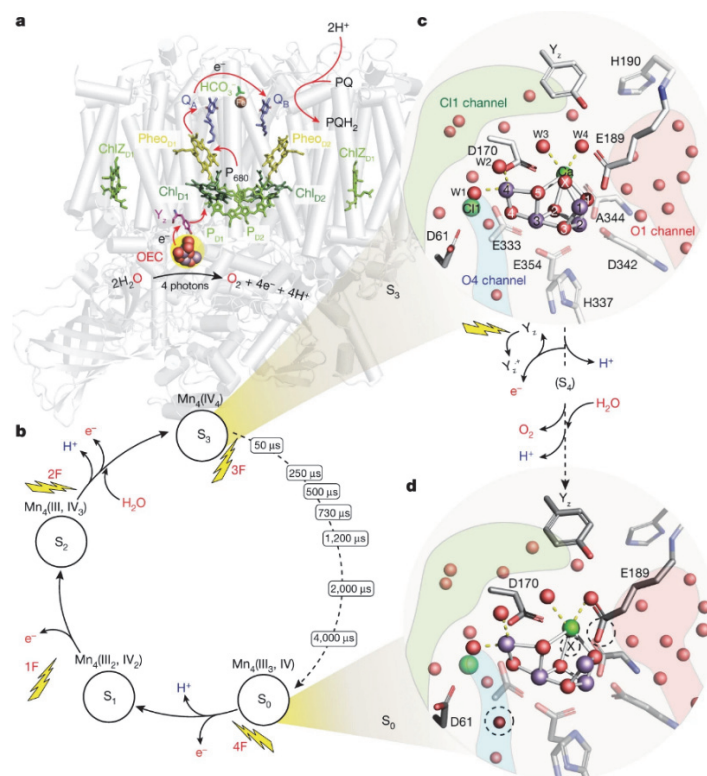


图2 PS II和发生水氧化的电子供体位点的概述<sup>[19]</sup>

a. PS II的结构，其中传递电子的主要结构用深灰色标出；b. Kok循环及后续实验中采样的时间点；c, d. OEC在 $S_3$  (c)和 $S_0$  (d)状态下的结构以及在这两种状态之间所发生的反应。虚线圆圈标出了 $S_3$ 和 $S_0$ 状态之间的结构差异。电子版为彩图，下同

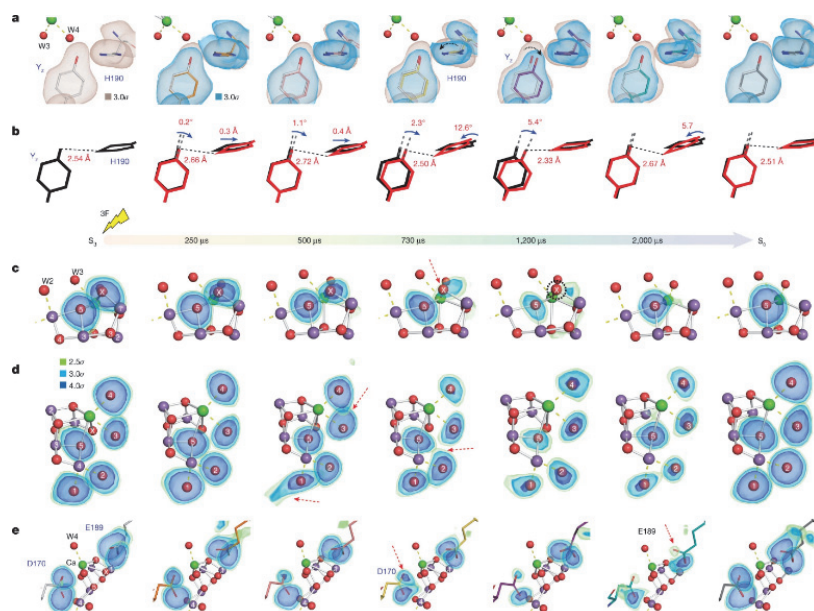
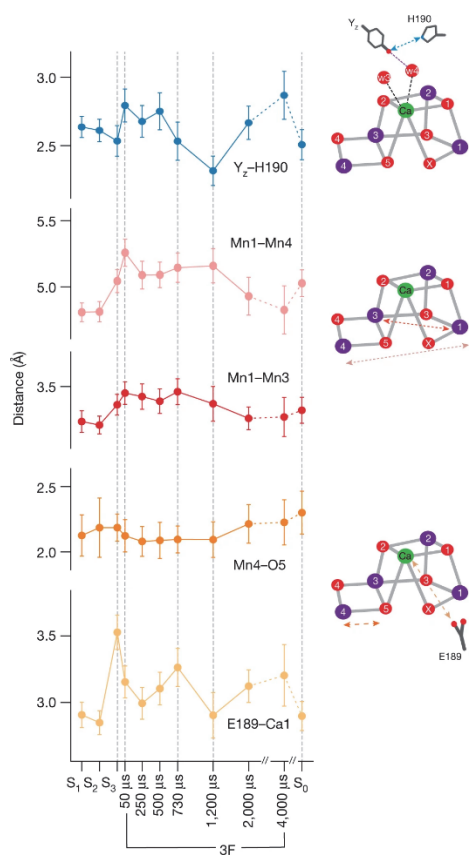


图3 在PS II氧化还原活性给体位点从 $S_3$ 到 $S_0$ 的转化中(包括 $S_3$ 和 $S_0$ )，五个时间点的键组分的 $mF_{\text{obs}} - DF_{\text{calc}}$ 电子密度删减图<sup>[19]</sup>

a. 残基D1-Y161 ( $Y_2$ )和D1-H190；b.  $Y_2$ 区域观察到的结构变化的简化表示；c. OEC的 $O_5$ 和 $O_x$ 原子的删减密度；d. OEC的 $O_5$ 原子和末端水配体W1, W2, W3和W4的删减密度；e. D1-E189和D1-D170的羧基氧原子的删减密度。显著特征用箭头和虚线圆圈标出；所有删减图都在 $2.5\sigma$ 、 $3\sigma$ 和 $4\sigma$ 处使用d中注释的颜色方案进行了等高线标注

图4  $S_3 \rightarrow S_0$ 转变期间OEC中选定原子/残基之间的距离变化<sup>[19]</sup>

锰和氧分别用深色大球和浅色小球表示

### 2.1.2 水和质子通道

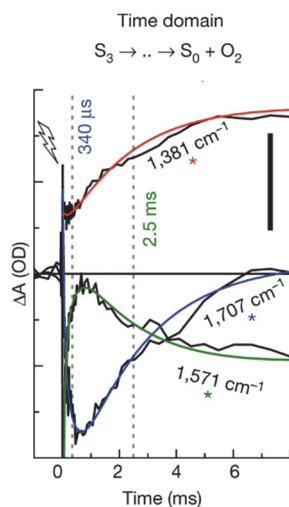
PS II有几个从OEC延伸到类囊体薄膜管腔侧的亲水性通道，其中一些被认为在催化循环中运输质子和底物水方面发挥了关键作用(O1、O4和C11通道，如图2所示)。Bhowmick小组认为在 $S_2 \rightarrow S_3$ 转化中，(从OEC的O1和Ca延伸到主体的) O1通道是底物水通道，(从OEC的W1和W2延伸到主体的) C11通道为质子释放通道。在OEC附近的O1通道中，水分子的电子密度发生了很大的变化，相对于更稳定的水，具有更低的电子密度和更高的B因子。他们将此解释为这些水高流动性的迹象，并推测该区域可以作为在分子氧释放之后重新填充OEC的底物水的入口。从OEC向C11通道的第一个质子转移出现在50–300  $\mu\text{s}$ 之前。而在1200  $\mu\text{s}$ 时，D1-E65/D2-E312的相互作用显著减弱，可能形成了一个可以接受下一个质子的结构。这一系列变化解释为与 $\text{Mn}_4\text{CaO}_5$ 团簇开始恢复有关(即通过将水分子插入OEC并启动去质子化)。结果表明，D1-E65/D2-E312区域在 $S_3 \rightarrow S_0$ 的转化中两次充当了释放质子的门控。

## 2.2 质子与电子转移

Greife等人<sup>[18]</sup>则采取了傅里叶红外光谱(FTIR)进行结构测定，并对氧气形成时电子和质子转移之间的关系进行了研究。

### 2.2.1 $\text{O}_2$ 生成的时间分辨跟踪

为对PS II进行时间分辨红外光谱分析，Greife小组开发了一种自动交换暗适应的PS II粒子的FTIR步进扫描实验装置(从而从先前对单个波长的实验拓展到对完整指纹区的探测)。使用基于Kok标准模型的反卷积方法，他们获得了四个半稳定反应周期中间体 $S_1$ 、 $S_2$ 、 $S_3$ 和 $S_0$ 之间每步转换的时间相关S态差分光谱，重点研究了 $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0 + \text{O}_2$ 的氧形成过程，如图5所示。实验发现，只有在质子去除完成后O—O键才能形成。

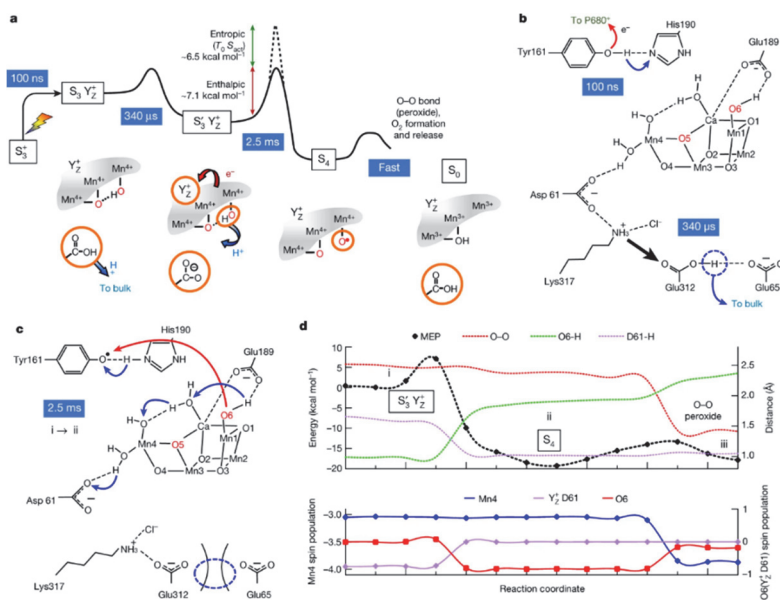

 图5 傅里叶变换红外光谱(FTIR)追踪析氧转换<sup>[18]</sup>

### 2.2.2 关键侧链去质子化

Greife等人观察到与传统的稳态S态差分光谱不同的行为，并用 $S_3 \rightarrow S_4 \rightarrow S_0$ 转变早期的羧酸侧链去质子化来解释，该去质子化过程随后在氧气形成时逆转。基于实验结果，他们发现羧酸的去质子化、质子向水溶液转移以及羧酸盐的再质子化与 $O_2$ 的形成平行进行。

### 2.2.3 量子化学的原子情景

他们还利用基于密度泛函理论(DFT)的最小能量路径(MEP)计算研究了O—O键形成的路径。如图6所示，计算出的MEP包括三个亚稳态(i、ii和iii)和两个过渡态。计算结果表明，在第一个转化过


 图6 析氧过程中的质子和电子转移步骤<sup>[18]</sup>

a. 反应中间产物、时间常数(倒数速率常数)、活化能的焓贡献和熵贡献以及S态分配的实验结果示意图摘要。关键特征用圆圈圈出，电荷转移事件用箭头标出。在 $Mn_4Ca$ 离子簇的四个锰离子中，图中只画出了其中三个在之前的S态转变中积累了氧化当量，并在形成 $O_2$ 的同时被还原的锰离子(Mn1、Mn3和Mn4)。b、c. 在计算结果的帮助下，a中描述的 $S_3 \rightarrow S_4$  (b)和 $S_3 \rightarrow S_4$  (c)的速率常数过程归属于原子事件。虚线圈突出了 $Tyr_z$ 氧化引起的质子空位的产生，并通过Lys317侧链的移动激活Asp61作为 $S_3 \rightarrow S_4$ 转变中的质子受体。d. 最小能量路径(MEP)计算中有关的能值和核间距(上图，虚线)，以及表征过氧化物形成的Mn离子、原子和残基种类的自旋布居(下图，实线)

程 i  $\rightarrow$  ii (图6c, d), 电子转移(到氧化的酪氨酸残基上)与质子转移(从与Mn结合的氢氧根转移到水分子W2上)耦合, 使得氧自由基最终结合到Mn离子上。同时, 氧化态的酪氨酸残基空穴向O6的转移导致了对底物水的单电子氧化。围绕酪氨酸残基和金属-氧团簇的核重排是通过水分子团簇实现的。

计算还表明, 活化自由能受到熵效应的显著影响, 约为6.5 kcal·mol<sup>-1</sup> (1 kcal·mol<sup>-1</sup>  $\approx$  4.186 kJ·mol<sup>-1</sup>)。对此现象的一个合理解释是, 活性位点的蛋白质与水分子氢键网络中拥有大量能量相近的构象, 而在这些构象之间存在快速流变。Yano等人<sup>[20]</sup>观测到Glu65构象变化, 这一发现支持了Greife小组的结论, 即酪氨酸残基的氧化诱导了残基重排和Glu65-Glu32的去质子化。

### 3 结语

近年来, 动力学与晶体学方面的进展, 提供了一个具有较高说服力的质子-电子协同迁移的水氧化机理。连续飞秒X射线晶体学研究提供了各步反应的大致时间顺序: Y<sub>2</sub>的氧化还原状态变化、第一次去质子化、OEC氧化和O<sub>2</sub>的形成, S<sub>0</sub>态Kok时钟的完全恢复和重置, 以及每个阶段可能存在的合理的中间体。

光合放氧机理的阐明, 是理解水氧化反应的关键一步。生物催化剂通过金属中心、蛋白质环境和水网络之间的相互作用来实现多电子/多质子连续反应, 这为发展人工光合系统提供了重要灵感与启发, 有助于开发出更高效、更绿色和更廉价的太阳能利用设施, 建设可持续发展的社会经济体系。

### 参 考 文 献

- [1] Priestley, J. *Phil. Trans. R. Soc.* **1772**, *62*, 147.
- [2] Junge, W. *Quart. Rev. Biophys.* **2019**, *52*, e1
- [3] Kok, B.; Forbush, B.; McGloin, M. *Photochem. Photobiol.* **1970**, *11* (6), 457.
- [4] Sauer, K. *Acc. Chem. Res.* **1980**, *13* (8), 249.
- [5] Zouni, A.; Witt, H.-T.; Kern, J.; Fromme, P.; Krauss, N.; Saenger, W.; Orth, P. *Nature* **2001**, *409*, 739.
- [6] Ferreira, K. N.; Iverson, T. M.; Maghlaoui, K.; Barber, J.; Iwata, S. *Science* **2004**, *303*, 1831.
- [7] Umena, Y.; Kawakami, K.; Shen, J.-R.; Kamiya, N. *Nature* **2011**, *473* (7345), 55.
- [8] 张纯喜. 自然杂志, **2021**, *43* (3), 199.
- [9] Yano, J.; Yachandra, V. *Chem. Rev.* **2014**, *114* (8), 4175.
- [10] Dau, H.; Haumann, M. *Coord. Chem. Rev.* **2008**, *252* (3–4), 273.
- [11] Ibrahim, M.; Fransson, T.; Chatterjee, R.; Cheah, M. H.; Hussein, R.; Lassalle, L.; Sutherlin, K. D.; Young, I. D.; Fuller, F. D.; Gul, S.; *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2020**, *117* (23), 12624.
- [12] Kern, J.; Chatterjee, R.; Young, I. D.; Fuller, F. D.; Lassalle, L.; Ibrahim, M.; Gul, S.; Fransson, T.; Brewster, A. S.; Alonso-Mori, R.; *et al.* *Nature* **2018**, *563* (7731), 421.
- [13] Suga, M.; Akita, F.; Yamashita, K.; Nakajima, Y.; Ueno, G.; Li, H.; Yamane, T.; Hirata, K.; Umena, Y.; Yonekura, S.; *et al.* *Science* **2019**, *366* (6463), 334.
- [14] Kern, J.; Chatterjee, R.; Young, I. D.; Fuller, F. D.; Lassalle, L.; Ibrahim, M.; Gul, S.; Fransson, T.; Brewster, A. S.; Alonso-Mori, R.; *et al.* *Nature* **2018**, *563* (7731), 421.
- [15] Suga, M.; Akita, F.; Sugahara, M.; Kubo, M.; Nakajima, Y.; Nakane, T.; Yamashita, K.; Umena, Y.; Nakabayashi, M.; Yamane, T.; *et al.* *Nature* **2017**, *543* (7643), 131.
- [16] Suga, M.; Akita, F.; Hirata, K.; Ueno, G.; Murakami, H.; Nakajima, Y.; Shimizu, T.; Yamashita, K.; Yamamoto, M.; Ago, H.; *et al.* *Nature* **2015**, *517* (7532), 99.

- [17] Castilho-Almeida, E. W.; Paschoal, D.; Santos, H. F. D.; O'Malley, P. J.; Almeida, W. B. D. *J. Brazil. Chem. Soc.* **2017**, *28* (2), 242.
- [18] Greife, P.; Schönborn, M.; Capone, M.; Assunção, R.; Narzi, D.; Guidoni, L.; Dau, H. *Nature* **2023**, *617* (7961), 623.
- [19] Bhowmick, A.; Hussein, R.; Bogacz, I.; Simon, P. S.; Ibrahim, M.; Chatterjee, R.; Doyle, M. D.; Cheah, M. H.; Fransson, T.; Chernev, P.; *et al.* *Nature* **2023**, *617* (7961), 629.
- [20] Hussein, R.; Ibrahim, M.; Bhowmick, A.; Simon, P. S.; Chatterjee, R.; Lassalle, L.; Doyle, M.; Bogacz, I.; Kim, I.-S.; Cheah, M. H.; *et al.* *Nat. Commun.* **2021**, *12*, 6531.