ウェブサイト公開用

（様式 10）
（海外特別研究員事業）
令和　3 年　3 月　17 日

海 外 特 別 研 究 員 最 終 報 告 書

独立行政法人日本学術振興会 理事長　殿

採 用 年 度　平成 31 年度
受 付 番 号　201960608
氏　　名　米田 勇祐
（氏名は必ず自署すること）

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。
なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地：カリフォルニア州バークレー　（国名：米国）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと違わないように記載すること。
非線形多次元分光による光合成エネルギー移動経路探索メカニズムの解明

3. 派遣期間：平成 31 年 4 月 1 日　～　令和 3 年 1 月 31 日

4. 受入機関名及び部局名
受入機関名：University of California, Berkeley
部局名：Department of Chemistry

5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意　**書式任意（A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可）**
（研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等）
（注）「6. 研究発表」以降については様式 10－別紙 1～4 に記入の上、併せて提出すること。

【研究の背景・目的】

光合成は地球上の食物・化石燃料等のエネルギーのほとんどの起源である。特にその初期過程においては、吸収した光子に対してほぼ 100%の量子収率で反応が進行する。したがって、その反応過程を直接的に捉えてメカニズムを解明することは、エネルギー問題を解決する上で重要な課題の一つである。

光合成反応初期過程においては複雑緻密に配列されたアンテナたんぱく質中の色素によって光エネルギーが吸収され、その励起エネルギーは多数の分子間を伝達され、反応中心（RC）と呼ばれる目的の位置まで伝達される（Fig. 1）。RC では、その励起エネルギーを利用して電子移動反応が駆動される。これら反応を効率的に進行させるためには、励起エネルギーや電子をいかに「高速」に「目的の位置」まで伝達するかが重要である。これまでに多くの時間分解分光測定手法によって、各々の素過程はフェムト秒からピコ秒といった超高速な時間スケールで進行することが明らかにされてきた（G. R. Fleming, *et al.*, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **1997**, *7*, 738; T. Mirkovic, *et al.*, *Chem. Rev.*, **2017**, *117*, 249）。一方で、アンテナたんぱく質におけるエネルギー移動経路に関して、紅色細菌等が持つ単純なアンテナ系であればエネルギー勾配を利用して目的の位置（RC）までエネルギー移動を行うが、高等植物に含まれているような複雑なアンテナ系においては RC をどのようにを探索するかそのメカニズムは未だ明らかになっていない。さらに、紅色細菌の RC と高等植物に含まれる RC は構造が類似しているにもかかわらず、高等植物の RC における電子伝達経路も明らかではない。これは、アンテナ・RC に含まれているクロロフィル等の個々の色素分子の電子スペクトルの区別が難しいことが関係している。

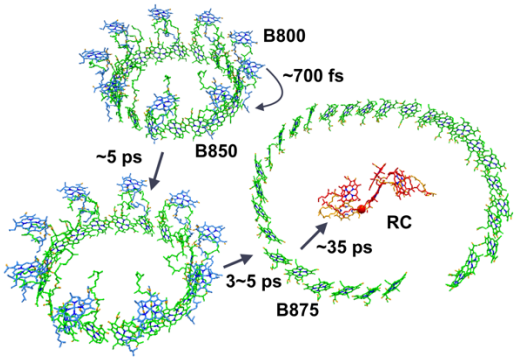

Figure 1. 光合成初期過程におけるアンテナたんぱく質での超高速励起エネルギー移動。

二次元電子振動分光（2DEV）は筆者の派遣先である Fleming グループにおいて開発された電子状態と振動構造の相関を検出することのできる非線形多次元分光法であり、電子・エネルギー移動経路探索メカニズムを明らかにすることができる可能性を持っている（T. A. A. Oliver, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **2014**, *111*, 10061）。2DEV を用いることによって、一般的な可視領域の分光手法では識別できないたんぱく質中の分子であっても、色素の結合位置に依存した振動をプローブとすることで、原理的にはエネルギー移動経路を直接検出することが出来る（N. H. C. Lewis, *et al.*, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2016**, *7*, 4197）。

本研究では、**2DEV を中心とした分光手法を比較的単純な分子系や実際の光合成たんぱく質系に応用することで、それらのダイナミクスとメカニズムを明らかにすることを目的**として研究に取り組んだ。ここでは、筆者が主体的に行った研究の中でも「プロトン共役電子移動に伴う電子-核ダイナミクス」、「Photosystem II 反応中心の混成励起子-電荷移動状態のダイナミクス」の研究について取り上げる。

【研究結果】

・プロトン共役電子移動に伴う電子-核ダイナミクス[1]

プロトン共役電子移動（PCET）は、光合成等においても重要な役割を果たす素反応である。例えば、光化学系 II 反応中心（PSII-RC）では、電荷分離反応によって生じた P_{680}^{+}は高い電気化学ポテンシャルを持ち、最終的に酸素発生複合体（OEC）での水の酸化に用いられる（Fig. 2a）。OEC はチロシン（Tyr_Z）を電子移動の媒介として活性化される。ここで、単純にチロシンから P_{680}^{+}への電子移動を考えると、エネルギー的には不利であるが、チロシンの持つプロトンを隣接するヒスチジン（His_{190}）へ移動することによって系全体のエネルギーは安定化され、反応は進行しうる。実際に、変異置換によって His_{190} を取り除くと光合成が停止してしまうことからも（R. A. Roffey, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **1994**, *1185*, 257）、PCET が重要な役割を果たしていることを示している。

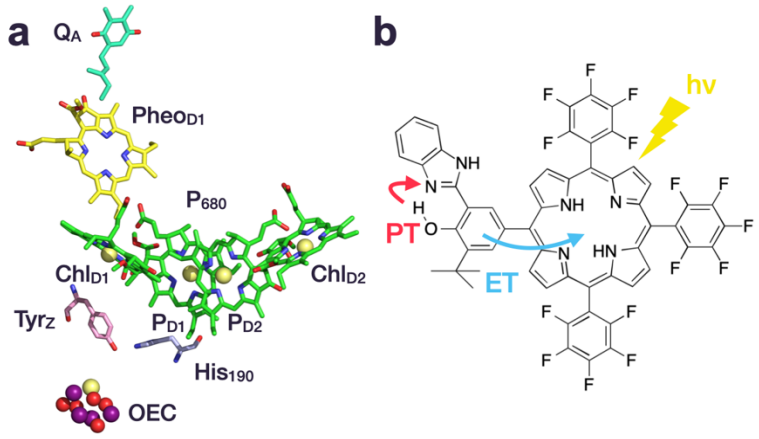

Figure 2. (a) PSII-RC の色素配置。 (b) BIPPF15 の分子構造。

PCET は一般的に、Marcus の電子移動理論のように周囲媒体の運動が主な反応座標として捉えられ、電荷が局在した非断熱状態間の遷移として記述されてきた（S. Hammes-Schiffer, *et al.*, *Chem. Rev.*, **2010**, *110*, 6939）。電子励起状態においても、その反応速度と反応始・終状態間のエネルギーギャップとの関係性等が議論されてきた（G. A. Parada, *et al.*, *Science*, **2019**, *364*, 471）。しかし、これまでの研究においては、PCET は単純な状態から状態への遷移として捉えられてきた。一方、電子的励起状態は、様々な電子配置の重ね合わせとして表され、さらにその重ね合わせは電子・プロトンの動きに応じて変化することも報告されている（E. Takeuchi, *et al.*, *J. Phys. Chem. C*, **2016**, *120*, 14502; Y. Yoneda, *et al.*, *J. Phys. Chem. A*, **2020**, *124*, 265）。そういった電子移動度の動的変化を考慮した、真の意味での PCET「メカニズム」は全く解明されていない。

そこで、PSII-RC を模倣した光誘起 PCET 系 benzimidazole-phenol-porphyrin（BIPPF15, Fig. 2b）のダイナミクスの解明に取り組んだ。この系のポルフィリン、フェノール、ベンズイミダゾール部位は PSII-RC における三量体 P_{680}, Tyr_Z, His_{190} をそれぞれ模倣している。ポルフィリン部位の光励起によって、「フェノールからベンズイミダゾールへのプロトン移動（PT）」と「フェノールからポルフィリンへの電子移動（ET）」が誘起される。この BIPPF15 に 2DEV を応用し、そのメカニズムを解明に取り組んだ。

得られた 2DEV スペクトルを Fig. 3a に示す。BIPPF15 の 2DEV スペクトルにおいては 1548 cm^{-1} および 1597 cm^{-1} に PCET に伴う負の信号が観測された。これら信号は IR spectroelectrochemistry 測定の結果と比較することで、それぞれプロトン移動、電子移動に起因した信号に帰属することが出来る。電子移動に起因する 1597 cm^{-1} のバンドの二次元スペクトルの形状を解析することによって得られた center line slope (CLS)ダイナミクスを Fig. 3b に示す。PCET 反応に関連しない低波数バンド（< 1530 cm^{-1}）の CLS は、光励起後ほぼゼロであったの

に対し、電子移動に起因するこのバンドの CLS では 120 fs の立ち上がりが観測された。電子構造計算の結果と総合して、この **CLS 立ち上がりは、BIP 部位と PF15 部位の間の二面角のねじれに伴って、系の電子移動度が増加していく過程に起因していると結論**した。言い換えると、この系の PCET における電子移動過程は状態 A から状態 B への単純な変化としては記述できないことを示している。

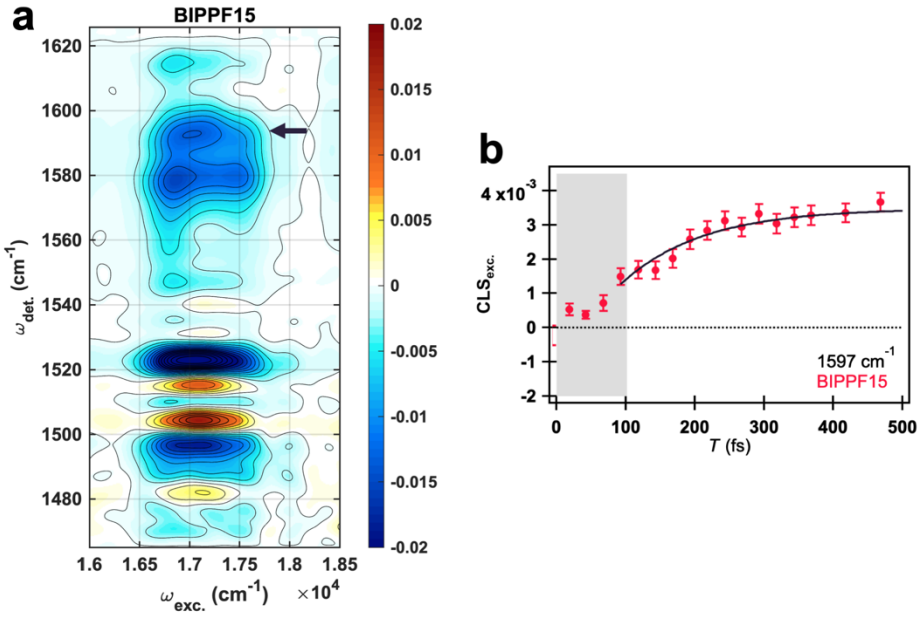

Figure 3. (a) BIPPF15 の 2DEV スペクトル。
(b) 電子移動に起因する 1597 cm^{-1} のバンドの CLS ダイナミクス。

以上の結果は *Journal of the American Chemical Society* に投稿し論文として受理され [1]、さらに Spotlights on Recent JACS Publications として取り上げられた。

また、BIP にピリジンを付加することによって、電気化学的に 1 電子 2 プロトン移動（E2PT）を誘起できることが報告されている（W. D. Guerra, *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.*, **2020**, *142*, 21842）。BIPPF15 にもピリジンを付加することで光をトリガーとして E2PT を誘起することができ、現在この系のダイナミクスの解明にも取り組んでいる[2]。

・Photosystem II 反応中心の混成励起子-電荷移動状態のダイナミクス[3]

Photosystem II 反応中心(PSII-RC)は光合成たんぱく質の中でも電荷分離反応を行うことができる最も小さいユニットの一つであり、光合成における光エネルギー変換初期過程のメカニズムを研究する上で理想的なモデル系である（G. Renger, *et al.*, *Photosynthetic. Res.*, **2008**, *98*, 53; E. Romero, *et al.*, *Nature*, **2017**, *543*, 355）。PSII-RC は 6 つの中心色素（P, Chl, Phe）および 2 つのアンテナ（Chlz）が擬似対称的に配置されており（Fig. 4a）、電子移動は D1 たんぱく側で進行する。

PSII-RC のダイナミクスに関する研究では、二次元電子分光を用いて振電コヒーレンスが観測されているなど目覚ましい成果も多いが（F. D. Fuller, *et al.*, *Nature Chem.*, **2014**, *6*, 706; E. Romero, *et al.*, *Nature Phys.*, **2014**, *10*, 676）、その電子移動経路は未だに議論の最中である。具体的には、最初の電子移動が $Chl_{D1}^{+}Phe_{D1}^{-}$で起こるのかあるいは $P_{D2}^{+}P_{D1}^{-}$で起こるのか長年議論されてきたが、まだ決着がついていない。これは、PSII-RC に含まれている色素の吸収スペクトルが重なっており、過渡種の区別が出来ないことが原因である。さらに、PSII は 680nm よりも長波長の光を用いても駆動されることが知られており、この赤外励起には混成励起子-電荷分離状態（mixed exciton-charge transfer state, MECTS）が関係している可能性がある（A. Thapper, *et*

al., *Plant Cell*, **2009**, *21*, 185）。しかし、PSII-RC は吸収スペクトルが複雑であるためこの MECTS のダイナミクスは全く開拓されていない。

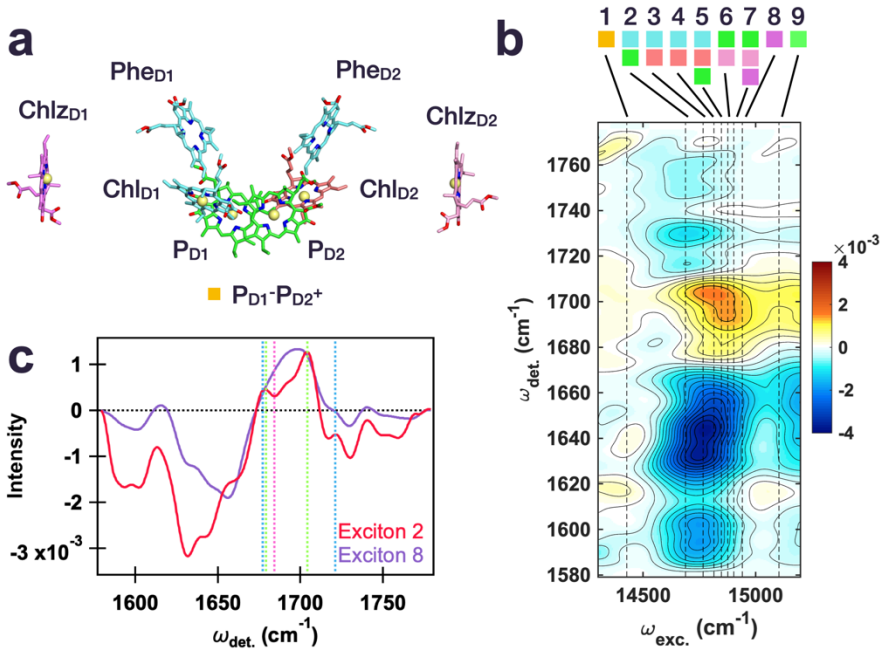

Figure 4. (a) PSII-RC の色素配置。(b)PSII-RC の 2DEV スペクトル。
(c)励起子 2 および 8 のエネルギーに沿った 2DEV スペクトル。

一方で、クロロフィルやフェオフィチンのケト CO およびエステル CO モードは、色素の周囲環境や電子状態、あるいはイオン状態に応じて中赤外領域に特徴的な吸収を示すことが知られている（M. Di Donato, *et al.*, *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.*, **2015**, *1847*, 2）。そこで、電子励起周波数と赤外観測周波数の分解能を同時に併せ持つ 2DEV 分光を PSII-RC に応用し、そのダイナミクスを解明することを試みた。

Figure 4b は得られた 2DEV スペクトルおよび励起子モデル（V. I. Novoderezhkin, *et al.*, *Biophys. J.*, **2007**, *93*, 1293）によって得られた遷移エネルギーを示している。励起子 2 および 8 のエネルギーに沿った 2DEV スペクトルを比較すると（Fig. 4c）、励起子 2 は P（ω_{det} = 1679, 1701 cm^{-1}, green）および Phe（ω_{det} = 1677, 1721 cm^{-1}, blue）に対応したブリーチを示すのに対し、励起子 8 は Chlz（ω_{det} = 1684 cm^{-1}, pink）に対応した領域により大きなブリーチを示すことがわかる。この結果は長波長励起では RC 色素、短波長励起ではアンテナ Chlz がそれぞれ選択的に励起されていることに対応し、励起子モデルともよく一致していることを確認することができる。

さらに MECTS に関する詳細な知見を得るために、励起子 1 および 2 のエネルギーに沿った 2DEV スペクトルを比較した（Fig. 5a）。励起子 1 のスペクトルは励起直後から ω_{det} = 1657 cm^{-1} および 1666 cm^{-1} に特徴的なピークを示すことがわかる。これらのピークは RC における電荷分離に応答した周囲たんぱく質のアミド CO モードに帰属することができ、励起子 1 の遷移が強い CT 性によって特徴づけられていることがわかる。さらに、励起子 1 のスペクトルの変化においては、ω_{det} = 1716 cm^{-1} のバンドが数ピコ秒の時間スケールで 1713 cm^{-1} へシフトしていく様子を観測することができた（Fig. 5b）。このシフトはクロロフィルカチオンが Chl_{D1}^{+}から P^{+}へと変化していく過程に対応していると考えられ、**光励起によって生成する MECTS が $P_{D2}^{+}P_{D1}^{-}$というよりは $Chl_{D1}^{+}Pheo^{-}$によって特徴づけられると結論**した。以上の成果は現在論文として投稿準備中である[3]。

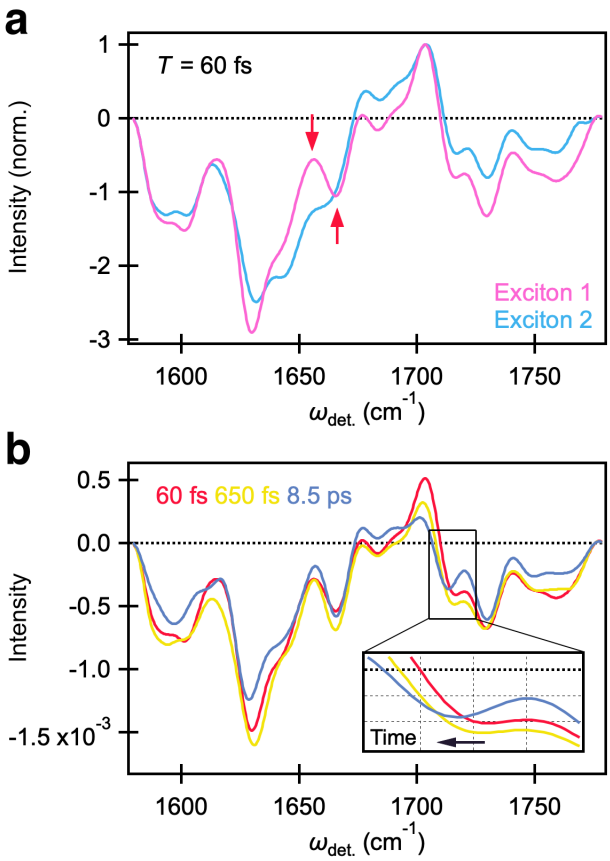

Figure 5. (a) 励起子 1 および 2 のエネルギーに沿った 2DEV スペクトル。
(b) 励起子 1 のエネルギーに沿った 2DEV スペクトルの時間変化。

【研究成果】

[1] **Y. Yoneda**, S. J. Mora, J. Shee, B. L. Wadsworth, E. A. Arsenault, D. Hait, G Kodis, D. Gust, G. F. Moore, A. L. Moore, M. P. Head-Gordon, T. A. Moore, G. R. Fleming "Electron–Nuclear Dynamics Accompanying Proton-Coupled Electron Transfer" *Journal of the American Chemical Society,* **143**, 3104, 2021. (**highlighted in the spotlights on recent JACS publications**)

[2] **Y. Yoneda**, E. Odella, J. Shee, B. L. Wadsworth, J. J. Goings, E. A. Arsenault, W. D. Duerra, M. N. Urrutia, G Kodis, D. Gust, A. L. Moore, S. Hammes-Schiffer, G. F. Moore, M. P. Head-Gordon, T. A. Moore, G. R. Fleming "Photoinduced One-Electron Two-Proton Transfer in Biomimetic Artificial Photosynthetic System" *in preparation*

[3] **Y. Yoneda**, E. A. Arsenault, K. Orcutt, M. Iwai, G. R. Fleming "Dynamics of mixed exciton-charge transfer state of photosystem II reaction center" *in preparation*

[4] E. A. Arsenault, **Y. Yoneda**, M. Iwai, K. K. Niyogi, G. R. Fleming, "The role of mixed vibronic Qy-Qx states in green light absorption of light-harvesting complex II" *Nature Communications,* **11**, 6011, 2020.

[5] E. A. Arsenault, **Y. Yoneda**, M. Iwai, K. K. Niyogi, G. R. Fleming, "Vibronic mixing enables ultrafast energy flow in light-harvesting complex II" *Nature Communications,* **11**, 1460, 2020.

[6] P. Roy, J. Shee, E. A. Arsenault, **Y. Yoneda**, K. Feuling, M. P. Head-Gordon, G. R. Fleming, "Solvent Mediated Excited State Proton Transfer in Indigo Carmine" *The Journal of Physical Chemistry Letters,* **11**, 4156, 2020

[7] M. Iwai, J. J. Chen, S. Park, **Y. Yoneda**, E. M. Schmid, D. A. Fletcher, G. R. Fleming and K. K. Niyogi, “Variable optical properties of light-harvesting complex II revisited”, *bioRxiv*, 2020 doi:10.1101/2020.10.05.312405