

光受容蛋白蛍光分光測定への超高速カーゲート法の適用

兼松 泰男^{1,2}, 中村 亮介², 濱田 格雄², 徳永 史生^{2,3}

¹大阪大学 ベンチャービジネスラボラトリー (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

²科学技術振興機構 (JST) CREST (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

³大阪大学大学院 理学研究科 (〒560-0043 大阪府豊中市待兼山1-1)

Optical Kerr Gate Technique for Ultrafast Fluorescence Spectroscopy of Photoactive Proteins

Yasuo KANEMATSU,^{1,2} Ryosuke NAKAMURA,² Norio HAMADA,²
and Fumio TOKUNAGA^{2,3}

¹Venture Business Laboratory, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

²JST-CREST, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

³Graduate School of Science, Osaka University, 1-1 Machikaneyama, Toyonaka, Osaka 560-0043

(Received September 4, 2003)

A measurement system for ultrafast time-resolved fluorescence spectroscopy was constructed based on electronic Kerr effect. Suitable Kerr medium was searched among glasses and isotropic single crystals by using the Z-scan method that can evaluate two-photon absorption coefficient and photo-induced refractive index change. With optimization of design of the optical system, we achieved the time resolution of 180 femto-second, 5 % gating transmittance and the one-order-faster data acquisition than conventional method.

Time-resolved spectra were measured for photoactive yellow protein (PYP). The Kerr-gating system enabled for the first time to obtain the 2-dimensional, time- wavelength mapping of time-resolved fluorescence spectra in the femto-pico-second time region. Vibrating behavior of fluorescence intensity peak was clearly recognized, which is curious and has never seen in dye solution systems at room temperature. It suggests that, in PYP, chromophore is energetically isolated from the main structure of amino-acid chain and that photo-excited energy is dissipates through specific channels.

Key Words: Optical Kerr gate, Time-resolved fluorescence, Ultrafast spectroscopy, Photoactive yellow protein

1. 序

蛋白モジュールの開発におけるひとつの目標は、細胞増殖・分化をコントロールする蛋白集合体の配列を形成することである。一方、自然界における対応物として、機能を発現する蛋白分子を含む構造体が、自己組織化により形成されている。したがって、自己組織化に対する分子レベルからのアプローチもCRESTプロジェクトの重要な側面である。対象となる系は、空間的な組織化という観点から、蛋白質結晶に代表される分子集合体や幾何学的配列を持った生体膜構造に代表される高次の構造体があげられる。また、蛋白分子間相互作用を通しての分子集合体の連鎖による機能発現は、時間構造の組織化といえることができる。

いずれにせよ、構造自己組織化に着目して、構造と機能の相関を検討することが重要である。結晶構造、溶液における構造、および、機能発現する生体内微細構造下における振る舞いとの違いは何か。蛋白質が集団となっ

ているときにどのような特異な作用があるのか、集合状態が細胞における認識に影響を与えることはあり得るか。蛋白モジュールという観点からは、もっと単純に、局所濃度と作用との相関なども問題となり得る。

このような一般的な題材への切り口として、光受容蛋白を題材として研究を進めるのがわれわれの立場であり、さらに、実験的にはハイスループット分光手法の開発・導入を目指している。光受容蛋白は、光による状態制御、光による状態検知が可能であり、種々のレーザー分光の対象として有利な対象である。ただし、これまで、大量の蛋白試料を溶液状にして、レーザー分光に供するという研究法が主流であった。集合体の時間空間構造を追跡するという視点、また、観測によるダメージを避けるという視点から、分光手法自体のシステム化および効率化が、不可欠の研究開発課題として生じてくる。

ハイスループット分光手法に関しては、種々のイメージング分光や、コンビナトリアル化学、マイクロ化学、

および、DNAチップ等々のマトリックス評価に関して、時代の要請として様々な開発が進められている。また、分光における本質としては、光の諸パラメータを汲み尽くすことが目標であり、超高速分光におけるシングルショット分光^{1,2)}などの先進的例も存在する。レーザー光源、および、周辺技術の進化が、技術開発を容易にしつつあり、CRESTプロジェクトにおいては、オーダーメイドで開発を進展させていく。

ここでは、光受容蛋白蛍光分光測定への超高速カーゲート法の適用ということで、ハイスループット分光手法への開発の一例を題材に、対象となる光受容蛋白の概略に続けて、最新の成果を紹介する。

2. 光受容蛋白質

光受容蛋白質は、光刺激を受けて、構造変化を生じ、多くの場合、様々な中間状態を経て初期状態へ戻るという光サイクルを呈する。光によってトリガできるという点は、レーザー分光には有用な特徴である³⁾。

我々のグループでは、発色団としてレチナール(Fig. 1 (a))を持っているレチナール蛋白質の研究を長年行ってきた⁴⁾。レチナール蛋白質は、哺乳類の視物質であるロドプシンや分子光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン、細菌の走行性に関与しているセンサーロドプシンなどが挙げられる一群の膜蛋白質である。その中でもバクテリオロドプシンは、プロトンポンプ機能と蛋白質の構造変化の機構が詳細に検討されている蛋白質である。バクテリオロドプシンは、レチナールが光を吸収し、発色団の異性化から始まる光反応サイクルを有しており、このサイクルの中でレチナールの状態に応じた分光学的に分離可能な中間状態をとり、それぞれFig. 2 (a)のような名前により区別されている。このサイクル中で蛋白質も構造変化しプロトン輸送が実現されていると考えられている⁵⁾。この構造機能相関の詳細は完全解明されていない。

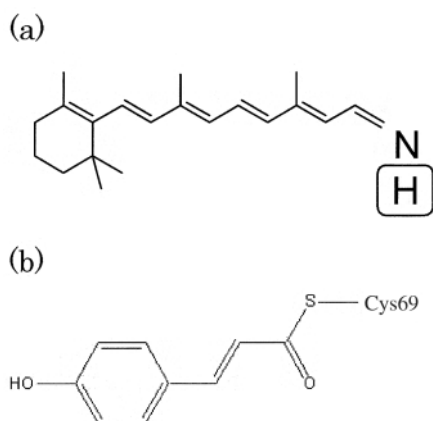


Fig. 1 (a) The retinal chromophore of bacteriorhodopsin (BR). BR has a retinal linked to Lys216 via a protonated Schiff base. (b) The *p*-coumaryl chromophore of PYP. The chromophore is covalently bound to a unique cyctein (Cys69) in the apoPYP via thiol ester bond.

さらに我々の研究グループでは、測定系の構築に有用な蛋白質としてPYPを考えている。PYPもバクテリオロドプシン同様、光を吸収し発色団の異性化から始まる光反応サイクルを有している(Fig. 2 (b))。PYPは、発色団として*p*-クマル酸(Fig. 1 (b))を持っており、これはレチナールなどと比べると小さく扱い易い。また分子量も14 kDaと蛋白質の中ではかなり小さく、さらに水溶性蛋白質であることから応用利用にも向くと考えられる。実際、遺伝子改変も容易に行え、大腸菌の発現系も有していることから大量入手も可能となっている⁶⁾。我々の研究グループでは、レーザー分光とNMRを組み合わせた構造機能相関の理解を目指し研究を行っている^{7,8)}。

これまでの研究で蛋白質の静的構造情報は豊富にあり、PYP、バクテリオロドプシンともに光反応に入る前の暗状態の構造は高分解能で得られている^{9,10)}。バクテリオロドプシンに関しては光反応中間体の構造も高分解能モデルが報告されはじめている¹¹⁾。しかし、構造変化メカニズムの解明には至っていない。PYP、バクテリオロドプシンともに発色団の異性化反応が蛋白質内部で高度に制御されており、反応開始は光であるが、元の状態に戻るのには全て蛋白質が行う熱過程である。この制御反応は、ほぼ半永久的に回る反応サイクルであり、光化学的にも興味深く、構造変化メカニズムの解明が異性化反応制御そのものの解明につながると考えられる。

3. 超高速カーゲート蛍光分光法

ハイスループットレーザー分光手法の一例として、電子応答起因の光カー効果を利用したフェムト秒時間分解蛍光分光法を紹介する。フェムト秒領域における時間分解蛍光測定の一般的手法は和周波混合法¹²⁾である。この手法は非常に高感度という利点を持ちながらも、多くの観測波長でデータを取得するためには膨大な時間と労力を必要とする難点を持ち合わせている。光励起初期過程における蛍光を時間-周波数マッピングすることで、新たに何が見えてくるのか、という観点から、フェムト秒光カーゲートシステムの構築、さらに、それを光受容性蛋白質に適用し、フェムト秒領域における微弱な蛍光スペクトル変化を追跡した結果をまとめる。

光カー効果とは、光電場に誘起されて媒質の屈折率が変化する現象のことで、パルスレーザーの出現後すぐに、時間分解測定に利用されてきた^{13,14)}。従来の光カーシャッターに使われてきた材料は二硫化炭素などの液体であり、分子配向による遅い応答が存在するため、達成できる時間分解能は数ピコ秒である。この手法をフェムト秒領域の時間分解能へと高めるためには、より速い応答を持つカー媒質を利用しなければならない。さらに蛍光分光へ適用するためには、時間的に切りだされた蛍光が微弱なものとなるため、高効率化を図るとともに、ゲート光により発光することのないカー媒質を見いだすことが必要である。

また、光カーシャッターの応答時間がフェムト秒の速さに達してくると、カー媒質内でのシグナル光とゲート

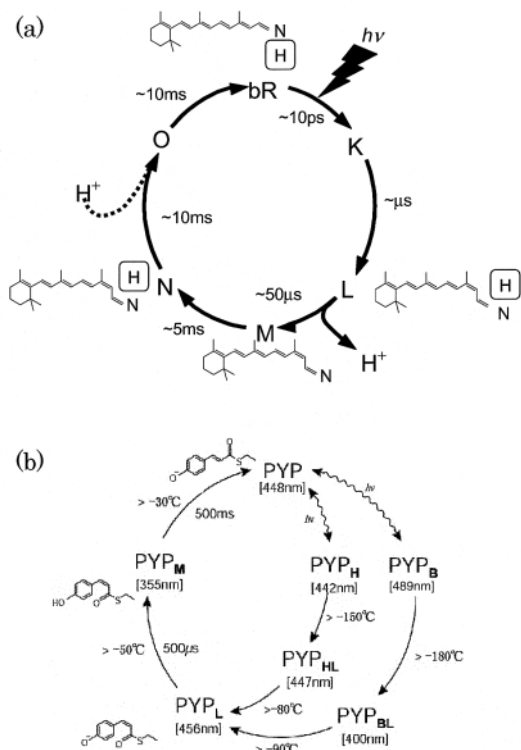


Fig. 2 (a) The photocycle of BR. Each photo-intermediate can be distinguished with absorbance spectrum. The absorbance maximum of photo-intermediate BR (dark state), J, L, M, M, N, O is 570, 625, 610, 550, 410, 570, 640 nm, respectively. The photointermediates are indicated differences in the chromophore environment. In Fig, the retinal environments are shown as schematic drawing, for example, the M intermediate represents the intermediate with 13-cis retinal (isomerization chromophore) and with an deprotonated Schiff base, whose absorption maximum is near 410 nm. (b) The photocycle of PYP. Adopted from (Imamoto, et al., 1996). The wavy and solid lines show the photochemical and thermal reaction, respectively. The (difference) absorption maxima of the intermediates are indicated in brackets. The transition temperature of each conversion is shown beside the arrows. The near-UV intermediate (PYP_M) was not detected in low temperature experiments. The laser flash photolysis has revealed PYP_L decays with a 500 sec lifetime to PYP_M, which itself subsequently returns to the dark state with a 500 msec time constant at pH 7 at room temperature (Genick, et al., 1997).

光の空間的・時間的重なりを正しく評価しなければならない。ふたつのパルス光のビーム径・入射角度・カー媒質の厚さなどのパラメータは、システムの時間分解能や効率などの測定精度に大きく影響する²⁾。特に、シグナル光として蛍光のような幅広い波長成分を含む場合は顕著であり、各光学素子の分散も含めてシステムの最適化を行わなければならない。

3.1 測定法

Fig. 3に、光カーシャッターを用いた時間分解蛍光分光法の測定システムを示す。再生増幅チタンサファイア

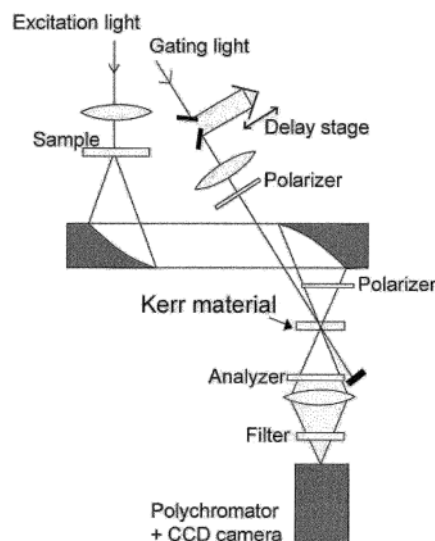


Fig. 3 Schematic diagram of time-resolved luminescence spectroscopy based on optical Kerr gate.

レーザー (Coherent, RegA9000)からのパルス光(繰り返し 200 kHz, パルス幅 150 fs, 波長 830 nm)をビームスプリッターで分割し、一方をゲート光として、他方をBBO結晶を通して2倍波(415 nm)に変換し、励起光として用いた。ゲート光は強度 50 mWに調節し、レンズ($f = 100$ mm)でカー媒質上に集光した。測定試料は、0.7 mm厚の熔融石英ではさまれた光路長0.3 mmのフローセルを用いて循環させた。試料からの蛍光は一對の軸外し放物面鏡($f = 75$ mm)でカー媒質上に集光した。カー媒質上でのスポット径は約100 μ mである。カー媒質の前後に偏光子・検光子を偏光軸が互いに90度になるようにして配置した。偏光子として厚さ0.8 mmのプラスチック偏光板(Edmund Scientific, TECH SPEC)を用いた。検光子を透過してきた蛍光はレンズで光ファイバーに集光し、ポリクロメータ(Acton, SpectraPro-275)で分光したあと、イメージインテンシファイア付CCDカメラ(Princeton Instruments, LN/CCD-1024/EEV)で受光した。スペクトル分解能は5 nmである。ゲート光および励起光の強い散乱光が受光系で入らないように、UV-IRカットフィルターをポリクロメータ手前に置いた。蛍光に対するゲート光の相対的カー媒質到着時間は、光学遅延ステージによって変化させた。

光カーシャッターシステムにおいてバックグラウンドになり得る要素は2種類ある。ひとつはゲート光がカー媒質によって多光子吸収されることにより、カー媒質自身が発光することである。これは、カー媒質としてどのような物質を選ぶのか、という評価基準のひとつであり、さらに、カー媒質の厚さやゲート光強度などのパラメータに依存する。これらの点については後述する。バックグラウンドになり得る要素のもう1点は、偏光子・検光子対からわずかにもれてくる測定試料からの蛍光である。測定試料の蛍光寿命がカーシャッターの応答時間に比べて長くなればなるほど、このバックグラウンドの影響は大きくなる。測定前に、シグナルが検出されない領域まで光学遅延ステージを動かす、そこでバックグラウンド

を取得し、測定中はそれぞれの光学遅延の位置でバックグラウンドを差し引いた。

3.2 カー媒質の評価

微弱蛍光のフェムト秒時間分解分光に適したカー媒質を評価するために、Z-scan法¹⁵⁾を用いて可視域で透明なガラス、等方性単結晶の光誘起屈折率変化、2光子吸収係数を測定した。Z-scan法は簡単な光学系で構成でき、サンプル位置を走査しながら透過光強度を測ることで、光誘起屈折率変化、2光子吸収係数ともにごく短時間で測定できる。

3種類の等方性単結晶(SINCOSHA, Inc.)と16種類の光学ガラス(OHARA)について光誘起屈折率変化 $\gamma(\text{cm}^2/\text{W})$ および2光子吸収係数 $\beta(\text{cm}/\text{W})$ を求めた。Table 1には、3種類の単結晶および代表的な光学ガラスSFS1(評価したガラスの中で最も大きな γ を持つ)の γ^2 および $\gamma\beta$ を λ_c とともに示す。ここで、 λ_c とは紫外領域での吸収スペクトルの長波長側の裾で、透過率が50%となる波長である。光カーシャッターの効率は γ^2 に比例し、 $\gamma\beta$ もカー媒質を評価するうえで重要な因子である。2光子吸収は熱レンズ効果や蛍光、光ダメージを生じさせ、システム全体の測定精度や時間分解能を著しく低下させる。したがって、効率のよい光カー媒質として、 γ^2 および $\gamma\beta$ ともに大きな値をもつ物質を探さなければならない。表からわかるように、SrTiO₃が評価した試料の中で最も大きな γ^2 を持つ。ついで、SFS1ガラスが大きな γ^2 を持ち、その値はSrTiO₃の6分の1の大きさである。SrTiO₃とSFS1はほぼ同じ $\gamma\beta$ を持つことから、評価した物質の中ではSrTiO₃が最も効率のよいカー媒質であるといえる。

3.3 測定システムの評価

ゲート光強度はカー媒質の多光子吸収による蛍光特性と、光カーシャッター効率の両方から決められる。Fig. 4に、焦点距離100 mmのレンズで集光した場合の、ゲート光強度に対するSrTiO₃の蛍光積分強度および光カーシャッター効率を示す。ゲート光強度が40 mW以下では、蛍光強度はゲート光強度の2乗に比例しているが、それ以上の強度を入射すると急激に増大する。光カーシャッター効率は70 mWぐらいまでは、ゲート光強度の2乗にほぼ比例している。以上のことを考慮し、ゲート光強度として50 mWを選んだ。このときの光カーゲート効率は5%である。

カー媒質内でのシグナル光とゲート光の空間的・時間的重なりが、システムの時間分解能や効率などの測定精度にいかん影響を与えるかを正しく評価するために、 β -カロチン溶液の時間分解蛍光スペクトルを測定した。 β -カロチン分子の蛍光寿命は約200フェムト秒と短く、われわれ

Table 1 Linear absorption edges λ_c and obtained values of γ^2 and $\gamma\beta$ by Z-scan experiments.

	Materials	λ_c (nm)	γ^2 (cm^4/W^2)	$\gamma\beta$ (cm)
(Crystals)	SrTiO ₃	393	4.0×10^{-28}	4.2×10^{-4}
	*YSZ	299	3.2×10^{-30}	1.5×10^{-3}
	MgO	215	4.1×10^{-31}	2.6×10^{-4}
(Glass)	SFS1	374	7.1×10^{-29}	4.4×10^{-4}

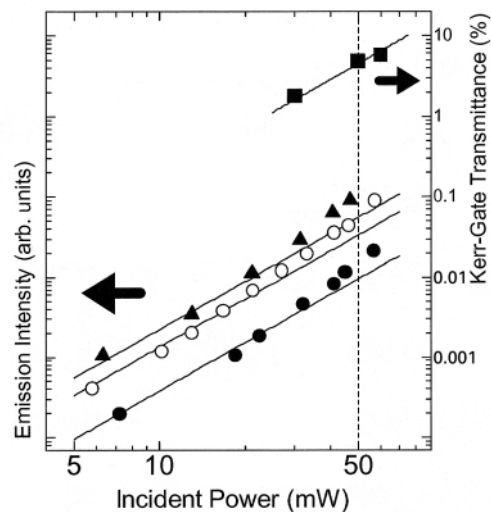


Fig. 4 Log-log plot of integrated intensity of emission spectrum due to two-photon absorption as a function of incident intensity. Closed circles, open circles and closed triangles are results for SrTiO₃ with 0.1, 0.3 and 0.5 mm thickness, respectively. The optical Kerr-gate transmittances are also plotted by squares. Solid lines are fitting curves proportional to square of the incident power. The broken line indicates the incident power employed for measurements.

のシステムで用いているレーザー光のパルス幅と同程度である。さらに、 β -カロチンの蛍光スペクトルは可視域で幅広く、広い波長領域でのシステム評価に好都合である。 β -カロチンの時間分解蛍光スペクトルを、ガウシアンビーム伝播に基づいた数値計算と比較することで、システムを評価し、最適化を行った。

4. 受容性蛋白質PYPの超高速カーゲート蛍光分光

最近、蛋白質において、光励起によって生成されたコヒーレンスが室温・溶液中という条件においてさえ、数ピコ秒間持続することが、各種フェムト秒時間分解光学測定によって明らかにされてきた¹⁶⁾。また、これまでに、和周波混合法によって、蛋白質におけるフェムト秒時間分解蛍光が測定されており、そのようなコヒーレンス振動が報告されている¹⁷⁻¹⁹⁾。そこで、われわれは光カーゲート法を用いて、蛍光を時間-周波数マッピングすることにより、電子励起状態における波束の動きを追跡した。光カーゲートシステムの改良により、時間分解能180フェムト秒、スペクトル分解能5 nmを達成し、これは、蛍光の時間-周波数マップ上で、低振動数モードに起因するコヒーレンス振動を捕らえるのに適当な分解能であると考えられる。

室温におけるPYPの定常光吸収・蛍光スペクトルをFig. 5に示す。吸収スペクトルのピークエネルギー、半値全幅はそれぞれ22,422 cm^{-1} (446 nm), 3,190 cm^{-1} である。蛍光スペクトルのピークエネルギー、半値全幅はそれぞれ20,326 cm^{-1} (492 nm), 2,250 cm^{-1} である。したがって、ストークスシフトは2,096 cm^{-1} である。点線で示したエネルギー ω_{00} は吸収スペクトルと蛍光スペクトルが交差するエネルギーであり、電子基底状態ポテンシャルと励起状態

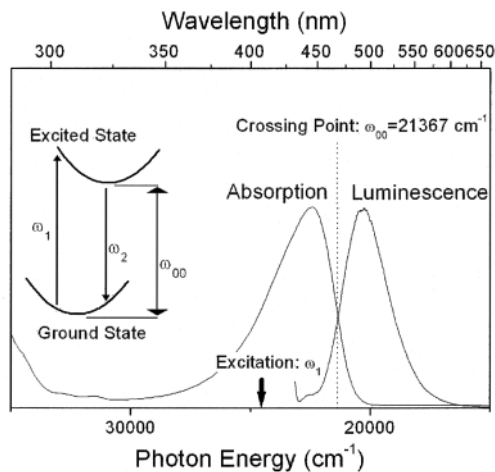


Fig. 5 Stationary spectra of absorption and luminescence for PYP at room temperature. The excitation energy, ω_1 , both for the stationary and the time-resolved luminescence measurements is 24390 cm^{-1} (410 nm) indicated by the thick arrow. The dotted line represents the energy, ω_{00} , at the crossing point of the absorption and luminescence spectra. The schematic potential-energy diagram is illustrated in the inset with ω_{00} , ω_1 , and the emitted photon energy of ω_2 at the luminescence peak.

ポテンシャルの最小点間のエネルギー差にほぼ対応していると考えられる (Fig. 5の挿入図参照).

室温におけるPYPの時間分解蛍光スペクトルをFig. 6に等高線表示で示す. バックグラウンド成分は差し引き, 測定システムの群速度遅延分散等の補正はすでに施してある. 光励起直後(遅延時刻0フェムト秒), 放出光子のエネルギーは $22,500 \sim 17,500 \text{ cm}^{-1}$ の幅広いエネルギー領域に広がり, その後サブピコ秒の時間スケールで, $21,500 \sim 18,000 \text{ cm}^{-1}$ のやや狭いエネルギー領域に分布していく様子が観測されている.

蛍光スペクトルの時間的振る舞いをより詳細に見るために, Fig. 6で得られた時間分解蛍光スペクトルを, 各観測波長においてピーク強度で規格化した (Fig. 7). この表示は, 異なる観測波長間の位相関係を見るのに役立つ. また, 上側の横軸に $\omega_{00} - \omega_2$ の値を表示した. もし, 蛍光が電子励起状態におけるポテンシャル表面の最小点から起こるとすれば, $\omega_{00} - \omega_2$ は光子放出の際に励起される電子基底状態での(分子内/分子間)振動モードのエネルギーに対応する. 一方, $\omega_{00} - \omega_2$ が負のエネルギー領域では, 電子励起状態での緩和過程におおまかに対応していると考えられる.

まず, Fig. 7において, $\omega_{00} - \omega_2 < 0 \text{ cm}^{-1}$ のエネルギー領域に注目すると, $\omega_{00} - \omega_2$ が正に近づくにつれて, 蛍光の減衰時間が長くなっていることが分かる. これは, 光励起後, 電子励起状態でのポテンシャル表面の最小点へ向けて緩和していく, いわゆるダイナミックストークスシフトに対応づけることができる. これは, 溶液中色素分子において観測されているダイナミックストークスシフト^{12,20)}の振る舞いとよく似ているが, 蛋白質中では蛍光の立ち上がり時間が非常に速いという相違点がある.

つぎに, $\omega_{00} - \omega_2 > 500 \text{ cm}^{-1}$ のエネルギー領域に注目する

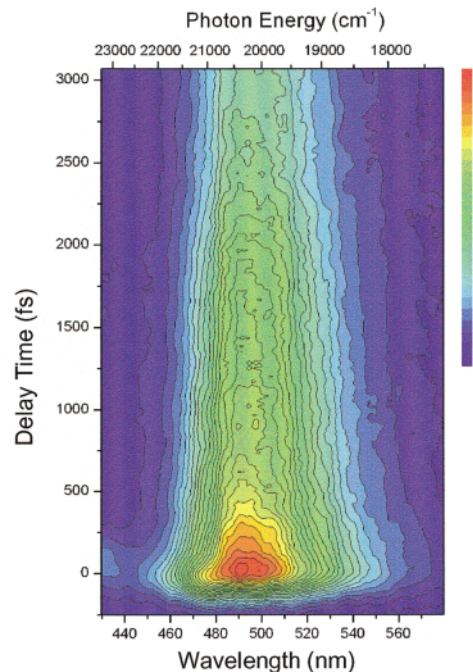


Fig. 6 Time-resolved luminescence spectra for PYP at room temperature are plotted in contour representation.

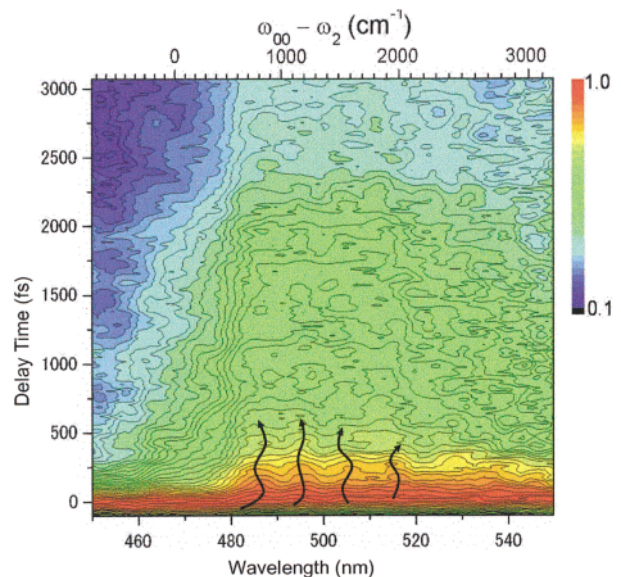


Fig. 7 Normalized spectra by the peak intensity at each wavelength obtained from the data in Fig. 6. Black tracing arrows are drawn to guide the eye.

と, エネルギー的に分離可能な複数の成分の存在が確認でき, 各々限られたエネルギー範囲の中で時間軸にそって振動している様子が見られる (図中に黒い矢印で示した). これまで, 蛍光スペクトルの幅程度の大きな振幅をともなって振動しているのではないかと予想されていたが, われわれの測定結果は, むしろ比較的小さな振幅を持つ振動が複数存在することを示唆した点で重要である. その周期と振幅は, それぞれ $500 \sim 800$ フェムト秒, $100 \sim 200 \text{ cm}^{-1}$ である. 観測したサブピコ秒の振動周期は, 和周波混合法により測定された報告^{18,19)}とほぼ一致している.

これらの振動成分は, サブピコ秒という振動周期か

ら、発色団の電子状態と相互作用している蛋白質全体の低振動数モードに起因していると考えられる。また、 $100 \sim 200 \text{ cm}^{-1}$ という振幅が、低振動数モードの振動エネルギーとほぼ同程度であることから、発色団の電子状態とその周囲を囲む蛋白質全体の振動との相互作用は、光反応初期過程においてはそれほど強くはないことを示唆している。一方、各振動成分の中心エネルギーは、 $500 \text{ cm}^{-1} < \omega_0 - \omega_2 < 2,000 \text{ cm}^{-1}$ のエネルギー領域におもに分布し、それぞれの中心エネルギーは、発色団の電子基底状態における分子内振動モードのエネルギーに対応していると考えられる。このとき、各振動成分の位相関係は発色団の分子内振動モードと周囲の蛋白質全体の動きとの相互作用を反映するため重要であるが、その詳細な議論のためにはさらなる測定精度の向上が必要とされる。

5. まとめ

電子応答に起因する光カー効果に着目し、固体のカー媒質を用いることで、フェムト秒パルスを利用する超高速時間分解蛍光分光システムを構築した。Z-scan法によるカー媒質探索により、効率がよく、かつ、背景光として除くべき、カー媒質の二光子励起蛍光の少ない、 SrTiO_3 を見出した。更なる探索により、より高効率な等方性結晶を見出す可能性がある。また、背景光としての蛍光も、結晶育成や意図的な不純物の導入などに基づく制御により、有効なカーシャッター媒質を創り出すことも考えられる。一挙にスペクトルが取得できるという点、また、容易に時間分解能を高め得る点が注目し値するため、今後、超高速域の時間分解分光において、さらなる発展が望まれる。時間-波長(エネルギー)マップという形で、励起状態におけるダイナミクスを検知できる直感的手法として広く利用される可能性がある。

さらに、開発した手法を適用して、紅色光合成細菌由来のPhotoactive Yellow Proteinにおいて、時間分解蛍光スペクトルの全貌を観測し、振動的振る舞いを明瞭に見出すことができた。室温、溶液においては、多くの色素において同様の観測が行われているが、それらの結果とは異なり、今までに観測されていない現象である。個々の蛋白質内に、光学中心となる発色団が、アミノ酸主鎖とは相互作用を絶たれて存在し、また、光によって誘起されたエネルギーの伝播が特定のモードを通して行われていることを示唆する結果である。エネルギー的な孤立、散逸の抑制、蛋白という同一の構造体中に光学中心が存在するため実現する不均一性の抑制といった特殊な条件下、はじめて出現した現象であると考えられる。色素-蛋白系における光エネルギー利用が損失の少ない特別なチャンネルを通して行われている

可能性を示唆する重要な結果である。今後、さらに、詳細な研究と、他の光受容蛋白などにおける観測との比較を進めていく必要がある。

以上、ハイスループット分光の一例として、超高速カーゲート法のPYPへの適用について述べた。現在、蛋白質単体から、蛋白集合、異種分子を含む構造体へと研究を進めている。手法としても、超高速からマイクロ、ミリ秒オーダーの現象へと展開させつつある。ハイスループット分光の開発は、測定対象に応じて手段を選んで従来法を超えることを目指す。したがって、テーブルトップ、オーダーメイドの機器開発が研究の成否を分けるため、研究機器産業などとの共同も今後の展開として想定している。一方、蛋白モジュールは、構造の定まった蛋白という要素を基礎として配列させ、さらに、連関するシステムを目指すわけであるから、計算機科学と実験科学の融合による複雑系へのアプローチの題材としても興味深い。

参考文献

- 1) H. -S. Albrecht, P. Heist, J. Kleinschmidt, D. V. Lap, and T. Schroder: *Appl. Phys.* **32** (1993) 6659.
- 2) J. T. Fourkas, L. Dhar, and K. A. Nelson: *J. Opt. Soc. Am. B* **12** (1995) 155.
- 3) D. G. Stavenga: *Photoreceptor Evolution and Function* (ed. M. G. Holmes; Academic Press, London, 1991).
- 4) M. Nakasako, M. Kataoka, Y. Amemiya, and F. Tokunaga: *FEBS Lett.* **292** (1991) 73.
- 5) T. Oka, N. Yagi, F. Tokunaga, and M. Kataoka: *Biophys. J.* **82** (2002) 2610.
- 6) K. Mihara, O. Hisatomi, Y. Imamoto, M. Kataoka, and F. Tokunaga: *J. Biochem.* **121** (1997) 876.
- 7) M. Unno, M. Kumauchi, J. Sasaki, F. Tokunaga, and S. Yamauchi: *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 4233.
- 8) 山本 仁ら：第39回年会日本生物物理学会予稿集 (2001年)。
- 9) G. E. O. Borgstahl, D. R. Williams, and E. D. Getzoff: *Biochemistry* **34** (1995) 6278.
- 10) R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, and K. H. Downing: *J. Mol. Biol.* **213** (1990) 899.
- 11) J. K. Lanyi and B. Schobert: *J. Mol. Biol.* **328** (2003) 439.
- 12) M. A. Kahlou, W. Jarzeba, T. P. DuBruil, and P. F. Barbara: *Rev. Sci. Instrum.* **59** (1988) 1098.
- 13) M. A. Duguay and J. W. Hansen: *Appl. Phys. Lett.* **15** (1969) 192.
- 14) P. M. Rentzepis, M. R. Topp, and R. P. Jones: *Phys. Rev. Lett.* **25** (1970) 1742.
- 15) M. Sheik-Bahae, A. A. Said, T. H. Wei, D. J. Hagan, and E. W. Van Stryland: *IEEE J. Quantum Electron.* **26** (1990) 760.
- 16) M. H. Vos, J. -L. Martin, and Biochim: *Biophys. Acta* **1411** (1999) 1.
- 17) R. J. Stanley and S. G. Boxer: *J. Phys. Chem.* **99** (1995) 859.
- 18) N. Mataga, H. Chosrowjan, Y. Shibata, Y. Imamoto, M. Kataoka, and F. Tokunaga: *Chem. Phys. Lett.* **352** (2002) 220.
- 19) N. Mataga, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, N. Hamada, F. Tokunaga, Y. Imamoto, and M. Kataoka: *Phys. Chem. Chem. Phys.* **5** (2003) 2454.
- 20) S. J. Rosenthal, X. Xie, M. Du, and G. R. Fleming: *J. Chem. Phys.* **95** (1991) 4715.

レーザーワード

光カーゲート (optical kerr gate)

光カー効果を利用した超高速ゲート。偏光軸の直交した2枚の偏光子の間にカー媒質を挟んで配置し、カー媒質上でゲート光とシグナル光を重ねる。シグナル光に対して45度に偏光したゲート光によって、カー媒質内に過渡

的な屈折率異方性が誘起される(光カー効果)。結果、カー媒質を透過するシグナル光の偏光状態が変化し、シグナル光は後方の偏光子を通過することができる。

(兼松 泰男)