

光応答蛋白質における超高速反応とコヒーレント振動

又賀 昇, コスロービアン ハイク, 谷口 誠治

レーザー技術総合研究所 (〒550-0004 大阪市西区靉本町1-8-4)

Ultrafast Photoinduced Reaction Dynamics and Coherent Oscillations in Photoresponsive Proteins

Noboru MATAGA, Haik CHOSROWJAN, and Seiji TANIGUCHI

Institute for Laser Technology, Utsubo-Honmachi 1-8-4, Nishi-ku, Osaka 550-0004

(Received September 5, 2002)

We have studied primary processes of ultrafast photoisomerization reactions of photoactive yellow protein (PYP) and visual rhodopsin (Rh) as well as ultrafast photoinduced electron transfer reactions of flavoproteins (FP) by means of the fs fluorescence up-conversion method. On the basis of these studies, we have examined the effects of the protein nanospace (PNS), where the chromophore is held, on the dynamics and mechanisms of the ultrafast and highly efficient photoinduced reactions of these proteins. In this article, we discuss mainly results of our comparative fluorescence dynamics studies on wild type (w.-t.) PYP, its site-directed mutants, analogues with replaced chromophore and FP, including the coherent vibrations in the ultrafast fluorescence decays of w.-t. PYP and mutants in the course of the photoisomerization, ultrafast dynamic Stokes shift of fluorescence of PYP analogues, and ultrafast electron transfer of FP.

Key Words: Ultrafast photoreaction, Ultrafast Stokes shift, Coherent vibration, Protein nanospace, PYP

1. はじめに

光と生命現象の係わりは我々にとってこの宇宙における根源的な問題の一つであり、特に光に対して顕著なレスポンスを示す蛋白質が光励起された場合に、蛋白質内の励起クロモフォア分子が周囲の蛋白質媒体 (protein nanospace, PNS) との相互作用によって助けられて行う極めて高効率で超高速の過程を含む巧妙な反応の仕組みを理解することは最も重要な基本的問題の一つである。このような視点に立って、負の走光性を示すバクテリアの光センサー蛋白質 Photoactive Yellow Protein (PYP)¹⁾、視覚の Rhodopsin (Rh)²⁾、および光生物反応で直接光受容蛋白質として働いているものは少ないが生体内酸化還元で重要な役割をしているフラビン蛋白質 (Flavoprotein, FP)³⁾、について、fsレーザーによる蛍光のup-conversion法で光励起状態のダイナミクスを調べてきた。その結果、次のようなことが明らかになった。

(a) PYP, Rh, FP, いずれの場合も、光励起によって起こる超高速反応は主として励起フランク・コンドン (FC) 状態から蛍光 (FI) 状態へ移行直後の振動非緩和状態から起こっている可能性が大きい。PYPとRhの場合はこの超高速初期反応はPNSにおける励起クロモフォア分子の異性化過程におけるねじれ運動 (twisting) であり、FPの場合はPNSにおける励起クロモフォアへの近接アミノ酸残基 (ト

リプトファン (Trp.NH) ないしチロシン (Tyr.OH)) からの超高速電子移動である³⁾。これらPYP, Rh, FPではクロモフォアの分子構造も性質も全く異なり、PYP, RhとFPでは反応の種類も異なるにも拘わらず、いずれも超高速で高効率の光反応が起こっているのは、光反応に対するPNS環境場の効果が極めて大きいことを示しており、非常に興味深い重要な結果である。

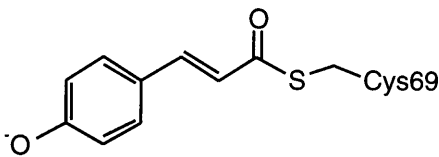
(b) このPNS効果に関連して、PYPの場合に遺伝子操作による種々の変異体 (mutant) と野生種 (wild-type, w.-t.) の反応ダイナミクスの比較を行い^{1a)}、野生種の場合がPNS環境場は最適であり、mutantでは反応は若干遅くなることが明らかにになった。

(c) これらPYPの光反応初期過程におけるクロモフォアのtwistingによる蛍光減衰ダイナミクスの種々の波長における詳細な測定結果から^{1a)}、クロモフォアのtwistingにはクロモフォアやPNSでクロモフォアと相互作用しているアミノ酸残基のコヒーレントな振動がcoupleしており、その振幅が蛍光減衰初期に若干減少するため蛍光スペクトルのsharpeningが起こっている可能性を指摘した^{1a)}。このコヒーレントな振動とのcouplingがtwistingを促進している可能性もあり、より高時間分解能の測定を試みた結果、100 fs-1 ps領域の蛍光減衰曲線にコヒーレントな振動を観測し^{1b)}、現在詳細な研究を展開している。ここでは、w.-t. PYP, 種々のmutantおよびPYPのクロモフォアを類似の若

干異なったクロモフォア分子と入れ換えたanalogue体に関するfs蛍光ダイナミクスの測定による我々の研究結果を中心に、この興味深い重要なPNS環境場における超高速光反応の問題をまとめて考察し、RhやFPのPNS環境場における同様な超高速光反応についても簡単にふれる。

2. 野生種(w.-t.)PYPおよび遺伝子操作による Mutant PYPの蛋白質ナノスペース(PNS)における超高速光反応

PYPのクロモフォア(脱プロトン化p-coumaric acid)はtailの部分がチオエステル結合のところで蛋白質のシステインに結合しており、phenolate負イオンのheadの部分はPNSのアミノ酸残基との水素結合networkによってfixされている。



る。このトランス体のクロモフォア(Tr⁻)は光励起によってFC→Fl conversionに続いてチオエステル結合の所でねじれた(Tw⁻)状態になり蛍光は消光され、そこから基底状態へ返るものと、さらにCis⁻体になり、それに続く反応サイクルを経てもとの(Tr⁻)に戻るものがある。fs蛍光分光ではFC→Fl→Tw⁻のダイナミクスを調べることになり、w.-t. PYPでは水素結合networkとチオエステル結合で両端をPNS中にfixされた状態で数10 fsから数psの間に起こる超高速反応である。1. で述べたように、遺伝子操作により水素結合networkを弱めたり、あるいはチオエステル結合の近くのポリペプチド鎖のアミノ酸残基をよりflexibleなものに変えてクロモフォアを含むPNSの構造をよりルーズにあるいは乱雑にした場合には(Tw⁻)状態の生成過程はいずれの場合にもw.-t. PYPよりもかえっておそくなるという極めて興味深い結果が得られた^{1,4)}。これは、PNS中にfixされた状態で、チオエステル結合のflippingによってphenolateイオンのような大きなグループを出来るだけ動かさずに巧妙な過程で光励起エネルギーを極めて有効に使うTw⁻状態生成の超高速反応を実現する自然によるデザインと考えられる。

クロモフォアに対する環境場が乱雑になった一つの極限としてFig. 1にw.-t. PYPの蛋白質を変性剤でunfoldingした場合のスペクトルの長波長側、短波長側、peak付近の蛍光減衰曲線を示す。短波長側の速い減衰と長波長側のそれに対応した立ち上がりはクロモフォアの周囲の水溶液との相互作用によるdynamic Stokes shiftによるもので、peak付近では指数関数的減衰が観測され、 $\tau \sim 11$ psで、w.-t. PYPのPNS中の超高速減衰(Fig. 2)とは全く異なる。Fig. 2のw.-t. PYPも種々のmutantの場合にもFig. 1のようなdynamic Stokes shiftは見られず、スペクトルの両端でpeak付近よりもより速い初期減衰を示す。これは、1. で述べたようにFl状態でのtwistingにはコヒーレント振動がcoupleしており、その振幅がtwistingの初期に減衰するためと考

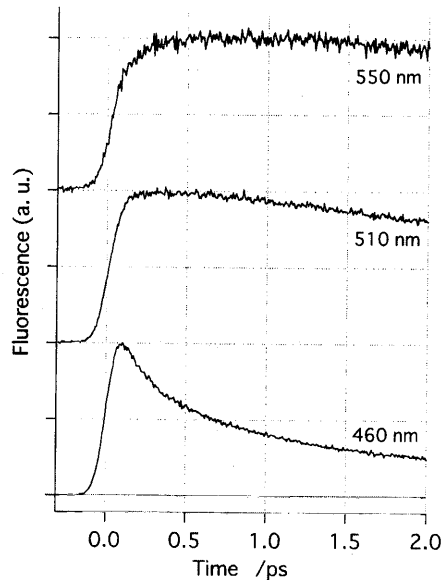


Fig. 1 Fluorescence decays at three characteristic wavelengths on blue, top and red sides of the spectrum for denatured PYP.

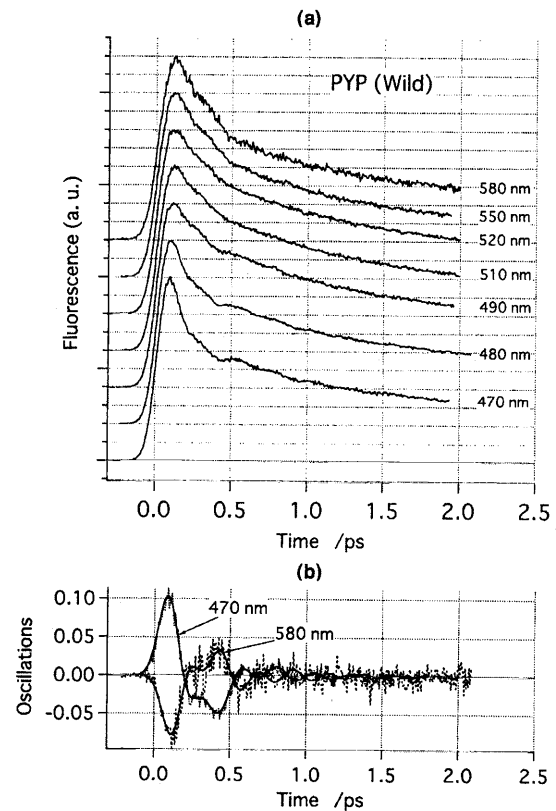


Fig. 2 (a) Fluorescence decays at various wavelengths of w.-t. PYP. (b) Coherent oscillating parts extracted from the fluorescence decay curves at blue (470 nm) and corresponding red (580 nm) sides of the spectrum.

えられる^{1a)}。Fig. 3にそのimageを模式的に示した。実際にFig. 2 (b)に示したように、コヒーレントな振動は速いdampingを示している。Fig. 2, Fig. 3に示したようなFl状態での超高速twistingとcoupleしたコヒーレントな振動の

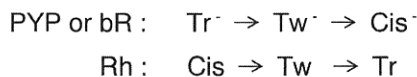
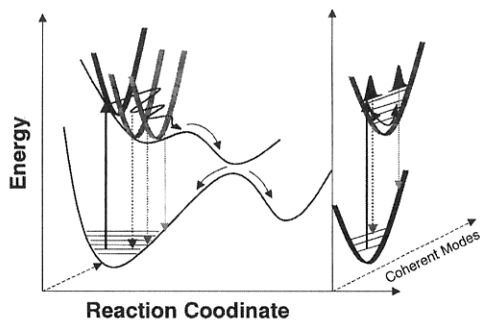


Fig. 3 Schematic image of $FC \rightarrow FI \rightarrow Tw^-$ process along the reaction coordinate of the twisting coupled with coherent vibrations.

dampingによって起こる蛍光減衰曲線の観測波長依存性，すなわち蛍光帯の両端で初期減衰が速くなる効果は，視覚のRhの場合にも観測され^{2b)}，PYPとRhのクロモフォア分子の構造は全く異なるが光励起直後のtwistingに関しては極めて類似していることが確認された^{2b)}．さらに，以前に行われたバクテリオロドプシン (bacterio-rhodopsin, bR) の種々の波長における蛍光減衰曲線の測定結果も同様であり⁵⁾，twistingの過程は同様のメカニズムに従うと考えられる．このような観点から，我々はw.-t. PYP, PYP mutant, RhおよびbRの光励起状態からの異性化初期反応過程に対して，PNS環境場によって規制されている統一的なモデルを提案している^{1b)}．

上述の変性したw.-t. PYPの場合には，クロモフォアの蛍光寿命はPNS中の場合と比べて遙かに長くなり，また励起状態での溶媒和による蛍光のdynamic Stokes shiftが観測されるが，恐らく溶媒和した周囲の水分子の乱雑な相互作用のため，蛍光減衰過程にcoupleしたコヒーレントな振動は消滅する．遺伝子操作による種々のmutantの場合にも，クロモフォアを含むPNSの構造がw.-t. PYPに比べてルーズになり，twistingの反応はおそくなるが，コヒーレントな振動は観測される．現在までに，E46Q, T50V, R52Q, (E46Q/T50V), (E46Q/R52Q), P68A, W119Gの7種のmutantについて測定し，コヒーレントな振動の問題を含む詳細な研究を現在展開中である．最初の二種(E46Q, T50V)はphenolateイオンの-O⁻との水素結合を弱くしたり，水素結合networkを切ってPNSの構造をルーズにし，R52Qではphenolate負イオンの近くの正電荷を持ったアルギニンを中性のグルタミンに変える．次の二種類((E46Q/T50V), (E46Q/R52Q))はこれらのmutationの二つを同時に行ったものでPNSの構造はさらに乱雑になると思われ，蛍光の減衰過程は実際には一カ所のmutationのものよりおそくなる^{1,4)}．またP68Aはポリペプチド鎖のクロモフォアが結合している部位の近くをよりflexibleなアミノ酸残基に変えて，PNS構造をよりルーズにしたものであり，蛍光の減衰はw.-t. PYPに比べてやはりかなりおそくなる．W119Gはクロモフォアが結合していないポリペプチド鎖のアミノ酸残基を1個変えたものであり，蛍光ダイナミクスはw.-t.

PYPと実際上同じであり，またコヒーレントな振動も同様に観測される^{1b)}．mutant PYPの蛍光減衰曲線におけるコヒーレントな振動の実例として，T50Vおよび(E46Q/T50V)の種々の波長における観測結果をFig. 4に示す．このT50Vおよび(E46Q/T50V)を含むdouble mutationの場合には特にコヒーレントな振動の振幅が大きく，クロモフォア周辺の水素結合のnetworkを安定化するのにスレオニン(T)が重要な役割をしていることを示唆しているようである．

以上のようなw.-t. PYPおよびmutant PYPのコヒーレントな振動を示す蛍光減衰曲線は近似的に(1)式のように表され，2種類のコヒーレントな振動が認められる．

$$F(t) = \text{Const.} + \sum_{i=1}^2 a_i \exp(-t/\tau_i) + \sum_{j=1}^2 b_j \exp(-t/\tau_j^d) \sin(\varphi_j + \omega_j t) \quad (1)$$

$$\omega_j = 2\pi\nu_j, \quad j = 1, 2$$

$\nu_1 \sim 130 - 150 \text{ cm}^{-1}$, $\tau_1^d \sim 500 \text{ fs}$, $\nu_2 \sim 40 - 70 \text{ cm}^{-1}$, $\tau_2^d \sim 250 \text{ fs}$, τ_j^d : damping time

ν_1 , ν_2 がどういう振動かということは今の所明確ではないが，一応 ν_1 はクロモフォアの振動(恐らくout-of-plane)であり， ν_2 はPNSにおいてクロモフォアと相互作用している周囲の蛋白質の低周波数の振動と仮定する． ν_1 のdamping timeはmutationによって殆ど変わらないが， ν_2 のそれは，mutationによってPNSの構造がよりルーズに無秩序になると短くなる傾向がある．これは上の仮定と矛盾しないであろう．また，Fig. 1の結果は既に述べたように無秩序になった一つの極限で τ_j^d が非常に短くなった状態とみなされる．

コヒーレントな振動の位相については，Fig. 3のtwistingのreaction coordinateとcoupleしたコヒーレントな振動のimageおよび実際にFig. 2のw.-t. PYPの場合に蛍光スペクトルの短波長側と長波長側の蛍光減衰曲線の対応したコヒーレントな振動の位相に π のシフトがみられ，振動の振幅はスペクトルの両端付近で大きく，peak付近では小さいことから明らかであろう．また同様の結果はmutantの場合にも

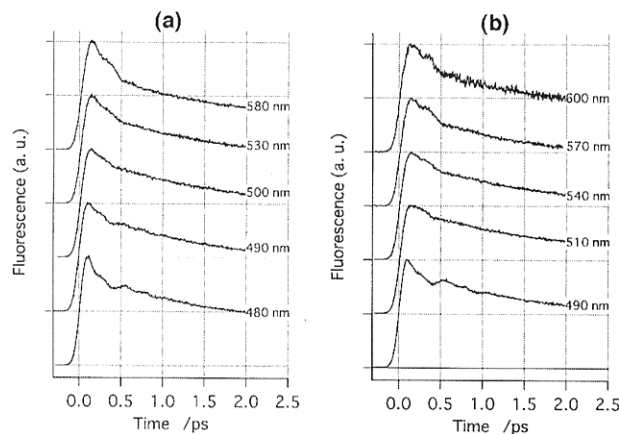


Fig. 4 Coherent vibrations in the fluorescence decay curves of mutant PYP's; (a) T50V, (b) E46Q/T50V.

みられ、Fig. 5にT50Vと(E46Q/T50V)の短波長側と長波長側の対応した蛍光減衰曲線にcoupleした π の位相差を持つコヒーレント振動を示す。

以上、w.-t. PYPおよびそのPNS環境場をmutationによってmodifyした種々のmutant PYPの蛍光ダイナミクスとそれに付随するコヒーレントな振動の比較を行い、光励起によるFC \rightarrow FI \rightarrow Tw過程に対するPNS環境場の極めて大きな重要な効果についての我々の研究成果の現状を中心に考査した。この問題をもう少し違った面から調べる方法として、PYPと類似のクロモフォアで置換基を種々変えたものをPYPの場合と同様に蛋白質のシステイン基に結合したPYP analogueのfs蛍光ダイナミクスの研究を行っており、極めて興味深い結果が得られつつある。

3. PYP Analogueの蛍光ダイナミクスに対するPNS環境場効果と超高速dynamic Stokes shiftの観測

現在調べているクロモフォアは、7-hydroxy-coumarin-3-carboxylic acid (locked chromophore), 3-methoxy-4-hydroxy cinnamic acid (ferulic acid), 4-dimethylamino cinnamic acid (dmac acid) および3, 4-dihydroxy cinnamic acid (caffeic acid) である。

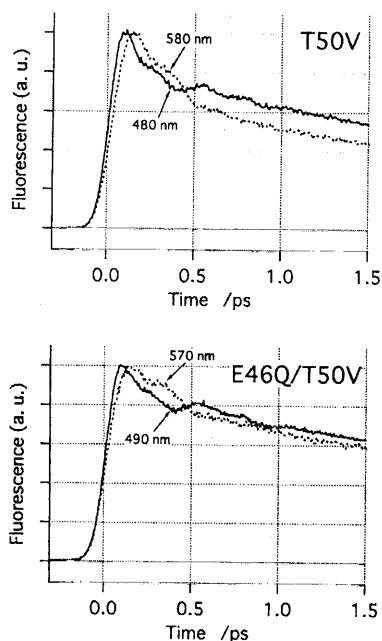
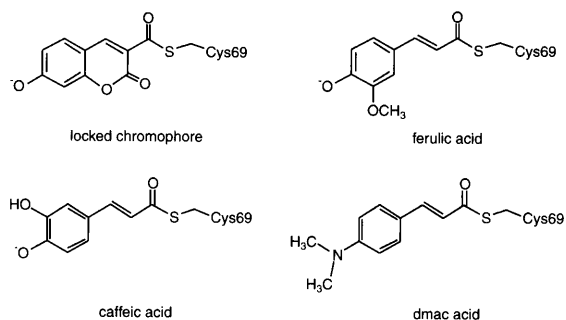
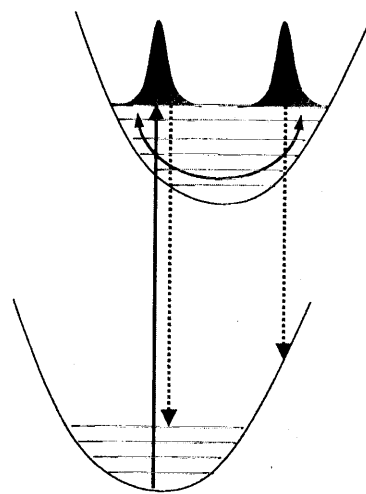


Fig. 5 Coherent vibrations, coupled with the fluorescence decay curves at blue and red sides of the spectrum, and showing characteristics of the phase shift π , for the mutants T50V and E46Q/T50V.

これらの中で、locked chromophore, ferulic acidおよびcaffeic acidの種々の波長における蛍光ダイナミクスの結果をFig. 6に示す。Fig. 6 (a)に示したlocked chromophoreの場合は、rigidな構造で、-CH=CH- やチオエステル結合の所でのtwistingが困難なため蛍光寿命は非常に長く(≥ 60 ps), 数10 fs - 1 ps領域の速い成分は認められない。この結果は以前のChangenetらの報告⁶⁾と完全に一致している。しかし、Changenetらの報告に比べ若干高時間分解能なため、非常にわずかではあるがコヒーレントなoscillationと思われるものがFig. 6 (a)に認められるが現在の所、これを(1)式を用いて解析することには成功していない。

これに対して、Fig. 6 (b)のferulic acidは、w.-t. PYPや種々のmutant PYPとは全く異なったfs蛍光ダイナミクスの波長依存性を示している。すなわち短波長側の端では非常に速い減衰を示し、長波長側になる程減衰はおそくなり、長波長端では短波長端での超高速減衰に対応した立ち上がりを示している。これはw.-t. PYPとは全く異なり、ferulic acidのクロモフォアは励起状態において周囲のPNS環境場との相互作用による超高速安定化による蛍光のdynamic Stokes shiftを示していると考えられる(dmac acidも類似の挙動を示している)。しかし、これらの場合には、w.-t. PYPやmutant PYPで観測したような蛍光減衰ダイナミクスに付随したコヒーレントな振動は観測されていない。これらのPYP analogueの定常的な吸収スペクトルと蛍光スペクトルをw.-t. PYPのそれと比較すると、locked chromophoreの場合は別にして、dmac acidの場合はw.-t. PYPにかなりよく似ており、ferulic acidとcaffeic acidでは吸収スペクトルはw.-t. PYPより若干長波長シフトしているが、蛍光スペクトルはそれよりさらに大きく長波長シフトしており、ferulic acidの場合の超高速dynamic Stokes shiftと矛盾しない。さらにFig. 6(c)のcaffeic acidクロモフォアの場合には、超高速dynamic Stokes shiftに加え明らかにコヒー



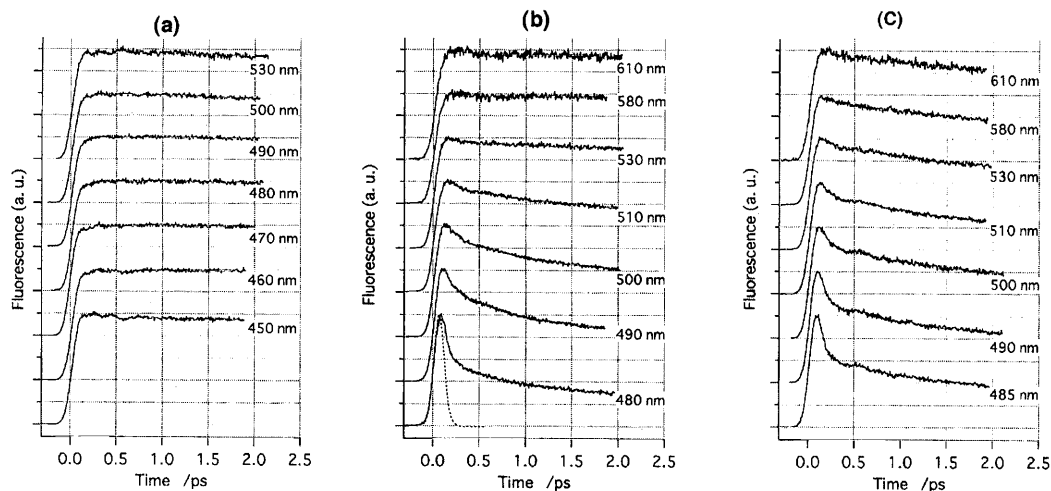


Fig. 6 Fluorescence decay dynamics at various wavelengths of PYP Analogues; (a) locked chromophore, (b) ferulic acid, (c) caffeic acid.

レントな振動も付随しているようであるが、PYPの場合とは異なり、長波長側では殆ど認められなくなる。

このPYP analogueの蛍光の超高速dynamic Stokes shiftは、PNS環境場中で観測された最初の例であるが、そのw.-l. PYPやmutant PYPとの違い、あるいはPYPを変性させた場合の水溶媒に囲まれたchromophoreの蛍光のdynamic Stokes shiftとの違い(PNS中の方がはるかに速い)の原因が何であるかについて、現在詳細な実験結果の解析と考察をおこなっているが、明確な結論が未だ得られていない。いずれにしても、溶液、野生種蛋白質、遺伝子操作でmodifyした蛋白質、あるいはmodifyしたクロモフォアを蛋白質環境場に入れた場合等について、クロモフォアの光励起とそれに続く超高速反応過程に対する環境場の問題としてどのような統一的描像が得られるかということは興味深い重要な問題であり、その解明に向けて研究を進めている。

4. フラビン蛋白質(FP)における

超高速光誘起電子移動反応：

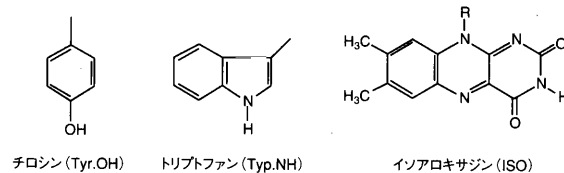
フラボドキシ(Flavodoxin, FD)および

Mutantによる電子移動ダイナミクスとメカニズム

FPは光励起に対して殆ど完全に“無蛍光性”か極めて微弱な蛍光しか示さないものが多い。FPのクロモフォアのイソアロキサジン(ISO)は励起状態ではかなり強い電子受容体として働く。PNS中でこれを励起すると近接芳香族アミノ酸(Trp.NH, Tyr.OH)から高速ないし超高速電子移動によって消光すると考えられ、筆者らはそのことを直接示す最初の実験をpsレーザー分光による過渡吸収スペクトル測定で、1980年代にFDについて行い、 $ISO^* \cdots Trp.NH \rightarrow ISO \cdots Trp.NH^+$ によるラジカルイオン対の生成を確かめた⁷⁾。また最近、Riboflavin Binding Protein (RBP), Glucose Oxidase (GOD), D-amino Acid Oxidase Benzoate Complex (DAOB)等の“無蛍光性”FPのfs蛍光ダイナミクスを測定し、これらFPのX線結晶構造解析によるPNS中のISOとTrp.NHやTyr.OHとの距離、配向を超高速蛍光減衰ダイナ

ミクスと比較して検討し、これらの場合にも電子移動消光メカニズムが妥当であることを示した^{3,8)}。

ここでは、最初にpsレーザー分光による時間分解過渡吸収スペクトル測定によって、光誘起電子移動によるイオンラジカル対、 $ISO \cdots Trp.NH^+$ の生成を確認した⁷⁾ FDについて、fs蛍光減衰曲線測定による電子移動ダイナミクスとメカニズムの研究を最近行った結果⁹⁾について報告する。FDおよびRBPではPNS中でクロモフォアのISOはいずれの場合もTrp.NHとTyr.OHに上下から挟まれた配置になっており、ISOと各アミノ酸残基の面間距離は3~4 Åで非常に接近していることが分かっている³⁾。従ってこれらの系ではISOを励起した直後にアミノ酸残基からの超高速電子移動による蛍光消光のため寿命は非常に短くなり、殆ど“無蛍光性”になると考えられるが、実際に蛍光寿命は100 fs程度になる^{3,8,9)}。GODやDAOBではISOとTyr.OHやTrp.NHの間の距離はもう少し大きく、共役π電子系の面がISOと向かい合ったサンドイッチ構造ではなく傾斜しているため、電子移動反応はもう少し遅くなる。



この超高速電子移動反応とPNS中での励起ISOとTrp.NH, Tyr.OHの相互作用の詳細を明らかにするために、遺伝子操作で、Trp.NH, Tyr.OHのどちらかを電子移動反応における電子供与体としては不活性なphenylalanineに変えたものおよび両方を変えたmutantについて、蛍光ダイナミクスを調べ、Fig. 7のような結果が得られた⁹⁾。これらの減衰曲線は全て、二つのexponentialの重ね合わせで表されるが、装置のレスポンスを考慮して、(2)式で実測値をシミュレーションしたときのパラメータを、RBPの値も含めてTable 1に示す。

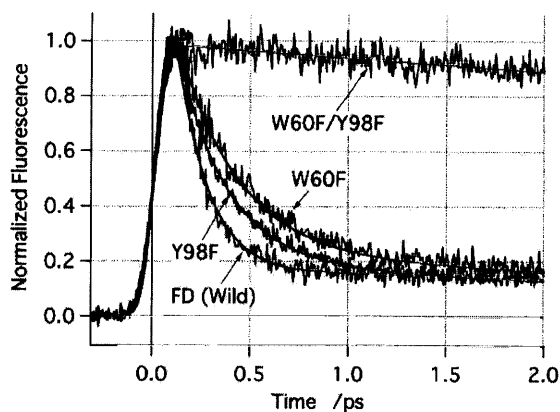


Fig. 7 Fluorescence rise and decay dynamics of w.-t. FD and mutants W60F (Trp.NH is replaced by phenylalanine), Y98F (Tyr.OH is replaced by phenylalanine) and W60F/Y98F (both Trp.NH and Tyr.OH are replaced by phenylalanine).

$$I(t) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2) \quad (2)$$

w.-t. FDの非常に長寿命の成分は、FDがわずかに分解して、溶液中に遊離したクロモフォアによるものである。従ってw.-t. FDのPNSにおける光誘起電子移動反応の速度定数は $k_{et} = (1/\tau_1) = 6.3 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ である。またTyr.OHをphenylalanineに変えたY98Fの方が短寿命であるが、これは励起クロモフォアへの電子移動はTrp.NHからの方が反応の自由エネルギーギャップ $-\Delta G_{et}$ がTyr.OHからよりも大きく、かつ反応はnormal regionにあるからである¹⁰⁾。

PNSにおけるクロモフォアと近接Trp.NHやTyr.OHの間の距離や配向が遺伝子操作によるアミノ酸残基の取り換えによって実際上変化しないならば、w.-t. FDの $k_{et} = 6.3 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ は二つのmutant W60FおよびY98Fの蛍光ダイナミクスから得られる k_{et} の和に近似的に等しくなるはずである。これらのmutantの最初の速い減衰成分はアミノ酸残基からの電子移動によるものであるが、おそい成分は恐らくISOから若干離れた位置にあるTrp.NHやTyr.OHからのおそい電子移動によるものと考えられ、これも考慮に入れると $k_{et} = 2.6 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ (W60F), $k_{et} = 3.5 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ (Y98F)でその和 $k_{et} \sim 6.1 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ は実験誤差の範囲内でw.-t. FDの和 $k_{et} \sim 6.3 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ と一致する。さらに、(W60F/Y98F)の場合にはISOへの電子移動は若干離れた位置のTrp.NHやTyr.OHからのものだけであり、 $k_{et} = (1/\tau_2) = 0.055 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ で、これとW60F, Y98Fの速い成分から求めた k_{et} の和 $6.05 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ との和 $6.1 \times 10^{12} \text{ s}^{-1}$ は上の値と一致する。これらの

結果はPNS内でISOに近接しているTrp.NHやTyr.OHをphenylalanineに取り換えた場合にPNSおよびその周辺の構造は殆どdisturbされず高速光誘起電子移動過程が起こっていることを示している。このようにして、FDの場合にPNS中で特異的に起こる超高速光誘起電子移動反応のメカニズムとダイナミクスが完全に解明された。

以上、PNS中で特異的に超高速光誘起反応を行うもう一つの例としてFPに関する我々の研究について簡単に述べたが、FDやRBPのような超高速光誘起反応を行う系の場合にも、またその他の我々が研究したFPの場合にも、PYPのような蛍光減衰ダイナミクスに付随したコヒーレントな振動は現在までの所観測されていない。しかし我々が現在までに研究したFPについては、水溶液中における励起クロモフォアの溶媒和を含むdynamic Stokes shiftの大きさと、PNS中でのStokes shiftの大きさが殆ど同じであることが明らかになっている^{3,8)}。水溶液中のクロモフォアのdynamic Stokes shiftは現在のfs up-conversion装置で直接観測できるが、PNS中のそれは、装置のレスポンス以内に起こる超高速過程であり、蛍光状態は振動非緩和状態ではないかと考えている。

装置の時間分解能をさらに高くした測定で、超高速電子移動とcoupleしたコヒーレントな振動の観測を計画している。

5. まとめと展望

以上、w.-t. PYP, mutant PYPの光励起状態における超高速twisting過程とそれに付随するコヒーレントな振動に対する蛋白質ナノスペース環境場の極めて重要な効果について、我々のfs蛍光分光による研究を中心に考察し、さらにPYP analogue系の場合に、光にレスポンスを示す蛋白質としては最初の例である、蛍光の超高速dynamic Stokes shiftを見出した。これらの超高速光反応のメカニズムとダイナミクスおよびそれに対する蛋白質ナノスペースを含む種々の環境場効果についての研究を進め、またFPの超高速光誘起電子移動反応も蛋白質ナノスペースの特異的環境場の問題としてこれに含め、より広い見地から統一的描像の確立に向けて研究を展開しつつある。

参考文献

- 1) (a) N. Mataga, H. Chosrowjan, Y. Shibata, Y. Imamoto, and F. Tokunaga: J. Phys. Chem. B. **104** (2000) 5191. (b) N. Mataga, H.

Table 1 Parameter values for simulation of fluorescence decay curves of RBP, w.-t. FD and its mutants with $I(t) = a_1 \exp(-t/\tau_1) + a_2 \exp(-t/\tau_2)$, taking into consideration the response of the apparatus.

	a_1	a_2	τ_1/fs	τ_2/ps	χ^2
w.-t. FD	0.92	0.08	158	> 500	0.27
W60F	0.83	0.17	322	5.5	0.31
Y98F	0.85	0.15	245	4.0	0.13
W60F/Y98F	—	1.0	—	~18	0.45
RBP	0.93	0.07	100	0.7	0.075

- Chosrowjan, Y. Shibata, Y. Imamoto, M. Kataoka, and F. Tokunaga: Chem. Phys. Lett. **352** (2002) 220.
- 2) (a) H. Chosrowjan, N. Mataga, Y. Shibata, S. Tachibanaki, H. Kandori, Y. Shichida, T. Okada, and T. Kouyama: J. Am. Chem. Soc. **120** (1998) 9706. (b) H. Kandori, Y. Furutani, S. Nishimura, Y. Shichida, H. Chosrowjan, Y. Shibata, and N. Mataga: Chem. Phys. Lett. **334** (2001) 271.
- 3) N. Mataga, H. Chosrowjan, Y. Shibata, F. Tanaka, Y. Nishina, and K. Shiga: J. Phys. Chem. B. **104** (2000) 10667.
- 4) H. Chosrowjan, N. Mataga, Y. Shibata, Y. Imamoto, and F. Tokunaga: J. Phys. Chem. B. **102** (1998) 7695.
- 5) M. Du and G. R. Fleming: Biophys. Chem. **48** (1993) 101.
- 6) P. Changenet, H. Zhang, M. J. van der Meer, K. J. Hellingwerf, and M. Glasbeek: Chem. Phys. Lett. **282** (1998) 276.
- 7) A. Karen, M. T. Sawada, F. Tanaka, and N. Mataga: Photochem. Photobiol. **45** (1987) 49.
- 8) N. Mataga, H. Chosrowjan, Y. Shibata, and F. Tanaka: J. Phys. Chem. B. **102** (1998) 7081.
- 9) N. Mataga, H. Chosrowjan, S. Taniguchi, F. Tanaka, N. Kido, and M. Kitamura: J. Phys. Chem. B. **106** (2002) 8917.
- 10) A. Karen, N. Ikeda, N. Mataga, and F. Tanaka: Photochem. Photobiol. **37** (1983) 495.

レーザーワード

超高速光反応 (ultrafast photoreaction)

光化学や光生物反応には本質的に超高速のものが多く、その反応ダイナミクスとメカニズムの詳細な定量的研究はfsレーザー分光によって可能となり、大きく進歩しつつある。特にbarrierlessでcoherentな超高速反応を高効率で起こすことができれば極めて有用であるが、高速の無輻射遷移による失活のため通常の光化学反応では容易で

はない。一方光応答性を示す蛋白質でそのような過程が実現している場合があり、光合成反応中心、ロドプシンや本解説論文のPYPなどであり、蛋白質ナノスペースで実現しているそのような超高速・高効率反応の解明は極めて興味深い重要な問題である。
(又賀 昇)