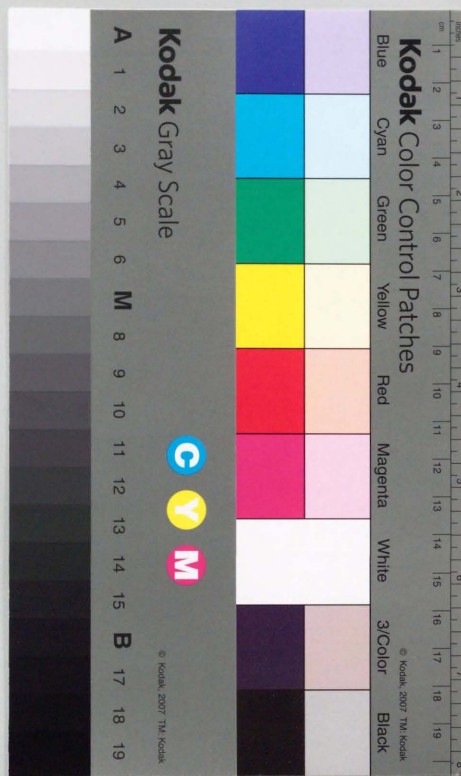


博士論文

波長可変フェムト秒レーザーを用いた
タコロドプシン及びバクテリオロドプシンの
光初期過程

泰地 真弘人



①

博士論文

波長可変フェムト秒レーザーによる
タコロドプシン及びバクテリオロドプシンの
光初期過程

泰地 真弘人

1991 年 12 月

目次

1 序	1
2 波長可変フェムト秒レーザー	5
2.1 序	5
2.2 装置	8
2.2.1 基本波フェムト秒光源	8
2.2.2 白色光増幅器	10
2.2.3 吸収分光装置	12
2.3 装置の特性	13
2.4 データの処理について	17
2.5 装置の性能と問題点	18
3 タクロドブシンの光初期過程	21
3.1 序	21
3.2 実験	26
3.2.1 試料	26
3.2.2 装置	30
3.3 結果	31
3.3.1 吸収変化スペクトル	31
3.3.2 吸収変化の時間依存性	34
3.4 考察	42
3.4.1 重水中のサンプルでの違い	42
3.4.2 プライムロドブシン及びバソロドブシンの位置	42
3.4.3 ヒブソロドブシン	48
3.5 まとめ	49
4 14-フルオロバクテリオロドブシンの光初期過程	51
4.1 序	51
4.2 実験	55
4.2.1 試料	55
4.2.2 装置	56
4.3 結果と考察	59

4.3.1	バクテリオロドプシンの吸収変化スペクトルとその時間依存性	59
4.3.2	暗順応状態での 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化 スペクトルとその時間依存性	62
4.3.3	暗順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの結果に 関する考察	62
4.3.4	明順応状態での 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化 スペクトルとその時間依存性	66
4.3.5	明順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの結果に 関する考察	69
4.4	まとめ	71
5	まとめ	73
	謝辞	77
	参考文献	87

第 1 章 序

視覚は生物にとって最も重要な感覚の一つである。視覚は、感度の高さ・空間分解能力・高度な情報処理などの点で際立った特徴をもっている。こうした特徴のうちいくつかは、目の形態・神経系の構成に依存したものである。これらは生物の種によって互いに異なり、実に多様な進化を遂げている。しかしながらいずれの生物においても、光子の一次レベルの受容にかかわっている分子(視物質)は、そろって 11-*cis* レチナール(ビタミン A アルデヒド)がオプシンと呼ばれる蛋白質と結合した分子なのである。視物質が光を吸収すると、まず 11-*cis* レチナールが all-*trans* レチナールに構造変化をおこし、これが更にオプシンの構造変化を誘起する。この構造変化が分子レベルで増幅され、最終的に神経に対する刺激として検出される。オプシンのアミノ酸配列は生物によっても異なるし、色覚を持つ生物の場合は細胞の種類によっても異なる。またレチナールにも数種類ある。こうした違いのために感度が極大になる波長は視物質の種類によって異なっている。しかし、ここで述べたような視覚の分子レベルの機構は驚くほど似かよっているのである。

また、視覚系の感度の良さ、ダイナミックレンジの広さは光検出器としても極めて優れた性能を誇るもので、視覚の研究は応用的な観点からも重要な課題として認識されている。こうした興味から、視覚の機構は古くから研究されており、今なお多くの研究者を魅了して活発な研究が続けられている。

本研究で扱ったロドプシンは、薄明視つまり明暗を感じる細胞(脊椎動物の場合桿体細胞)に存在する視物質であり、最もよく研究されているものである。

高度好塩菌 *Halobacterium Halobium* の細胞膜にも、発色団としてレチナールをもつ蛋白質が見つかっており、バクテリオロドプシンと呼ばれている。バクテリオロドプシンは光を吸収してプロトン細胞外に汲み出す働きをもっており、*Halobacterium Halobium* はこうしてできるプロトンの濃度勾配をエネルギー源として利用している。バクテリオロドプシンの場合、レチナールは all-*trans* 型をとっており、光を吸収すると 13-*cis* に構造が変化する。このようにバクテリオロドプシンの生理的役割はロドプシンと異なっているが、光反応の第一段階にレチナールの *cis-trans*(*trans-cis*) 異性化を利用している点では共通性があり、同じ問題意識のもとに研究が進められている。

本論文では、フェムト秒時間分解分光技術を用いておこなった、タクロドプシンおよびバクテリオロドプシンの光励起後の初期過程の研究について論ぜられる。

近年の超短光パルス発生技術の発展は、分光学にも革命的な進歩をもたらし、これによって物質のダイナミクスをフェムト秒の時間分解能で観測することが可能になった。現在では、物理学・化学・生物学の幅広い領域で標準的技法として使われるようになり、多くの成果を産みだしている。この技法はロドプシンの光初期過程の研究にも早い段階から応用されてきた。しかし、ロドプシンを励起するためには、波長約 500nm の緑色帯の光が必要である。この波長域のフェムト秒パルス発生は難しく、このため従来行われてきたロドプシンの初期過程の研究は、(ごく最近発表されたものを除いて) 最高でも 6 ピコ秒の光パルスを用いておこなわれたものしかなかった。しかし、共鳴ラマン散乱や発光効率の実験結果は、ロドプシンにおいては *cis-trans* 異性化がピコ秒以下の時間で起こることを示していた。従って 6 ピコ秒の時間分解能では不十分であり、ロドプシンの光初期過程において最も興味深い過程である *cis-trans* 異性化過程を見ることはできていなかった。また、3 種類の間mediate (プライムロドプシン、ヒプソロドプシン、パソロドプシン) の関係などの問題点が数多く残されていた。本論文では、パルス幅約 300 フェムト秒の光パルスを用いておこなったタクロドプシンの研究の結果が示される。本研究によって、上述した問題点に関する重要な知見を数多く得ることができた。

バクテリオロドプシンの光初期過程については、既に多くの研究者によってフェ

ムト秒領域での研究が進められている。その結果、各種中間体の存在とその緩和の時定数や、励起状態での波束の運動の様子が明らかにされている。しかし、緩和の時定数を決める要因や、異性化の分子機構を考えるためには、さらに実験データや理論的考察を加えていかねばならない。本論文では、分子の化学構造の一部を変更して得られるアナログの研究を通じて、発色団の電子構造と異性化のダイナミクスの間の関係について考察を加えた。

以下、論文の内容を略説する。

まず第2章では、ロドプシンの研究のために開発した波長可変フェムト秒光源について述べられる。まず 630nm のフェムト秒パルスのスペクトル幅を自己位相変調効果によって広げ、その一部分を取り出すことにより波長変換を実現した。これを Q スイッチ Nd:YAG レーザーの第三高調波で励起された色素増幅器によって増幅することによって、測定に十分なパワーを持つパルス幅約 300 フェムト秒の緑色帯の光パルスを得ることができた。

次に第3章では、この装置を用いておこなったタクロドプシンの光初期過程の結果が示される。まず、プライムロドプシンの生成は約 400 フェムト秒以内に起こり、それがパソロドプシンに移行することがわかった。この間の吸収変化が小さいことから、プライムロドプシンとパソロドプシンは似かよったものであり、プライムロドプシンにおいて既にロドプシンは all-*trans* への異性化を完了しており、基底状態にいる可能性が高いと結論された。また、800nm より長波長側には 2~4 ピコ秒の寿命を持つ利得が観測された。これはプライム(パソ)ロドプシンを生成する以外に、何らかの光る状態に分岐しているためであると考えられた。

ヒプソロドプシンに関しては、はっきりとヒプソロドプシンの生成を示すような信号は得られなかった。ヒプソロドプシンの減衰にしたがうパソロドプシンの生成は見られなかったことから、ヒプソロドプシンを経て生成されるパソロドプシンは、プライムロドプシンから直接生成されるものに対して、20%以下の寄与を持つに過ぎな

いと結論された。

次に、第4章では、バクテリオロドプシンのレチナールの14位の水素をふっ素で置換することによって得られるアナログ「14-フルオロバクテリオロドプシン」のフェムト秒吸収分光の結果が示される。14-フルオロバクテリオロドプシンでは、発色団の電子構造には大きな変化が期待できるが、蛋白質と発色団の間の相互作用は、通常のバクテリオロドプシンの場合と似ていると考えられる。この研究は、発色団の電子構造を変化させることにより、異性化のダイナミクスがどのような影響を受けるかを調べることを目的としておこなった。

14-フルオロバクテリオロドプシンには、暗順応と明順応の2種類の状態が存在し、明順応状態では特異な長波長シフトした成分が存在することがわかっている。

まず暗順応状態では、通常のバクテリオロドプシンとほとんど変わらず、励起状態I中間体は約500フェムト秒でJ中間体に緩和していた。このことは、異性化のダイナミクスを決定する要因は、発色団の電子構造ではなく、蛋白質-発色団相互作用であることを示している。

また、明順応状態では、長波長シフトした成分からの寄与のため、励起状態の寿命は約1ピコ秒と遅くなった。これは、発色団とそのシッフ塩基の周囲にあるプロトン供与基との相互作用を考えることにより説明された。

第2章

波長可変フェムト秒レーザー

2.1 序

近年の超短光パルス発生技術の発展には目をみはるものがある[1]。1960年にレーザーが発明されて以来の急激な進歩で、現在ではフェムト秒領域の光パルスを発生させることもそう難しいことではない。また、これらの技術は時間分解光学の飛躍的な発展をもたらした。短パルス化という面では、1987年にベル研究所で6フェムト秒という記録[2]が達成され、競争にも一息ついた感がある。しかし、物理学・化学・生物学への応用という面からみて重要なのは、短パルス化だけではない。その波長を変えられなければ、自ずと適用範囲が限られてしまう。例えば、本研究で取り上げたタコロドプシンの場合、吸収極大は約480nmにある。しかし、従来著者らが修士過程で開発してきたフェムト秒光源は、中心波長が約630nmに固定されており、ロドプシンを励起することはできない。このため、まず本研究では波長可変フェムト秒光源の開発を行なった。開発にあたっては次の点を考慮した。

- ロドプシンを励起できる波長を発生させること。つまり、青～緑の領域(400～550nm)の光を発生させること。
- ポンププローブ型吸収分光を行うために十分なだけのパルスエネルギーを得ること。これは対象とする物質・レーザーのくり返し周波数などにも依存するが、大体の目安として1パルス当たり数 μJ である。

- できるだけ広い波長可変域を確保すること。

レーザーの波長を変える方法としては、大きく大別して2つの方法がある。一つは、色素などの交換が容易な利得媒質か、広い利得スペクトル幅を持つ利得媒質を励起してレーザーの発振波長を変える方法である。もう一つは、何らかの形で非線型光学効果を利用して、レーザーの波長変換を行なう方法である。

まず、第一の方法について考える。色素レーザーを用いて、青～緑の波長域のフェムト秒パルスを直接発生させることは、不可能ではないがかなり難しい。主な問題点は、励起光源の制約にある。青～緑の波長域で色素レーザーを発振させる場合、400nmより短波長のレーザーを励起光源として用いなければならない。この条件を満たすものの内で、フェムト秒パルス発生に適当なもの一つは、CWモード同期Nd:YAGあるいはNd:YLFレーザーの第三高調波である。これらのレーザーを用いた同期励起色素レーザーも発売されているが、励起光源の強度に余裕がないことなどが問題であり、フェムト秒パルスの発生は困難であるのが現状である。ただし、近年優れた非線型光学材料が次々と開発されて、高調波発生の効率が上がってきているので、この先有効な方法の一つである。

またもう一つの方法として、パルスQスイッチモード同期Nd:YAG(またはNd:Glass)レーザーの第三高調波などを励起光源に用いた、分布帰還型色素レーザーによってフェムト秒パルスを生ずる方法がある[3]。

レーザーから青～緑帯の光を直接発生させるのではなく、赤外の短パルスを生ずるから、第二高調波発生により可視光を生ずることもできる。特に、最近優れた固体レーザー媒質($\text{Ti:Al}_2\text{O}_3$)が開発され、これによって波長720～1000nmの広い帯域でフェムト秒パルスが容易に発生できるようになった。この第二高調波の利用が、今後最も有力な手法となると思われる。ただし、この場合は530nm近辺の波長帯の光の発生は難しい。

次に、第二の非線型光学効果を利用する方法について考える。波長が固定したレーザーから、連続的に波長を変えられる光を取り出すには、二つの方法が考えられる。一つは、光パラメトリック発振を利用する方法である。もう一つは、強い超短パルス

を物質に集光し、自己位相変調効果によって広帯域の白色光を発生させる方法である。本研究では後者の方法を用いて波長変換を実現している。パラメトリック発振を用いるほうがエネルギーの変換効率が良いが、励起光より長波長側の光しか発生できない。一般的なフェムト秒光源は波長600nm近辺に集中しているので、青～緑の光を発生させるためにはさらに第二高調波発生によって変換する必要がある。これに比して、自己位相変調を用いる方法では、直接この帯域の光を発生できる。ただし、後に述べるように、エネルギーをある特定の波長にだけ集中して変換するのではなく、スペクトル幅自体を広げた後にその一部分だけをとりだすことによって波長変換を行うため、そもそも効率が悪いという欠点がある。特に、求める波長が入射光の波長から離れるにつれて強度が弱くなるため、入射光から非常にはなれた波長の光を得るのは難しい。長所としては、位相整合の条件がないので、非常に簡単に波長変換を達成できることがあげられる。

また、レーザーの発振波長を直接変更する第一の方法に比べた場合、波長を変えるために共振器内の素子を変更する必要がないことがこの方法の長所である。強いピーク強度を持つパルスを生ずる必要がないため、装置が大掛かりになるのが欠点であるが、本研究の場合、既に自己位相変調による白色光を発生させるのに十分なだけの強度をもつフェムト秒光源を開発済みであったのでこの問題は無視できた。

自己位相変調により白色光を発生させ、この一部を取り出しただけでは、試料を励起する光源としてはエネルギー不足である。このためこれを増幅する必要がある。波長可変性、フェムト秒パルスに十分な帯域幅、青～緑領域という波長帯などの条件を考えると、色素を利得媒体に用いた増幅器がもっとも適している。このようなシステムは既にMigus等[4]が報告している。また、銅蒸気レーザーを色素増幅器の励起光源として用いて、近赤外域の波長可変光パルスを生ずるシステムもよく利用されてきた[5]。しかし、この構成の装置は、原理的に光をだすだけでなく簡単であるが、実際には実用的な強度で、ASE(Amplified Spontaneous Emission、増幅された自然放出)をできるだけ抑えて出力するのが問題になる。実際、本装置の開発を始めた時点では、緑色帯でサブピコ秒～フェムト秒の分光を行なった例はなかった。

その後 Shoenlein ら [6] が、同じ原理に基づいて、色素増幅器の励起光源に XeF エキシマーレーザー (351nm) を用いた中継り返し (400Hz) の青～緑帯のフェムト秒光源を開発し、やはりロドプシンの研究に応用している [7]。本研究では、レーザーを2台用いて、ポンプ-プローブ型吸収分光に十分使えるレベルの光を発生させることを目的とした。もちろん最近のレーザーを用いるなら、一台でも基本波用と波長可変光源用の両方の増幅器を励起するのに十分なパルスエネルギーがあるが、現有の装置を進展させる方向で検討を進めた。結果として、手持ちのレーザーがもう一台あったので、これを波長可変光源用の色素増幅器の励起光源に利用することにした。

2.2 装置

2.2.1 基本波フェムト秒光源

図 2.1 に赤色フェムト秒光パルス (630nm) を発生させるための装置を示す [8, 9]。これは著者らが修士課程において製作した装置に、若干の改良を施したものである。光源は、衝突モード同期 (Colliding Pulse Mode-locked, CPM) 色素レーザーと、4 段の色素増幅器からなる。CPM 色素レーザーは、7 枚のミラーと 4 つの群速度分散補正用プリズムからなる共振器を持つ。励起光源としてはアルゴンイオンレーザー (Spectra Physics、Model 2030 または LEXEL LASER、Model 3500) を用い、利得媒体に Rhodamine 6G のエチレングリコール溶液、過飽和色素に DODCI のエチレングリコール溶液を使用している。最短約 40 フェムト秒の光パルスを発生できるが、安定性を確保するため、通常は 80~120 フェムト秒で使用している。その他の出力特性は、くり返し 100MHz、パルスエネルギー約 200pJ、波長 625nm である。

この CPM レーザーの出力を、4 段の色素増幅器を用いて増幅する。増幅器の励起光源として Q スイッチ Nd:YAG レーザー (Quanta-Ray, DCR1A) の第二高調波 (532nm, 10Hz) を用いた。増幅用の色素としては、初段に Rhodamine 640、残りの 3 段に Sulforhodamine 640 を 2% の界面活性剤 (Ammonix LO) を含んだ蒸留水に溶かしたものを使った。4 段共に横励起配置をとっているが、第 3 段には Bethune cell [10]、第 4 段には Axicon cell [11] を用いて、ビームクオリティと安定性の向上を達成した。

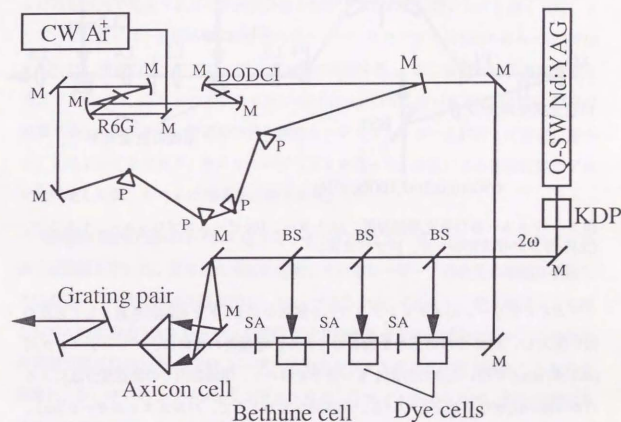


図 2.1: 基本波フェムト秒光源の概略図。CPM 色素レーザーと 4 段の色素増幅器からなる。M:ミラー、BS:ビームスプリッター、P:プリズム、SA:過飽和色素。

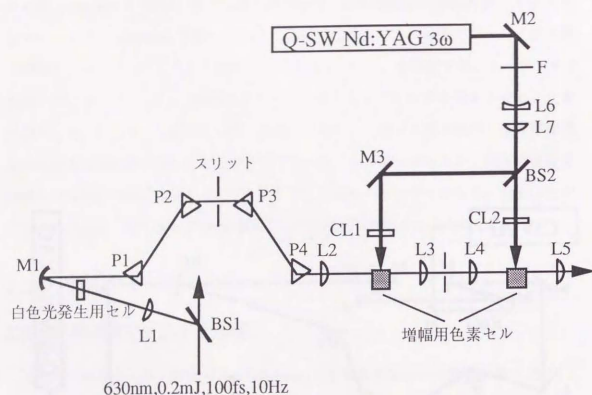


図 2.2: フェムト秒白色光増幅装置。M:ミラー、BS:ビームスプリッター、L:レンズ、CL:シリンダリカルレンズ、P:プリズム。

マラカイトグリーンのエチレングリコール溶液のジェットを過飽和色素として各段の間に挿入し、ASEからの寄与を除去している。増幅器の後は、グレーティング対(600本/mm)を用いた負の分散をもつ素子を用いて、増幅器内での群速度分散によるパルス幅の広がりを補正している。最終的な出力として、パルスエネルギー 0.2mJ、パルス幅約 100 フェムト秒、波長 630nm の光パルスが得られる。

2.2.2 白色光増幅器

白色光を増幅するための装置を図2.2に示す。前節で述べた基本波光源からの出力は、まずビームスプリッターで2つに分割される。このうちの透過側は、図2.3に示す吸収分光装置に導かれ、プローブ光を発生させるために用いる。反射側は、レンズで四塩化炭素を含んだ光路長 3mm のガラスセルに集光し、自己位相変調効果によっ

てスペクトル幅を広げる。生成した白色光をアルミ全反射凹面鏡で反射させて、プリズム列に導く。プリズムを2つ通過したところにスリットを置き、凹面鏡の位置を調節して白色光がスリットの面上に焦点を結ぶようにする。こうすると、スリットの面上で分光された白色光が像を結ぶので、この装置は分光器として機能し、スリットの位置・幅を調節することによって任意の波長・スペクトル幅の光を切り出すことができる。またこのプリズム列は、負の群速度分散をもつ素子であり、白色光発生過程および増幅器内で発生する正の群速度分散を補正するための装置としても働く[12]。プリズムの材質には、高屈折率・高分散のスーパーフリントガラス SF57 あるいは SF10 を用いた。通常のガラスでは、プリズム間の距離を数 m にしなければ群速度分散を補正できないが、これらのガラスを用いれば 15cm(SF57) ないし 40cm(SF10) 程度の距離で済むためである。群速度分散の調節は、プリズムをビームに対して垂直に動かすことによってなされる。更に2つのプリズムを通して、波長による空間位置のずれを元に戻した後、ビームは増幅器に導かれる。

増幅器の励起光源にはパルス Q スイッチ Nd:YAG レーザー (Quantel, YG-472) の第三高調波を用いた。基本波の増幅に使用しているレーザー、白色光の増幅に使用しているレーザー共にパルス幅は約 5 ~ 15ns であるから、CPM レーザーの出力を基準としてこの2台の YAG レーザーを同期させて動作させなければならない。このための同期回路を自作した。CPM レーザーの出力をフォトダイオードで検出したものを基準に、レーザーのフラッシュランプのトリガ、Q スイッチのトリガ、および測定系のトリガを出力する。Q スイッチのトリガはデジタルディレイラインおよび電圧可変型ディレイラインによってサブナノ秒〜ナノ秒の精度で調整できる。

増幅器は2段構成になっており、励起エネルギーの分岐比は初段 10%、2 段目 90% である。初段のセルには通常の色素レーザー用のクロードのセルを用い、マグネティックスターラー (サイニクス, CS101) で攪拌して色素の劣化を防ぐ。2 段目のセルはフローセルで、マグネットギヤーポンプ (イワキ, MDG-M2TD24) を用いたサーキュレーターを作製して、色素溶液を流している。各段からの ASE の除去には、ピンホールや色ガラスフィルターを使用している。

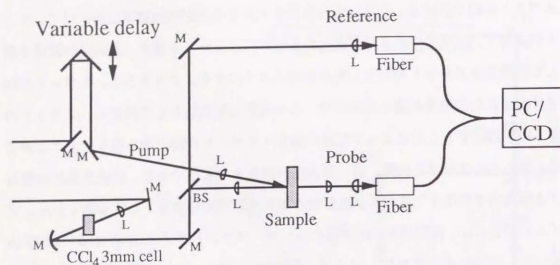


図 2.3: フェムト秒ポンプ-プローブ吸収分光装置。M:ミラー, BS:ビームスプリッター, L:レンズ, PC:分光器, CCD:CCD センサー

2.2.3 吸収分光装置

図 2.3 にポンプ-プローブ型吸収分光装置の概要を示す。励起光としては上記の増幅装置の出力、あるいは 630nm の基本波パルスを用いる。励起光は、ステップイングモーターで駆動された可変遅延路を通して、サンプルに集光される。残りの基本波パルスはレンズで四塩化炭素の入った光路長 3mm のセルに集光され、自己位相変調効果により白色光を発生させる。これを凹面鏡で平行光にしてフィルター類を通した後、ビームスプリッターで 2 つに分割し、片方は試料に集光され、プローブ光として用いる。もう一方はプローブ光の変動を補正するための参照光として用いる。プローブ光、参照光共にファイバー束ケーブルを通して分光器 (Jarrel-Ash, Monospec 27) に導かれる。分光器で分散させた光を CCD (Charge-Coupled Device) センサ (Princeton Instruments, TE-576UV) で検出する。この時 CCD センサの領域を 2 分割し、プローブ光、参照光を同時に一つの検出器で測定する。CCD センサは専用コントローラ (Princeton Instruments, ST-110) で制御される。コントローラは GP-IB インターフェイスを介してマイクロコンピュータ (日本電気, PC-9801RA21) に接続され、吸収変化の計算などの一次データ処理を行ない、結果は磁気ディスクに保存される。

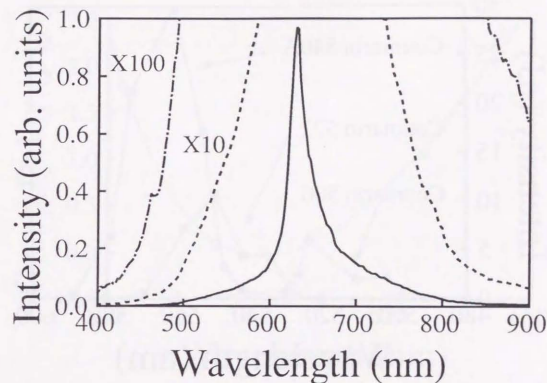


図 2.4: 四塩化炭素を含んだ光路長 3mm のガラスセルによる白色光スペクトル。

また同じ光学系を用いて、励起光とプローブ光、あるいは励起光と基本波パルスの間の 2 次の強度相互相関を測定し、プローブ光の時間特性や励起光のパルス幅を求めている。この場合は、試料の位置に非線型光学結晶をおき、和周波発生によって相互相関を測定する。非線型光学結晶には、厚さ 0.2mm の BBO (β -barium borate) 結晶を用いている。発生した和周波の光を、分光器 (リッター, MC-10) を通して光電子増倍管 (浜松ホトニクス, 1P28) で検出する。

2.3 装置の特性

白色光のスペクトル 図 2.4 に四塩化炭素の入った光路長 3mm のガラスセルにフェムト秒パルスを集光したときに得られる白色光のスペクトルを示す。入射パルスの中心波長 630nm を中心に裾が広がる形になっている。裾の部分では、およそ中心波長から 100nm ずれるごとに 1/10 になっている。絶対的な強度としては、波長 500nm

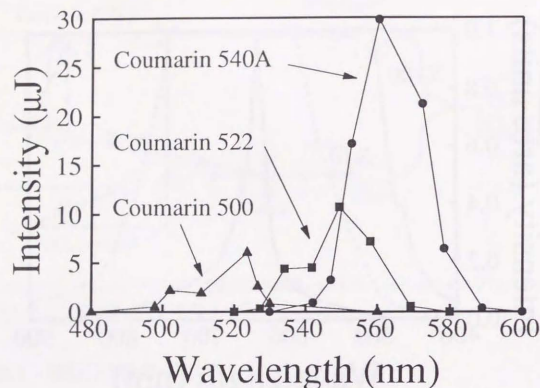


図 2.5: 増幅後のパルスの出力特性。各点でスペクトル幅 3nm の光を増幅したときの出力強度を示してある。

においてスペクトル幅 3nm の光を切り出したとき、10 ～ 20nJ のパルスエネルギーが得られる。

増幅後の出力 図 2.5 に、増幅後の出力特性を示す。色素としては、クマリン 500、クマリン 522、クマリン 540A の 3 種類を用い、スペクトル幅 3nm の光を増幅したときの出力強度である。長波長側はど強くなっているのは、白色光のスペクトルの形状を反映しているためである。実際、得られる利得はどの色素を用いた場合でも約 100 ～ 200 倍であった。また、ここの図に示した強度は、ASE の流入をなるべく (10% 以下) 抑えるような対策を施した上での強度であることに注意しておく。つまり、この図に示したのは実用的な意味での強度である。これから、約 500nm から 580nm の光がこの 3 つの色素を使って得られることがわかる。

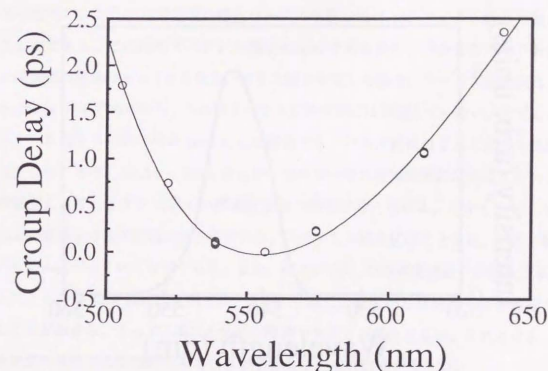
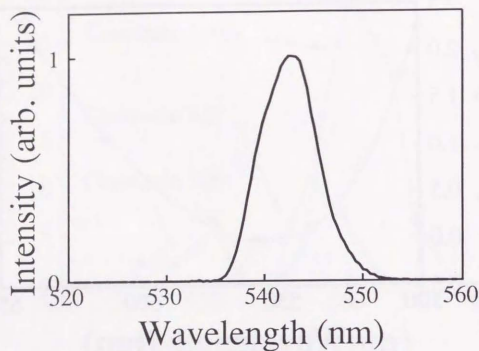


図 2.6: 増幅されたパルスの群遅延の分散。丸印は実測、実線はガイドラインである。

パルスの時間特性 切り出して (増幅した) 白色光パルスと基本波 (630nm) の間の相互相関を測定して、パルスの時間特性を評価するために利用した。装置内で発生する群遅延の分散のため、最短パルスを得るには、波長ごとにプリズムの位置を最適化する必要がある。図 2.6 に、出力波長を変えたときの、出力の相対的な遅延時間の変化の一例を示す。増幅器内の正の群速度分散と、プリズム対による負の群速度分散が組み合わさって、遅延時間に極小点が発生している。この極小点で、2 次の群速度分散が 0 になるので、プリズムの位置を動かして、極小点がいまだたい波長におよそ一致するようにすれば、パルス幅を最短にすることができる。もっと単純に、一波長点でのパルス幅を測定して、それが最短になるようにプリズムの位置を最適化する方法でも、同じ結果を得ることができる。

図 2.7(a) に、増幅後のスペクトルを、また図 2.7(b) に基本波との相互相関波形を示す。相互相関波形はガウス型でよくフィットすることができ、その半値全幅は 320

(a)



(b)

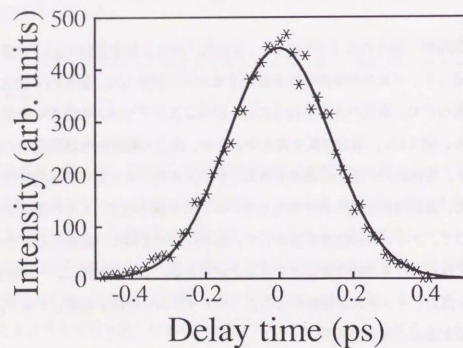


図 2.7: (a) 増幅後のスペクトルの一例。中心波長は 543nm、スペクトルの半値全幅は 6.4nm。(b) 増幅後のパルスと基本波との相互相関波形。*:実測値、実線は半値全幅 320 フェムト秒のガウス型関数へのフィッティング。

フェムト秒であった。この時の基本波の自己相関波形の半値全幅は 210 フェムト秒であったので、これから増幅後の緑色パルスの半値全幅は 280 フェムト秒と見積もることができる。この時のスペクトル幅は 6.4nm であるから、パルスのスペクトル幅と時間幅の積 $\Delta\nu\Delta\tau = 1.8$ となる。ガウス型を仮定した場合、フーリエ変換限界では $\Delta\nu\Delta\tau = 0.44$ であるから、これはフーリエ変換限界には到達していない。ただし、スペクトル幅をこの約半分の 3nm にした場合でも、パルス幅はほとんど変わらなかった。このときは、 $\Delta\nu\Delta\tau = 0.9$ となるが、まだフーリエ変換限界には到達しない。この原因として、まず 3 次以上の群速度分散の効果が考えられる。しかし、もし 3 次以上の群速度分散が問題になる場合には、スペクトル幅を広げたときに、パルス幅がどんどん広がっていくはずである。また、図 2.6 に示した群速度遅延の分散を見ると、スペクトル幅 3nm 程度の範囲では、3 次の分散による広がりは無視できる程度であることがわかる。よって、高次の分散が原因であるとは考えにくい。それよりも、白色光発生過程での空間的なふらつきが影響している可能性が大きい。

2.4 データの処理について

この節では、データの解析手順について簡単に触れておく。

CCD 検出器で測定された 1 ショット毎のプロープ光と参照光強度から、その場で吸収変化スペクトルの平均値を計算し、磁気ディスクに保存する。この測定プログラムは竹内佐彦氏によって製作されたものを改造して用いた。

可変遅延路の長さを変化させて、各遅延時間での吸収変化スペクトルを測定する。ところが、測定系の群速度遅延の分散のために、プロープ光が試料に到達する時間が波長によって異なっている。つまり、プロープ光の励起光に対する遅延時間は、可変遅延路の長さだけでなく波長にも依存している。従って、波長に応じて時間原点のずれを補正する必要がある。補正を行なうためには、まずプロープ光の時間特性を調べなければならない。このために、和周波発生法を用いて励起光とプロープ光の強度相互相関を測定し、各波長での時間原点を求める。通常は約 40nm おきに測定し、これを光周波数の自乗を横軸にとって二次スプライン関数でフィットすることにより、各

波長での時間原点と可変遅延路長の対応を決定する。

この情報を基に、測定したデータの時間原点のずれを補正する。ある遅延時間、ある波長での吸収変化を、前後の最も近い時間データを直線補間して求めている。従って、ある程度密に可変遅延路長を変えてデータ点をとらないと、直線補間が成り立たなくなるので、注意が必要である。つまり、通常変化の速い時間原点付近では時間間隔を短くして、データを密に測定しなければならない。

吸収変化の時間依存性は、各時間点でのスペクトル変化を基にして得ている。時定数を求めるために、非線型最小乗法を用いて次の関数へのフィットをおこなった[13]。

$$\Delta A(t) = \exp\left(\frac{(t-t_0)^2}{T^2}\right) * \begin{cases} \sum_{i=1}^N A_i \exp(-\frac{t}{\tau_i}) + A_0 & (t > 0) \\ 0 & (t < 0) \end{cases} \quad (2.1)$$

つまり、応答を指数関数(+定数)、入力をガウス型と仮定したときの信号である。ガウス型と仮定したのは、(2.1)式は誤差関数を用いてあらわすことができるので、比較的簡単に計算できるためである。また、パルスの相互相関波形がガウス型でよく合わせることができることから、この仮定は妥当であると考えられる。ただし、時定数がパルス幅に比べて短くなってきた場合には、より正確なパルス波形の情報が必要になるであろう。本研究では、フィッティングを行なう際にガウス関数のパルス幅を±20%程度変えてフィットを行ない、それによる変動分も含めて時定数のおよその誤差を見積もっている。

以上の解析を行なうプログラムは全て自作したものである。

2.5 装置の性能と問題点

以上のように、実用になるレベルのフェムト秒波長可変光源を製作することができた。この装置の性能を下にまとめておく。

波長 500 ~ 570 nm

エネルギー 1 μJ @500 nm, 30 μJ @560 nm (Δλ = 3 nm)

繰り返し 10 Hz

パルス幅 約 300 フェムト秒

この装置の問題点を以下に整理しておく。

白色光発生時の空間パターンの悪さ 自己位相変調によってフェムト秒白色光を発生させているが、空間パターンが汚く、分光した後で見るとスペckル様になっている。この原因としては、もとのフェムト秒基本波パルス自体の空間パターンも均一とはいえないものである。これを四塩化炭素に絞りこんだときに、self-focusingをおこしていくつものフィラメントになってしまうためではないかと考えている。この空間パターンの悪さのため、初段の増幅用セルにきつく絞れなかった。このため、初段の倍率は約5倍であり、あまり高い利得が得られていない。

安定性 増幅器の出力の変動は約30~50%程度である。この原因は、主として白色光発生過程に生じている。レーザーの電気的なジッターは1ナノ秒以下であり、問題にならない程度であった。

パルス幅 前節の最後で述べたように、パルスはフーリエ変換限界に到達していない。

結局、問題点の原因は白色光発生過程でのパターンに集約される。これを改善するため、絞りこむレンズの焦点距離や、白色光発生用の媒質をかえてみたが、有意な結果は得られなかった。やはりビームクオリティの良いパルスから白色光を発生させるより他に手はないのかもしれない。

第3章

タコロドプシンの光初期過程

3.1 序

生物の視覚については、古くから様々な研究がおこなわれてきた。全ての生物の視覚系において、光子の受容を担っている物質は、11-*cis* レチナールが蛋白質オプシンとシッフ塩基結合したものである。この中で最もよく研究されているのは、脊椎動物の桿体細胞または一部の無脊椎動物の感光細胞にあるロドプシンと呼ばれる物質である。ロドプシンの発色団の構造を図3.1に示す。ロドプシン中において、レチナールは11-*cis*型をとり、プロトン化されたシッフ塩基をもつ。プロトン化シッフ塩基をもつレチナールは単体では442nmに吸収極大をもつが、これがオプシンと結合することにより、長波長シフトする。これはオプシンシフトと呼ばれている。生物によってオプシンはそれぞれ異なるので、吸収極大の位置にも違いがあるが、およそ500nm

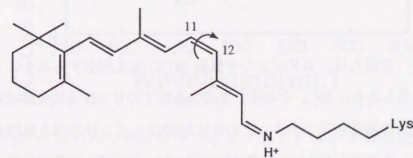


図 3.1: タコロドプシンの発色団の化学構造。

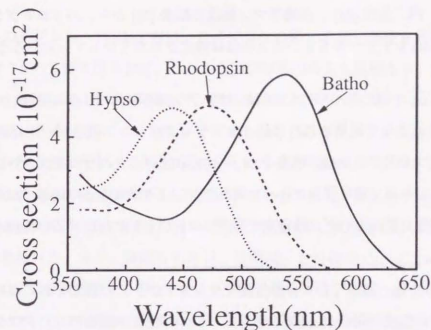
である。例えば本研究で扱ったタコロドプシンの場合 480nm、また同様によく研究がおこなわれているウシロドプシンの場合 500nm に吸収極大を持つ。この吸収極大波長は、それぞれ海中および地上における太陽光スペクトルの極大に一致しており、生理的理由と合致しているのである。

ロドプシンが光子を吸収して最初起こす変化は、レチナールの 11-*cis* → *all-trans* 異性化である。プロトン化されたシッフ塩基をもつレチナール単体では、この異性化の量子効率は高々25%程度であるが、ロドプシンにおいては 60 ~ 70% という非常に大きな値 [14] となり、視覚の高い感度を支える一因となっている。これから、オプシンはこの異性化過程において本質的な役割を担っていることがわかる。この異性化反応に誘起されて蛋白質はさらに構造変化を続け、メタロドプシン II (metarhodopsin, 頭足類の場合アシッド-またはアルカリ-メタロドプシン) に至ると、トランスデューシンと結合し、様々な反応過程を経て化学的に増幅され、最終的に神経に対する刺激として感知される。脊椎動物では、メタロドプシンは一旦オプシンとレチナールに分解した後再生されるが、タコ・イカなどの頭足類の場合、約 20°C 以下の低温では分解せずにロドプシンが再生される [15]。

本研究で扱うのは、レチナールが異性化する 100 ピコ秒以内におこる現象である。レチナールが異性化する初期過程において、現在 3 つの中間体があると考えられている。それらはバソロドプシン (bathorhodopsin)、ヒプソロドプシン (hypsohodopsin)、プライムロドプシン (primerhodopsin) と呼ばれる中間体である。図 3.2 に、低温での光誘起スペクトルから再構成したバソロドプシン、ヒプソロドプシンの吸収スペクトルとその差スペクトルを示す [16, 17]。以下これらの中間体の性格を簡単にまとめる。

バソロドプシン 吉沢らは、ロドプシンを低温 (87K) で光照射することによりバソロドプシンを発見した [18, 19]。その後、生理的条件下のピコ秒時間分解吸収分光でもこれに対応する中間体が見つかり、その生成時間は 6 ピコ秒以内と見積もられた [20, 21, 22]。但し後述するように、ヒプソロドプシン・プライムロドプシンが見出されてからは、バソロドプシンの生成時間は数十ピコ秒であると考えられた。バソロド

(a)



(b)

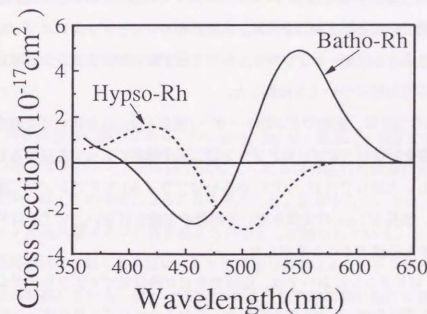


図 3.2: (a) タコのバソロドプシン、ヒプソロドプシンの吸収スペクトル Rhodopsin:10°C でのロドプシン、Batho:10K でのバソロドプシン、Hypso:10K でのヒプソロドプシンのスペクトル。(b)(a) から計算した差スペクトル。Batho-Rh: バソロドプシン-ロドプシン、Hypso-Rh: ヒプソロドプシン-ロドプシン。

ブシンは長波長シフトした吸収ピーク (約 535nm) をもっている。また、バソロドブシが 9-*cis* ロドブシンからも生成する事実 [19] や、 $C_{11}=C_{12}$ を固定したアナログでの実験 [23]、円二色性 [24]、共鳴ラマン散乱の結果 [25] から、バソロドブシンがねじれた *all-trans* レチナールをもつことはほぼ確立されたといっていだろう。

ヒプソロドブシン ヒプソロドブシンは、ロドブシを液体ヘリウム温度 (10K) で光照射することによって発見された [26]。ヒプソロドブシンの吸収ピークは約 440nm にある。ヒプソロドブシンは、温度を 20 ~ 40K に上げるとバソロドブシンに変換されることから、ヒプソロドブシンはバソロドブシンより前にある中間体ではないかと考えられ、実際に室温でのピコ秒分光でヒプソロドブシンに対応する中間体が確認された [27, 28]。

小林 [29, 30] は、室温でのピコ秒分光でウシロドブシの研究をおこない、ヒプソロドブシンの生成時間を 15 ± 5 ピコ秒、ヒプソロドブシンからバソロドブシンに変換される時定数を 50 ± 20 ピコ秒と見積もった。またバソロドブシンより約 20nm 長波長にシフトした誘導吸収をもち、ヒプソロドブシンに緩和する状態を見出し、これを緩和励起状態であると考えた。さらに、大部分のバソロドブシンはヒプソロドブシンから生成されるとしたが、ヒプソロドブシンを経ずにバソロドブシンが生成される過程が存在する可能性についても指摘した。

一方、松岡ら [31] は、室温でピコ秒レーザー (波長 532nm) を用いて吸収変化の強度依存性の実験を行ない、ヒプソロドブシンは二光子励起によって生成すると結論した。これに対し、大谷ら [17] は、バソ (あるいはプライム) ロドブシンの二段階吸収を避けるため、波長 461nm の光源を用いて同様の実験を行ない、ヒプソロドブシンが一光子過程でも生成することを示した。

また、ウシロドブシンにおいては、室温でのピコ秒分光でヒプソロドブシンの生成を検出できたのは小林 [29, 30] のみである。このようにヒプソロドブシンの生成に関しては研究者によって意見が分かれている状態である。

ヒプソロドブシンの構造に関してはよくわかっていないが、共鳴ラマン散乱の結果から、プロトン化されたシッフ塩基をもち、レチナールは *all-trans* 型であると推定

されている [32]。

プライムロドブシン Doukas らは、ロドブシンの発光の量子効率を測定し、 $(1.2 \pm 0.5) \times 10^{-5}$ という値を得た [33]。これから励起状態の寿命を見積もり、1 ピコ秒以下であろうと結論した。また、共鳴ラマン散乱の結果も、サブピコ秒で *cis-trans* 異性化が起こることを示していた [34, 35]。そこで七田ら [36] はウシ、イカ及びタコロドブシンのピコ秒分光を行ない、小林が見出ししていたのと同様の、バソロドブシンによく似ているが約 10nm 長波長シフトした誘導吸収をもつ変化を新しい中間体とみなし、これをフォトロドブシンと名付けた。一方同じ中間体を、大谷ら [17] はプライムロドブシンと名付けた。また、神取ら [37] は、五員環、七員環で $C_{11}=C_{12}$ の結合を固定したアナログのピコ秒分光を行なった。五員環の場合には、強固に固定されているので長波長シフトした中間体は観測されず、異性化が阻害されたため励起状態の寿命が長くなり蛍光が観測された。一方、 $C_{11}=C_{12}$ の結合がある程度ねじれることができる七員環の場合には、プライム (フォト) ロドブシンに対応する吸収変化が観測された。このことは、プライムロドブシンがかなりねじれた *all-trans* 状態であることを示唆している。この場合蛍光は非常に弱く、プライムロドブシンが基底状態にある証拠の一つとなっている。

次に、同位体効果の問題がある。Peters ら [38] は、低温 (< 40K) でウシロドブシンのピコ秒分光を行ない、570nm 付近に見られる誘導吸収の減衰に同位体効果があり、重水中では 1/7 の速度になることを見出した。重水中においては、シッフ塩基の水素イオンが重水素イオンに置き換えられることが知られている。このことから、彼らは光励起後最初に起こる過程は、シッフ塩基の水素イオンのトンネリングによる移動であると結論している。但し、前述したように光励起後に起こる最初の変化は *cis-trans* 異性化であることを示す証拠は数多く、最近では彼らの説はあまり省みられなくなっている。しかし、彼らが観測している過程が、一体何に対応しているのかについては再検討の余地がある。

問題点をまとめると、以下のようになる。

- プライムロドプシンの位置付け。
プライムロドプシンの生成時間、つまりロドプシンが異性化に要する時間はどれほど速いのか?
また本当にプライムロドプシンは基底状態なのだろうか?
- ヒプソロドプシンの位置付け。
一光子で生成するのか、それとも二光子なのか。
パソロドプシンはヒプソロドプシンを経て生成されるのか?
- 重水中のサンプルでの違い。

これらを明らかにするためには、時間分解能を上げることが必須である。本研究の目的は、サブピコ秒の分光手法をロドプシンに応用して、これらの問題点を解決することである。

ごく最近、Schoenlein ち [7] がウシロドプシンのフェムト秒分光を行なって結果を報告している。彼らは 35 フェムト秒の時間分解能で 450 ~ 580 nm の範囲の吸収変化を観測し、プライムロドプシンが 200 フェムト秒以内に生成し、数ピコ秒でパソロドプシンになると報告している。彼らが観測している波長はごく狭い範囲に限られているが、彼らの結果は本研究の結果とほぼ一致する。詳しくは考察の節で扱いたい。

3.2 実験

3.2.1 試料

試料は姫路工業大学の中川将司博士および津田基之教授に調製していただいたものである。以下の5つのサンプルについて実験をおこなった。

サンプル a タコ視細胞マイクロビレイ膜を 2 % 界面活性剤 L-1690 で可溶化したもの。OD_{475nm}^{1cm} = 8。

サンプル b タコ視細胞マイクロビレイ膜を 2 % 界面活性剤 L-1690 で可溶化したもの。OD_{475nm}^{1cm} = 12。

重水中のサンプル c 2 % 界面活性剤 L-1690 で可溶化したタコ視細胞マイクロビレイ膜を凍結乾燥して重水に溶かしたもの。OD_{475nm}^{1cm} = 15。

サンプル d タコ視細胞マイクロビレイ膜を 2 % 界面活性剤 L-1690 で可溶化したもの。OD_{475nm}^{1cm} = 10。

サンプル e タコ視細胞マイクロビレイ膜を 2 % 界面活性剤 L-1690 で可溶化したもの。OD_{475nm}^{1cm} = 14。

上記で、タコ視細胞のマイクロビレイ膜に含まれる膜蛋白のうち、タコロドプシンの比率は約 80 % である。また、光学的純度 $\Lambda_{280nm}/\Lambda_{475nm} \leq 3$ である。タコには複数のロドプシンが存在する可能性があるが、網膜においては一種類しか存在しない [39]。

基本的な試料の調製法は、文献 [15, 17] に示した手順と同様であるが、緩衝液の構成あるいは界面活性剤の種類などの細かい点で違いがある。以下に試料の調製法の概略を示す。

以下の調製は全て暗室中で、赤色光下において行なう。北海道近海で捕らえられたみずだこ (*Paroctopus defleini*) は、即座に暗所で解体され、眼球だけを取り出して -80°C に保存しておく。氷中で約 50 個の眼球を切り裂き、網膜を取り出す。それを緩衝液 A (400 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MOPS [pH 7.4], 1 mM DTT, 20 μM APMSF) に懸濁させてガーゼでこす。残留物を再度緩衝液 A に懸濁したものを合わせて、遠心 (20 Krpm, 30 分) にかけてベレットを取り出す。これをショ糖を溶かした緩衝液 A に懸濁しテフロンホモジナイザーでホモジナイズし、最終的な濃度を 34 % にする。ショ糖浮揚法でマイクロビレイ膜を単離する。遠心の条件は 20 Krpm, 30 分である。赤色光下で無色の層がショ糖の上に浮かび、底に黒いベレットが落ちる。オレンジ色のゾーンを取り出し、赤色光下で無色の層だけを回収し緩衝液 A で薄めてホモジナイズした後、遠心 (20 Krpm, 30 分) にかけてベレットを取り出す。これ

をもう一度、上と同様にショ糖浮揚法を用いて精製する。これを等張の緩衝液 A に懸濁してホモジナイズした後、遠心にかけて上清に抽出される蛋白質を除く作業を数回くりかえす。その後低張の緩衝液 B (10 mM MOPS [pH 7.4], 1 mM DTT, 20 mM APMSF) に懸濁し、遠心法により低イオン濃度で抽出される蛋白質を除く作業 (20 Krpm, 40 分) を数回くりかえす。最終的に緩衝液 B に懸濁した状態にし、完全に遮光し -80°C で凍結して保存しておく。50 個の眼球から、total OD_{475nm} = 60 ~ 80 のロドプシンが得られる。また、このサンプルの電気泳動パターンは、~ 50 KD の単一バンドとなる。このことは、他の蛋白質による汚染がほとんどないことを示している。また、電気泳動の条件によっては二量体のバンドも現れるが、その比率は 30 % 以下である。また二量体より大きな会合体は存在しない。実際の試料では、以下に述べるように界面活性剤を高い濃度で使用しているので、二量体の比率はこれよりもかなり小さいと考えられる。また、可視域での二量体の吸収スペクトルは単分子の場合とほとんど一致することから、二量体が存在するとしても光初期過程に与える影響は小さいであろう。これらのことから二量体の影響は無視できると考える。

この凍結保存した状態の試料を必要だけ取り出して解凍し、まず遠心分離機でペレットの状態にする。これを 2 mM MOPS [pH 7.4], 2% 界面活性剤 (L-1690、サンプル e では SM-1200) で可溶化する。まず約 10 分間震とうした後、遠心 (100 Krpm, 15 分) にかけて、上清だけを取り出して試料とした。

重水中のサンプル c は、この界面活性剤で可溶化した試料を凍結乾燥し、重水で同じ体積になるように溶かす作業を 3 回繰り返すことにより調製した。

また、サンプル d およびサンプル e では、centriflow CF-25 型 (Amicon Co.) フィルターを用いて限外濾過することにより試料を濃縮した。

サンプル a, b 及び重水中のサンプル c は、完全に遮光し、 -18°C で凍結した状態で輸送され、 -20°C で保存し、測定の前直前に解凍して用いた。サンプル d, e は、完全に遮光し、 4°C の液体の状態に輸送され、 4°C で保存して試料として用いた。サンプル a は一年以上冷凍保存されており古い試料であるが、サンプル b, c は調製後 2 ヶ月以内、サンプル d, e は一週間以内に全ての測定を終えており、これらについては試料

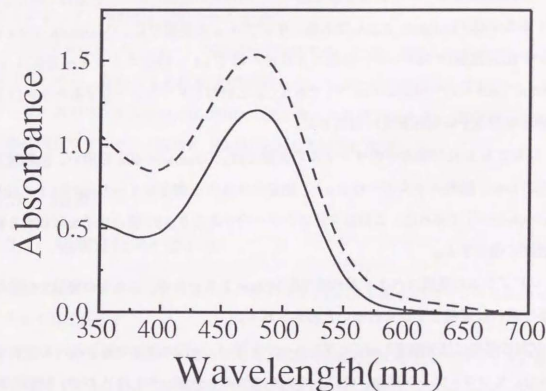


図 3.3: タコロドプシンの吸収スペクトル。実線: サンプル b、破線: 重水中のサンプル。

の劣化の心配はない。

主として同時に調製されたサンプル b と重水中のサンプルの結果について述べ、サンプル a に関しては試料依存性が見られる部分についてのみ参考データとして用いる。サンプル d, e の実験結果は図示しないが、まずサンプル d の結果は、サンプル b の結果とはほぼ一致した。界面活性剤の種類が違う (SM-1200) サンプル e では、界面活性剤の光生成物からの信号の寄与が見られたが、それ以外の点ではサンプル b の結果と一致している。但し、サンプル d, e の実験では、励起光の散乱の影響が大きく、500 nm より短波長側では信頼性の高いデータは取れなかった。試料の吸収スペクトルを図 3.3 に示す。各サンプルの吸収スペクトルはほとんど一致していた。また、重水中のサンプルについても、吸光度が違うのみでスペクトル形状はほぼ一致する。

3.2.2 装置

主な実験装置については第2章で述べた。白色光の増幅に用いた色素は Coumarin 503 あるいは Coumarin 522A である。サンプル a の実験では、Coumarin 522A を用い、励起波長は 538 nm、励起エネルギーは 5 μJ 、励起エネルギー密度は 2.5 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ (6.9×10^{15} photons $\cdot\text{cm}^{-2}$) であった。これはロドプシン分子あたり 0.17 個の光子を吸収する励起密度に相当する。

サンプル b 及び重水中のサンプルの実験では、Coumarin 503 を用い、励起波長は 525 nm、励起エネルギーは 8 μJ 、励起エネルギー密度は 4 $\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ (1.1×10^{16} photons $\cdot\text{cm}^{-2}$) であった。これはロドプシン分子あたり 0.27 個の光子を吸収する励起密度に相当する。

ロドプシンの吸収スペクトルの幅は約 100nm と広いので、これらの実験での励起波長の違いは無視してかまわないと考えられる。

試料の保持には光路長 1mm のガラスセルを用い、一回の測定で約 250 μl の試料を使った。タコロドブシンは 20 $^{\circ}\text{C}$ 以上で光をあてると分解してしまうので、試料を常温より低い温度に保つ必要がある。このため試料セルをペルチェ素子により冷却し、PID 制御装置 (小松エレクトロニクス, K1204A) を用いて温度を一定に保った。但し、温度の制御は、試料セルの内部の温度をモニターしながらするのではなく、ペルチェ素子の表面付近に温度センサーを設置して制御している。理由の一つは、制御のために用いている温度センサ (サーミスタ) が大きいこと、もう一つは、セルの内部の温度をモニターして制御しようとする、不安定になりやすく、安定になる制御定数を見つけるのが難しいことである。その代わりに、セルの中の温度をモニターするために、薄膜白金温度センサー (村田製作所, TRFA101B) を利用した電子温度計を自作して用いた。これらにより、試料の温度を $8.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ に保つことができた。また、セルの表面に乾燥窒素をわずかに吹き付けて、冷却のためにおこる結露を防止した。

励起光をあてると試料は長い寿命を持つ光生成物となって褪色してしまうので、励起光が当たる位置でのサンプルを入れ替えながら実験しなければならない。タコロドブシンの場合、試料の量が限られているため、セルの中を攪拌することによってこ

の問題を解決した。プラスチックコートされた細い金属線を、モーターで上下させることによって、連続的に試料をかきまぜた。

サンプルに約 150 ショットの励起光パルスをあてた後、褪色したロドプシンを回復するために、橙色の光を約 40 秒間照射した。このための光源としてはコールドライトソース (HOYA-Schott, HL100R) の光をカットオフフィルター (HOYA, O58) 及び熱線吸収フィルター (HOYA, HA30) を通して試料に照射した。

3.3 結果

3.3.1 吸収変化スペクトル

図 3.4 にサンプル b の吸収変化スペクトルを、図 3.5 に重水中のサンプルのスペクトルをそれぞれ示す。

一部スペクトルが切れているところは、試料での励起光の散乱がプローブ光に混入して検出されてしまうために、測定が困難な領域である。誤差は Δ difference absorbance ~ 0.005 程度である。また、630nm の付近では、プローブ光のふらつきのためにノイズが比較的大きくなっている。これらの吸収変化スペクトルに共通してみられる特徴は、

- 530 \sim 620nm に見られる誘導吸収
- 450 \sim 500nm に見られる褪色
- 800 \sim 1000nm に見られる過渡利得

である。これらについては次の節で時間依存性と共に論ずる。

その他、遅延時間 0ps の前後で、サンプル b の約 440nm、重水中のサンプルの約 465nm に、鋭い誘導吸収が現れている。この時間応答は、励起光パルスに追従することから、これは逆ラマン損失によるものであると考えられる。ストークスシフトを計算してみると、サンプル b、及び重水中のサンプルに対し、それぞれ 3680cm^{-1} 、 2460cm^{-1} ともなる。これはそれぞれ O-H、O-D 伸縮振動のエネルギーに相当する [40]。従ってこれらの吸収変化は水あるいは重水の逆ラマン損失であると結論でき

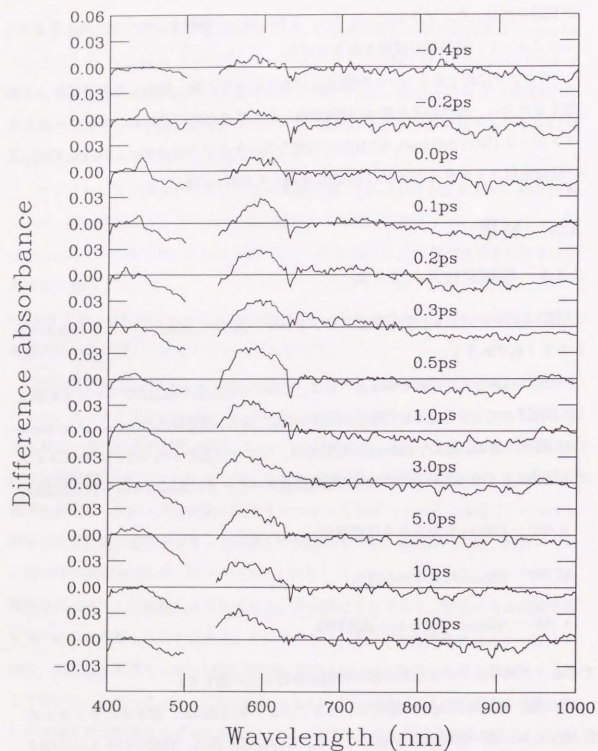


図 3.4: タコロドブシ (サンプル b) の吸収変化スペクトル。励起波長は 525nm、温度は 8°C。

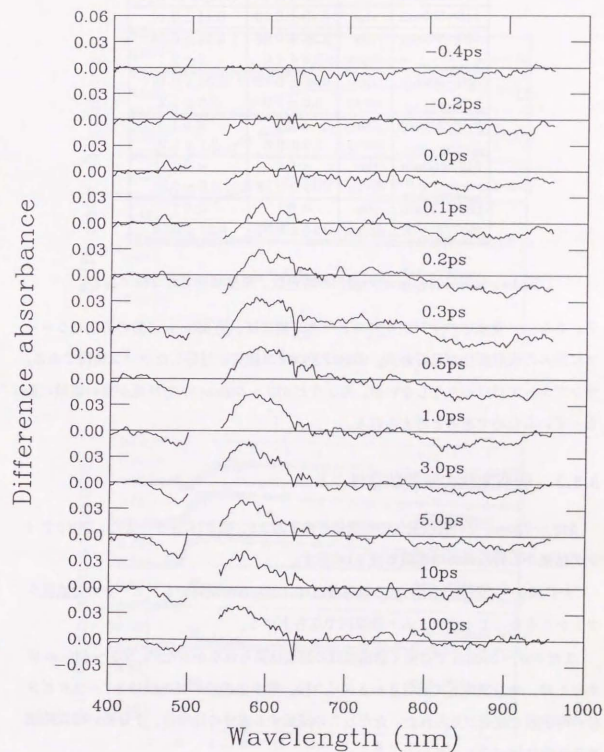


図 3.5: 重水素化したタコロドブシの吸収変化スペクトル。励起波長は 525nm、温度は 8°C。

Wavelength		Sample b	Sample in D ₂ O
540~560nm	rise	0.40 ± 0.10	0.44 ± 0.10
560~580nm	rise	0.36 ± 0.08	0.34 ± 0.08
	decay	2.0 ± 1.0	4 ± 2
580~600nm	rise	0.26 ± 0.12	0.33 ± 0.10
	decay	3.0 ± 1.0	4.8 ± 1.2
610~630nm	rise	< 0.1	< 0.1
	decay	2.5 ± 0.8	3.7 ± 1.2
640~660nm	rise	< 0.1	< 0.1
	decay	0.36 ± 0.18	0.6 ± 0.3
680~730nm	rise	< 0.1	< 0.1
	decay	0.14 ± 0.07	0.25 ± 0.15

表 3.1: 540 ~ 730nm での変化の時定数。単位は全てピコ秒である。

る。さらに、重水中のサンプルのストークス側には、約 595nm に負の方向にシャープに凹んだ吸収変化が見られる。これは逆ラマン損失に対応したラマン利得である。サンプル b でははっきりしないが、ちょうど 620 ~ 640nm の S/N 比が悪い領域に重なっているためであると考えられる。

3.3.2 吸収変化の時間依存性

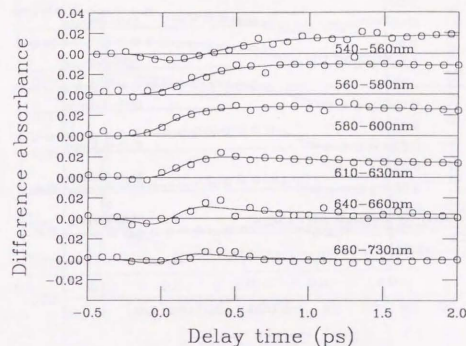
540 ~ 730nm での吸収変化の時間依存性を図 3.6、図 3.7 に示す。また、フィッティング結果から得られた時定数を表 3.1 に示す。

まず 540 ~ 630nm に見られる誘導吸収は、どちらの試料でも、ピークの短波長シフトをともなって 400 フェムト秒以内で立ち上がる。

また 540 ~ 560nm では全く誘導吸収の減衰は見られなかったが、560 ~ 630nm にかけては、サンプル b では 2.0 ~ 3.0 ピコ秒、重水中のサンプルでは 3.7 ~ 4.8 ピコ秒の時定数で減衰が見られた。ただしこの減衰する成分の比率は、十分長い時間持続する成分に比べると小さい。

次に 640 ~ 730nm の瞬時に現れる誘導吸収は、瞬時 (≤ 100 フェムト秒) で立ち上がり、速い時定数 (140 ~ 600 フェムト秒) で減衰した。この波長域での誘導吸収

(a)



(b)

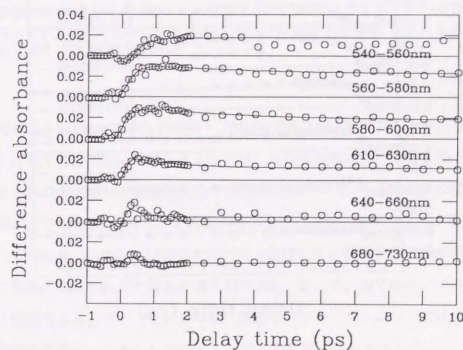
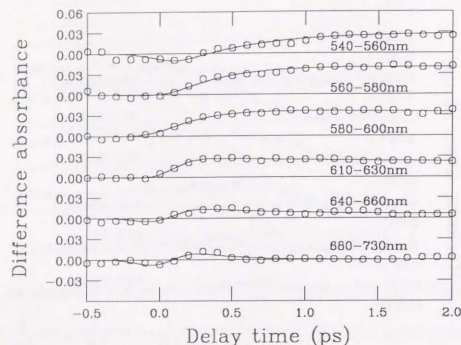


図 3.6: タコロドプシン (サンプル b) の吸収変化の時間依存性。(a) と (b) の違いは時間範囲のみである。

(a)



(b)

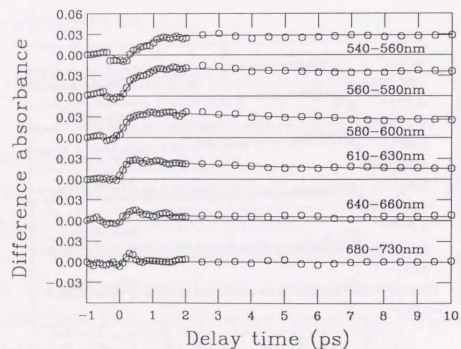


図 3.7: 重水中のタコロドブシンの吸収変化の時間依存性。(a) と (b) の違いは時間範囲のみである。

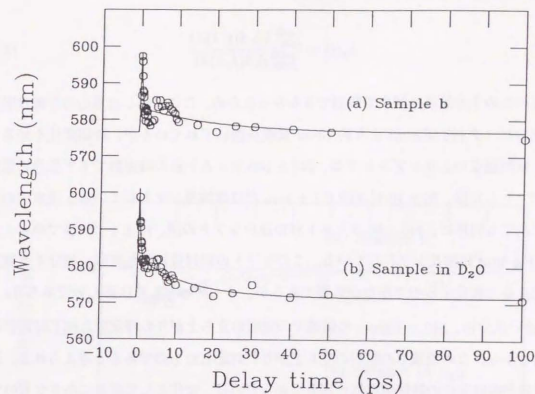


図 3.8: 波長 530 ~ 620nm の範囲で計算した吸収の重心位置の時間変化。(a) サンプル b。実線は時定数 240 ± 100 フェムト秒と 20 ± 10 ピコ秒をもつ 2 つの指数関数の和へのフィット。(b) 重水中のサンプル。実線は時定数 340 ± 80 フェムト秒と 13 ± 4 ピコ秒をもつ 2 つの指数関数の和へのフィット。

は、非常に小さい(サンプル b の 680 ~ 730nm で約 0.01)ものであるが、5 つの試料に全てで再現する。実際にはサンプル a では、この波長域に長い寿命を持つ負の吸収変化があらわれるために誘導吸収としては観測されていない。(この負の吸収変化には再現性がなかった。)しかし、この負の吸収変化は 200 ~ 400 フェムト秒の立ち上がりをもっており、このことは他のサンプルと同様の正の誘導吸収が負の吸収変化に重なって見えているためだと考えることができる。従って、全てのサンプルで再現していると結論できる。また、サンプル b、重水中のサンプル c についてはそれぞれ 2 回づつ測定を行ない、これらについても一致した結果が得られている。

図 3.8 に、波長 530 ~ 620nm の範囲での吸収の「重心」の時間変化を示す。これ

は次の式によって計算したものである。

$$\lambda_g(t) = \frac{\int_{530}^{520} \lambda \Delta A(t, \lambda) d\lambda}{\int_{530}^{520} \Delta A(t, \lambda) d\lambda} \quad (3.1)$$

散乱のため十分短波長側まで観測できなかったため、ここに示した重心の位置は吸収変化のピーク (約 560nm) より約 10nm 長波長側にずれているが、時間変化を知るためには問題ない。サンプル b では、 240 ± 100 フェムト秒の時定数でまず急速に短波長シフトした後、 20 ± 10 ピコ秒で 7 ± 3 nm だけ短波長シフトしている。重水中のサンプルでも同様に、 340 ± 80 フェムト秒の速いシフトの後、 13 ± 4 ピコ秒でゆっくりと 11 ± 3 nm 短波長シフトしている。このシフトの絶対量に関しては、積分する範囲を変えると変化するので注意が必要であるが、オーダーとしては正しいであろう。

速い成分は、540 ~ 600nm の領域での吸収の立ち上がりの時定数と同じ時間領域であるから、この領域での吸収の立ち上がりに対応したものであると考えられる。遅い成分が吸収変化の時間依存性に現れなかったのは、変化として非常に小さなものであったためであろう。

次に図 3.9 に、波長 860 ~ 920nm の範囲で積分した利得の時間変化を示す。この利得を単一指数関数でフィットすると、サンプル b で 2.0 ± 0.8 ピコ秒、重水中のサンプルで 4.0 ± 1.5 の時定数が得られた。

450 ~ 500nm の褪色には、試料依存性が見られた。まず波長 460 ~ 500nm の範囲で積分した信号の時間変化を図 3.10 に示す。サンプル a 及び重水中のサンプルでは、ラマン損失による瞬時の応答の寄与が含まれているので、 δ 関数成分を考慮してフィッティングを行なった。サンプル a では最初誘導吸収が観測され、それが 2.3 ± 0.3 ピコ秒で減衰して褪色になっているのに対し、サンプル b 及び重水中のサンプルでは、励起直後に大部分が褪色し、その後の増加は観測されなかった。また図 3.11 に、波長 400nm ~ 440nm で積分した信号の時間変化を示す。信号が小さいのでかなり S/N 比が悪く、有意な時定数を求めることはできないが、励起直後にわずかに正の方向の吸収変化があるように見える。少なくともサンプル a では比較的是っきりした変化が見られている。

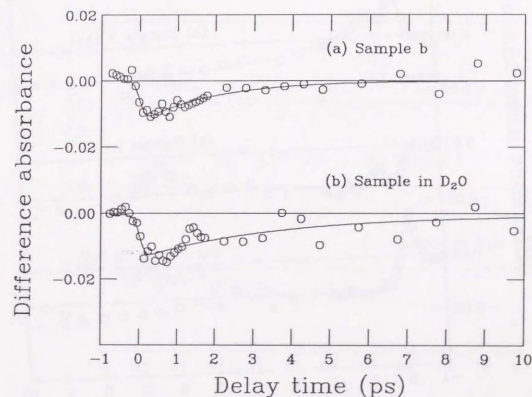


図 3.9: 波長 860 ~ 920nm の範囲で積分した信号の時間変化。(a) サンプル b。実線は単一指数関数でのフィットであり、時定数は 2.0 ± 0.8 ピコ秒。(b) 重水中のサンプル。時定数は 4.0 ± 1.5 ピコ秒。

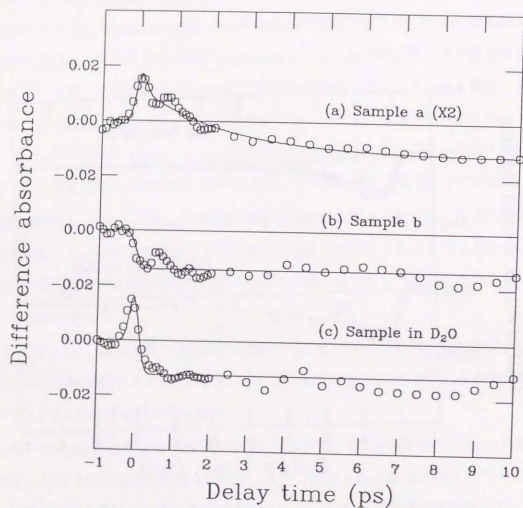


図 3.10: 波長 460 ~ 500nm の範囲で積分した信号の時間変化。(a): サンプル a。実線は (δ 関数+指数関数+定数) をガウス型関数 (幅 300 フェムト秒) で畳み込んだ関数へのフィット。指数関数の時定数は 2.3 ± 0.3 ピコ秒。(b): サンプル b。定数成分のみ。(c): 重水中のサンプル。 δ 関数と定数成分のみ。

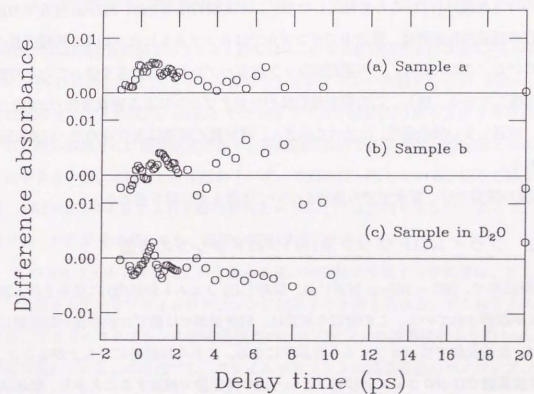


図 3.11: 波長 400 ~ 440nm の範囲で積分した信号の時間変化。(a): サンプル a。(b): サンプル b。(c): 重水中のサンプル。

3.4 考察

3.4.1 重水中のサンプルでの違い

以上のように重水中のサンプルと、サンプルbの信号のスペクトル形状にはほとんど違いがない。また、540 ~ 600nm の吸収の立ち上がりは、どちらの試料でも誤差の範囲内で一致する。

Peters らは、低温 (< 40K) で、570nm 付近に見られる誘導吸収の減衰は重水中の試料のほうが遅い (1/7) ことを見出した [38]。本実験の結果では、570nm 付近での誘導吸収の減衰の時定数は、重水中のサンプルではサンプルbに比べ約 1.5 倍程度長くなっている。このことは、この過程がシッフ塩基のプロトンの動きを伴っている可能性を示唆している。但し、この吸収変化はバソロドプシンによる吸収変化 (つまり一定の、減衰しない吸収変化) と比べて小さく、時定数の誤差は大きいので、注意が必要である。

以後の議論では、重水中での違いについては考えずに話を進める。

3.4.2 プライムロドプシン及びバソロドプシンの位置

実験結果で、600 ~ 700nm 付近には、瞬時 (100 フェムト秒以内) に立ち上がる誘導吸収が観測されている。この吸収の減衰は、短波長側では数ピコ秒の長い時定数になるが、長波長側では 400 フェムト秒以下になる。これらは瞬時に立ち上がること、また長波長側では 400 フェムト秒以下という速い時定数で減衰することから、励起状態からの誘導吸収であると考えられる。長波長側で非常に速く減衰するのは、フランク-コンドン状態近くからの吸収であるためであろう。

また、100 ピコ秒でみられる長寿命の成分は、

- 100 ピコ秒での吸収変化の形状はバソロドプシンの生成による吸収変化と一致する
- バソロドプシンは 100 ピコ秒以内に生成することは確立している

などの事実から、バソロドプシンによるものであると断定できる。

次に、530 ~ 600nm で、有限の寿命をもつ誘導吸収の立ち上がりが観測されている。ここでは短波長側ほど長い時定数で立ち上がっているが、これについては2つの理由が考えられる。

1. フランク-コンドン状態から波束が運動する様子が、連続的にみえている。
2. 瞬時に立ち上がるものと、400 フェムト秒ぐらいの時定数をもつものが混ざって、中間的な時定数が観測されている。

本研究での時間分解能約 300 フェムト秒では、この2つを判別するのは難しい。Schoenlein ら [7] は時間分解能 35 フェムト秒でウシロドプシンの実験を行ない、570nm 付近では 200 フェムト秒以内、535nm では 400 フェムト秒以内の立ち上がりを観測している。彼らの信号には振動構造があり、非指数関数的であるので、時定数を求めることはできないが、本研究と時定数のオーダーや傾向は一致している。彼らの結果の場合、瞬時の応答+400 フェムト秒の応答ということでは説明できない。よって、本研究で得られた結果に関しても、前者の説明が適当であろう。

この 400 フェムト秒以内という極めて速い時定数で生成する中間体は、ピコ秒分光で見出されているプライムロドプシンに対応すると考えられる。ピコ秒分光の結果では、プライムロドプシンの誘導吸収はバソロドプシンの誘導吸収より約 5nm 長波長側に現れている。本研究でも、プライムロドプシンの誘導吸収のバソロドプシンのそれに対するシフトは 5 ~ 15nm であり、これは誤差の範囲内で一致する。

次に、プライムロドプシンがどこに位置するかについて考える。次の二つの可能性が挙げられる。

(1) プライムロドプシンは既に基底状態にある中間体であり、よりねじれた状態にあるバソロドプシンである。(図 3.12)

(2) 「プライムロドプシン」であると考えたものは実は緩和励起状態であり、約 2 ピコ秒で基底状態に落ちてバソロドプシンになる。(図 3.13)

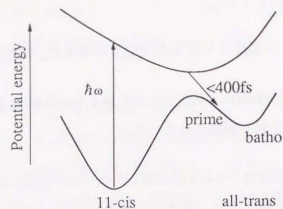


図 3.12: モデル 1 での断熱ポテンシャルの模式図

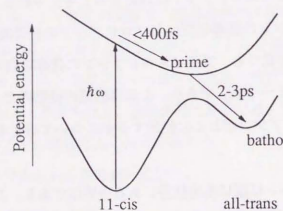


図 3.13: モデル 2 での断熱ポテンシャルの模式図

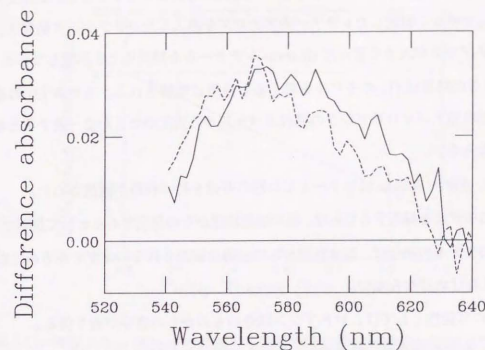


図 3.14: プライムロドプシンとバソロドプシンの吸収変化スペクトルの比較。実線:遅延時間 2 ピコ秒 (プライムロドプシン)、破線:遅延時間 100 ピコ秒 (バソロドプシン)

ここで、プライムロドプシンとバソロドプシンの吸収変化スペクトルを比較してみる。図 3.14 に示すように、実験結果に現れているプライムロドプシンとバソロドプシンの違いは、

- 580nm より長波長側での誘導吸収の減衰 (1 ~ 3 ピコ秒)
- 吸収の重心の短波長シフト (10 ~ 20 ピコ秒)

の 2 点である。これらはどちらも全体の吸収変化に比べると非常に小さなものであって、プライムロドプシンとバソロドプシンの構造上の類似性を示唆している。

また、この変化はバクテリオロドプシンの場合の J 中間体から K 中間体への緩和とふるまい (625nm → 590nm への短波長シフト)・時定数 (約 3 ピコ秒) が似ている。バクテリオロドプシンの場合、時間分解ラマン散乱の結果から J 中間体においてすでに異性化を完了して、かなりねじれた 13-*cis* 状態になっていることが最近示されている [41]。これからプライムロドプシンの場合も同様に、発色団がよりねじれていて、

高い振動励起状態にあるバソロドプシンであると考えられる。また七員環で $C_{11}=C_{12}$ をゆるく固定したレチナールアナログを導入したロドプシンの結果も、プライムロドプシンが大きく歪んだ *all-trans* レチナールを持つことを示唆している [37]。

これらの結果は (1) のモデルを考えると自然に理解される。モデル (2) の場合は緩和励起状態とバソロドプシンの吸収スペクトル、強度がたまたま一致すると考えなければならぬ。

一方、800 ~ 900nm には 2 ~ 4 ピコ秒の寿命を持つ利得が観測された。

(2) のモデルを採用するならば、緩和励起状態からの発光であるとして説明できる。

(1) のモデルの場合は、基底状態からの利得は観測されないはずであるので別の機構を考えなければならない。

一つの可能性としては、ロドプシン以外のものからの寄与が有り得る。

まず、可溶化剤からの発光が考えられるが、可溶化剤 (L1690) だけからなる試料では、測定可能な波長域 (400 ~ 950nm) において全く吸収変化が見られなかったため、その可能性は排除できる。

また、実験の前後でサンプルの吸収スペクトルの変化がなかったことから、ロドプシンが壊れてできたものからの寄与でもないと考えられる。

低温での最終産物であるアシッドメタロドプシンが蓄積して、その吸収変化が観測されている可能性も考えられる。しかし、試料に励起光を約 500 ショット照射する前後での吸収スペクトル変化を測定したところ、まったく変化が見られなかった。また、光生成物からの寄与であれば励起光強度の自乗に比例して信号が増大するはずである。図 3.15 に、波長 805 ~ 957nm で平均した吸収変化の励起光強度依存性を示す。このように、誤差を考慮しても自乗依存性とは考えにくいことから、光生成物の蓄積効果の可能性は否定される。よってロドプシン以外のものからの寄与である可能性は低い。

もう一つの可能性としては、ロドプシンが励起された後、バソロドプシンに至る反応経路を辿るものとは別のものに分岐し、そこからの利得が観測されていることが考えられる。あるいは、ロドプシンの基底状態に 2 つのサブステートがあって、それ

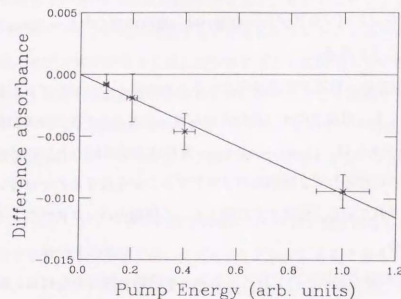


図 3.15: 波長 805 ~ 957nm の範囲で平均した吸収変化の励起光強度依存性。

ぞれが異なる反応経路を経ると考えることもできる。この場合、ロドプシンの発光スペクトルが問題になる。Doukas ら [33] はロドプシンの発光極大は約 620nm にあると報告しているが、彼らは 560 ~ 800nm の範囲でしか発光を測っていないので、ここで観測された利得については議論できない。また、ピコ秒時間分解吸収分光でもこの波長域での測定結果の報告は存在しない。従って、この可能性については否定できない。

以上を総合すると、現在のところ以下の可能性が最も高いと考えている。

プライムロドプシンにおいて既に異性化が起こっており、すでに基底状態にいる (モデル (1))

ロドプシンが何らかの「発光する状態」に分岐して、そこからの利得が観測されている。

前述したように、プライムロドプシンからバソロドプシンへの変化の過程で、560 ~ 630nm の範囲では 2 ~ 4 ピコ秒で減衰する誘導吸収が観測されている。この時定数は利得の時定数と一致している。そこで、プライムロドプシン以外のものが光るとする以上のモデルの場合には、この範囲に現れている誘導吸収はプライムロドプシン

以外の「発光する状態」に起因していると考えたほうが適切であろう。この場合、ブライムロドプシンとパソロドプシンの違いは、吸収の重心の5～15nmの長波長シフトだけということになる。

佐々木ら [42] は、低温での光誘起スペクトルから、パソロドプシンには2種類あることを見出した。常温でのナノ秒分光からも、このことを裏づける結果が得られている [43]。佐々木らは、11-*cis* → all-*trans* 異性化が時計回りと反時計回りの両方向で起こり、それに対応して2種類のパソロドプシンが生成するのではないかと論じている。今観測されている「発光する状態」も、2種類のパソロドプシンと関係している可能性がある。

観測された利得の起因・パソロドプシンとの関係を解明するには、800～900nmの波長域での発光・吸収の測定に加え、時間分解ラマン分光などの手法による光初期過程の研究を今後積み重ねていく必要があるであろう。

3.4.3 ヒブソロドプシン

従来の研究では、励起後ブライムロドプシンが生成した後、それが一旦ヒブソロドプシンになり、それからパソロドプシンになるという図式が考えられてきた [28, 27, 29, 30, 17]。本研究の結果でも、400～440nm で非常に小さい誘導吸収が見られており、これをヒブソロドプシンによるものと帰着させることも可能である。しかし、パソロドプシンの吸収がみられる領域には、時定数 400 フェムト秒 (以下) で立ち上がる成分のほかには、吸収が増加する傾向がみえない。もしヒブソロドプシンからパソロドプシンが生成するのであれば、ヒブソロドプシンの減衰とともにパソロドプシンの増加が見えなければならないはずである。またもしブライムロドプシンからヒブソロドプシンが生成するなら、ブライムロドプシンの減衰につれてヒブソロドプシンが増加しなくてはならない。ヒブソロドプシンの吸収の見えるべき 400～450nm の波長域では、信号が小さく、また S/N 比自体も悪いので、立ち上がりの時定数を論じるのは難しいが、比較的はっきり見えているサンプル a の信号では、少なくとも 400 フェムト秒以内に立ち上がっている。これはヒブソロドプシンが励起状態から直接生

成することを示している。これらの条件を考えると、ヒブソロドプシンがブライムロドプシンとパソロドプシンの間に位置すると考えるにはいささか無理がある。ここで見られている「ヒブソロドプシン」は、パソロドプシンに緩和しないか、または「ヒブソロドプシン」自体の生成効率が小さいと考えないとうまく説明できない。少なくとも、パソロドプシンの誘導吸収の大きさ (サンプル b のピーク付近で約 0.03) と、実験データの誤差 (< 0.005) から考えて、20%以下の寄与しかない結論することができる。

本研究では、ヒブソロドプシンの存在自体については、断定的なことはいえない。大谷ら [17] のピコ秒分光の実験では、ヒブソロドプシンによると考えられる誘導吸収の強さは、パソロドプシンの誘導吸収と比べて 1/5～1/10 であった。本研究の場合、パソロドプシンの誘導吸収の強さはピークで約 0.02～0.04 であるから、ヒブソロドプシンに期待される誘導吸収の強度は 0.008～0.002 である。これは実験誤差 0.005 に比べて同程度の信号であるので、検出するのは困難である。従って、この実験結果から大谷らが検出しているヒブソロドプシンの存在について論ずることはできない。

3.5 まとめ

最後に本研究で得られた知見についてまとめておく。

- 励起状態の誘導吸収が波長 600～700nm にかけて観測された。
- 励起後 400 フェムト秒以内に *cis-trans* 異性化が起こり、ブライムロドプシンが生成する。
- ブライムロドプシンは基底状態の中間体である。
- ブライムロドプシンがパソロドプシンへ変化すると、吸収が 5～15nm 短波長シフトする。この過程は 10～20 ピコ秒の時定数を持ち、発色団のねじれの変化を伴っていると考えられる。

- ヒプソロドプシンを経るパソロドプシンの生成過程は、全体のパソロドプシンの生成量に対し20%以下の寄与しかしていない。
- 励起後、パソロドプシンに至るものの他に、「発光する状態」に至る経路もある。この状態は800nmより長波長側に利得を持ち、2~4ピコ秒の寿命で減衰する。

以上は最も有力なモデルに基づいた解釈であるが、特に利得の起因についてはまだ問題が残されている。また、ヒプソロドプシンの生成も将来の課題である。

第4章

14-フルオロバクテリオロドプシンの光初期過程

4.1 序

既に序章において簡単に述べたように、バクテリオロドプシン (bacteriorhodopsin, BR) とは高度好塩性の古細菌 *Halobacterium Halobium* の細胞膜中に存在する分子量約26,000の膜蛋白であり、光を吸収してプロトンを細胞外に汲みだす機能を持っている。*Halobacterium* は、このプロトンポンプ機構によって発生するプロトンの濃度勾配を利用して、ATPの合成をおこなう。ロドプシンは光センサとして働くのに比べ、BRはエネルギー源として働くという点で、生理的機能には大きな違いがある。しかし、BRは発色団として、 LyS_{216} にシッフ塩基結合されたレチナールをもつことや、蛋白質が膜を横断する7本の α -ヘリックスからなる構造をもつこと、アミノ酸組成の類似性などから、ロドプシンとの進化上の関連性にも興味をもたれている。その光初期過程に関しても、レチナールの異性化を伴うことなどの点で分子機構にロドプシンとの類似性が見られる。このような興味深い点に加えて、試料を大量に得ることが比較的容易なため、精力的に研究が進められている [44, 45]。

Halobacterium Halobium にはバクテリオロドプシンの他にも3種類のレチノイド蛋白質 (ハロロドプシン [46]、センサリーロドプシン [47]、フォボロドプシン [48]) が見つかっている。ハロロドプシンは塩素イオンの汲みだしに、センサリーロドプシンは正の光走行性に、フォボロドプシンは負の光走行性にそれぞれ関与している。

バクテリオロドプシンには、明順応状態と暗順応状態の2つの状態がある。明順応状態では、レチナールはすべて *all-trans* の形をとっているが、暗順応状態では、*all-trans* : 13-*cis* の比は 50% : 50% であるといわれている [49]。ただし最近の研究では、*all-trans* : 13-*cis* = 66% : 34% であるとの報告もある [50]。明順応状態から暗順応状態へ緩和する速度は $\tau_{1/2} = 30$ 分 (26°C) という非常にゆっくりした時間スケールで起こる。この中で、*all-trans* レチナールをもつバクテリオロドプシンだけがプロトンポンプとして機能することができる。*all-trans* バクテリオロドプシンの光サイクルについて、非常によく研究されており、次のようなスキームが提案されている。

BR ₅₆₈		<i>all-trans</i> バクテリオロドプシン (BR) の基底状態
↓ $h\nu$		
BR*		フランク-コンドン状態
↓ ~200 fs		
I ₄₀₀		緩和励起状態
↓ 500 fs		
J ₆₂₅		より発色団がねじれた状態にある K ₅₉₀
↓ ~3 ps		
K ₅₉₀		13- <i>cis</i> , プロトン化シッフ塩基
↓ 1 μ s		
L ₅₅₀		
↓ ~70 μ s		
M ₄₁₂		13- <i>cis</i> , 脱プロトン化されたシッフ塩基
↓ 800 μ s		
N ₅₂₀		
↓ 2 ms		
O ₆₄₀		
↓ ~500 μ s		
BR ₅₆₈		

この中で、本研究で注目するのは初期過程、つまり K 中間体が生成するところまでの過程である。K 中間体は、低温 (77K) で光励起した場合に生成し、無限に長い寿命を持つ中間体であるので、基底状態にある。共鳴ラマン分光の結果 [51, 52] などから、K 中間体の発色団の構造は 13-*cis* で、プロトン化されたシッフ塩基を持つことが確かめられている。従って発色団の *all-trans* → 13-*cis* の異性化は、励起状態から K 中間体にいくまでにおこる。BR の明順応状態の初期過程のダイナミクスは、既によく研究されており、励起後約 200 フェムト秒で緩和励起状態に到達し、その後 500

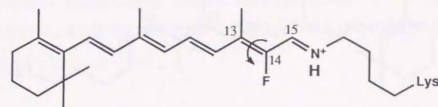


図 4.1: 14-フルオロバクテリオロドプシンの発色団の化学構造。all-*trans*, 15-*anti* 構造をもつ。

フェムト秒で J 中間体が生成する [53, 54, 55, 56, 57, 56, 58, 59, 60]。J 中間体は、この中間体からの利得が見えないこと、また K 中間体とよく似た吸収変化スペクトルをもつことから、基底状態の第一中間体であると考えられている。またピコ秒共鳴ラマン分光の結果から、J 中間体は 13-*cis* であるがかなりねじれた発色団を持っており、高い振動励起状態にあることが最近報告された [41]。J 中間体は約 3 ピコ秒で K 中間体に緩和する。

しかし、励起状態の緩和時間 500 フェムト秒が、どのような要因で決定されているのかはまだよくわかっていない。例えば、酸性型バクテリオロドプシンの場合には、8.6 ピコ秒という非常に長い時定数が得られている [59, 60]。この場合は蛋白質の構造変化のためであると考えられるが、異性化の分子メカニズムを明らかにするためには、いろいろな条件下での実験を積み重ねていくことが必要であろう。本研究では、特に発色団の電子構造と異性化のダイナミクスの関係についての情報を得るために、発色団であるレチナールをふっ素で化学的に修飾することによって得られるアナログ「14-フルオロバクテリオロドプシン (14-fluorobacteriorhodopsin, 14-F-BR)」のフェムト秒吸収分光を行なった。14-F-BR の発色団の構造を図 4.1 に示す。レチナールの C₁₄ 位置の水素原子を、ふっ素原子で置換したものである。ここに示したのは、all-*trans*、15-*anti* 構造を持つ発色団である。14-F-BR の吸収極大は 587nm にあり、BR に比べると 30nm はど長波長側にある。しかし、オプシシフトの量は 4940cm⁻¹ であり、BR のオプシシフトと一致する。このことは、14-F-BR における蛋白質-発色団相互作用は、BR の場合と同程度であることを示唆している。また、14-F-BR

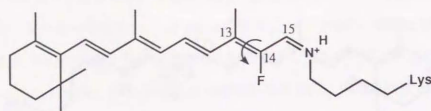


図 4.2: 14-フルオロバクテリオロドプシンの発色団の化学構造。all-*trans*, 15-*syn* 構造をもつ。長波長シフトした成分のもつ構造と考えられている。

はプロトンポンプ能力を持ち、M 中間体と O 中間体に相当する中間体が見つかった [61]。これらは、光サイクルもまた BR の場合と同様であることを示している。但し、M 及び O 中間体の寿命は、それぞれ 30 ミリ秒、100 ミリ秒と、BR に比べて長い。

しかし、ふっ素原子は高い電気陰性度をもつため、発色団の電子状態には大きな影響があると期待される。予想される変化としては、ふっ素置換のために $C_{13}=C_{14}$ の結合がよりイオンのなり、励起状態で異性化が起こりにくくなり、緩和の時定数が遅くなる、といったことが考えられるであろう。

14-F-BR にも、暗順応状態と明順応状態が存在する。暗順応状態では、all-*trans* 体と 13-*cis* 体の比は 50% : 50% であり、BR の場合と同様である [61]。しかし、明順応状態においては、約 95% が all-*trans* 体であるが、暗順応状態にはない新たな長波長シフトした成分が見つかった。この成分は約 680nm 付近に吸収ピークをもち、不安定であり暗順応状態に 38 秒 (25°C) で熱的に戻る。これは通常の BR の暗順応速度に比べて格段に速い。Tierno ら [61] は、この事実及び再構成の過程の解析から、この新たな長波長シフトした成分が、図 4.2 に示すような all-*trans*, 15-*syn* の構造をもつと主張している。結局、明順応状態では、長波長シフトした新しい成分 (all-*trans*、15-*syn*)、普通の all-*trans*、15-*anti* の成分、および微量の 13-*cis* という 3 つの成分が混ざっていることになる。

この長波長シフトした新しい成分は、14 位をふっ素が塩素で置換したときのみに見られるものであり、他の位置 (8,10,12) をふっ素で置換した場合や、14 位をメチル

基で置換した場合には生成しない。このことから、この長波長シフトした成分の生成には、ふっ素とふっ素の近くにあるプロトン供与基との静電相互作用が何らかの役割を果たしていると考えられている。

4.2 実験

4.2.1 試料

試料はサントリー生物有機化学研究所の関谷紀子博士と吉原和雄博士に調製していただいたものである。試料の調製法の概略を以下に示す。

1. まずバクテリオロドプシン紫膜を、Oesterhert と Stoekenius の方法 [62] により得る。

2. 紫膜を脱色することにより、アポバクテリオロドプシン膜を得る。

以下の操作は全て暗室中・赤色光下で行なう。精製した紫膜 (10 mg) を、0.5 M ヒドロキシルアミン、0.1 M Tris-HCl、3 mM NaNO_3 水溶液に懸濁し、水酸化ナトリウムで最終 pH を 7.5 にする。液温を 25 °C 以下に保ち、攪拌しながら 500 W のプロジェクターランプの光を Y-52 フィルター (東芝) を通して照射する。適時吸収を測定し、560 nm での吸収が完全に消失するまで行なう (約 7 ~ 8 時間)。こうして脱色された膜を、20 mM Tris-HCl、3 mM NaNO_3 水溶液 (pH 7.2) で数回洗い、遊離しているヒドロキシルアミンを取り除く。

3. アポバクテリオロドプシン膜中に残っているレチナールオキシムを取り除く。

このため、まず得られた膜のペレットを 5 % bovine serum albumin、3 mM NaNO_3 、20 mM Tris-HCl 水溶液 (pH 7.2) に懸濁し、0 °C で 5 ~ 12 時間攪拌した後、遠心分離 (100,000×g, 30 分) によりアポバクテリオロドプシン膜を回収する。この操作を、360 nm に現れるレチナールオキシムの吸収が上清に認められなくなるまで繰り返す。これを 20 mM Tris-HCl、3 mM NaNO_3 水溶液で数回洗浄し、最終的なアポバクテリオロドプシン膜が得られる。

4. アポバクテリオロドプシン膜と 14-フルオロレチナールから、14-フルオロバクテリオロドプシンを再構成する。

14-フルオロレチナールの合成は、Asato ら [63, 64] の方法による。再構成の過程も、赤色光下で行なった。上記の方法により得られたアポバクテリオロドプシン膜を、100 mM 磷酸ナトリウム水溶液 (pH 6.0) に懸濁する。これに 0.9 等量の 14-フルオロレチナールを加え、25° に保って数時間以上放置し、14-フルオロバクテリオロドプシンを得る (14-フルオロレチナールを 0.9 等量にしているのは、余剰の 14-フルオロレチナールが残らないようにするためである)。

14-フルオロバクテリオロドプシンは、遠心分離によりペレットにして、4°C で輸送された。これを蒸留水に懸濁して試料として用いた。

図 4.3 に、暗順応状態及び明順応状態での試料の吸光度を、その差スペクトルと共に示す。前節で述べたように、明順応状態では大きく長波長シフトしたスペクトルになっている。

また、これと比較するために用いたバクテリオロドプシンの試料は、東京工業大学の太谷弘之助教授に提供していただいた。試料の吸収スペクトルを図 4.4 に示す。

4.2.2 装置

実験には、第 2 章で述べたフェムト秒吸収分光装置を用いた。励起光には、フェムト秒パルスの基本波 (634nm) を用いた。励起エネルギーは $3.3\mu\text{J}$ 、励起エネルギー密度は $1.2\text{mJ}\cdot\text{cm}^{-2}$ (3.8×10^{15} photons $\cdot\text{cm}^{-2}$) であった。

試料の保持には、光路長 1mm のガラスセルを用いた。試料の温度は第 3 章で述べたのと同じベルチェ素子で一定に保った。暗順応状態の実験では、より速い暗順応速度を得るため、温度を 18°C に保った。明順応状態の実験では、暗順応の速度を遅くして試料を明順応状態にとどめるため、温度を 7°C に設定した。明順応状態に保つための光源としては、100W のタングステンハロゲンランプを用い、熱線吸収フィルター (HOYA, HA30) とバンドパスフィルター (HOYA, G533) を通して試料に照射した。また、中間体からの寄与を避けるため、第 3 章で述べた搅拌装置を用いて、試料

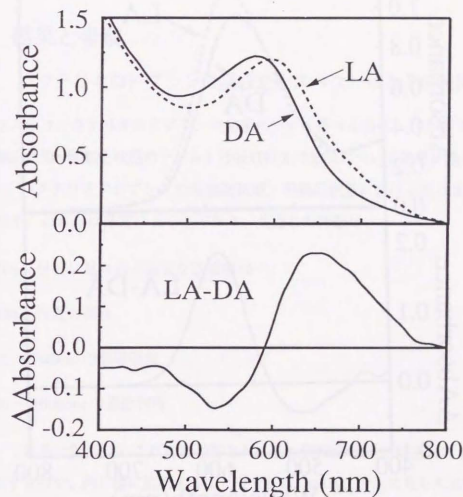


図 4.3: 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収スペクトル。実線は暗順応状態 (DA)、破線は明順応状態 (LA)。その差スペクトル (LA-DA) を下に示してある。

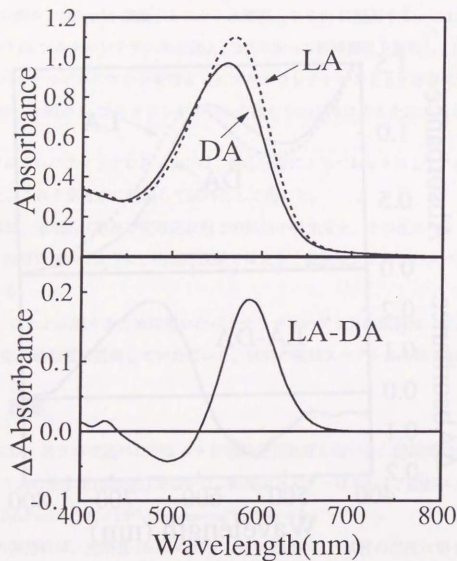


図 4.4: バクテリオロドプシンの吸収スペクトル。実線は暗順応状態 (DA)、破線は明順応状態 (LA)。その差スペクトル (LA-DA) を下に示してある。

を連続的に攪拌しながら実験を行なった。

比較のために行った暗順応状態のバクテリオロドプシンの実験では、試料を暗順応状態に保つために、ポンプ (アトー, ペリスタ SJ-1211H) で約 3ml の試料を循環させながら実験をおこなった。また、実験の途中で吸収スペクトルを測定し、暗順応状態にあることを確かめた。

4.3 結果と考察

4.3.1 バクテリオロドプシンの吸収変化スペクトルとその時間依存性

14-フルオロバクテリオロドプシンの結果について述べる前に、バクテリオロドプシン暗順応状態・明順応状態のフェムト秒吸収分光の結果について簡単に触れておく。図 4.5 に、バクテリオロドプシンの暗順応状態・明順応状態における吸収変化スペクトルを示す。これらは非常によく似ており、共通した特徴は、

- 460nm 付近に見られる顕著な誘導吸収
- 580nm 付近の褪色
- 600 ~ 700nm の誘導吸収
- 800 ~ 1000nm の過渡利得

である。これらの特徴は、これまで報告されてきた明順応状態の結果 [53, 57, 58] とよく一致するので、同じ様に解釈することができる。460nm 付近に見られる誘導吸収は、励起状態及び緩和励起状態からの誘導吸収であり、それに対応して、励起状態からの過渡利得が 800 ~ 1000nm の信号に対応する。また、600 ~ 700nm の誘導吸収は、基底状態の第一中間体である J 中間体、およびそれがさらに緩和して生成する K 中間体からの誘導吸収である。

また、図 4.6 に、吸収変化の時間依存性を示す。いずれの波長においても、明順応状態の信号、暗順応状態の信号共に、時定数 500 フェムト秒でよくフィットできる。Petrich ら [56] は、暗順応状態でのフェムト秒時間分解分光を行ない、明順応状態と

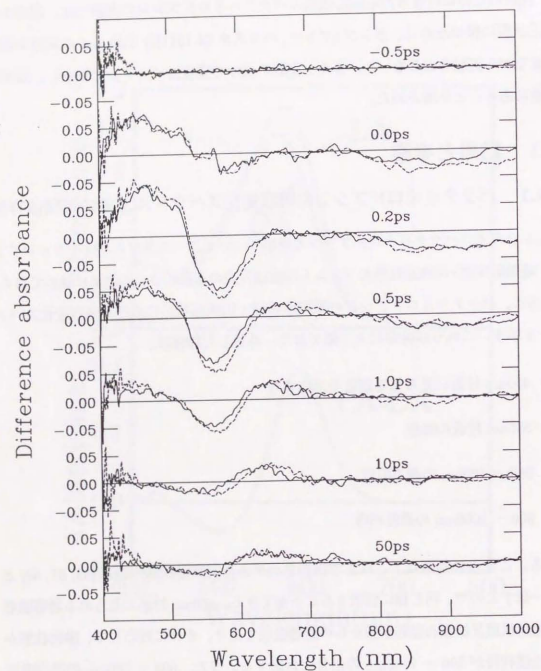


図 4.5: バクテリオロドプシンの吸収変化スペクトル。実線は暗順応状態 (DA)、破線は明順応状態 (LA)。

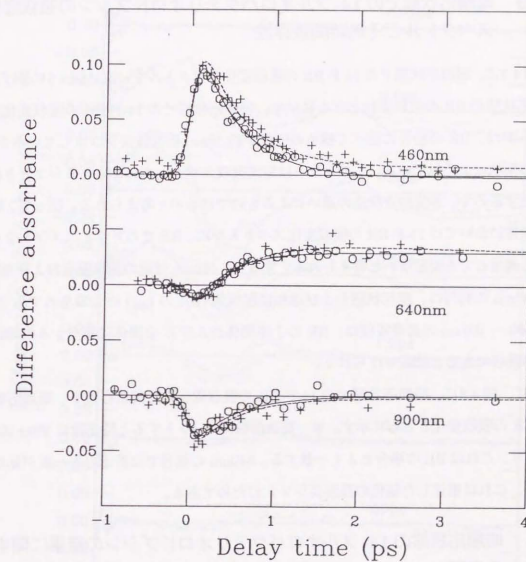


図 4.6: バクテリオロドプシンの吸収変化の時間依存性。○、実線は暗順応状態 (DA)、+、破線は明順応状態 (LA)。実線、破線共に時定数 500 フェムト秒の単一指数関数と定数を用いたフィッティングである。

ほとんど変わらない時定数を得ている。本研究の結果も、彼らの結果にはほぼ一致しており、励起状態では all-*trans* BR と 13-*cis* が同じ断熱ポテンシャル面をもつという考えを支持している。

4.3.2 暗順応状態での 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化スペクトルとその時間依存性

図 4.7 に、暗順応状態での 14-F-BR の吸収変化スペクトルを、既に図 4.5 に挙げた暗順応状態での BR の吸収変化とともに示す。暗順応状態での 14-F-BR の吸収変化スペクトルは、BR の場合に比べて褪色の位置が約 20nm 程長波長シフトしているが、全体の形状はよく似ている。このシフトは定常吸収スペクトルにみられるシフトとはほぼ一致するので、本質的な構造の違いによるものではないと考えられる。従って、暗順応状態においては 14-F-BR の吸収変化スペクトルに、BR でのアサインメントをそのまま適用しても問題ないと考えられる。すると、460nm 付近の誘導吸収および 800 ~ 1000nm の利得は、励起状態および緩和励起状態 (BR の I_{460}) によるものであり、また 600 ~ 700nm の誘導吸収は、BR の J 中間体および K 中間体に相当する中間体からの吸収であると結論づけられる。

次に、図 4.8 に、暗順応状態での 14-F-BR の吸収変化の時間依存性を、暗順応状態での BR の吸収変化とともに示す。単一指数関数でフィットすると時定数は 500 ± 100 fs となり、これは BR の場合とよく一致する。640nm の信号では若干の不一致が見られるが、これは前述した褪色の長波長シフトのためである。

4.3.3 暗順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの結果に関する考察

これまで述べたように、14-F-BR の光初期過程におけるふるまいは BR とほとんど変わらなかったことから、発色団にふつ素原子を導入したことは、 $C_{13}=C_{14}$ のまわりの異性化のダイナミクスに影響をあたえなかったと結論づけることができる。これに比べ、酸性型バクテリオロドプシンでは、励起状態からの緩和の顕著な低速化が観測されている [59, 60]。また、バクテリオロドプシンのキャスト膜を真空中におき、

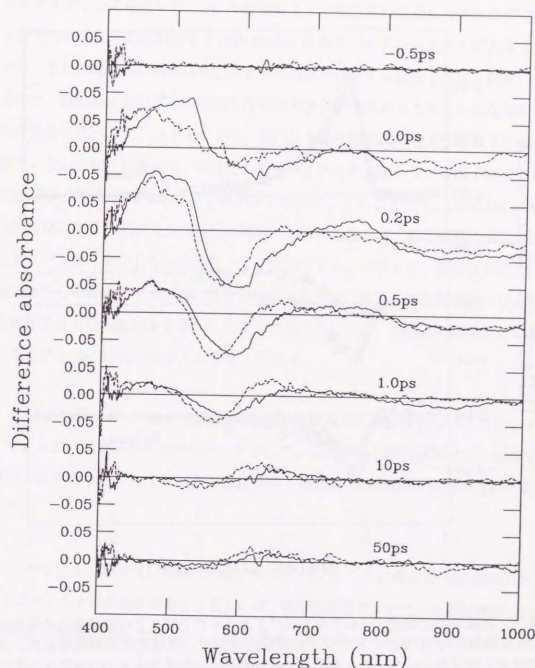


図 4.7: 14-フルオロバクテリオロドプシンの暗順応状態での吸収変化スペクトル (実線)。破線はバクテリオロドプシンの暗順応状態での吸収変化スペクトル。

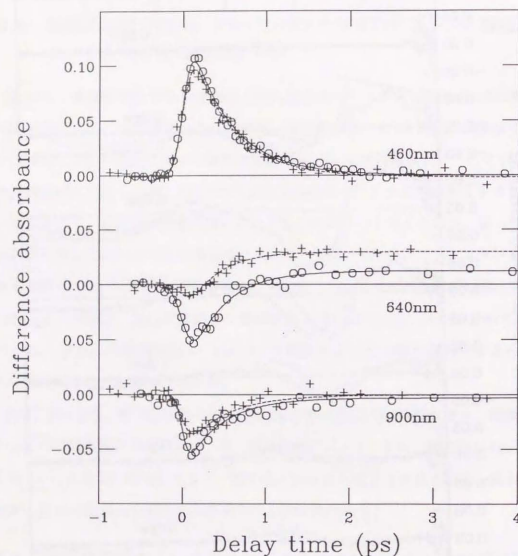


図 4.8: o、実線:暗順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化の時間依存性。+、破線:バクテリオロドプシンの暗順応状態で吸収変化の時間依存性。実線、破線共に時定数 500 フェムト秒の単一指数関数と定数を用いたフィッティングである。

乾燥させることによって得られるバクテリオロドプシンの乾燥膜の場合にも、緩和の時定数は約 3 ピコ秒であり、BR に比べて非常にゆっくりになる [65]。酸性型バクテリオロドプシンの場合には、pH の変化によって蛋白質の構造にも大きな変化があると考えられる。実際吸収ピークは約 605nm にあり、オプシシフトが大きくなっている。また、乾燥膜の場合にも、発色団の周囲に存在する水分子が取り除かれてしまうので、発色団と蛋白質の間の相互作用に大きな変化があると考えられる [66]。これらの場合に比べると、14-F-BR では、蛋白質と発色団の間の相互作用は BR の場合に似ている。これらの事実は、異性化のダイナミクスを支配している因子は主として蛋白質-発色団相互作用であることを示唆している。これによって、14-F-BR に於いては発色団の電子状態に大きな変化が期待できるにも関わらず、励起状態の緩和のダイナミクスが大きく変化しない原因をうまく説明できる。これまで、蛋白質は基底状態の構造をむしろ安定化する方向に働き、励起状態では二重結合が反結合的になるために異性化するというモデルも考えられてきた [67]。しかし、本研究の結果からは次のようなモデル [68] に妥当性があると考えられる。

「基底状態においても、蛋白質-発色団相互作用のために発色団は異性化しようとしているが、二重結合のためにロックされている。しかし励起状態では、結合交替位置の入れかわりによってロックが解除され、蛋白質-発色団相互作用のために異性化する。」

このモデルの場合は、異性化角度が 90 度に近いところに蛋白質-発色団相互作用によるポテンシャルの極小があると考えれば、暗順応状態でレチナールの配置が all-*trans*: 13-*cis* = 50% : 50% であること、また基底状態の第一中間体である J 中間体がかたねじれた発色団をもつことなどの実験事実が矛盾なく説明できる。レチナール単体では異性化の速度は遅く、三重項状態を経る。バクテリオロドプシンにおける非常に速い異性化は、蛋白質を抜きにしては説明できないのであるから、蛋白質が異性化を助けていると考えるのは自然な考えであろう。また、最近の時間分解ラマン分光の結果も、この考えを支持している [69]。

4.3.4 明順応状態での 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化スペクトルとその時間依存性

図 4.9 に、明順応状態での 14-F-BR の吸収変化スペクトルを示す。比較のため、暗順応状態の結果も同時に示してある。明順応状態での 14-F-BR の吸収変化スペクトルは、暗順応状態の場合に比べて褐色が長波長側に広がっているが、全体の形状はよく似ている。この長波長側の広がりは、暗順応状態のときと同様に定常吸収スペクトルから説明できる。従って、明順応状態においても、14-F-BR の吸収変化スペクトルに、BR でのアサインメントをそのまま適用しても問題ないと考えられる。すると、460nm 付近の誘導吸収および 800 ~ 1000nm の利得は、励起状態および緩和励起状態 (BR の I_{460}) によるものであり、また 700 ~ 800nm の誘導吸収は、BR の J 中間体および K 中間体に相当する中間体からの吸収であると結論づけられる。但し、10 ピコ秒後の信号からわかるように、K 中間体に相当する吸収は非常に弱い。また、遅延時間 0 付近の信号と、1 ピコ秒後の信号の大きさを比較すると、明順応状態のほうが寿命が長いことがわかる。

この事実は、次の図 4.10 に示した、明順応状態での 14-F-BR の吸収変化の時間依存性からよりはっきりする。ここでもまた、暗順応状態での吸収変化とともに示してある。これらを単一指数関数でフィットすると時定数は 900 ± 100 フェムト秒と決められる。この長い時定数は、明順応状態で新たに現れる、長波長シフトした成分からの寄与であると考えられる。ただし、明順応状態の場合、暗順応状態に存在するのと同じ成分からの寄与も考えに入れる必要がある。一つの時定数を、暗順応状態で観測されたのと同じ 500 フェムト秒に固定して、二つの指数関数の和でフィッティングを行なうと、もう一つの時定数として 1.0 ± 0.2 ピコ秒という値を得る。単一指数関数でのフィッティングの結果得られる時定数もこの時定数の範囲に含まれているので、長波長シフトした成分の励起状態の寿命は 1.0 ± 0.2 ピコ秒と結論して問題ないであろう。

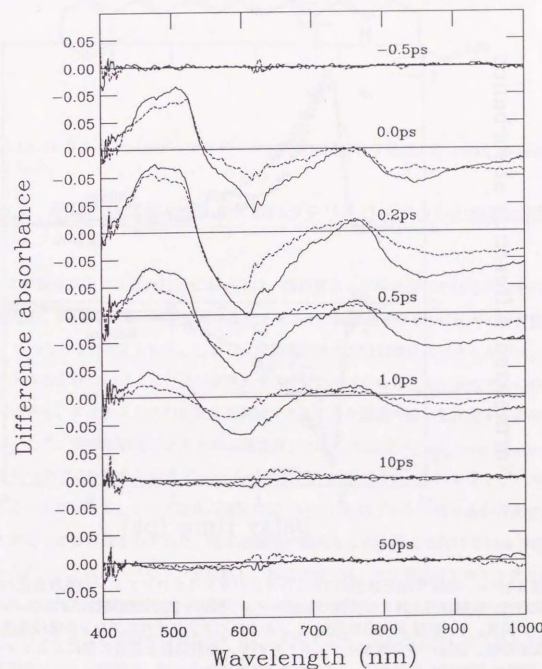


図 4.9: 実線:明順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化スペクトル。
破線:暗順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化スペクトル。

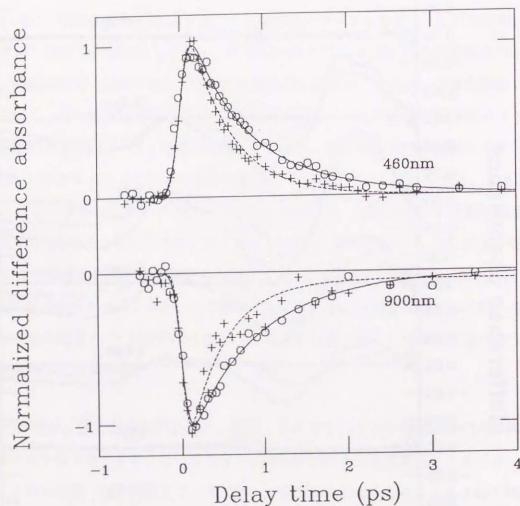


図 4.10: o、実線・明順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化の時間依存性。実線は時定数 1 ピコ秒と 500 フェムト秒の 2 成分指数関数によるフィッティング結果。+、破線・暗順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの吸収変化の時間依存性。破線は時定数 500 フェムト秒の単一指数関数と定数の和によるフィット。どちらも規格化してある。

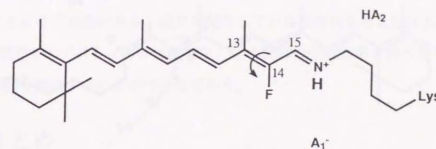


図 4.11: 14-フルオロバクテリオロドプシンの発色団の化学構造。all-trans, 15-anti 構造をもつ。

4.3.5 明順応状態の 14-フルオロバクテリオロドプシンの結果に関する考察

この長波長シフトした成分においては、蛋白質および発色団における何らかの構造変化が、蛋白質・発色団相互作用を変化させ、その結果通常の BR に比べて時定数が長くなっていると考えられる。しかし、今回測定された吸収変化スペクトルでは、スペクトルの形状にはほとんど違いが現れず、時定数だけが変化しているので、この情報だけから、ダイナミクスの低速化を説明できるような構造の違いを決定するのは難しい。ただ、明順応状態にあらわれる長波長シフトした成分が、all-trans, 15-syn 構造をもつのではないかという Tierno らの示唆 [61] に基づいて、次のようなモデルを立てることができる。 Schiff 塩基の周囲には、いくつかのプロトン供与基が存在することが古くから主張されており、電子線回折の結果もこの主張を裏付けている [70]。これらが Schiff 塩基へプロトン进行供給し、基底状態では Schiff 塩基がプロトン化されている。バクテリオロドプシンの光サイクル中、M 中間体では Schiff 塩基からプロトンが外れていることが確かめられている。このことから、発色団を介したプロトン供与基間のプロトン移動が、何らかの形で BR のプロトンポンプとしての機能に関係していると考えられている。 Schiff 塩基の周囲のプロトン供与基の数としては、通常 2 ~ 3 個を考慮の対象としているが、ここでは 2 個あるモデルで考えてみる。 2 つのプロトン供与基が、 Schiff 塩基の両側に存在しているとする。

図 4.11 のように、all-trans, 15-anti 構造を持つ場合には、 Schiff 塩基がプロトン

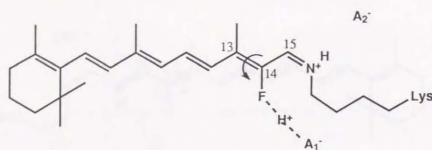


図 4.12: 14-フルオロバクテリオロドプシンの発色団の化学構造。all-*trans*, 15-*syn* 構造をもつ。

化されることによって、ふっ素原子と同じ側にあるプロトン供与基がイオン化する。ふっ素原子は電気陰性度が高いので、負電荷を帯びていると考えられる。ふっ素原子とイオンの静電相互作用を考えると、この系は不安定になり、発色団の異性化は促進される方向である。これに対し、図 4.12のように、発色団が all-*trans*, 15-*syn* 構造を持つ場合には、シッフ塩基にプロトン进行供給するプロトン供与基は、ふっ素原子の反対側にある。その結果、プロトンを介して、ふっ素原子とプロトン供与基の間に水素結合で結ばれ、発色団の構造は安定化する。従って異性化の過程は遅くなる。

以上の説明では、14-F-BR の暗順応状態では通常の BR に比べて異性化が速くなることが期待される。しかし、実験結果によれば、異性化のダイナミクスには変化がない。これについては、暗順応状態の 14-F-BR では、静電相互作用により異性化させる力は大きくなるが、水素原子がふっ素原子に置きかわったことにより慣性モーメントが増大し、これらの効果が打ち消しあって結果として通常の BR の場合と同じになっている、という可能性も考えられる。

実際のところ以上に述べたプロトン供与基との相互作用によって生ずる変化を定量的に評価するのは難しいが、定性的には実験結果を説明できたといえる。

14-F-BR の明順応状態で K 中間体に相当する吸収が弱いのは、2つの原因が考えられる。一つには、定常吸収が長波長側にシフトしているのにもかかわらず、K 中間体の吸収の位置はそれほど変わらないために、吸収の褪色と重なって見えなくなっている可能性がある。もう一つは、K の生成効率自体が低いという可能性であ

る。励起状態からの遅い緩和に対応して、異性化の効率つまり K の生成効率が低いと考えることは妥当性がある。両方が関与している可能性も考えられる。

明順応状態でのプロトンポンプ能力や、M 中間体の生成効率を調べることによって、この問題を解決することができるだろう。

4.4 まとめ

14-フルオロバクテリオロドプシンの光初期過程に関して得られた主要な結論をまとめておく。

- 暗順応状態では、14-フルオロバクテリオロドプシンの励起状態 (I_{460}) の寿命は 500 ± 100 フェムト秒であり、通常のバクテリオロドプシンの場合とほとんど変わらないことがわかった。このことから、発色団の *trans-cis* 異性化のダイナミクスを支配している因子は蛋白質-発色団相互作用であると考えられた。
- 明順応状態は、暗順応状態に比べて長い寿命 (1.0 ± 0.2 ピコ秒) をもっていた。このことはシッフ塩基の周囲のプロトン供与基と発色団の間の相互作用を考えると定性的に説明できた。

今回の研究では一種類のアナログだけを取り扱ったが、将来様々なアナログの初期過程の研究を積み重ねていくことによって、バクテリオロドプシンにおける発色団と蛋白質の相互作用の様子をより精密に理解することができるようになるであろう。

第5章

まとめ

本研究の主要な内容を以下に再びまとめておく。

- まず、ロドプシンを励起するために必要な、波長500nm 帯の波長可変フェムト秒光源の開発を行ない、パルス幅約300 フェムト秒で十分な出力強度を持つ光源を開発することができた。
- この光源を今までフェムト秒領域の研究がなされていなかったタコロドプシンの光初期過程の研究に応用し、以下の知見が得られた。
 - － 励起状態の誘導吸収が波長600～700nm にかけて観測された。
 - － 励起後400 フェムト秒以内に *cis-trans* 異性化が起こり、プライムロドプシンが生成する。
 - － プライムロドプシンは基底状態の中間体である。
 - － プライムロドプシンがバソロドプシンへ変化すると、吸収が5～15nm 短波長シフトする。この過程は10～20 ピコ秒の時定数を持ち、発色団のねじれの変化を伴っていると考えられる。
 - － ヒプソロドプシンを経るバソロドプシンの生成過程は、全体のバソロドプシンの生成量に対し20%以下の寄与しかしていない。
 - － 励起後、バソロドプシンに至るものの他に、一部分は「発光する状態」に分岐する。この状態は800nm より長波長側に利得を持ち、2～4 ピコ秒の

寿命で減衰する。

- また、バクテリオロドプシンの光異性化過程において、発色団の電子状態が異性化のダイナミクスに対してもつ役割に関する知見を得るために、14-フルオロバクテリオロドプシンのフェムト秒吸収分光を行なった。この結果から次のような結論が得られた。

- 暗順応状態では、14-フルオロバクテリオロドプシンの励起状態 (I_{400}) の寿命は 500 ± 100 フェムト秒であり、通常のバクテリオロドプシンの場合とはほとんど変わらないことがわかった。このことから、発色団の *trans-cis* 異性化のダイナミクスを支配している因子は蛋白質-発色団相互作用であると考えられた。
- 明順応状態は、暗順応状態に比べて長い寿命 (1.0 ± 0.2 ピコ秒) をもっていた。このことはシッフ塩基の周囲のプロトン供与基と発色団の間の相互作用を考えることによって定性的に説明できた。

残された課題として最も重要なものは、タクロドプシンで観測された利得の帰属である。この解明のために、試料依存性も含めて、今後近赤外領域の発光・吸収分光の知見をもっと積み重ねていく必要がある。

今や超高速時間分解分光は、視覚だけでなく光合成なども含め、生物の光初期過程の研究にはなくてはならない重要な手法となっている。本研究でも、その大きな可能性の一端を示したといえるだろう。本研究で使用した装置は大掛かりで熟練を要するものであるが、今後はこの手法がもっと手軽なものになることが期待される。その結果研究対象が量的に拡大することにより、質的に違った知見が得られるようになるであろう。

また一方で、理論の進展も期待される。ロドプシン・バクテリオロドプシンに関する分子軌道計算は数多くあるが、電子数が多いので励起状態の扱いが難しいこと、また蛋白質との相互作用をきちんと取り入れるのが難しいことなどが問題となっている。計算機的能力向上と共に、蛋白質の高次構造予測や、その動的挙動のシミュレー

ションを行なうことができるようになり、こうした理論上の問題点も徐々に解決されていくことが期待される。

謝辞

本研究を進めるにあたり、指導教官である小林孝嘉助教授には様々な面にわたって御指導・援助をいただきました。

姫路工業大学の津田基之教授、中川将司博士、サントリー生物有機化学研究所の吉原和雄博士、関谷紀子博士、東京工業大学の太谷弘之助教授には、試料を提供していただき、また有益な議論・御助言をいただきました。

本研究で行なった実験のほとんどは、東京大学に一年間 Postdoctoral researcher として在籍していた Krzysztof Bryl 博士と共同して行なったものです。彼の協力・議論・助言・激励なしでは、本研究を遂行することはとてもできなかったでしょう。

研究室の助手である吉澤雅幸博士にも実験に協力していただきました。また、本研究で使用したフェムト秒レーザー装置の一部は氏と共同で開発したものです。

美濃島薫氏には実験に協力していただくと同時に、有益な議論に付き合ってもらいました。また暖かい励ましをいただきました。

竹内佐年氏には測定用のプログラムを提供していただきました。

そのほかの研究室のメンバーの方々にも、実験装置の整備や議論に協力していただきました。

これらの方々に深く感謝します。

この研究の一部には、東京大学中間子科学研究センターの VAX6400 計算機を使用させていただきました。

また、研究を進める上で、数多くの free softwares にお世話になりました。

これらの維持・開発を行なっている方々の努力に深く感謝します。

最後に、母と兄の精神的・財政的両面にわたる援助は、もちろん何にも代えられ

ないものでした。ここに深く感謝します。

参考文献

- [1] Wolfgang Kaiser, editor. *Ultrashort laser pulses and applications*. Volume 60 of *Topics in applied physics*, Springer-Verlag, Berlin, 1988.
- [2] R. L. Fork, C. H. Brito Cruz, P. C. Becker, and Charles V. Shank. Compression of optical pulses to six femtoseconds by using cubic phase compensation. *Opt. Lett.*, 12:483-485, 1987.
- [3] H. Kogelnik and C. V. Shank. Stimulated emission in a periodic structure. *Appl. Phys. Lett.*, 18:152-154, 1971.
- [4] A. Migus, A. Antonetti, J. Etchepare, D. Hulin, and A. Orszag. Femtosecond spectroscopy with high-power tunable optical pulses. *J. Opt. Soc. Am. B*, 2:584-594, 1985.
- [5] P. C. Becker, H. L. Fragnito, R. L. Fork, F. A. Beisser, and C. V. Shank. Generation of tunable 9 femtosecond optical pulses in the near infrared. *Appl. Phys. Lett.*, 54:411-415, 1989.
- [6] R. W. Schoenlein, J. -Y. Bigot, M. T. Portella, and C. V. Shank. Generation of blue-green 10 fs pulses using an excimer pumped dye amplifier. *Appl. Phys. Lett.*, 58:801-803, 1991.
- [7] R. W. Schoenlein, L. A. Peteanu, R. A. Mathies, and C. V. Shank. The first step in vision: Femtosecond isomerization of rhodopsin. *Science*, 254:412-415, 1991.

- [8] Masayuki Yoshizawa, Makoto Taiji, and Takayoshi Kobayashi. Relaxation dynamics of photoexcitations in polydiacetylene films. *IEEE J. Quantum Electron.*, 25:2532-2539, 1989.
- [9] 泰地 真弘人. フェムト秒時間分解分光装置の開発とその擬一次元系への応用. Master's thesis, 東京大学, 1989.
- [10] D. S. Bethune. Dye cell design for high-power low-divergence excimer-pumped dye lasers. *Appl. Opt.*, 20:1897-1899, 1981.
- [11] F. P. Schäfer. On some properties of axicons. *Appl. Phys. B*, 39:1-8, 1986.
- [12] R. L. Fork. Optical frequency filter for ultrashort pulses. *Opt. Lett.*, 11:629-631, 1986.
- [13] 栗屋 隆. データ解析. 学会出版センター, 1983.
- [14] James B. Hurley, Thomas G. Ebrey, Barry Honig, and Michael Ottolenghi. Temperature and wavelength effects on the photochemistry of rhodopsin, isorhodopsin, bacteriorhodopsin and their photoproducts. *Nature*, 270:540-542, 1977.
- [15] Motoyuki Tsuda. Transient spectra of intermediates in the photolytic sequence of octopus rhodopsin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 545:537-546, 1979.
- [16] Motoyuki Tsuda, Fumio Tokunaga, Thomas G. Ebrey, Kwok To Yue, Jeffrey Marque, and Laura Einstein. Behaviour of octopus rhodopsin and its photoproducts at very low temperatures. *Nature*, 287:461-462, 1980.
- [17] Hiroyuki Ohtani, Takayoshi Kobayashi, Motoyuki Tsuda, and Thomas G. Ebrey. Primary processes in photolysis of octopus rhodopsin. *Biophys. J.*, 53:17-24, 1988.

- [18] Tôru Yoshizawa and Yûji Kito. Chemistry of the rhodopsin cycle. *Nature*, 182:1604-1605, 1958.
- [19] Tôru Yoshizawa and George Wald. Pre-lumirhodopsin and the bleaching of visual pigments. *Nature*, 197:1279-1286, 1963.
- [20] G. E. Busch, M. L. Applebury, A. A. Lamola, and P. M. Rentzepis. Formation and decay of prelumirhodopsin at room temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69:2802-2806, 1972.
- [21] V. Sundstrom, P. M. Rentzepis, K. Peters, and M. L. Applebury. Kinetics of rhodopsin at room temperature measured by picosecond spectroscopy. *Nature*, 267:645-646, 1977.
- [22] B. H. Green, T. G. Monger, R. R. Alfano, B. Aton, and R. H. Callender. Cis-trans isomerization in rhodopsin occurs in picoseconds. *Nature*, 269:179-180, 1977.
- [23] J. Buchert, V. Stefancic, A. G. Doukas, R. R. Alfano, R. H. Callender, J. Pande, H. Akita, V. Balogh-Nair, and K. Nakanishi. Picosecond kinetic absorption and fluorescence studies of bovine rhodopsin with fixed 11-ene. *Biophys. J.*, 43:279-283, 1983.
- [24] S. Horiuchi, F. Tokunaga, and T. Yoshizawa. *Biochimica et Biophysica Acta*, 591:445-457, 1980.
- [25] Gregory Eyring, Bostick Curry, Richard Mathies, Ruud Fransen, Ilona Palings, and Johan Lugtenburg. Interpretation of the resonance Raman spectrum of bathorhodopsin based on visual pigment analogues. *Biochemistry*, 19:2410-2418, 1980.

- [26] Tōru Yoshizawa. The behaviour of visual pigments at low temperatures. In H. J. A. Dartnall, editor, *Handbook of sensory physiology VII/1*, pages 146–179, Springer-Verlag, Berlin, 1972.
- [27] Yoshinori Shichida, Tōru Yoshizawa, Takayoshi Kobayashi, Hiroyuki Ohtani, and Saburo Nagakura. Squid hypsorhodopsin and bathorhodopsin by a picosecond laser photolysis. *FEBS Letters*, 80:214–216, 1977.
- [28] Yoshinori Shichida, Takayoshi Kobayashi, Hiroyuki Ohtani, Tōru Yoshizawa, and Saburo Nagakura. Picosecond laser photolysis of squid rhodopsin at room and low temperatures. *Photochemistry and Photobiology*, 27:335–341, 1978.
- [29] Takayoshi Kobayashi. Hypsorhodopsin: The first intermediate of the photochemical process in vision. *FEBS Letters*, 106:313–316, 1979.
- [30] Takayoshi Kobayashi. Existence of hypsorhodopsin as the first intermediate in the primary photochemical process of cattle rhodopsin. *Photochemistry and Photobiology*, 32:207–215, 1980.
- [31] Sinzi Matuoka, Yoshinori Shichida, and Tōru Yoshizawa. Formation of hypsorhodopsin at room temperature by picosecond green pulse. *Biochimica et Biophysica Acta*, 765:38–42, 1984.
- [32] A. J. Pande, R. H. Callender, Thomas G. Ebrey, and Motoyuki Tsuda. Resonance Raman study of the primary photochemistry of visual pigments hypsorhodopsin. *Biophys. J.*, 45:573–576, 1984.
- [33] A. G. Doukas, M. R. Junnarkar, R. R. Alfano, R. H. Callender, Toshiaki Kaki-tani, and Barry Honig. Fluorescence quantum yield of visual pigments: Evidence for subpicosecond isomerization rates. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:4790–4794, 1984.

- [34] Gary Hayward, William Carlsen, Anthony Siegman, and Lubert Stryer. Retinal chromophore of rhodopsin photoisomerizes within picosecond. *Science*, 211:942–944, 1981.
- [35] Glen. R. Loppnow and Richard A. Mathies. Excited-state structure and isomerization dynamics of the retinal chromophore in rhodopsin from resonance Raman intensities. *Biophys. J.*, 54:35–43, 1988.
- [36] Yoshinori Shichida, Sinzi Matuoka, and Tōru Yoshizawa. Formation of bathorhodopsin, a precursor of bathorhodopsin, detected by picosecond laser photolysis at room temperature. *Photobiochem. Photobiophys.*, 7:221–228, 1984.
- [37] Hideki Kandori, Sinzi Matuoka, Yoshinori Shichida, Tōru Yoshizawa, Masayoshi Ito, Kiyoshi Tsukida, Valeria Balogh-Nair, and Koji Nakanishi. Mechanism of isomerization of rhodopsin studied by use of 11-cis-locked rhodopsin analogues excited with a picosecond laser pulse. *Biochemistry*, 28:6460–6467, 1989.
- [38] K. Peters, M. L. Applebury, and P. M. Rentzepis. Primary photochemical event in vision: Proton translocation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 74:3119–3123, 1977.
- [39] Y. Kito, M. Seidou, K. Narita, and M. Michinomae. ホタルイカにとっての“三原色”. *日経サイエンス*, 22(1):30–41, 1992.
- [40] Gerhard Herzberg. *Molecular spectra and molecular structure II. Infrared and Raman spectra of polyatomic molecules*. D. Van Nostrand, New York, 1945.
- [41] S. J. Doig, P. J. Reid, and R. A. Mathies. Picosecond time-resolved resonance Raman spectroscopy of bacteriorhodopsin's J, K, and KL intermediates. *J. Phys. Chem.*, 95:6372–6379, 1991.
- [42] N. Sasaki, F. Tokunaga, and Tōru Yoshizawa. The formation of two forms of bathorhodopsin and their optical properties. *Photochem. Photobiol.*, 32:433–441, 1980.

- [43] C. M. Einterz, J. W. Lewis, and D. S. Klier. Spectral and kinetic evidence for the existence of two forms of bathorhodopsin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84:3699-3703, 1987.
- [44] W. Stoeckenius, R. H. Lozier, and R. A. Bogomolni. Bacteriorhodopsin and the purple membrane of halobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 505:215-278, 1979.
- [45] W. Stoeckenius and R. A. Bogomolni. Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Ann. Rev. Biochem.*, 52:587-616, 1982.
- [46] A. Matsuno-Yagi and Y. Mukohata. Two possible roles of bacteriorhodopsin. A comparative study of strains of halobacterium halobium differing in pigmentation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 78:237-243, 1977.
- [47] R. A. Bogomolni and J. L. Spudis. Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic halobacterium halobium. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:6250-6254, 1982.
- [48] H. Tomioka, T. Takahashi, N. Kamo, and Y. Kobatake. Flash spectrophotometric identification of a fourth rhodopsin-like pigment in *Halobacterium Halobium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 139:389-395, 1986.
- [49] M. J. Pettei, A. P. Yudd, K. Nakanishi, R. Henselman, and W. Stoeckenius. Identification of retinal isomers isolated from bacteriorhodopsin. *Biochemistry*, 16:1955-, 1977.
- [50] P. Scherrer, M. K. Mathew, W. Sperling, and W. Stoeckenius. Retinal isomer ratio in dark-adapted membrane and bacteriorhodopsin monomers. *Biochemistry*, 28:829-834, 1989.

- [51] M. Braiman and R. A. Mathies. Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: Evidence for a distorted 13-*cis* retinal chromophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79:403-407, 1982.
- [52] S. P. A. Fodor, J. B. Ames, R. Gebhard, E. M. M. van den Berg, W. Stoeckenius, and R. A. Mathies. Chromophore structure in bacteriorhodopsin's N intermediate: Implications for proton-pumping mechanism. *Biochemistry*, 27:7097-7101, 1988.
- [53] A. V. Sharkov, A. V. Pakulev, S. V. Chekalin, and Y. A. Matveetz. Primary events in bacteriorhodopsin probed by subpicosecond spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 808:94-102, 1985.
- [54] M. C. Nuss, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kollong, and D. Oesterhelt. Femtosecond spectroscopy of the first events of the photochemical cycle in bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Letters*, 117:1-7, 1985.
- [55] H. -J. Pollard, M. A. Franz, W. Zinth, W. Kaiser, E. Kolling, and D. Oesterhelt. Early picosecond events in the photocycle of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.*, 49:651-662, 1986.
- [56] J. W. Petrich, J. Breton, J. L. Martin, and A. Antonetti. Femtosecond absorption spectroscopy of light-adapted and dark-adapted bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Letters*, 137:369-375, 1987.
- [57] J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt. Excited-state reaction dynamics of bacteriorhodopsin studied by femtosecond spectroscopy. *Chem. Phys. Letters*, 144:215-220, 1988.
- [58] R. A. Mathies, C. H. Brito Cruz, W. T. Pollard, and C. V. Shank. Direct observation of the femtosecond excited-state *cis-trans* isomerization in bacteriorhodopsin. *Science*, 240:777-779, 1988.

- [59] Mamoru Terauchi. *Primary photoprocesses in bacteriorhodopsin and octopus rhodopsin by time-resolved spectroscopy*. PhD thesis, University of Tokyo, 1989.
- [60] Takayoshi Kobayashi, Mamoru Terauchi, Tsutomu Kouyama, Masayuki Yoshizawa, and Makoto Taiji. Femtosecond spectroscopy of acidified and neutral bacteriorhodopsin. In *Laser applications in life sciences, Part two: Lasers in biophysics and biomedicine, SPIE vol. 1403*, pages 407-416, 1990.
- [61] M. E. Tierno, D. Mead, A. E. Asato, R. S. H. Liu, N. Sekiya, K. Yoshihara, C.-W. Chang, K. Nakanishi, R. Govindjee, and T. G. Ebrey. 14-fluorobacteriorhodopsin and other fluorinated and 14-substituted analogues. An extra, unusually red-shifted pigment formed during dark adaptation. *Biochemistry*, 29:5948-5953, 1990.
- [62] D. Oesterhelt and W. Stoekenius. *Methods Enzymol.*, 31:667-678, 1974.
- [63] A. E. Asato and R. S. H. Liu. *Tetrahedron Lett.*, 27:3337-3340, 1986.
- [64] A. E. Asato, H. Matsumoto, M. Denny, and R. S. H. Liu. *J. Am. Chem. Soc.*, 100:5957-5960, 1978.
- [65] Krzysztof Bryl, Makoto Taiji, Kaoru Minoshima, and Takayoshi Kobayashi. Femtosecond absorption studies of bacteriorhodopsin dry films. in preparation.
- [66] Peter Hildebrandt and Manfred Stockburger. Role of water in bacteriorhodopsin's chromophore: Resonance Raman study. *Biochemistry*, 23:5539-5548, 1984.
- [67] Arieh Warshel and Natalia Barboy. Energy storage and reaction pathways in the first step of the vision process. *J. Am. Chem. Soc.*, 104:1469-1476, 1982.
- [68] Toshiaki Kakitani and Hiroko Kakitani. Molecular mechanism for the initial process of visual excitation I. Model of photoisomerization in rhodopsin and its

- theoretical basis by a quantum mechanical calculation of adiabatic potential. *J. Phys. Soc. Jpn.*, 38:1455-1463, 1975.
- [69] George H. Atkinson. private communication.
- [70] R. Henderson, J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, and K. H. Downing. Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.*, 213:899-929, 1990.

