

## References

Satoshi Tanaka, Hiroshi Yamada and Yosuke Kayanuma, J. Phys. Soc. Jpn (to be published)

## 6. 生体物質のピコ秒蛍光ダイナミックス

野村正英

ピコ秒時間領域で変化する高速且つ微弱な発光現象を、高感度高時間分解能で測定する為にシンクロスキャンストリークカメラ(SSC法)は大変有効な方法である。これにリング型強制モード同期レーザー及び分光器を組み合わせることにより、発光スペクトルの減衰過程を波長/時間二次元の強度分布として同時測定することが可能となる。

本研究は、電子技術総合研究レーザー研究室山下幹雄主任研究員等と共同で、この二次元シンクロスキャンストリークカメラ法をもちいたシステムの設計、組み立て及びそのシステムを用いてバクテリオロドプシン(bR)及び癌親和性色素ヘマトポルフィリン誘導体(HpD)についての、ピコ秒蛍光ダイナミックスの測定及び解析を行なったものである。本発表では、そのうちbRについての測定及び解析結果について報告する。

\* 測定装置 試料の測定を行なうに際して、二次元SSC法を可能とするためにいくつかの点について装置を各々試作、設計、改良した。

- 1) シンクロナスモードロックレーザーの試作及び改良。
- 2) 試料及びレンズホルダー系の設計。
- 3) SITカメラ用回転ホルダーの設計。
- 4) データ処理用プログラムの製作及び改良、等。

色素レーザーはAr-ionレーザーの514.5 nmの光でRhodamine 6GをPumpした強制モードロックリングレーザーで、二てい倍光は変換効率を高める為ADP結晶を共振器内においた。測定系の時間分解能を決めている主な要因は、色素レーザーのJitterであり、Ar-ionモードロッカー部分を温度コントロールすること等により、最適条件では10 ps以下のレーザーパルス幅の観測に成功した。

\* 実験 測定用試料bRは、高度好塩菌の細胞膜中に紫膜(PM)として存在する色素蛋白で、

レチナールを発色団としてもつ。蛋白質におけるトリプトファン(Trp)などの芳香性アミノ酸は、280 nm 付近の波長域に吸収極大をもち、その励起によって出される蛍光を測定する事により、分子内プローブとして使う事ができる。bRの場合にはレチナールとTrpとの間で双極子-双極子相互作用によるエネルギー移動がおこる。本報告は、bRの蛍光ダイナミックスを測定することにより、Trpとレチナールの間の相互作用を調べ、分子内構造についての知見を得ようとしたものである。

#### < $\gamma$ バンドの励起による近紫外領域での蛍光測定 >

280 nm 付近に極大をもつ bRの吸収帯( $\gamma$ バンド)は、約9割がTrpに起因し、残りの1割がレチナールおよびそれとの相互作用に起因する。まずPMからレチナールを取り除いた bPMでの近紫外域での蛍光ダイナミックスを測定した。その結果約340 nm に蛍光極大を持つ寿命約1550 psの長寿命成分と、320-330 nmに蛍光極大を持つ寿命約200 psの短寿命成分からなる蛍光が観測された。一方PMではレチナールへのエネルギー移動が存在するため bPMでの長寿命成分の寿命は約650 psへ、短寿命成分の寿命は約130 psへと、それぞれ短寿命化する事がわかった。これは、PMにおいてはbPMにおけるTrp由来の長短ふたつの蛍光成分がそれぞれ0.60, 0.35程度のエネルギー移動効率で、消光されることを示す。

これまでの報告では長寿命成分のみが報告されていたが、高時間分解能をもつ二次元SSC法を用いることによって初めて短寿命成分を見だし、その寿命とスペクトルを決定することに成功した。

#### < $\alpha$ バンドの励起による可視域での蛍光測定 >

これまでに報告された室温での蛍光寿命の測定結果によれば、パルス列励起による測定では10-20 psの蛍光寿命が、また単発励起による測定では全て測定時間分解能以下であるという報告がなされている。この違いは、パルス列励起の場合では中間体の蓄積と、そこからの蛍光の測定によるものとして説明され得る。実際に測定を行なった結果、蛍光は670-680 nm 付近に極大をもって観測され、一分子に着目した場合の平均励起間隔  $\Delta T = 0.16 \mu\text{sec}$  程度の励起強度において、 $\tau = 45 \text{ ps}$ の寿命が観測され、 $\Delta T = 16 \mu\text{sec}$ 程度の励起強度では、蛍光励起パルスと区別がつかなかった。これより励起強度が弱いときのレチナール由来の蛍光の寿命は、数ピコ秒以下であると結論できる。

#### < $\gamma$ バンドの励起によるレチナールからの蛍光測定 >

Trpからレチナールへのエネルギー移動を別な視点でみるために $\gamma$ バンドを励起して、レチナール由来の蛍光の観測出来る600-700 nmの波長領域での発光現象をPMとbPMについ

て測定した。このような方法で Trp からのレチナールへのエネルギー移動の様子を観測した報告はいまのところない。

Trp からのレチナールへのエネルギー移動により励起されたレチナールの蛍光が観測される事が期待されたが、実験の結果 Trp からのエネルギー移動により励起されたレチナールからの蛍光は、予想されるより極端に少ない事が分った。

\* 結論 以上の一連の実験から以下のような事が明らかになった。

- 1) PMにおいて発色団レチナールは光励起された Trp の励起エネルギーとしてはたらく。そのときドナーとなる Trp は周りの環境場の違いにより少なくとも2つに分類され、そのうち1つは蛍光極大波長(340 nm)、長寿命(650 ps)で、約60%程度のエネルギー移動効率を持ち、発色団との平均距離は約26 オングストローム、もう1つは蛍光極大が短波長(320-330 nm)、単寿命(約130 ps)で、約35%のエネルギー移動効率を持ち発色団との平均移動距離は約30.5 オングストロームである。
- 2) 蛋白からのエネルギー移動により励起されたレチナールからの見掛けの蛍光量子収率は、直接  $\gamma$  バンドで励起されたレチナールからの蛍光量子収率に比べ著しく小さい事が明らかになった。この結果の解釈について論じた。

## 7. ヨード化紫膜の X 線回折的研究

佐藤直紀

紫膜は高度好塩菌、Halobacterium halobium の細胞膜の一部で、膜内には唯一種類の蛋白質分子バクテリオロドプシン(6R)が二次元六方格子状に結晶配列している(p3: 格子定数 62.7 Å)。bR は発色団レチナールの光異性化に伴って proton を菌体外へ放出する、即ち light driven proton pump として機能する。bR 分子を構成するアミノ酸残基のうちチロシン残基(Tyr)が bR の光反応やポンプ機能に重要な役割を果たしている事が Tyr のヨード化による分光学的研究などから明らかとなっている。我々は Tyr のヨード化が紫膜構造に与える影響及びヨード化される Tyr 残基の位置を知る事を目的として本研究を行なった。

X線回折実験は主に、高エネルギー物理学研究所放射光実験施設の分子生理用小角散乱装置