

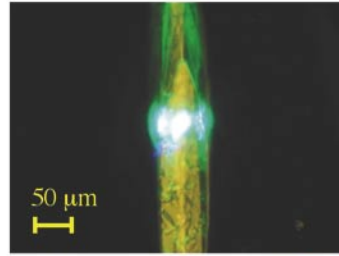


2006, May.

No. 218

CONTENTS

- 蛋白質結晶の光反応：
顕微蛍光アップコンバージョンシステムによる観測
- 【光と蔭】わが国の科学技術開発への願い
- 日米で競い合う成果、Fokker-Planckコードの開発



【表紙写真】顕微蛍光アップコンバージョン測定システムと観測時の様子（PYP単結晶）

蛋白質結晶の光反応：顕微蛍光アップコンバージョンシステムによる観測

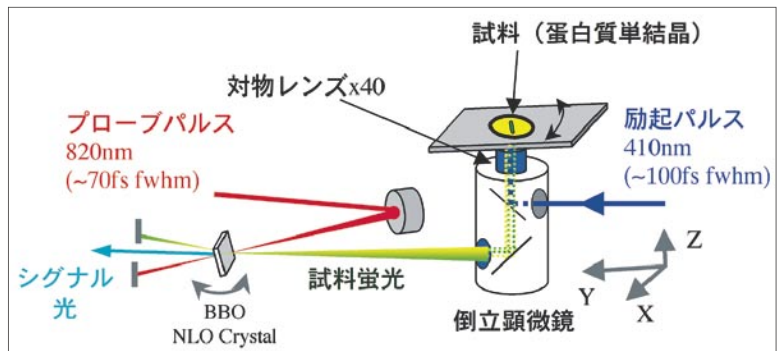
レーザーバイオ科学研究チーム 谷口誠治、コスロービアンハイク

■はじめに

われわれはこれまで、微小領域における光物性評価の新技术として、フェムト秒領域での蛍光計測が可能でアップコンバージョン法と光学顕微鏡とを組み合わせた新たな計測法（顕微蛍光アップコンバージョンシステム）の開発を行ってきた。本稿では、本システムの生体関連分野への応用として、結晶状態の光機能性蛋白質について、観測を行った結果について報告する。

■測定システムの概要

顕微蛍光アップコンバージョンシステムについては以前にも報告した（「Laser Cross」No.209）ので、ここではその概要について述べる。システムの装置図を図1に示す。励起レーザー光は顕微鏡内部から対物レンズを通して試料を励起する。試料からの蛍光は対物レンズにより非線形光学結晶に集光し、ゲート光との和周波（シグナル光）を発生させ、その光量を観測する。ゲート光のタイミングを光学遅延により制御することで、フェムト秒領域での時間分解蛍光の観測が可能となる。このシステムの時間分解能を評価するため、励起光パルス（波長410nm、時間幅約100fs(FWHM)）とゲート



【図1】システム図

ト光（820nm、時間幅約70fs(FWHM)）のクロスコリレーションを観測した結果、装置応答関数は時間幅約400fsであり、フェムト秒領域での蛍光測定が可能であることが分かった。一方空間分解能については、顕微鏡による励起位置の制御により $2\mu\text{m}$ 以下と大きく向上した。さらにこのシステムでは、蛍光の集光率も良く、観測に必要な励起光強度も $100\mu\text{W}$ 以下にまで抑えられる。このことから計測の際問題となる試料の劣化についても極力抑えた形での観測が可能となった。

■蛋白質の機能解明における問題点

生体内でさまざまな役割を果たす蛋白質の高い機能

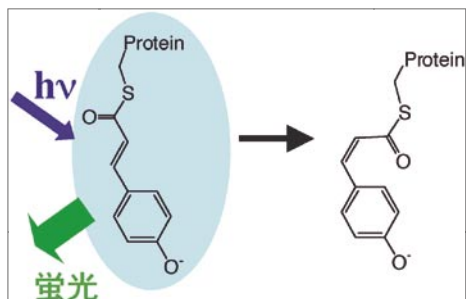
次ページへつづく▶

蛋白質結晶の光反応：顕微蛍光アップコンバージョンシステムによる観測

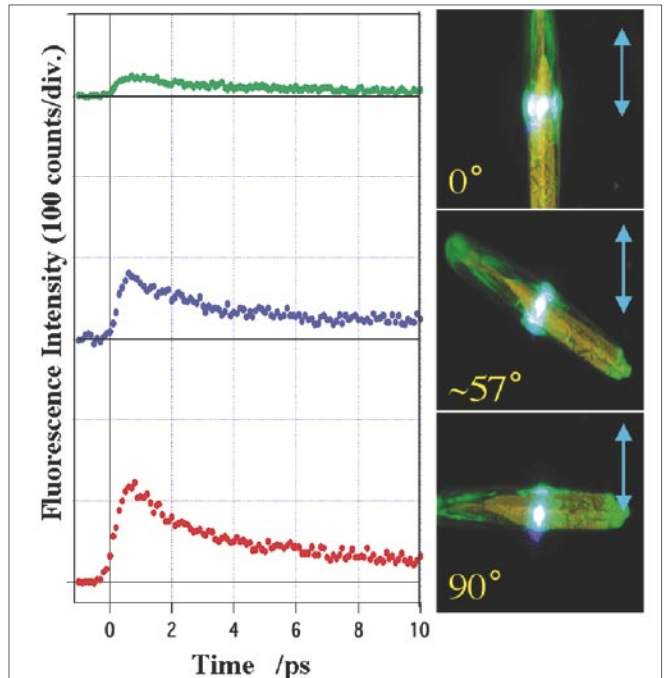
性には、アミノ酸残基により巧みに構成される蛋白質の“構造”自体が深く関与していると考えられ、蛋白質構造と機能性(反応性)との関連性について明らかにすることはバイオ研究の大きな課題である。そのためにはまず蛋白質の構造を明確にする必要があることから、近年X線を用いた結晶構造解析による研究が大きな進展を見せている。一方で、X線による測定手法では基本的に結晶を試料として用いなければならないという点に大きな問題がある。つまり、蛋白質は本来生体膜(または(水)溶液)中で機能することから、環境の大きく異なる結晶状態でも同様の構造、あるいは反応を示すかどうかという点に疑問符が打たれているのである。このため溶液中と結晶中での蛋白質の構造や反応メカニズムの相違点を明らかにすることは上記の研究を進展させる上でも重要な研究課題であり、そのためには溶液中と結晶中での蛋白質反応について同一の手法により観測し、比較することが良い方法であろうと思われる。われわれの研究グループでは蛋白質機能のメカニズムを解明することを目的とし、光に直接応答する蛋白質(光受容性蛋白質)PYP(Photoactive Yellow Protein)の溶液中での光反応について時間分解蛍光測定手法を用いた研究を行い、その反応が蛋白質環境場の微弱な変化により大きく影響されることを見出してきた。また、結晶状態の蛋白質についても時間分解蛍光測定による研究を進めてきた(「Laser Cross」No.200)が、本測定システムを用いることにより、結晶状態での光反応メカニズムについてより詳細な情報が得られる可能性がある。

■PYP単結晶の光初期反応の観測

光活性蛋白質PYPは光受容性蛋白質(光を直接吸収して反応する蛋白質)の代表的なもの1つとして知られており、発色団(p-クマル酸)の光異性化反応(図2)がトリガーとなって蛋白質の構造変化を引き起こす光サイクル反応を示す。本研究では、発色団の光異性化反応に焦点を絞り、PYP単結晶のフェムト秒蛍光の観測を行った。



【図2】PYP発色団(p-クマル酸)の光異性化反応



【図3】PYP単結晶のフェムト秒蛍光の経時変化と観測時の様子(写真中青線は励起光の偏向方向を示す)

子を図3に示す。観測される蛍光は光励起後寿命数ピコ秒での減衰を示し、結晶中においても発色団の異性化が起こっている様子が観測された。また、直線偏光である励起レーザー光の偏向方向(図中青線)と配置する結晶の角度に対する依存性を調べたところ、観測される蛍光強度に差が見られ、その強度比は励起光方向に対して結晶の長軸を0°に配置した場合と比較して、90°に配置した場合で約6.5倍となった。このような現象に対しては、結晶中の発色団の配置を考慮することにより説明できる。結晶内の発色団は、結晶の短軸から13.5°傾いた方向に配置され、また6つの発色団が長軸方向に螺旋状に配列しユニットを形成している。このことから遷移双極子モーメントが分子に平行であると仮定すれば、結晶の短軸方向に平行な励起光偏向の方が光の吸収確率が大きくなり、蛍光強度は増大するものと考えられる。結晶構造から予想される励起光偏向面に対する蛍光強度比は7.3と見積もられ、比較的良い一致を示した。一方、蛍光の経時変化については励起光偏向方向に対する変化は見られず、発色団の異性化反応自体は励起光偏向による影響は受けていないものと考えられる。

観測により得られたPYP単結晶の蛍光の経時変化について3成分指数関数による寿命解析を行ったところ、寿命1.4psの減衰を主とする10ps、および20ps以上の長寿命成分の3成分指数関数で減衰することが分かった。一方水溶液中でのPYPの反応では、蛍光寿命

は450fs、1.8ps、14psの成分を持つ減衰を示しており、結晶での光異性化は、溶液中反応と比較して全体的に遅くなっているものと考えられる。また、結晶中での異性化反応では、溶液中で観測されたようなサブピコ秒の超高速寿命成分が見られないことが特徴的である。溶液中反応における超高速蛍光減衰については、これまでのわれわれの研究から、周囲のアミノ酸との相互作用を含んだ発色団の特定の分子振動が新たな異性化反応経路を開き、反応を促進するために起こるものと考えてきた。一方結晶状態では蛋白質が規則正しく配列しており、水溶液中に比べ蛋白質および発色団の空間的自由度に制限があると考えられる。このことから、結晶中では異性化に必要な分子振動が空間的に制

限を受け、その結果光反応性が低下する可能性が考えられる。また、このような超高速領域においても反応性の違いが観測されることから、溶液中と結晶状態では蛋白質構造自体が異なっている可能性も考えられる。

■まとめ

顕微蛍光アップコンバージョン測定システムによる観測により、水溶液中と結晶中における蛋白質の光反応性に相違点が見られることが明らかとなった。このような事実は、蛋白質の機能を十分に発揮させるためには蛋白質そのものだけでなく周囲の環境場についても考慮をする必要性を示している。それらの詳細についてさらに明らかにするため、今後も研究を進展させたいと考えている。

山中千代衛



わが国の科学技術開発への願い

現在の国際環境はわが国にとってきわめて厳しい状況にある。BRICSの未来が喧伝されているが、わが国を長らく支配し続けてきたアメリカの崩れと一方チャイナの急成長と巨大化は、いや応なしにわれわれに新しい対応を要請している。

今やわが国は人口の減少、かつて世界に誇った堅実な社会基盤の崩壊、活力の低下、教育水準の劣化、モラルと治安のゆらぎなど、国力の衰退を示す指標にこと欠かない現状にある。ジャーナリズムは元々情緒的な動きを示すものであるが、「日本人は働き過ぎ」とか「ワーカホリック」などと称して自ら社会の規範を掘り崩す役目を果たしてきた結果が今日の体たらくである。

Japan as No. 1の1985年時代を振り返るとともに智慧を出して現実の対応を図らねばならない。それでも日本が世界をリードする技術のなお健在することはまことに喜ばしい。例えば自動車、工作機械、光学機械など、この底流にある科学技術の温存と振興を考える必要がある。何といたっても日本的システムの特徴を生かすことが大切で、安易にアメリカモデルの真似をしても前途への道は開けない。

まず、戦後の甘い教育制度をたたき直さねばなるまい。明治の人達の厳しい人生観を取り戻さなければ新体制の世界に生残ることは出来ない。

政府も科学技術の重要性を認めて科学技術基本法を作り、総合科学技術会議が、第一次、第二次、第三次と科学技術基本計画を打ち出し、大型予算を計上してきた。現時点での反省として、小泉政府は経済振興には熱心に取り組むが、科学技術立国の本来の意味をよく理解していないのではという心配がある。今までの一次、二次計画10年を振り返っても、大きなインパクトや見るべき成果は見えないのではなからうか。

チャイナのロケット開発や最近の宇宙有人飛行、かつてわれわれが指導したレーザー核融合の進展などを見せられると、この国の科学技術立国への確固たるメッセージが読み取れるのである。これに引き比べわが国の計画はいかにも日常茶飯の産業技術振興やこまごました新技術の産業化に振り回されている感、なきにしもあらずである。

先進国として重要な科学技術の強化が軽視されているのが現状で、エネルギー、宇宙、環境、安全保障、その他の大きい予算を削減して、ちょっと見に先端的と思えるような研究分野に金をバラまいている感がある。多くの場合、内容が詰まっていない点もあり流行に浮かされているようにも見える。

重要研究課題の立案と推進にはビジョンと使命感をもった適切なリーダーが必要である。この際、産学官の連携の大切なことはいうまでもないがそれぞれ固有の役割があり、産の側はすでに見通しのある研究開発は自らの意志で行うべきであり、学はなお困難を伴う未踏のテーマに対処することが期待され、官は国自身がやるべき分野を的確に推進する覚悟が望まれるのである。法と金と会議でことが済むとは思われない。

【(財)レーザー技術総合研究所 研究所長】

日米で競い合う成果、 Fokker-Planckコードの開発

理論・シミュレーションチーム副主任研究員 砂原 淳

■重要な電子熱輸送の過程

レーザープラズマ中で電子熱輸送といえば、臨界密度で吸収されたレーザーエネルギーを高密度領域まで運ぶ重要なエネルギー輸送過程です。しかし今までに経験的に決められた自由ファクター(flux-limiter)なしでは実験を再現するような正確な計算が難しい状況です。これは電子の平均自由行程がプラズマの勾配長に近くなると電子の速度分布関数がMaxwell分布から離れ、熱流が非局所的になるためです。この場合、Maxwell分布という仮定は使えず、電子の速度分布関数そのものをFokker-Planck方程式に基づいて解く必要が出てきます。

■ロチェスター大で非局所モデルを構築中

そこで1980年代から各国のグループがFokker-Planckコードを開発してきたのですが、なかなか思うようなコードが出来ませんでした。密度・温度が激しく変化するような爆縮の条件では数値的な振動が抑えられなかったり、計算が破綻したり、対象が完全電離プラズマだけだったりするのです。また、数値シミュレーションに頼らない非局所熱輸送モデルを考えようという動きもあり、論文も多数でていますが、これといった成功モデルはありませんでした。その状況がここに来て変わりつつあります。私は研究職について以来Fokker-Planckコードの開発を行ってきたのですが、数値計算上の不安定の嵐をなんとかパスし、やっと爆縮条件でもそれなりに計算ができるようになってきました。一方、阪大と競争関係にある米国ロチェスター大では非局所電子輸送モデルを構築中です。

■日米が協力して1ヵ月の研究

ロチェスター大では阪大同様にクライオ爆縮実験を開始しており、重水素から徐々にDT燃料へとより現実に近い条件に移行しようとしています。クライオ爆縮では電子による先行加熱が問題になるため、先行加熱の正確なモデリングが必要です。そのような背景の中、

日米協力事業のもとで1ヵ月、米国ロチェスター大レーザーエネルギー学研究所を訪問し、Fokker-Planck解法と、非局所熱輸送について研究、議論する機会を得ました。ロチェスター大の理論グループは総勢10名ほど、それに加え、新たにFusion Science Centerという独立組織の理論センターをRicardo Betti教授が立ち上げ、今まで以上に勢いに乗っています。そのようなパワーあふれる相手に対しては一点突破的な対抗しかできませんが、Fokker-Planck計算なら負けないつもりで頑張ってきました。計算比較等は現在も進行中ですが、1ヵ月の間、議論を通して様々なことを考え、計算を試し、有益な結果を得ることができました。そしていまだ実際の爆縮条件での計算には持ち込んでいませんが、今まで以上に数値的に安定で正確に計算できる数値計算スキームにたどり着くことが出来ました。

■はたして層の厚い米国に勝てるか

ロチェスター大側もDr. V. Goncharovを中心に先行加熱物理グループをつくって、調整パラメーターなしに実験を再現するモデルを構築しています。同じ計算ができるのであれば、時間のかかるFokker-Planckシミュレーションよりもモデルを導入した方が有益に決まっていますが、2次元化や他の物理過程の導入などの拡張性の観点ではFokker-Planckシミュレーションの方にまだ利がありそうです。この勝負、これからも続くことになりそうですが、結果はいかに。層の厚い米国に勝つのは容易ではなく、一度2番手、3番手になると相手にされなくなる非情な世界。理論だけでなく、2007年度中には完成すると思われるOmega-EPと阪大レーザー研の進めるFIREX計画との対決も同様ですが負けられません。私個人としてはFokker-Planckもそうですが、現在のメインの仕事であるEUVのシミュレーションでも米国に負けたくありません。わが阪神の金本選手のように？ 誠心誠意頑張ろうと思います。