

2010, Oct.

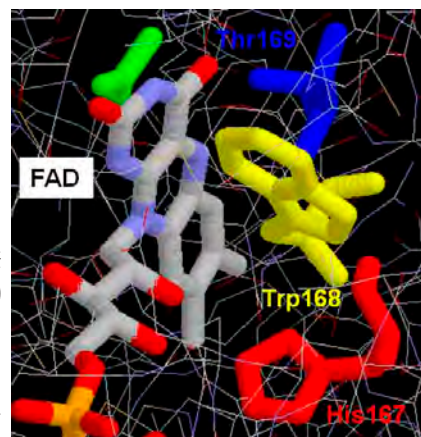
No. 271

レーザー・クロス CROSS

CONTENTS

■ピラノース酸化酵素の光励起ダイナミクス：
ミューテーションの効果
■レーザーによる希土類イオンの価数変化
■【光と蔭】レーザー発明50周年記念祭に
■第9回レーザーおよび非接触法による
振動計測国際会議に参加
■主な学会等報告予定

【表紙図】ピラノース酸化酵素
(Pyranose-2-oxidase)のFAD
近傍の結晶構造
黄：トリプトファン(Trp168),
赤：ヒスチジン(His167),
青：スレオニン(Thr169)を示す



ピラノース酸化酵素の光励起ダイナミクス： ミューテーションの効果

レーザーバイオ科学研究チーム コスロービアンハイク、谷口誠治

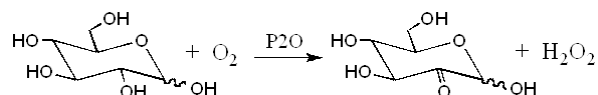
■はじめに

本研究チームでは、高効率の光機能性分子や材料の開発に向け、光に顕著な応答を示す種々の蛋白質や光反応性分子群の光初期反応についてレーザー分光計測による検討を行ってきた。これに関連して我々は最近、5つの炭素と1つの酸素により構成される6員環を基本的な構造とする糖類(ピラノース)を分解する反応(図1)を示すことから有用な物質合成への応用が期待されているピラノース酸化酵素(Pyranose 2-oxidase, P2O)の光励起過程について研究を行っている(Laser Cross No.263を参照)。本稿では、P2Oを構成するアミノ酸の一部を改変(ミューテーション)した変異体(ミュータント)の光過程の観測と、野生種との比較について報告する。

■P2Oミュータントのフェムト秒蛍光ダイナミクス

実験には、H167A、T169Aと呼ばれる2種のミュータントを用いた。H167Aは、発色団の近傍に存在し、共有結合によりFADを蛋白質内に固定する役割を果たすアミノ酸(ヒスチジン、His167)を、FAD(フラビンアデニンジヌクレオチド)と共有結合をしないアラニン(A)に置き換えたものである。また、T169Aは水素結合によりFAD配置の安定性を高める役割を果たすと考えられるスレオニン(Thr169)を、水素結合のないアラニンに置き換えたものである(図2)。これらの操作により、FADは蛋白質内での配置がより不安定なものとなると共に、改変したアミノ酸の大きさが異なるため発色団周囲の蛋白質構造に変化が生じることが予測さ

れる。P2Oミュータントの光過程の観測には、フェムト秒パルスレーザーを用いた蛍光アップコンバージョン法を用い(時間分解能~170fs)、それぞれのミュータント試料のフェムト秒蛍光ダイナミクスを観測した。観測波長530nm(FADの蛍光スペクトルのピーク波長)での測定結果を図3に示す。比較のため、野生種での観測結果も合わせて示す。H167Aでは野生種の結果と同様、電子移動反応によるものと考えられる超高速蛍光減衰と、長寿命の蛍光減衰が共に観測されるが、野生種のそれ(寿命約110fsと300psの2成分指数関数)と比べ超高速減衰成分の成分比がより大きくなる。また蛍光寿命解析の結果から、超高速減衰成分の寿命は長くなり(~240fs)、長寿命減衰成分の寿命は逆により短くなる(~120ps)ことが分かった。T169Aの観測においてもH167Aと同様の傾向が見られるが、長寿命減衰成分の寿命は更に短くなる(~15ps)ことが分かった。この結果は、超高速減衰だけでなく、長寿命減衰もまた光反応に由来するものであることを示している。野生種と比較してミュータント試料が超高速減衰の寿命が長くなる、つまり(電子移動)反応速度が低下するという結果については、我々が以前行った、PYP(Photoactive Yellow Protein)の光初期異性化反応の研究において、



【図1】P2Oによるピラノース分解反応

次ページへつづく▶

同様の結果が得られている。PYPでは、発色団近傍のアミノ酸の改変により蛋白構造が不安定となり、反応に有利な構造が崩れるために異性化反応速度は減少する^[1-3]。このことから、P2Oミュータントについても同様に蛋白構造の不安定化が起こり、その結果FADとTrp168間の分子間距離および配向が変化し、電子移動速度の低下を引き起こすと考えることが可能である。H167AとT169Aを比較しても、FADに対してより直接的に相互作用するThr169を改変した方がより長い寿命となる結果が得られており、このような考察を可能としている。しかし一方で、長寿命蛍光減衰の寿命はミュータントの方が逆に短くなっている。この減衰成分が電子移動反応に由来するものとする、この減衰成分の寿命もミュータントの方が長くなると考えられ、実験結果と矛盾する。このことから、P2Oの蛍光ダイナミクスが多成分減衰を示す要因として、P2Oが一つの蛋白構造を持ち、光励起状態においてISO周囲の環境場が変化するという過程が起こるとは考え難く、P2Oが水溶液中において複数の構造を形成していると考えべきである。この場合、P2Oは熱的に安定な2種の構造を持ち、一方の構造はFADとTrp168の分子間距離が近接(～0.55nm)しており超高速の電子移動(100fs)を示すが、もう一方の構造は分子間距離がより大きく、電子移動速度は遅くなる(～360ps)。またミュータントが野生種に比べて長寿命減衰成分の寿命が短くなる(電子移動速度の増加)現象については、アミノ酸の改

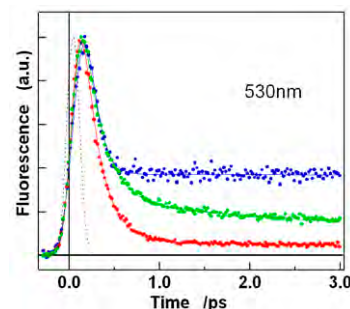
変効果により、ミュータントでのFAD-Trp168間の距離が野生種に比べて近くなっていると考えることにより説明が可能である。

■まとめ

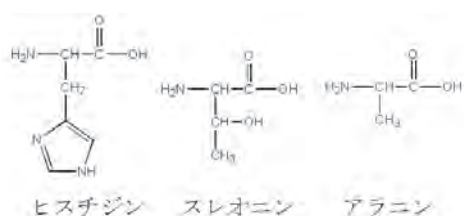
ピラノース酸化酵素(P2O)ミュータントのフェムト秒蛍光ダイナミクスを観測した。その結果、P2Oが溶液中で2種の安定な構造を有しており、その一方が近傍のアミノ酸(Trp138)との間で寿命約100fsの超高速電子移動を示す可能性が高いことが分かった。一方で、これらの結果はフェムト秒蛍光観測により導かれたものであり、より定量的な議論を行うためには、溶液中でのP2Oの構造と熱的な平衡状態についての情報を得る必要がある。今後ミュータントの結晶の構造解析や、NMR測定による溶液中でのFAD近傍のアミノ酸配置、分子動力学(MD)による熱的な構造変化の計算等の研究を予定している。本稿における研究は、Chaiyen Pimchai教授、Jeerus Sucharitakul教授、田中文夫客員教授(Mahidol大)らの研究グループから試料の提供を受け行われているものである。御協力に感謝します。

参考文献

- [1] Mataga, N.; Chosrowjan, H.; Shibata, Y.; Imamoto, Y.; Kataoka, M.; Tokunaga, F. *Chem. Phys. Lett.* 2002, 352, 220.
- [2] Mataga, N.; Chosrowjan, H.; Taniguchi, S.; Hamada, N.; Tokunaga, F.; Imamoto, Y.; Kataoka, M. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2003, 5, 2454-2460.
- [3] Chosrowjan, H.; Taniguchi, S.; Mataga, N.; Unno, M.; Yamauchi, S.; Hamada, N.; Kumauchi, M.; Tokunaga, F. *J. Phys. Chem. B*, 2004, 108, 2686-2698



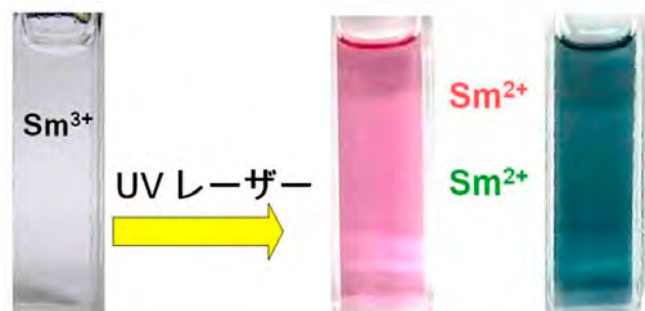
【図3】P2Oミュータント(H167A(赤),T169A(緑))および野生種(青)のフェムト秒蛍光(観測波長530nm)



【図2】ミュートーションに関わるアミノ酸の分子図

レーザーによる希土類イオンの価数変化

(財)レーザー技術総合研究所 特別研究員 中島 信昭
(財)豊田理化学研究所 フェロー



【図】無色のSm³⁺の溶液にUVレーザー(248 nm)を照射すると有色のSm²⁺を生じる

希土類イオンの内、Eu³⁺、Sm³⁺などはレーザー照射によりそれぞれ3価から2価のイオンEu²⁺、Sm²⁺に価数を変化できる。価数を変えることができればそのイオンを分離できる。原子力発電所の高レベル放射性廃棄物、この低減技術へのレーザー利用に展開できる。この方向は1980年代初頭から指摘があったが、一時熱が冷め、最近再び注目されつつある。(関連解説記事、化学と工業、62-3、205(2009))。化学薬品の代わりにレーザーを使えば、遠隔操作が可能であり安全の確保が容易になる、廃棄物の更なる増大を抑えられる、などが期待できる。筆者らは可視に近い光(396nm)で

$\text{Eu}^{3+} \rightarrow \text{Eu}^{2+}$ の多光子反応を見出し、短パルス励起では比較的高い効率でこの反応が進行することを示した(1999年)。最近では同様の反応を $\text{Sm}^{3+} \rightarrow \text{Sm}^{2+}$ に展開した。(J. Phys. Chem. A, 2010, 114, 5648-5654.)

Eu^{3+} 、 Sm^{3+} の系(Ln^{3+}) では次の三つの方法で価数を変え、 Ln^{2+} を生成できる。

- (1) UV レーザー励起(電荷移動吸収帯の励起)
- (2) 可視部多光子励起($4f \rightarrow 4f$ 遷移を経て電荷移動吸収帯へ励起)
- (3) フェムト秒レーザーにより溶媒をイオン化、その電子で3価を2価にする。

方法(1)では電荷移動吸収帯をUVレーザー、1光子で励起する。 Sm^{3+} を Sm^{2+} にした場合を図に示した。248 nmエキシマーレーザー(100 mJ / パルス)を2000ショット照射している。無色の3価イオンがピンク、あるいは、緑の2価イオンに変化する。方法(2)における $4f-4f$ 遷移は主として可視部にあり、1光子励起では価数は変化しないが、2または3光子励起で電荷移動吸収帯まで励起し、価数を変化さ

せる。なお、 $4f-4f$ 発光はレーザー発振に利用されている。方法(3)ではその系で最も還元されやすい化学種の価数に変化する。三つの方法の内、(2) $4f-4f$ 遷移の多光子励起が最も将来性がある。金属イオンをレーザーで選択して励起でき、可視部、またはそれに近い紫外、赤外光のレーザーを利用できるからである。

このような光反応の研究は今後次のような展開が考えられる。希土類イオンは14種類あるが、 Eu^{3+} 、 Sm^{3+} 以外の他のイオンはレーザーにより価数変化するのであろうか。また、溶媒、濃度、照射レーザーなど多くの実験パラメーターがあるが、価数変化の最適の条件は何か、すなわち、高い反応効率の条件を探る必要がある。実際の応用は超ウラン元素、特にNpへの応用が鍵とされている。すでに反応の試みは始まっていると聞いている。Npは放射性元素のため特別の研究所で扱うことができる。この展開をサポートする意味で、上述の希土類イオンの価数変化の実験、最適実験パラメーターを調べることは重要である。

山中千代衛



レーザー発明50周年記念祭に

The Laser FestとかThe Laser 50と題して世界中でレーザー発明50周年記念のお祭が開催されている。レーザー科学技術が原動力となりこの50年

間にすばらしい産業発展が進行したのは周知の通りである。

19世紀は蒸気機関の時代であり、20世紀は電子の時代と呼ばれている。20世紀最後にして最大の発明と称えられたレーザーも当初は科学者の玩具と揶揄されたが、発明50年を経て光の有する優れた特長が如実に効用を発揮し、今や21世紀は光の時代と言われるようになってきた。超高速、高精度、非接触、超高エネルギー集中など革新的レーザーの特性は現代社会で不可欠な存在となっている。

筆者はいみじくも1970年京都で開催された第6回IQEC(International Quantum Electronics Conference)を契機としてレーザー工学の大切さを痛感し、それに向けて着実に研究を組織してきた。手はじめが大阪大学工学部附属レーザー工学研究施設で1972年に開設された。

ついでその翌年レーザー懇談会が発足し、これは後年1977年(社)レーザー学会に成長した。また1976年に研究施設は改組拡充され大阪大学附置レーザー核融合研究センターに発展し、世界的に有名な成果を生んだガラスレーザー激光XII号が建設された。またレーザー研究人口養成のため大阪大学大学院電磁エネルギー工学専攻を1979年に開設し、研究者の確保につとめることとした。

1981年にはレーザー研究補佐員拡充のための組織レーザー技術振興センターが設置され、多数の研究スタッフが導入された。このようにして関係者の一致した努力の下、レーザー核融合研究におけるわが国の拠点は確立し、世界に向けて研究実績の大きな飛躍が実現し、今日に至る堅固としたレーザー核融合研究の国際的地位が築かれることとなった。

1987年には(財)レーザー技術総合研究所が産学官の協力により設立され、ここに産学連携の拠点が機能するようになり、長年の希望であった大学で研究開発された知材を産業界に移転する媒体が出来上がった。この40年余にわたる研究開発努力の結実が示すものは構成メンバーの高いインセンティブと強い団結力の重要性である。

レーザー発明50周年記念祭にあたり関係者は須く初心に立返り連携を再構築することが重要だと思われる。少なくとも大阪大学レーザーエネルギー学研究センターと大阪大学工学部光科学センターならびに工学部電気電子情報工学専攻は互いに連携を密にし、レーザー技術総合研究所とも交流を図り、整合性のある意図をもって研究に従事することが望まれる。

今日の競争の激しい時代を生き抜くためには心を合わせ有機的運営を計らねば、それぞれが各個撃破の憂き目に遭うことを肝に銘じなければならない。

「世の憂き目見えぬ山路へ入らむには 妬む人こそほだしなりけれ」

【研究名誉所長】

第9回レーザーおよび非接触法による振動計測国際会議に参加

レーザー加工計測研究チーム オレグ コチャエフ

■25カ国から非接触振動計測の専門家が参加

本会議はイタリア・レーザー速度計測・非破壊検査協会とイタリア・Marches理工大学機械学部との共催でイタリア・Ancona(イタリア東部・アドリア海に面した人口10万人の港湾都市)で6月22～25日に開催され、25カ国からレーザーなど非接触振動計測分野の専門家が参加した。この会議は非接触振動計測と土木工学分野などの非破壊検査に関する最新の情報交換と今後の研究促進を目的とし、プログラムは招待講演、技術講演、展示会と多岐に亘った。講演は、①非破壊検査と物質特定、②レーザードップラー振動計測、③超音波計測、④レーザーによる振動計測、⑤生物医学への応用、⑥デジタルイメージ相関法と欠陥探査、⑦ファイバー光学系、⑧振動モード解析と振動検査、⑨測定と校正の各分野に亘った。

■我々の研究に興味津々の科学者たち

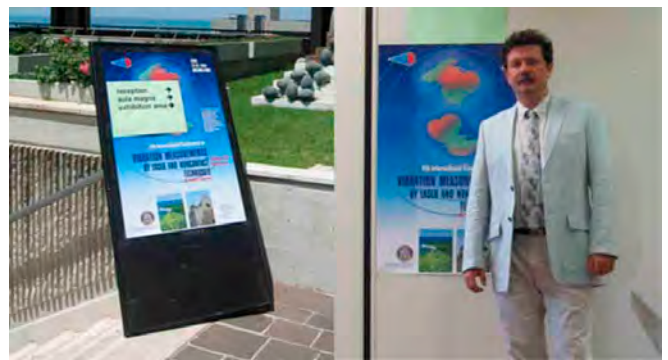
レーザーによる振動計測講演者は、市販のヘテロダインレーザードップラー振動計を使用しており、筆者以外でフォトリアクティブホモダイン干渉計を使っている者はいなかった。ホモダイン干渉計については、ドイツ連邦物理工学研究所のHans-Jürgen von Martens博士が「レーザーによる振動計測と校正の標準化」招待講演の中で触れていた以外は発表はなかった。楽観的な見方をすれば、フォトリアクティブホモダイン干渉計の分野で我々と競合する者はいないといえるかもしれないし、悲観的な見方をすれば、計測の安定化には熟練が必要であるため他の研究者は研究していないという解釈もできる。

しかしながら、筆者は6月24日に非破壊検査・物質

特定のセッションで「レーザー非破壊検査システムによるコンクリート構造物の実験室およびオンサイトでの実験」という講演を行った。実際の新幹線トンネルでの実験を行ったことで聴衆は興味を持ったようで、いつものように非常に多くの注目を浴び、講演後は長時間に亘ってこと細かな質疑応答があった。特にドイツ、スペイン、チェコ、インド、台湾の技術者・科学者が興味津々で、やはり我々の研究は他に類のないものと再認識した。

■興味ある研究発表

ドイツのPolytec社のElmar Uhlig博士の雑音フリーと考えられる「ヘテロダイン検出の使用」とチェコのプラズマ物理研究所のVit Ledl博士のナノメートル以下の二次元振動検出を行う「周波数遷移デジタルホログラフィの研究」が我々の研究にとって参考になると思った。



【写真】会場案内板(左)と筆者(右)

主な学会等報告予定

- 10月17日(日)～20日(水) 2010 International Symposium on Extreme Ultraviolet Lithography(神戸国際会議場)
砂原 淳 「Radiation Hydrodynamic Simulation of Laser-produced Tin Plasmas」
- 10月29日(金) 日本テクノセンターセミナー(東京都新宿・日本テクノセンター)
藤田 雅之「レーザ加工の基礎と応用」
- 10月29日(金) 材料学会・第10回コンクリート構造物の補修、補強、アップグレードシンポジウム(京都教育文化センター)
島田 義則「レーザー超音波を用いたクラック深さ計測実験」
- 11月7日(日)～11日(木) 19th Topical Meeting on the Technology of Fusion(Las Vegas, USA)
砂原 淳 「Multidimensional Radiation Hydrodynamics Simulation on Laser Ablated Plume」
- 11月8日(月)～10日(水) 第19回日本光学会年次学術講演会「Optics and Photonics Japan 2010(OPJ2010)」(中央大学駿河台記念館)
柴川 智弘「白色光偏光ライダーの開発」
- 11月15日(月)～17日(水) JIFT US-Japan Fast-ignition workshop(Livermore, USA)
砂原 淳 「preplasma formation」