

「新機能創成に向けた光・光量子科学技術」
平成17 年度採択研究代表者

山下 幹雄

北海道大学大学院工学研究科 特任教授

極限光電場波形制御による新光量子技術の創出

§ 1. 研究実施の概要

本研究のねらいは以下の通りである。①近赤外・可視域から紫外域に渡る極短光パルスの電場波形制御技術と②モノサイクル域光の高出力化・短パルス化・短波長化技術を開発すること。加えてそれらの、③XUV 域のアト秒パルス技術への応用および④超高速光異性化反応を利用した量子制御による遺伝子発現レーザー制御の手法への応用を開拓することである。

21 年度は、①については、前年度の試作 1 ピクセル・空間光振幅変調器の結果を基にして、300～1600 nm 透明新液晶¹⁾の 648 ピクセル・空間光振幅変調器(648・UV～NIR・ $A(\omega)$ ・SLM)を試作し、全波長域の光電場振幅透過率の印可電圧パルス幅特性などを明らかにした。ついでこれをプログラム制御し、380～420 nm 紫外フェムト秒パルス光と 500～900 nm 可視・近赤外フェムト秒パルス光とに対して周波数シフト・相似スペクトルペア光発生の実験を行い、超広帯域光の任意振幅変調が可能であることを確認した。これは、これまでで報告されてきたなかで最も広帯域な光波の振幅変調結果である²⁾。

②については、主に以下の三つの実験を進めた。第一に角度分散・非同軸光パラメトリック増幅(A-NOPA)によるオクターブ光チャープパルス増幅の実験において、高出力化に加えてチャープフリーパルス化をはかるために、高出力チャープ補償系の高精度化などの改良を行った。第二に高次・コヒーレント・アンチストークスラマン散乱(M-CARS)による高効率極短パルス光発生においては³⁾、紫外域まで透明なダイヤモンドに着目し、330～730 nm までの超広帯域 M-CARS 信号を発生させた後、試作したプリズム型角度分散補償装置により角度分散補償を行い、1 ビーム白色光波合成を実現させた。第三に、紫外広帯域パルス光の高出力化のために、260 nm フェムト秒チャープパルス光励起による非同軸光パラメトリック増幅(NOPA)実験(370-470 nm 光(5.8 fs フーリエ変換限界(TL)パルス)を 2.4 μJ に増幅:これはこの波長域では最高エネルギー・最広帯域増幅)を行うと共に、この結果を踏まえた 2 光子吸収を考慮した初の時空間発展 NOPA 伝播方程

式の詳細な数値解析を行った。その結果、この波長帯域では実現していない、数サイクルで高出力(〜100 μ J、1kHz 繰り返し)な極短パルス光源用広帯域増幅器の定量的な設計指針を得た。

③については、モノサイクル光の応用として、本質的に半サイクル現象である高次高調波⁴⁾によるモノサイクル光励起アト秒パルス発生の詳細な理論解析を行い、2 サイクル励起では 140 アト秒台までであるのに対して、モノサイクル光励起では 60 アト秒台(チャープ補償不必要)および 30 アト秒台(チャープ補償後)でかつ高効率なパルス発生が可能であることを定量的に初めて明らかにした。

④については、極限光技術からのアプローチ⁵⁾と生物化学的手法からのアプローチ⁶⁻¹⁴⁾(名古屋大チーム)と 2 つの視点から研究を行った。前者では、名大グループが合成に成功した、長波長用光応答性 DNA に用いられる、4' methyl thio azobenzene carboxylic acid (AzD2) のフェムト秒・紫外過渡吸収分光測定を行った結果、プローブ波長のわずかな違いで、そのフェムト秒減衰波形が正と負に大きく異なることが観測された。これは前年度開発されたレート方程式解析を応用することにより、吸収断面積差によることが明らかとなった⁵⁾。さらに、フェムト秒励起光パルス(60 fs、408 nm)当たりのトランスからシスへの光異性化率が 2.6 %と比較的大きな値であることがわかった。次いで、AzD2-DNA(1 重鎖と 2 重鎖)に対して同様な測定を行い、S2 励起状態と中間状態の 2 つのエネルギー状態の寿命 τ_1 、 τ_2 (τ_2 はシス異性体誕生時間に相当: 1 重鎖では 7.4 ps、2 重鎖では 8.0 ps であった)が共により長いこと、励起光パルス当たりの光異性化率が 2 重鎖の場合約 1/6 小さいことが明らかとなった。また試作 UV〜NIR・位相変調□・SLM を用いて量子制御に必要な 400 nm 波長域でフェムト秒光パルス列発生の波形整形が可能であることを実験的に確認した。これは液晶 SLM で成功した 400 nm 域での最初の実験である。

後者では、生体に対する損傷の小さい可視光領域($\lambda \geq 400$ nm)での光スイッチングを目指し、新たなアゾベンゼン: 4'-methylthioazobenzene-4-carboxylic acid(MeS アゾベンゼン)を設計・開発した。この新規アゾベンゼンは、DNA に導入した状態では設計通り *trans*-体で約 400 nm (398nm)に極大吸収を持つことが分かり、400 nm 光照射で *cis*-体に異性化した。一方 *cis*-体から *trans*-体への光異性化には 500 nm 以上の可視光照射で可能なことも明らかにし、*trans*→*cis*、*cis*→*trans* 双方向の光異性化を全て可視光照射のみで実現した。次に新規 MeS アゾベンゼンを T7 プロモーターに組み込んだ光応答性プロモーターと GFP タンパクをコードしている DNA を連結した長鎖キメラDNAを調製し、PURE SYSTEM を使用して *in vitro*での GFP タンパク質発現の光制御をおこなったところ、PURE SYSTEM を全く損傷することなく、可視光照射のみで GFP 発現の可逆的な光スイッチングを実現した。

§ 2. 研究実施体制

(1)「北海道大学」グループ

① 研究分担グループ長: 山下 幹雄(北海道大学大学院、特任教授)

② 研究項目

極限光電場波形の制御と、それを活かした高出力モノサイクル域光(近赤外・可視・紫外域)およびアト秒パルス(XUV・X線域)発生さらには遺伝子発現コヒーレント量子制御の研究

(2)「名古屋大学」グループ

① 研究分担グループ長:浅沼 浩之 (名古屋大学大学院、教授)

② 研究項目

DNA ハイブリダイゼーションの高効率光スイッチング技術とその応用

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

上記のねらいを実現するために、北海道大学チームと名古屋大学チームとが分担しあって 21 年度は以下の四つの研究を進めた。

1. 極限光電場波形制御技術の研究(北海道大学チーム)

① 下記 2 の紫外域までのびた超広帯域コヒーレント光波のチャープ補償のために、② 下記 3 のアト秒パルス計測に必要な相似スペクトルペア発生のために、③ 下記 4 の紫外から可視域に吸収を有するアゾベンゼン誘導体の光異性化のコヒーレント制御に必要な波形整形のために、近赤外から紫外まで透明な新しい液晶(LC)を用いて空間光変調器(SLM)を開発している。今年度は、前年度明らかにした 1 ピクセル SLM による基礎振幅変調特性を基にして、300 から 1600 nm で透明なこの LC を用いて 648 ピクセル・2 チャンネル・空間光振幅変調器(648・A(ω)・UV~NIR・SLM)を試作した(20 μ m 液晶厚、98 μ m ピクセル幅、9.9 mm1 チャンネル高さ)。次に、光電場振幅透過率の紫外から近赤外域までの波長依存印可電圧特性、印可電圧パルス幅特性を測定し(その特性は理論計算結果とも一致することを確認)、この SLM のコンピュータ制御のためのプログラムを作製した(256 階調、300~1100 nm 帯域)。さらにこれを用いて、超広帯域自己位相変調光(VIS~NIR:500-900 nm)および近赤外の第 2 高調波紫外光(UV;380-420 nm)の任意振幅変調がプログラム制御可能であることを実証した。これは、1 台の変調器でこれまでで最も広帯域な振幅変調結果である。また上記②への応用を念頭におき、前者の VIS~NIR 光に対しては 3.18 THz 周波数シフトした相似スペクトルペア光の発生(4.8 fs フーリエ変換限界(TL)パルスに対応)が、後者の UV 光に対しては 1.59 THz 周波数シフトした相似スペクトルペア発生(20.0 fs TL パルスに対応)が可能であることを実験的に確認した。

2. モノサイクル域光の高出力化・短パルス化・短波長化技術の研究(北海道大学チーム)

前年度に引き続き、大別して三つの新しい手法の研究を行った。第一のオクターブ光の角度分散・非同軸光パラメトリック増幅(A-NOPA)実験においては、高出力化を目指して、これまでの問題点を以下のように整理し、数々の装置改良を行った。1).増幅後のスペクトルに現れる微細構造のためスペクトル位相の再生が困難になり、チャープ補償が非常に困難になる。2).チャープパルス増幅を行う際、励起光のパルス幅を数百 fs から 1 ps 程度にまで伸長する必要があるが、別途

分散素子を挿入するとスルーポットの著しい低下や素子へのダメージを招いてしまう。3). 励起光のビーム品質が悪く、ビーム断面の非常に狭い領域に極端に強度の強い箇所が現れ増幅媒質の破壊などの問題が発生する。1) については、主として SLM による位相変調に起因とする強度変調が問題であると考え、SLM に与える位相変調負荷を最小化すべく、4-f 系自体に静的なチャープ補償機能を与えることのできる新しい配置を考案、導入した。加えて、昨年度開発した、スペクトルの強度変調に鈍感な計測法である Two Dimensional Spectral Shearing Interferometry (2DSI) をこの系に一体化し、チャープ補償のフィードバック制御可能化をはかった。2) については Ti:sapphire レーザー増幅器のパルス圧縮器の手前でビームを分割しかつ分岐先に新たにパルス圧縮器を挿入し、一方を励起光用のビーム、もう一方を光パラメトリック増幅(OPA)の種光用とした。これにより両者に著しく異なるチャープを全く独立に安全にかつ高スルーポットで与えることができるようになった。3) については真空空間フィルターを試作導入することでビーム断面内における強度の著しい局在を取り除くことができた。以上の改良を現在ほぼ終了し、系の最大エネルギー増幅化に取り組んでいる。現在のところ 500 ~1000 nm の増幅帯域で 400 nm 励起光 700 μJ の入射に対して 60 μJ の出力を得ており、出力パルスエネルギーの高出力化及びチャープ補償の最適化を進めている。

第二の原理的に全く新しい極短光パルス高効率発生を特徴とする多段コヒーレント・アンチストークスラマン散乱(M-CARS)法については、紫外域での透明なダイヤモンドに着目し、764 nm 光 (3.5 μJ , 100 fs)と 853 nm 光(1.6 μJ , 100 fs)の 2 波長・非同軸励起(5.8°)により、選択的にフォノン励起した結果、330-730 nm の紫外まで伸びる M-CARS 信号スペクトルが発生できた。この TL パルスは 1.8 fs(1.2 サイクルに対応する)である。ついで極短パルス化を可能にする光波合成を行うため、この信号光の角度分散特性を測定した結果、信号光の周波数と分散角度が線形である、Raman-Nath 的な過程で M-CARS 光が発生されていることがわかった。この結果をふまえて、石英プリズムを分散素子とする角度分散補償装置を試作し、これを用いて、一つの光ビームとしての白色光波合成が実現できた。

第三に紫外広帯域パルス光の高出力化のために、チタンサファイアレーザー増幅器の第 3 高調波(3 ω 光)励起による非同軸軸光パラメトリック増幅(NOPA)実験を行い、紫外域でこれまで報告されている増幅結果に比べて、最も広帯域(370-470 nm(5.8 fs TL パルスに対応)で最大の 2.4 μJ の高出力増幅を得ている。さらなる高出力化には、3 ω 励起光の増幅媒質による 2 光子吸収によるロスの実効的な効果を最小化する必要がある。このために、2 光子吸収の存在下での NOPA 過程を数値シミュレーションにより正確に解析し、その結果を増幅器の設計に利用するための指針を導出した。まず、シード、ポンプ、アイトラーパルスの連立伝搬方程式に 2 光子吸収項を付加したものをスプリット・ステップ・フーリエ法で解いた。これは増幅媒質の 2 光子吸収を考慮した NOPA 光パルス電場の時空間発展を直接導いた初めての解析結果である。初期条件として実験と同じものを仮定した場合には、実験により得られたスペクトル帯域および増幅率を再現することに成功し、シミュレーションの正しさが確認できた。また、ポンプの帯域幅が増幅率および増幅帯域幅に大きく影響することが確認できた。次に、初期条件であるのポンプ光強度、シード光強度、

両者の相対遅延時間、それらのビーム径、結晶厚等を変えた場合の増幅エネルギーを求め、それを図示したものをを用いて、与えられたポンプ光強度およびシード光強度の入力値に対して増幅エネルギーを最大化するための最適な励起光帯域幅・遅延時間・ビーム径等の定量的な設計値を得ることができた。結果として我々の励起光源を用いて、最大、 $\sim 100 \mu\text{J}$ 、7 fs、1 kHz 繰り返しの増幅出力がこの波長帯域で 3 mm 長 BBO・NOPA 結晶から実現可能であることがわかった。

3. モノサイクル光がいきるアト秒 XUV 分野の先導研究(北海道大学チーム)

モノサイクル光の応用として、本質的に半サイクル現象である高次高調波法によるモノサイクル光励起アト秒パルス発生の詳細な理論解析を行い、2 サイクル光励起では 100 アト秒台まで、モノサイクル光励起では 60 アト秒台(チャープ補償不要)および 30 アト秒台(チャープ補償後)で高効率な発生が可能であることを定量的に初めて明らかにした。

すなわち、単一原子近似をもとにした Lewenstein の量子力学的理論を用いて、モノサイクル光(MC:1.93 fs)励起高次高調波発生と、2 サイクル光(TC: 3.87 fs)励起高次高調波発生とに対して、XUV パルス波形への搬送波一包絡波位相(CEP)効果、発生 XUV スペクトルバンド幅依存性、スペクトル位相分散効果について詳細な数値シミュレーション計算(非線形媒質 He に対して、中心波長 580 nm、 $1.7\sim 2.0\times 10^{15} \text{ W/cm}^2$ ガウス型励起光パルス)を行った。その結果、単一の短電子軌道を選択的に利用することによって、サブパルス構造のない単一アト秒パルスが広範囲な CEP で得られ、XUV 域で同調可能なサブ 70 アト秒光源が実現できることがわかった。さらに、最短アト秒パルス発生にとって重要なことは、従来の一様な強度をもった広帯域なスペクトル領域や、高いカットオフ周波数領域を見いだす視点ではなく、群遅延分散や高次分散が小さいプラトー領域のスペクトル領域を見いだすことであることがわかった。MC 励起でチャープ補償なく発生できる最短パルス幅は 60 アト秒台 (CEP= -0.24π 、バンド幅 40 から 70 の高調波次数の帯域)、TC 励起で発生されるパルス幅 140 アト秒台 (CEP= -0.20π 、バンド幅 85 から 110 の高調波次数の帯域)である(この後者の結果は、最近の実験結果を説明する)。前者では、さらにチャープ補償を行うことによって 30 アト秒台まで(CEP= -0.5π の sin 波 MC 励起、バンド幅 32 から 88 の高調波次数の帯域)発生できる。

4. 遺伝子発現の超短パルスレーザー量子制御法の開拓研究

①極限光技術からのアプローチ(北海道大学チーム)

光応答性 DNA に用いられ長波長に吸収を持つトランス・アゾベンゼン誘導体 AzD2(図1参照)の紫外フェムト秒過渡吸収分光測定を行った。得られたフェムト秒過渡吸収信号について 3 成分(A1、A2、A3(定常項))でフィッティングを行い、励起状態の寿命 $\tau_1=210 \text{ fs}$ 、中間状態の寿命 $\tau_2=6.4 \text{ ps}$ (シス異性体誕生時間に相当)であることを明らかにした。また、プローブ波長 400 nm のとき、A1、A2、A3 項はすべて負であるのに対し、プローブ波長 420 nm のときは A1 が負、A2 が正、A3 が負であることを確認した。これらの結果は、我々が提案しているレート方程式解析により説明できることを確認した。つまり、プローブ波長に依存して吸収断面積差が大きく異なることによるものであることが示された。また、A3 項を利用してフェムト秒励起光パルス(60 fs、408 nm)当たりのトランスからシスへの異性化率が 2.6%であると初めて求めることができた。

次いで、AzD2-(s)DNA(1重鎖:8 mer)、AzD2-(d)DNA(2重鎖:8 mer)の紫外フェムト秒過渡吸収分光測定を行った。AzD2の時と同様、得られた過渡吸収信号について3成分でフィッティングを行い、AzD2-(s)DNAの励起状態の寿命 $\tau_1=660$ fs, 中間状態の寿命 $\tau_2=7.4$ ps(シス異性体誕生時間に相当)であることを明らかにした。一方、AzD2-(d)DNAの励起状態の寿命 $\tau_1=1.6$ ps, 中間状態の寿命 $\tau_2=8.0$ ps(シス異性体誕生時間に相当)であることを明らかにした。またA1、A2、A3項はすべて負であることを確認した。これらの結果についても、我々が提案しているレート方程式解析により説明できることを確認した。また、A3項よりフェムト秒励起光パルス当たりのトランスからシスへの異性化率をAzD2-(s)DNAの場合1.2%、AzD2-(d)DNAの場合0.4%であると初めて求めることができた。すなわちAzD2単体溶液に比べ約1/6小さいことがわかった。

さらに、開発した位相変調・UV~NIR・SLMを用いて紫外フェムト秒パルス列発生の波形整形が可能であることを初めて実験的に確認した。

②生物化学的手法からのアプローチ (名古屋大学チーム)

平成20年度に名古屋大学グループは、光応答性分子であるアゾベンゼンを導入したT7プロモーターを用いた遺伝子発現の光スイッチングシステムを構築し、紫外光(340-380 nm)照射によりGFP遺伝子発現を開始させることに成功した。しかし紫外光は、細胞や酵素などに損傷を与えるという問題があった。そこで本年度は、波長が400 nm以上の可視光照射で*trans-cis*異性化する4'-methylthioazobenzene-4-carboxylic acid(MeSアゾベンゼン:図1左参照)を設計・合成した。得られたMeSアゾベンゼンは設計通り*trans*-体で400nm付近に極大吸収波長を持っていた。そ

こで天然塩基12merの中央に、D-threoinolを通じてMeSアゾベンゼンを導入した修飾DNAを合成した(図1右参照)。

このDNAに400 nmおよび520 nmの可視光を照射したところ、吸収スペクトルが可逆的に変化した。この事実から、

DNA鎖中のMeSアゾベンゼン

が可視光照射のみで可逆的に*trans-cis*異性化可能なことが確認できた。この結果を踏まえ、MeSアゾベンゼンをT7プロモーターへ導入した光応答性GFP遺伝子を調製し、可視光照射のみで遺伝子発現が制御可能なシステムを構築した。まずはT7プロモーターの所定の位置に2つのMeSアゾベンゼンを導入した光応答性DNAを用いて、光応答性T7プロモーターで制御可能なGFP遺伝子を調製した。この遺伝子に異なる波長の可視光をそれぞれ照射した後に、無細胞タンパク質合成システムであるPURESYSTEMを用いてGFPを発現させた。遺伝子発現量は、GFPが発する緑色蛍光の強度から評価した。

まず天然の遺伝子を加えたPURESYSTEMで光照射の影響の有無を確認したところ、

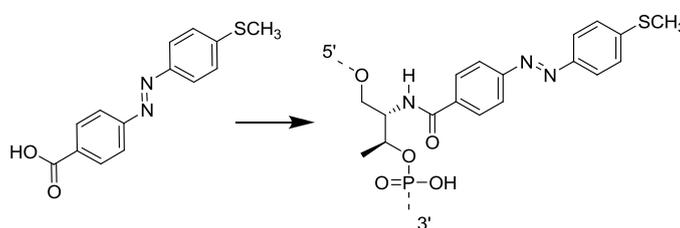


図1 本年度新規設計した可視光応答するMeSアゾベンゼン(左)と、D-threoinolを通じてMeSアゾベンゼンを導入した修飾DNA

400 nm の光を 10 min 照射しても GFP 発現は全く低下しなかった。この結果は 5min 照射で 50%以上損傷した 360nm の紫外光とは対照的であった。そこで光応答性遺伝子を用いて 520 nm の光を 5 min 照射したところ、GFP の発現量は、天然の遺伝子の場合の 10% 以下に抑制された。一方 400 nm の光を 5 min 照射した場合には遺伝子発現が大幅に促進され、その発現量は 520 nm 照射時の 6.8 倍 に達した。このように、可視光照射のみで遺伝子発現の光制御に成功した。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

- 1) T. Tanigawa, Y. Sakakibara, SB. Fang, T. Sekikawa, and M. Yamashita: "Spatial light modulator of 648 pixels with liquid crystal transparent from ultraviolet to near-infrared and its chirp compensation application", *Opt. Lett.* 34,1696-1698, 2009, DOI:10.1364/OL.34.001696
- 2) JF. Zhu, T. Tanigawa, T. Chen, SB. Fang, K. Yamane, T. Sekikawa, and M. Yamashita: "Ultrabroadband spectral amplitude modulation using a liquid crystal spectral light modulator with ultraviolet-to-near-infrared bandwidth", *Appl. Opt.* 49, No. 3, 350-357, 2010, DOI:10.1364/AO.49.000350
- 3) E. Matsubara, Y. Kawamoto, T. Sekikawa, and M. Yamashita: "Generation of ultrashort optical pulses in the 10 fs regime using multicolor Raman sidebands in KTaO₃", *Opt. Lett.* 34, 1837-1839, 2009, DOI:10.1364/OL.34.001837
- 4) E. Haraguchi, K. Sato, T. Tanigawa, M. Yamashita, and T. Sekikawa: "Efficient compression of carrier-envelope phase-locked laser pulses to 5.2 fs using an Al-coated hollow fiber", *Japanese Journal of Applied Physics*, 48, 010213, 2009, DOI:10.1143/JJAP.48.010213
- 5) A. Yamaguchi, N. Nakagawa, K. Igarashi, T. Sekikawa, H. Nishioka, H. Asanuma, and M. Yamashita: "Photoisomerization dynamics study on cis-azobenzene derivative using ultraviolet-to-visible tunable femtosecond pulses", *Appl. Surf. Sci.* 255, 9864-9868, 2009, DOI:10.1016/j.apsusc.2009.04.108
- 6) Liang, X.G.; Mochizuki, T.; Asanuma, H. "A supra-photoswitch involving sandwiched DNA base pairs and azobenzenes for light-driven nanostructures and nanodevices." *Small* **2009**, 5, 1761-1768. DOI:10.1002/sml.200900223
- 7) Kashida, H.; Takatsu, T.; Fujii, T.; Sekiguchi, K.; Liang, X. G.; Niwa, K.; Takase, T.; Yoshida, Y.; Asanuma, H. "In-stem molecular beacon containing a pseudo base pair of threoninol nucleotides for removal of background emission." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2009**, 48, 7044-7047. DOI: 10.1002/anie.200902367

- 8) Kashida, H.; Ito, H.; Fujii, T.; Hayashi, T.; Asanuma H. "Positively charged base surrogate for highly stable "base-pairing" through electrostatic and stacking interactions." *J. Am. Chem. Soc.*, **2009**, *131*, 9928-9930. DOI: 10.1021/ja9013002
- 9) Fujii, T.; Kashida H.; Asanuma, H. "Analysis of coherent heteroclustering of different dyes by use of threoninol-nucleotides for comparison with the molecular exciton theory." *Chem. Eur. J.*, **2009**, *15*, 10092-10102. DOI: 10.1002/chem.200900962
- 10) Kashida, H.; Takatsu, T.; Sekiguchi, K.; Asanuma, H. "An efficient FRET between pyrene and perylene assembled in a DNA duplex and its potential for discriminating single base changes." *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 2479-2486. DOI: 10.1002/chem.20092078
- 11) Nishioka H.; Liang, X.G.; Asanuma, H. "Effect of the ortho modification of azobenzene on the photoregulatory efficiency of DNA hybridization and thermal stability of its cis-form." *Chem. Eur. J.*, **2010**, *16*, 2054-2062. DOI: 10.1002/chem.200902789
- 12) Liang, X.G.; Nishioka H.; Mochizuki, T.; Asanuma, H. "An interstrand-wedged duplex composed of alternating DNA base pairs and covalently attached intercalators." *J. Mater. Chem.*, **2010**, *20*, 575-581. DOI: 10.1039/b915993b
- 13) Liang, X.G.; Wakuda, R.; Fujioka, K.; Asanuma, H. "Photoregulation of DNA transcription by using photoresponsive T7 promoters and clarification of its mechanism." *FEBS J.*, **2010**, *277*, 1551-1561. DOI: 10.1111/j.1742-4658.2010.07583.x
- 14) Zhou, M.; Liang, X.G.; Mochizuki, T.; Asanuma, H. "A light-driven DNA nanomachine for efficiently photoswitching RNA digestion." *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2010**, *49*, 2167-2170. DOI: 10.1002/anie.200907082.