

田原分子分光研究室
Molecular Spectroscopy Laboratory

主任研究員 田原 太平 (理博)
TAHARA, Tahei (D. Sc.)



キーセンテンス：

1. フェムト秒からピコ秒で進行する超高速分子現象を解明し制御する
2. 新しい非線形分光計測を開発して界面の静的・動的性質を解明する
3. 生体分子のナノ秒からミリ秒時間領域の構造変化を調べる

キーワード：

超高速分光、非線形分光、単分子分光、先端分光計測、反応ダイナミクス、界面、生体高分子

研究概要

分光計測は 21 世紀の科学の“目”であり、物理～化学～生物学～工学にわたるきわめて広い分野の基盤となっている。我々は新しい分光計測を開発し、それらを駆使して複雑分子系に対する分子科学研究を推進している。凝縮相における多種多様なダイナミクスを解明するためには、分子の電子状態や振動状態、周辺場の応答、あるいはそれらの背景にあるエネルギーの揺動や散逸を分子レベルで総合的に理解しなければならない。これを念頭におき、先端的な線形・非線形分光計測法を開発・駆使し、問題に本質的な時間・空間スケールを選択して研究を進めている。具体的には、短パルスレーザー技術をもとに、

1. 極限的な時間分解分光計測による超高速分子ダイナミクスの研究
2. 界面選択的非線形分光法の開発と柔らかな界面の研究
3. 新しい単分子分光法の開発と生体高分子の構造ダイナミクスの研究

を行っている。1 では溶液中の基本分子から複雑分子までのダイナミクス、2 では気液界面、液液界面、固液界面や脂質膜等の生物学的界面にある分子の振舞い、3 では生体高分子の構造揺らぎを対象として研究を行っている。

A. 極限的な時間分解分光計測による超高速分子ダイナミクスの研究

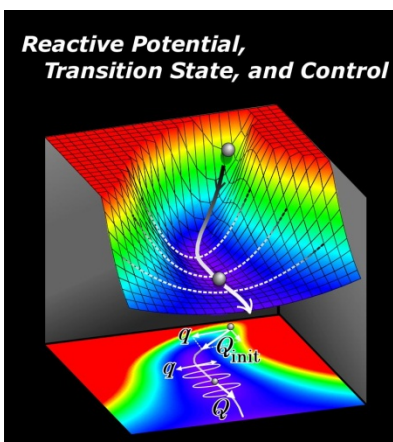


図. 超高速分光による化学反応の研究

1. フェムト秒時間分解時間領域ラマン分光によるジフェニルシクロプロペノン超高速光解離反応の実時間追跡

(倉持、竹内、田原)

Diphenylcyclopropanone (DPCP)は紫外光照射に伴い S_2 状態においてわずか 200 fs の時定数をもって解離反応を起こし、diphenylacetylene (DPA)を生じる。この光解離反応は非常に短い時間スケールで劇的な構造変化を伴いながら進むため、反応途中にある分子の構造変化を実時間追跡することが出来る可能性を有する系として非常に興味深い。そこで、我々は DPCP の超高速構造ダイナミクスを時間分解インパルスラマン分光法を用いて実時間追跡し、その反応機構の詳細を明らかにした。得られた S_2 状態の DPCP のフェムト秒時間分解ラマンスペクトルは驚くべきことに励起状態の寿命の間に大きなスペクトル形状の変化、波数のシフトを示さなかった。この結果は DPCP が S_2 状態において大きな構造変化を起こさないことを意味している。すなわち、観測されたスペクトルは S_2 状態の準安定構造に由来し、解離座標方向へのエネルギー障壁の存在を示唆する。DPCP の光解離反応は前期解離過程である可能性が示唆されていることから、このエネルギー障壁は S_2 状態の透熱ポテンシャル曲面とそれより高エネルギー領域に存在する解離性の透熱ポテンシャル曲面により形成されたものと考えられる。わずか 200 fs で進むことから DPCP の光解離反応はこれまで励起状態でバリアレスに進行すると考えられていたが、本研究によりこの反応にはエネルギー障壁があることが初めて明らかとなった。

2. ロドプシン光反応初期過程に現れる反応性・非反応性励起状態の起源：Na⁺輸送ロドプシン KR2 のフェムト秒吸収データの pH 依存性

(田原進也、竹内、吉住、井上、大谷、神取、田原太平)

KR2 は最初に発見されたナトリウムイオン輸送ロドプシンである。以前、我々は生理 pH 条件下で KR2 を光励起すると反応性 S_1 状態と非反応性 S_1 状態という複数の S_1 状態が生成することを報告した。しかしこれらの分子論的な起源は明らかになっていなかった。これら複数の S_1 状態の起源を解明するため、我々は pH 4 から 11 における KR2 の励起状態ダイナミクスをフェムト秒時間分解吸収分光法により調べた。その結果、反応性 S_1 状態のポピュレーションが発色団のカウンターイオンである Asp116 の pH 滴定曲線と強い相関を示すことがわかった。このことは反応性・非反応性 S_1 状態の起源が Asp116 のプロトン化状態に関連していることを強く示唆する。我々は定量的な解析に基づき、反応性・非反応性 S_1 状態がそれぞれ Asp116 と発色団の間に水素結合を持つ・持たない KR2 から生成していると結論付けた。

B. 界面選択的非線形分光法の開発と柔らかな界面の研究

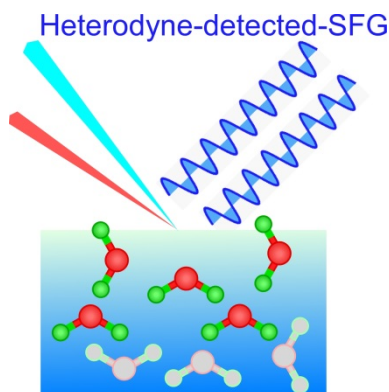


図. 和周波発生を用いた空気/水界面の観測

1. 2次元ヘテロダイン検出振動和周波発生分光を用いた両性イオン脂質/水界面の超高速水素結合ダイナミクスの研究

(井上、Singh、二本柳、山口¹、田原)

本研究では、生体膜を構成する代表的な脂質である両性イオン脂質(DPPC)/水界面に対して2次元ヘテロダイン検出振動和周波発生分光法(2D HD-VSFG)を用いた超高速振動ダイナミクス測定を行い、界面水の水和構造と水素結合ダイナミクスを解明した。DPPC /水界面の2D HD-VSFG スペクトルからリン酸基とコ

リン基がそれぞれ上向きと下向きの水和層を形成していることが確認された。また我々はこれまでに、リン酸基を持つ脂質(DPPG)とコリン基を持つ脂質(DPTAP)の脂質膜/水界面を2D HD-VSFGで研究し、DPTAP界面の水はバルクの水と同じように100フェムト秒以下の、極めて速い水素結合の揺らぎを示すのに対し、DPPG界面の水ではその揺らぎは大きく抑制されていることを報告している。今回、DPPCのリン酸基周りの水分子はDPPGのリン酸基周りの水分子と異なり、バルクの水と同様に極めて速く揺らいでいることが明らかとなった。このことは、DPPCのリン酸基の近傍にコリン基が存在するため、その周囲の極めて速い水素結合の揺らぎが、隣接するリン酸基周辺の水和水の揺らぎを誘起したためと考えられる。この結果は、両性イオン脂質界面の水の超高速振動ダイナミクスにおいて官能基間の協奏的な効果が存在することを示している。

¹埼玉大

2. 水表面への吸着によるヘモグロビンの等電点変化

(Devineau、井上、日下、浦島、二本柳、Baigl¹、常重²、田原)

タンパク質の吸着メカニズムを分子レベルで理解することは、バイオテクノロジーのさらなる発展のために非常に重要である。我々はこれまでヘテロダイン検出と周波発生(HD-VSFG)分光法を用いて空気/水界面における水の構造を研究してきた。HD-VSFG法には、界面水分子の上下配向を直接決定できるという特長がある。水の極性配向は表面の電荷に敏感であるから、水の配向をプローブとして表面の電荷状態を知ることができる。本研究ではこの関係性を利用して気水界面に吸着したヘモグロビン(HbA)の界面電荷状態を調べた。その結果、吸着ヘモグロビンの等電点(pH6)がバルク溶液中(pH7.0)と比べて有意に変化していることが示唆された。これは吸着に伴う構造変化によってHbAの表面電荷状態が変化した結果であると考えられる。タンパク質が表面変性することによりその等電点がシフトするというのは十分にあり得るシナリオであるが、実際に実験的に観測されたのはこれが初めてである。また他のタンパク質では見られていないことから、この現象がタンパク質の種類に強く依存することが明らかとなった。

¹ソルボンヌ大、²法政大

3. フェノール存在下での空気/水界面の構造

(日下、石山¹、二本柳、森田²、田原)

空気/水界面は、環境中、例えば大気中のエアロゾル表面や海水表面などに広く存在し、地球環境を左右する重要な化学反応がここで起こっている。環境中には多くの界面活性な有機化合物が存在するため、実際に空気/水界面で起こっている化学反応の機構を理解するためには、これらの有機化合物が空気/水界面に与える影響を明らかにすることが重要になってくる。本研究では、環境中に存在する有機化合物の例としてフェノールを選び、ヘテロダイン検出振動と周波発生(HD-VSFG)分光、および、MDシミュレーションによって、フェノールの存在する空気/水界面の構造を明らかにした。HD-VSFG分光により測定した、空気/フェノール水溶液界面の $\chi^{(2)}$ スペクトルの虚部($\text{Im} \chi^{(2)}$)は、フェノールの濃度に依存して、スペクトルの形が大きく変化することがわかった。重水を用いた実験やMDシミュレーションにより得られたスペクトル解析などによって、次のような界面の構造情報を得た。空気/水界面にフェノールが吸着されるのに伴って、(1)表面近傍の水はフェノールの芳香環とOH $\cdot\pi$ の水素結合を形成し、これが 3620 cm^{-1} の正のバンドを与える。(2)フェノールよりも深い位置にある水分子はフェノールのOHを受容して水素結合を形成し、自身のOH基を下に向けた配向をとる。これが、 3200 cm^{-1} をピークとする負のバンドを与える。フェノールは、中性で非常に単純な分子であるにも関わらず、界面の水と特徴的な水素結合を形成することによって、空気/水界面の構造に大きな影響を与えることを本研究によって見出した。環境中に存在する有機化合物は、空気/水界面の構造を大きく変化させ、その結果として、空気/水界面で起こる化学反応に影響を与えている可能性がある。

¹富山大、²東北大

C. 新しい単分子分光法の開発と生体高分子の構造ダイナミクスの研究

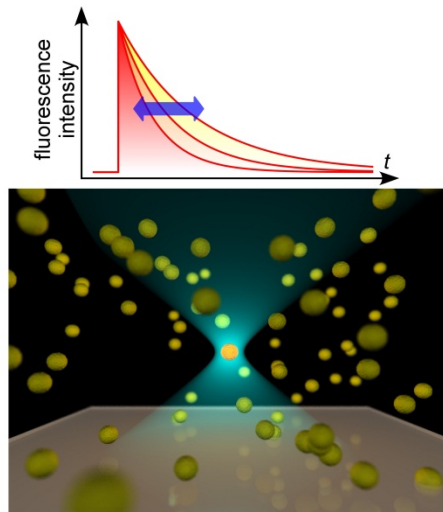


図. 新しい蛍光相関分光による複雑分子のダイナミクスの観測

1. 二次元蛍光寿命相関分光法によるシトクロム *c* の折り畳みにおける協同的収縮の観測 (坂口、山中¹、廣田¹、石井、田原)

シトクロム *c* (cyt*c*) の折り畳みダイナミクスは様々な実験手法を用いてよく調べられているが、短い時間スケールでの構造ダイナミクスの詳細は分かっていない。本研究では二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) を用いて cyt*c* のマイクロ秒構造収縮ダイナミクスを調べた。部位特異的な構造変化を調べるため、3か所の異なる位置に FRET ドナーを標識した試料を用意した。これらを 2D-FLCS を用いて測定したところ、酸変性条件下ですべての試料において二種の構造アンサンブルが検出された。蛍光寿命分布を元にこれらの成分を完全変性状態と部分的に折り畳んだ状態に帰属した。構造アンサンブル間の相互変換の時間スケールは3つの試料すべてで近い値をとり、さらに以前に非平衡条件の実験で報告されていた値とよく一致していた。このことから、cyt*c* の構造収縮は部位特異性に乏しい協同的な過程であると結論した。

¹奈良先端科学技術大学院大学

2. 交替励起方式を用いた二次元蛍光寿命相関分光法の開発 (Sarkar、水野、坂口、石井、田原)

2D-FLCS は FRET 標識した生体高分子の構造不均一性を蛍光寿命分布を通して計測する手法であり、構造遷移をマイクロ秒の時間分解能で調べることができる。本研究では、2D-FLCS をさらに発展させるため、FRET のドナーとアクセプターを交互に励起するパルス交替励起方式 (PIE) を導入し、スーパーコンティニューム光源を用いた PIE-2D-FLCS のセットアップを構築した。得られた光子データを用いて試料中に共存する分子種の寄与を分離し、さらに各分子種ごとに色素の欠落の検出およびドナー蛍光寿命・FRET 効率の決定を行うため、最大エントロピー法を用いた解析法を開発した。実験データ及びモンテカルロシミュレーションにより人工的に発生させた光子データに対して本解析法を適用した結果、実際の FRET 標識分子に対して十分信頼できる結果が得られることが示された。

3. 走査型二次元蛍光寿命相関分光法の開発 (長谷川、Vaidya、石井、田原)

2D-FLCS ではマイクロ秒時間領域の生体分子の構造ダイナミクスを調べることができるが、測定時間領域

の上限は分子の並進拡散運動のため数ミリ秒に制限されている。本研究では、試料分子をガラス基板に固定することで2D-FLCSの測定時間領域を拡大することを試みた。固定した単一分子に対して長時間励起光を照射し続けると色素の光褪色が起るため、試料ステージを低速で走査しながら2D-FLCS計測を行った。これにより、測定時間領域を数百ミリ秒まで延長できることが確認された。この方法をヘアピンDNAの構造ダイナミクスに適用した結果、マイクロ秒～ミリ秒領域の閉状態と開状態間の相互変換が観測され、溶液中の自由拡散分子に対する計測ではとらえられなかった時間領域のダイナミクスの情報を得ることができた。本研究で開発した走査型2D-FLCSは時間的な階層性を持つ生体分子ダイナミクスの解明に向けた強力な手段になると期待される。

Key Sentence :

1. Elucidating and controlling ultrafast phenomena in the condensed-phase
2. Studying soft interfaces by new nonlinear spectroscopy
3. Examining the nanosecond-millisecond structural dynamics of biomolecules

Key Word :

ultrafast spectroscopy, nonlinear spectroscopy, single molecule spectroscopy, advanced spectroscopy, reaction dynamics, interface, biological macromolecules

Outline

Spectroscopy is the “eyes” of modern science, and hence it plays essential roles in a variety of research fields covering physics, chemistry, and biology. We develop and utilize the most advanced spectroscopy for molecular science of complex systems in the condensed-phase. To elucidate a variety of complex phenomena occurring in the condensed phase, we need to clarify the electronic and vibrational states of molecules, the response of surroundings, and the fluctuation and dissipation of energy behind. Based on this view, we carry out fundamental research using the most advanced linear/nonlinear spectroscopic methods with most suitable time- and space-resolution for the problems to be studied. Currently, we are carrying out the following projects:

1. Study of ultrafast dynamics by advanced time-resolved spectroscopy,
2. Study of soft interfaces and development of interface-selective nonlinear spectroscopy,
3. Study of structural dynamics of biomolecules and development of new single molecule spectroscopy.

Targets of the projects 1, 2, 3 are (1) fundamental and complex molecules in solution, (2) molecules at the air/liquid, liquid/liquid, liquid/solid and biological interfaces, and (3) biological macromolecules, respectively.

A. Study of ultrafast dynamics by advanced time-resolved spectroscopy

1. Ultrafast photodissociation dynamics of diphenylcyclopropenone studied by time-resolved impulsive stimulated Raman spectroscopy
(Kuramochi, Takeuchi, Tahara)

We studied ultrafast photodissociation reaction of diphenylcyclopropenone (DPCP) in solution by time-resolved impulsive stimulated Raman spectroscopy (TR-ISRS) using sub-6-fs pulses. The obtained femtosecond time-resolved Raman data of excited-state DPCP did not show any noticeable spectral change during its lifetime of 180 fs. This indicates that photoexcited DPCP is trapped at the excited-state potential energy minimum before undergoing the photodissociation, which is consistent with the predissociation picture of ultrafast photodissociation reaction of DPCP. The present study demonstrates the high capability of TR-ISRS for structural characterization of short-lived reactive transients that decay within only a few hundreds of femtoseconds.

2. Origin of the reactive and non-reactive excited states in the primary reaction of rhodopsins: pH

dependence of femtosecond absorption of light-driven sodium ion pump rhodopsin KR2
(Shinya Tahara, Takeuchi, Abe-Yoshizumi, Inoue, Ohtani, Kandori, Tahei Tahara)

KR2 is the first light-driven Na⁺-pumping rhodopsin discovered. We previously reported that photoexcitation of KR2 generates multiple S₁ states, i.e., “reactive” and “non-reactive” S₁ states at the physiological pH, but their origin remained unclear. To elucidate the origin of these S₁ states, we examined the S₁ state dynamics of KR2 using femtosecond time-resolved absorption spectroscopy at different pH ranging from pH 4 to 11. It was found that the relative population of the reactive S₁ state correlates well with the titration curve of Asp116 which is the counterion of the chromophore, indicating that the protonation state of Asp116 is directly related to the formation of these S₁ states. The quantitative analysis led us to conclude that the reactive and non-reactive S₁ states originate from KR2 proteins in which a hydrogen bond between Asp116 and the chromophore is present and absent, respectively.

B. Study of soft interfaces and development of interface-selective nonlinear spectroscopy

1. Ultrafast dynamics study of water at a zwitterionic lipid/water interface revealed by 2D HD-VSFG spectroscopy
(Inoue, Singh, Nihonyanagi, Yamaguchi¹, Tahara)

Molecular-level elucidation of hydration at biological membrane interfaces is of great importance for understanding biological processes. We studied ultrafast hydrogen-bond dynamics at a zwitterionic phosphatidylcholine/water interface by two-dimensional heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (2D HD-VSFG) spectroscopy. The obtained 2D spectra confirm that the anionic phosphate and cationic choline sites are individually hydrated at the interface. Furthermore, the data show that the dynamics of water at the zwitterionic lipid interface is not a simple sum of the dynamics of the water species that hydrate to the separate phosphate and choline. The center line slope analysis of the 2D spectra reveals that ultrafast hydrogen-bond fluctuation is not significantly suppressed around the phosphate at the zwitterionic lipid interface, which makes the hydrogen-bond dynamics look similar to that of the bulk water. The present study indicates that the hydrogen-bond dynamics at membrane interfaces is not determined only by the hydrogen bond to a specific site of the interface but is largely dependent on the water dynamics in the vicinity and other nearby moieties, through the hydrogen-bond network.

¹Saitama Univ.

2. Isoelectric point of hemoglobin at the air/water interface probed by the orientation of water molecules
(Devineau, Inoue, Kusaka, Urashima, Nihonyanagi, Baigl¹, Tsuneshige², Tahara)

Elucidation of the molecular mechanisms of protein adsorption is of essential importance for further development of biotechnology. In this work, we used interface-selective nonlinear vibrational spectroscopy to investigate protein charge at the air/water interface by probing the orientation of interfacial water molecules. We measured the Imχ⁽²⁾ spectra of hemoglobin, myoglobin, serum albumin and lysozyme at the air/water interface in the CH and OH stretching regions using heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (HD-VSFG) spectroscopy, and we deduced the isoelectric point of the protein by monitoring the orientational flip-flop of water molecules at the interface. Strikingly, our measurements indicate that the isoelectric point of hemoglobin is significantly lowered (by about one pH unit) at the air/water interface compared to that in the bulk. This can be predominantly attributed to the modifications of the protein structure at the air/water interface. Our results also suggest that a similar mechanism accounts for the modification of myoglobin charge at the air/water interface. This effect has not been reported for other model proteins at interfaces probed by conventional VSFG techniques, and it emphasizes the importance of the structural modifications of proteins at the interface,

which can drastically affect their charge profiles in a protein-specific manner. The direct experimental approach using HD-VSFG can unveil the changes of the isoelectric point of adsorbed proteins at various interfaces, which is of major relevance to many biological applications and sheds new light on the effect of interfaces on protein charge.

¹Sorbonne Université, ²Housei Univ.

3. Structure at the air/water interface in the presence of phenol (Kusaka, Ishiyama¹, Nihonyanagi, Morita², Tahara)

Many kinds of organic compounds pollute the aquatic environment, and they change the properties of the water surface due to their high surface affinity. Chemical reactions at the water surface are key in environmental chemistry because, for instance, reactions occurring at the surface of aqueous aerosols play essential roles in the atmosphere. Therefore, it is very important to elucidate how organic compounds affect the properties of water surfaces. In this study, we chose phenol as an organic pollutant prototype and investigated how phenol affects the molecular-level structure of the air/water interface. Interface-selective vibrational spectra, i.e., the imaginary part of second-order nonlinear susceptibility ($\text{Im}\chi^{(2)}$), of the air/water-phenol mixture interface in the OH stretch region were collected using heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (HD-VSFG) spectroscopy, and the observed $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectra were interpreted with the aid of molecular dynamics (MD) simulation. The $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectra observed via HD-VSFG drastically change as a function of phenol concentration in water, and exhibit two isosbestic points. In the spectra, a positive OH band appears at 3620 cm^{-1} , which is assigned to an OH group of water that forms an OH- π hydrogen-bond (H-bond) with the aromatic ring of phenol, and a strong negative OH band appears around 3200 cm^{-1} , which is attributed to a water that accepts a H-bond from the phenol OH while pointing its OH groups toward the bulk water side. It was concluded that two types of unique water molecules hydrate a phenol molecule: (1) water that forms an OH- π H-bond; and (2) water that accepts a H-bond from a phenol OH group. Each phenol molecule adsorbed at the air/water forms a specific hydration structure, which causes a large change in the interfacial water structure. The present study provides a clear example demonstrating that even such a simple organic pollutant as phenol can drastically alter the interfacial water structure.

¹Univ. of Toyama, ²Tohoku Univ.

C. Study of structural dynamics of biomolecules and development of new single molecule spectroscopy

1. Observation of the cooperative collapse in the spontaneous folding process of cytochrome *c* by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (Sakaguchi, Yamanaka¹, Hirota¹, Ishii, Tahara)

The folding dynamics of cytochrome *c* (cyt*c*) has been extensively studied by a variety of experimental methods. However, site-specific folding dynamics on the short time scale is still controversial. In this work, the microsecond folding dynamics of cyt*c* under the equilibrium condition was investigated by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (2D FLCS). For clarifying the site-specific kinetics, we prepared three samples which have different labeling sites of the FRET donor. The structural heterogeneity induced by acid denaturation was detected by 2D FLCS as two species for all the three samples. These two species were assigned to the unfolded and a partially folded intermediate state based on their fluorescence lifetimes. The interconversion timescale between the two species was very similar for the three samples and was in good agreement with the timescale of the initial collapse of cyt*c* which was observed in non-equilibrium conditions with mixing methods. This result indicates that the collapse of cyt*c* occurs cooperatively with little site-specificity.

¹NAIST

2. Two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy with pulsed interleaved excitation (Sarkar, Mizuno, Sakaguchi, Ishii, Tahara)

2D FLCS can resolve conformational inhomogeneity of biopolymers utilizing fluorescence lifetime measurement of FRET-labeled molecules and enables us to examine conformational transitions with a microsecond time resolution. For improving the accuracy of 2D FLCS, we introduced a new method that incorporates pulsed interleaved excitation (PIE), in which the donor and acceptor dyes of a FRET pair are excited alternately. We constructed an experimental setup of PIE 2D FLCS based on a supercontinuum light source. For data analysis, we introduced the maximum entropy method in order to establish a protocol for separating contributions of co-existing species in the sample and for determining the dye stoichiometry, donor fluorescence lifetime, and FRET efficiency for each species. The result of application to experimental and simulated photon data demonstrated the feasibility of this new method to real FRET-labeled molecules.

3. Development of scanning 2D FLCS and application to structural dynamics of hairpin DNA (Hasegawa, Vaidya, Ishii, Tahara)

2D FLCS is a new method of single-molecule measurements, which enables us to observe structural dynamics of biomolecules in the microsecond time region. In 2D FLCS, however, the observation time window has been limited to several milliseconds because of the translational diffusion of the molecules. In this work, we attempted to extend the observation time window of 2D FLCS by immobilizing the sample molecules on a glass substrate. We name this new method scanning 2D FLCS because the sample stage is scanned continuously for preventing photobleaching. It was confirmed that the observation time window can be extended to hundreds of milliseconds by this approach. We applied this method to the study of structural dynamics of hairpin DNA and observed the interconversion between the closed and the open forms in the micro- to millisecond time region. It is anticipated that the scanning 2D FLCS will become a powerful tool to elucidate temporally hierarchical dynamics of biomolecules.

Principal Investigator

田原 太平 Tahei Tahara

Research Staff

竹内 佐年 Satoshi Takeuchi

石井 邦彦 Kunihiko Ishii

二本柳 聡史 Satoshi Nihonyanagi

倉持 光 Hikaru Kuramochi

井上 賢一 Kenichi Inoue

浦島 周平 Shuhei Urashima

坂口 美幸 Miyuki Sakaguchi

田原 進也 Shinya Tahara

Bidyut Sarkar

Ahmed Mohammed

Pardeep Kumar

Woongmo Sung

Sanat Ghosh

Students

張 君輔 Chun-Fu Chang

佐山 篤 Atsushi Sayama

長谷川 一途 Kazuto Hasegawa

Assistant and Part-timer

加藤 智子 Tomoko Kato

道幸 智恵 Tomoe Michiyuki

Visiting Members

山口 祥一 Shoichi Yamaguchi

大澤 正久 Masahisa Osawa

藤野 竜也 Tatsuya Fujino

細井 晴子 Haruko Hosoi

岩村 宗高 Munetaka Iwamura

乙須 拓洋 Takuhiro Otsu

Anton Myalitsin