

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. 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を研究する
3. 複雑な分子のフェムト秒からミリ秒での振舞いを調べる

キーワード：

超高速分光、非線形分光、極限分光計測、反応ダイナミクス、界面、複雑分子系、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。我々は新しい極限的な分子分光計測を開発し、それらを駆使して凝縮相複雑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、最も先端的な線形・非線形分光計測法を用い、個々の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. 極限的時間分解分光による超高速分子現象の解明と制御
2. 新しい非線形分光を用いたソフト界面の研究
3. 複雑分子系のフェムト秒～ミリ秒ダイナミクスの観測

を行っている。1 では溶液中の基本分子のダイナミクス、2 では気液界面、液液界面、固液界面、脂質膜等の生物学的界面にある分子の振舞い、3 では生体高分子の揺らぎと機能を対象として研究を行っている。

A. 極限的時間分解分光計測による超高速現象の解明と制御

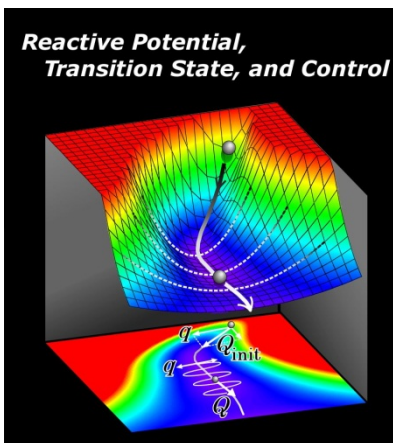


図. 超高速分光による化学反応の研究

1. 紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光によるイエロープロテイン発色団の超高速構造変化の研究 (倉持、竹内、田原)

新規に開発した紫外共鳴フェムト秒誘導ラマン分光を用いて、イエロープロテインの発色団であるトランス-パラ-クマル酸の超高速構造ダイナミクスを研究した。緩衝溶液中のアニオン種から得られたラマン信号は1 ps以内に明確なスペクトル変化を示し、その後は2.4 psの時定数で減衰した。これらの結果は、この分子が光励起後のフェムト秒時間スケールでフランク-コンドン状態からS₁状態の最安定構造に向けて構造変

化することを示している。 S_1 状態のスペクトルは S_0 状態のスペクトルとよく似たパターンを示すことから、この発色団分子は S_1 状態の寿命のあいだ、 $C=C$ 結合まわりに捩じれるのではなく、むしろ平面トランス構造を保ちつつ面内変形を起こすと結論した。

2. ジシアノ金錯体オリゴマーにおける金原子間結合の生成とコヒーレント運動の実時間観測

(岩村宗高、野崎浩一、竹内、田原)

ジシアノ金錯体のオリゴマーについてピコ秒およびフェムト秒の時間分解発光・吸収分光を行い、励起状態における金原子間結合の生成をはじめとする構造ダイナミクスを研究した。水溶液中で三量体を選択的に光励起したところ、励起状態による吸収バンドが600 nm付近に観測され、それが2.1 psの時定数で強度を増しながら短波長側にシフトした。量子化学計算の結果との比較により、このスペクトル変化は三量体の励起三重項状態における屈曲型から直線型への構造変化に帰属された。また過渡吸収バンドのピーク波長は光励起によって引き起こされた核波束運動を反映した変調を示し、その変調振動数(66 と 87 cm^{-1})は計算で求められた2つの金-金伸縮振動モードの振動数とよく一致した。ナノ秒領域の発光分光では、励起状態の三量体と基底状態の単量体との会合が2 nsで進み、励起状態の四量体を生じることも分かった。

B. 新しい非線形分光を用いたソフト界面の研究

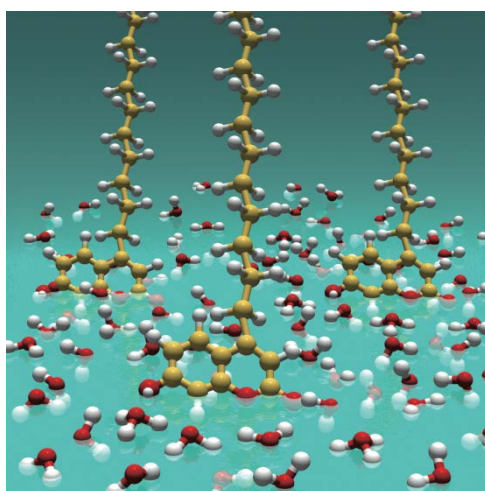


図. ヘテロダイン和周波分光で観る液体界面

1. ヘテロダイン検出振動和周波発生による双イオン性脂質単分子膜/水界面における水和構造の決定

(Mondal, 二本柳, 山口, 田原)

脂質/水界面は種々の生化学反応に対して重要な役割を果たしているが、その分子科学的理解は非常に限られている。我々は、ヘテロダイン検出振動和周波発生(HD-VSFG)分光法を用いて、双イオン性脂質であるジアルキルフォスファチジルコリンと水の界面における水の構造解析を行った。また、本研究では振動和周波スペクトルからカップリングの寄与を除くために同位体希釈水(HOD)を用いた。HD-VSFG スペクトルは特徴的な2こぶのブロードなOH伸縮振動バンドを示した。この特徴的なバンドの形が何に由来するものかを特定するために双イオン性界面活性剤およびカチオン性脂質とアニオン性脂質の混合膜についても測定を行った。これらの結果から、双イオン性脂質界面には三つの異なる水構造が共存していることが明らかとなった。ひとつは、負に帯電したリン酸基を水和している、水素上向きに配向した水である。二つ目は、正に帯電したコリン基に水和した、水素下向きに配向した水である。もうひとつは疎水基近傍に存在する非常に弱い水素結合をもつ水である。このような複数の水和構造は分子動力学シミュレーションの結果からは存在が示唆されていたものの、実験的には初めて観測されたものである。

2. 二次元ヘテロダイン検出振動和周波発生による帯電界面の水の超高速振動ダイナミクス

(Singh, 二本柳, 山口, 田原)

二次元ヘテロダイン検出振動和周波発生(2D HD-VSFG)分光法を水界面で実現した。本研究では

HD-VSFG スペクトルからカップリングの寄与を除くために同位体希釈水(HOD)を用いた。親水基が正に帯電した界面活性剤に覆われた水の表面の OH 伸縮領域の 2D HD-VSFG スペクトルは、赤外光励起直後は対角線方向に伸びた形状を示した。これは、界面の水の OH 伸縮バンドの不均一広がりを意味する。光励起後 300 fs には、対角線方向に伸びた形状は失われ、円対称な形状を示した。これはスペクトル拡散によるものである。興味深いことに、光励起直後の界面の水の 2D HD-VSFG スペクトルの形状の非対称性は、バルクの水の 2D IR スペクトルのそれと逆であることが分かった。すなわち、界面では励起波数が高いほど退色のバンド幅が狭く、バルクではその逆である。このことは、界面での水素結合の組み替えの機構がバルクとは大きく異なることを示唆している。

3. ヘテロダイン検出電子和周波発生分光による水の表面の pH の定量的評価

(山口、Kundu、Pratik Sen、田原)

水の表面はバルクよりも酸性なのか塩基性なのか、議論が続いている。分子動力学シミュレーション、振動和周波発生、第二高調波発生の研究からは表面はより酸性、一方で気泡の電気泳動の研究からはより塩基性という結果が得られている。我々はヘテロダイン検出電子和周波発生 (HD-ESFG) を水の表面の pH 指示薬に適用し、高感度で信頼性の高い分光測定を行なった。HD-ESFGによって測定した水の表面の pH 指示薬の二次非線形感受率 ($\chi^{(2)}$) の虚部と実部のスペクトルを解析した結果、水の表面はバルクよりも pH が 1.7 低いことが分かった。この実験は、バルクの pH 測定と同じ原理の測定を水の表面に適用した最初の例である。水の表面の pH がバルクよりも低いことは、海洋中や大気中の化学反応にとって重要な意味を持つと考えられる。

C. 複雑分子系のフェムト～ミリ秒ダイナミクスの研究

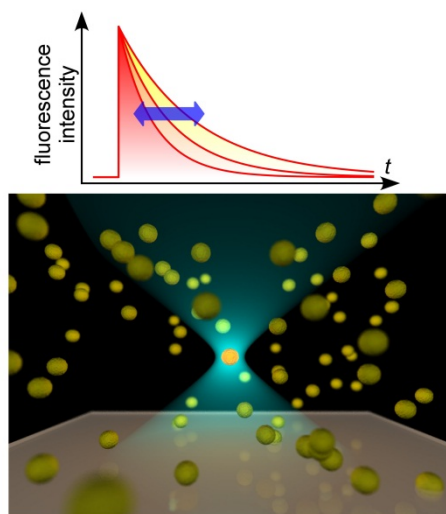


図. 新しい蛍光相関分光による複雑分子のダイナミクスの観測

1. 蛍光分光法を用いたハイドロゲルの局所環境の研究：超高強度ダブルネットワークゲルとシングルネットワークゲルの比較

(服部、石井、富永大輝、長田義仁、田原)

新奇なダブルネットワーク(DN)ハイドロゲルとその構成成分のハイドロゲル、PAMPS と PAAm の局所環境を蛍光プローブを用いて研究した。これら 3 種のハイドロゲル中での蛍光プローブの定常蛍光スペクトルと蛍光寿命はバルク水溶液中での値に非常に近く、ほぼ全てのプローブ分子がバルク水中と同様の局所的な極性環境をもつ水プール中に存在していることが確かめられた。また時間分解蛍光異方性測定の結果、PAMPS ゲル中ではバルク水中に近い単一指数関数的な減衰が見られ、プローブ分子がサイズの大きい水プール中で自由に回転していることが示唆された。しかし、PAAm ゲル中と DN ゲル中ではこれが二成分の減衰となり、一部のプローブ分子が「束縛された」水プール中存在することがわかった。この結果が

ら、DNゲルの高い機械的強度は PAAm が PAMPS ゲルと絡み合うことで実現され、PAAm は DN ゲル中の局所的な水環境を形成する上で支配的役割を果たしていることが示された。

2. ハイドロゲル中の水のダイナミクスの解明に向けたサブピコ秒時間分解赤外吸収異方性測定装置の製作

(服部、石井、富永大輝、長田義仁、田原)

DNゲル中の水のダイナミクスを直接的に調べるには、水分子自体の運動を時間分解計測することが必要である。この目標に向け、重水素化した水分子の回転運動をOD伸縮振動の遷移モーメントの異方性の緩和を通して測定できるサブピコ秒時間分解赤外吸収異方性測定装置を製作した。光源としてフェムト秒チタンサファイア再生増幅器の出力を光パラメトリック増幅器と非線形光学結晶を用いて中赤外領域(4 μm)に波長変換したものを用い、これを分割してポンプ光とプローブ光を用意した。ポンプ光とプローブ光の偏光を互いに 45° ずらして試料 (H₂O中のHOD分子) 中で重ね、ポンプ光によって誘起されたプローブ光の強度変化を分光器とMCT検出器を用いて検出した。試料を通過したプローブ光の経路に偏光子を挿入することで、ポンプ光の偏光と平行・垂直な偏光をもつプローブ光の吸収変化を個別に測定した。

3. 光子インターバル解析による単一光子アバランシェフォトダイオードの時間軸変動の補正

(乙須、石井、田原)

単一光子アバランシェフォトダイオード (SPAD) は時間分解蛍光測定のための高感度で優れたデバイスだが、その時間応答が計数率依存性を示すため、蛍光強度が揺らぐケースでは蛍光寿命の正確な決定が困難であった。我々は SPAD の時間応答を検出光子の時間間隔と関連づけて解析し、検出時間のシフトが時間応答の計数率依存性の原因であること、このシフトの量が前の光子との検出時間間隔のみで決まることを見出した。このことを利用して SPAD の時間応答の計数率依存性を補正する簡単な方法を提案した。これを応用することで、我々が現在構築を進めている多焦点型蛍光相関分光計を用いて二次元蛍光寿命相関解析を行うことが可能になり、蛍光寿命測定を通して複雑分子のマイクロ秒オーダーのダイナミクスを検出する精度が飛躍的に向上すると期待される。

----- Key Sentence :

1. Elucidating and controlling ultrafast phenomena in the condensed-phase
2. Studying soft interfaces by new nonlinear spectroscopy
3. Examining the femtosecond-millisecond dynamics of complex molecular systems

Key Word :

ultrafast spectroscopy, nonlinear spectroscopy, advanced spectroscopy, reaction dynamics, interface, complex molecular systems, biological macromolecules

Outline

Spectroscopy is “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. Elucidation and control of ultrafast phenomena using advanced time-resolved spectroscopy,
2. Study of soft interfaces using new nonlinear spectroscopy,
3. Study of the dynamics of complex systems in the femtosecond – millisecond time region.

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

A. Elucidation and control of ultrafast phenomena in the condensed-phase

1. Ultrafast Structural Evolution of Photoactive Yellow Protein Chromophore Revealed by Ultraviolet Resonance Femtosecond Stimulated Raman Spectroscopy (Kuramochi, Takeuchi, Tahara)

We studied ultrafast structural dynamics of the chromophore of photoactive yellow protein, trans-p-coumaric acid (pCA), using newly developed ultraviolet resonance femtosecond stimulated Raman spectroscopy (UV-FSRS). The UV-FSRS data of the anionic form (pCA⁻) in a buffer solution showed clear spectral changes within 1 ps, followed by a spectrally uniform decay with a time constant of 2.4 ps. The observed spectral change indicates that the structural change occurs in excited pCA⁻ from the Franck–Condon state to the S₁ potential minimum in the femtosecond time region. The S₁ Raman spectra exhibit spectral patterns that are similar to the ground-state spectrum, suggesting that pCA⁻ yet retains a planar-trans conformation throughout the S₁ lifetime. We concluded that S₁ pCA⁻ undergoes a femtosecond in-plane deformation, rather than a substantial C_{et}=C_{et} twist. With these femtosecond vibrational data, we discuss possible roles of the initial structural evolution of pCA in triggering the photoreceptive function when embedded in the protein.

2. Real-Time Observation of Tight Au–Au Bond Formation and Relevant Coherent Motion upon Photoexcitation of [Au(CN)₂]⁻ Oligomers (Munetaka Iwamura, Koichi Nozaki, Takeuchi, Tahara)

Structural dynamics involving tight Au–Au bond formation of excited-state oligomers [Au(CN)₂]⁻_n was studied using picosecond/femtosecond time-resolved emission and absorption spectroscopy. With selective excitation of the trimer ([Au(CN)₂]⁻₃) in aqueous solutions, transient absorption due to the excited-state trimer was observed around 600 nm. This transient exhibited a significant intensity increase ($\tau = 2.1$ ps) with a blue shift in the early picosecond time region. Density functional theory (DFT) and time-dependent DFT calculations revealed that the observed spectral changes can be ascribed to a structural change from a bent to a linear staggered structure in the triplet excited-state trimer. The transient absorption also exhibited a clear modulation of the peak position, reflecting coherent nuclear wavepacket motion induced by photoexcitation. The frequencies of the coherent motions are 66 and 87 cm⁻¹, in very good accord with the frequencies of two Au–Au stretch vibrations in the excited state of the trimer calculated by DFT. Time-resolved emission spectra in the subnanosecond time region showed that association of the excited-state trimer with the ground-state monomer proceeds with $\tau = 2.0$ ns, yielding the excited-state tetramer.

B. Study of soft Interfaces by new nonlinear spectroscopy

1. Three Distinct Water Structures at a Zwitterionic Lipid/Water Interface Revealed by Heterodyne-Detected Vibrational Sum Frequency Generation (Mondal, Nihonyanagi, Yamaguchi, Tahara)

Lipid/water interfaces and associated interfacial water are vital for various biochemical reactions, but the molecular-level understanding of their property is very limited. We investigated the water structure at a zwitterionic lipid, phosphatidylcholine monolayer/water interface using heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (HD-VSFG) spectroscopy. Isotopically diluted water was utilized in the experiments to minimize the effect of intra/intermolecular couplings. It was found that the OH stretch band in the Im $\chi^{(2)}$ spectrum of the phosphatidylcholine/water interface exhibits a characteristic double-peaked feature. To interpret this peculiar spectrum of the zwitterionic lipid/water interface, Im $\chi^{(2)}$ spectra of a zwitterionic surfactant/water interface and mixed lipid/water interfaces were measured. The Im $\chi^{(2)}$ spectrum of the zwitterionic surfactant/water interface clearly shows both positive and negative bands in the OH stretch region, revealing that multiple water structures exist at the interface. At the mixed lipid/water interfaces, while gradually varying the fraction of the anionic and cationic lipids, we observed a drastic change in the Im $\chi^{(2)}$ spectra, in which the spectral features similar to the anionic, zwitterionic, and cationic lipid/water interfaces appear successively. These observations demonstrate that, when the positive and negative charges coexist at the interface, the H-down oriented water structure and H-up oriented water structure appear in the vicinity of the respective charged sites. In addition, it was found that a positive Im $\chi^{(2)}$ appears around

3600 cm^{-1} for all the monolayer interfaces examined, indicating weakly-interacting water species existing in the hydrophobic region of the monolayer at the interface. Based on these results, we concluded that the characteristic $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum of the zwitterionic lipid/water interface arises from three different types of water existing at the interface: (1) the water associated with the negatively charged phosphate, which is strongly H-bonded and has a net H-up orientation, (2) the water around the positively charged choline, which forms weaker H-bonds and has a net H-down orientation, and (3) the water weakly interacting with the hydrophobic region of the lipid, which has a net H-up orientation.

2. Ultrafast Vibrational Dynamics of Water at a Charged Interface Revealed by Two-Dimensional Heterodyne-Detected Vibrational Sum Frequency Generation

(Singh, Nihonyanagi, Yamaguchi, and Tahara)

Two-dimensional heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (2D HD-VSFG) spectroscopy is performed for an aqueous interface for the first time. The 2D HD-VSFG spectra in the OH stretch region are obtained from a positively-charged surfactant/water interface with isotopically diluted water ($\text{HOD}/\text{D}_2\text{O}$) to reveal the femtosecond vibrational dynamics of water at the charged interface. The 2D HD-VSFG spectrum is diagonally elongated immediately after the photoexcitation, clearly demonstrating inhomogeneity in the interfacial water. This elongation almost disappears at 300 fs owing to the spectral diffusion. Interestingly, the 2D HD-VSFG spectrum at the 0 fs shows an oppositely asymmetric shape to the corresponding 2D IR spectrum in bulk water: The bandwidth of the bleach signal gets narrower when the pump wavenumber becomes higher. This suggests that the dynamics and mechanism of the hydrogen bond rearrangement at the charged interface are significantly different from those in bulk water.

3. Quantitative estimate of the water surface pH using heterodyne-detected electronic sum frequency generation

(Yamaguchi, Kundu, Pratik Sen, and Tahara)

Most chemical reactions in water are very sensitive to pH. Many environmentally important chemical reactions are known to take place at the water surface (i.e. air/water interface). However, the pH of the water surface is still controversial. Spectroscopic experiments and theoretical calculations indicate that the water surface is more acidic than the bulk, whereas electrophoretic experiments provide a contrary view. We show that a novel nonlinear optical experiment with a surface-active pH indicator can quantitatively evaluate the pH of the water surface. The result clearly indicates that the pH of the water surface is lower than that of the bulk by 1.7. This is the first study to apply a principle of bulk pH measurements to the water surface, and therefore provides a reliable experimental estimate for the pH difference between the water surface and bulk. It is considered that the higher acidity of the water surface plays a key role in marine and atmospheric chemical reactions.

C. Study on the femtosecond – millisecond dynamics of complex molecular systems

1. A fluorescence study on the local environment of hydrogels: Double-network hydrogels having extraordinarily high mechanical strength and its constituent single-network hydrogels

(Hattori, Ishii, Taiki Tominaga, Yoshihito Osada, Tahara)

We studied the local environment of a novel double-network (DN) hydrogel and its constituent hydrogels, poly-(2-acrylamido-2-methylpropanesulfonic acid) (PAMPS) and poly-acrylamide (PAAm) gel, by fluorescence spectroscopy using a fluorescent probe. The steady-state spectra and lifetimes of the probe fluorescence in the three hydrogels were similar to those in bulk water, indicating that almost all the probe molecules reside in water pools that have local polarity similar to bulk water. The fluorescence anisotropy decay in PAMPS gel exhibits a bulk-like single exponential decay, indicating that the probe exists in sufficiently large water pools where the probe freely rotates, while it shows bi-exponential decays in PAAm and DN gels, suggesting that a part of the probe reside in confined water pools. This observation indicates that PAAm is entangled with PAMPS gel in DN gel realizing high mechanical strength, and PAAm plays the dominant role in forming the local water environment in DN gel.

2. Construction of an apparatus for subpicosecond time-resolved infrared absorption anisotropy measurements aiming at elucidation of water dynamics in hydrogels
(Hattori, Ishii, Taiki Tominaga, Yoshihito Osada, Tahara)

For direct elucidation of the dynamical property of water in the DN gel, it is necessary to measure the dynamics of water molecules itself. To this end, we constructed an apparatus for subpicosecond time-resolved infrared absorption anisotropy measurements, which enables us to evaluate the rotational motion of deuterated water molecules through the relaxation of anisotropy of the transition moment of the OD stretching mode. We prepared the pump and probe pulses at 4 μ m using a femtosecond Ti:sapphire amplifier system combined with an optical parametric amplifier and nonlinear frequency conversion. The polarization angle between these pulses was set to 45 degree and the pulses were overlapped in the sample (HOD in H₂O solution). The pump-induced change of the probe intensity was detected with a monochromator and an MCT detector. By putting a polarizer in the probe beam path after the sample, absorption anisotropy measurements were achieved.

3. Simple calibration of the counting-rate dependence of the timing shift of single photon avalanche diodes by photon interval analysis
(Otsu, Ishii, Tahara)

The counting-rate dependence of the temporal response of single photon avalanche diodes (SPADs) is a critical issue for the accurate determination of the fluorescence lifetime. In this study, the response of SPADs was examined with analyzing the time interval of the detected photons. The results clearly show that the shift of the detection timing causes the counting-rate dependence of the temporal response, and this timing shift is solely determined by the time interval from the preceding photon. We demonstrate that this timing instability is readily calibrated by utilizing the macrotime data taken with the time-tag mode that is implemented in the time-correlated single photon counting modules. By using this calibration method, it becomes possible to extend the two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy to the multi-focus regime so that we can drastically improve the detection sensitivity of microsecond dynamics of complex molecules through fluorescence lifetime measurements.

Principal Investigator

田原 太平 Tahei Tahara

Research Staff

竹内 佐年 Satoshi Takeuchi
大澤 正久 Masahisa Osawa
山口 祥一 Shoichi Yamaguchi
石井 邦彦 Kunihiko Ishii
二本柳 聡史 Satoshi Nihonyanagi
乙須 拓洋 Takuhiro Otsu
服部 達哉 Tatsuya Hattori
藤澤 知績 Tomotsumi Fujisawa

Zhengrong Wei

Subhadip Ghosh

Prashant Singh

Matthew Sartin

Aniruddha Adhikari

Anton Myalitsin

Chao-Han Cheng

Students

倉持 光 Hikaru Kuramochi
松崎 維信 Korenobu Matsuzaki
Achintya Kundu
Ashish Jindal
Sukanya Bhattacharya
Yu-Hsuan Huang

Assistant and Part-timer

大里 砂里 Sari Osato
原 薫 Kaoru Hara

Visiting Members

藤野 竜也 Tatsuya Fujino
細井 晴子 Haruko Hosoi
岩村 宗高 Munetaka Iwamura