

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. 生体分子のナノ秒からミリ秒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、最も先進的な線形・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

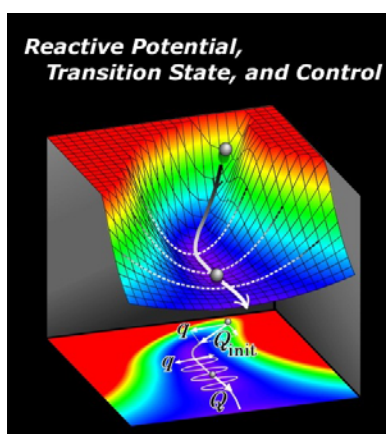


図. 超高速分光による化学反応の研究

1. 時間領域ラマン分光法によるイエロープロテイン (PYP) 光反応初期過程における超高速構造ダイナミクスの観測
(倉持、竹内、米澤、上久保、片岡、田原)

光受容タンパク質の高選択的、高効率な機能発現を支える精緻な分子機構を解明するうえで、機能中の構

研究年報

造変化を明らかにすることは蛋白質科学における究極の目標の一つといえる。しかしこれまで、タンパク質に特有の低波数振動を含む核の動きを超高速度時間スケールで捉えることが実験的に困難であったため、光吸収直後のダイナミクスにはまだ不明な点が残されてきた。そこで我々は、サブ7フェムト秒パルスを用いた独自の時間領域ラマン分光によりイエロープロテイン (PYP) の初期過程を研究し、その野生種および変異体の“瞬時的”な振動スペクトルを高感度で得ることに成功した。測定の結果、発色団の周辺の水素結合強度のマーカである 135 cm^{-1} バンドのラマン強度が数百フェムト秒以内に減衰することが分かった。これは、光吸収直後の励起状態で水素結合構造を変化させる分子間の構造再構成がすばやく起こることを示している。

2. フェムト秒時間分解吸収分光による銅(I)錯体の超高速度ダイナミクスに対する置換基効果の研究 (Hua、岩村、竹内、田原)

フェムト秒時間分解吸収分光を用いてビスフェナントロリン銅(I)錯体の MLCT 励起状態ダイナミクスを観測し、配位子の2位および9位の置換基による影響を検討した。測定の結果、 $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ は S_1 状態での flattening 構造変化 (0.2 ps) の後、1.8 ps の内部転換により S_0 状態に戻るのに対し、 $[\text{Cu}(\text{dpphen})_2]^+$ は flattening 構造変化 (0.9 ps) に引き続き項間交差 (11 ps) を起すことが分かった。以前に報告した $[\text{Cu}(\text{dmphen})_2]^+$ のデータを合わせて考察した結果、これら3つの銅錯体の緩和ダイナミクスの差異は、置換基の違いによる構造変化の大きさの違いとそれによる S_0/S_1 ポテンシャル曲面の近接度の違いによると結論した。本研究により、銅錯体の励起状態ダイナミクスに対する置換基効果をミクロな観点から統一的に理解することができた。

3. フェムト秒カーゲート蛍光分光によるアナベナセンサリロードプシンの励起状態ダイナミクスの研究 (田原進也、Wei、竹内、田原太平)

光受容体のように長寿命の中間体を生成する系の時間分解観測では、高繰り返し光源を用いた場合、中間体が複数回にわたり光励起されてしまう可能性がある。そこで我々は、1 kHz の繰り返し周波数の光源を用いたフェムト秒カーゲート蛍光分光測定装置を製作し、また、試料の循環速度を調整することにより、この多重励起の問題を解決した。この分光装置を用い、all-trans および 13-cis レチナールを発色団として有するアナベナセンサリロードプシン(AT-ASR および C-ASR)の時間分解蛍光スペクトルを測定した。その結果、AT-ASR の蛍光寿命は約 2 ピコ秒であったのに対し、C-ASR の蛍光寿命は約 200 フェムト秒と大幅に短いことが分かった。AT-ASR と C-ASR の蛍光寿命の明確な違いは、励起状態ダイナミクスが発色団構造に強く依存することを示している。

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

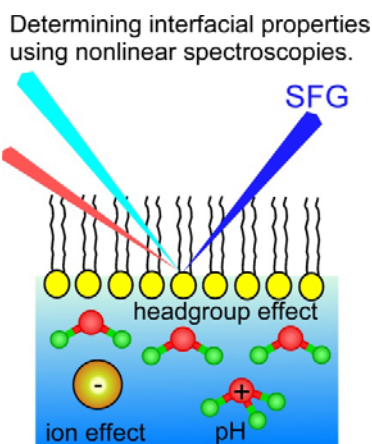


図. 和周波発生を用いたイオン性単分子膜/水界面の観測

1. 帯電界面における界面水の構造に及ぼす対イオン効果の研究 (二本柳、山口、田原)

ホフマイスター系列に代表される対イオン効果は種々の界面過程において重要である。我々はヘテロダイン検出振動和周波発生分光法を用いてイオン性単分子膜と水溶液の界面における水の構造に及ぼす対イオンの効果を調べた。正に帯電した界面においては界面水に由来するOHバンドの強度がホフマイスター系列に従って減少する。このことは、アニオンの界面への吸着力がホフマイスター系列を決定しているとする既存のモデルとよく一致する。それに対して、負に帯電した界面においては、界面水のOHバンドの強度ではなく、OHバンドの振動数つまり水素結合強度がホフマイスター系列に沿って変化することが初めて示された。これらの結果からアニオンとカチオンではホフマイスター系列を決定している機構が異なることを提案した。

2. ヘテロダイン検出電子和周波発生によるイオン性脂質と水の界面におけるpHの決定 (Kundu、山口、田原)

生体膜の界面近傍におけるpHは種々の生体膜過程において極めて重要であるが、これまでにはこれを決定する方法がなかった。我々は新しい界面選択的二次非線形光学測定をモデル生体膜である脂質単分子/水界面に適用することによって脂質界面のpHを決定した。この実験からイオン性脂質/水界面のpHはバルクのpHと大きく異なることが明らかとなった。脂質分子が正電荷を持つとき脂質界面のpHはバルクより高く、一方、脂質分子が負電荷を持つときは脂質界面のpHはバルクよりも低いことが示された。

3. 双イオン性脂質/水界面における水のモザイク配向の理論的研究 (李、二島、田原、杉田)

我々はこれまでにヘテロダイン検出振動和周波発生分光法を双イオン性脂質/水界面に適用し、正と負の二つのOH、すなわち水素上向きと、水素下向きの少なくとも二つの配向がこの界面に混在していることを実験的に示している。今回、杉田理論分子科学研究室と共同研究を行い、双イオン性脂質/水界面の分子構造を理論的に研究した。得られたMDシミュレーションの結果は、実験結果とよく一致しており、リン酸基周辺の水とコリン基周辺の水では配向が異なっていることが示された。

4. 気水界面における水分子の変角振動の研究 (Kundu、二本柳、山口、田原)

水界面の構造を分子レベルで理解することは水界面で起こる種々の化学過程を理解する上で非常に重要である。我々は独自に開発したヘテロダイン検出和周波発生分光法を用いて世界で初めて気水界面の変角振動領域の複素 $\chi^{(2)}$ スペクトルを実験的に観測することに成功した。得られた空気水界面の変角振動領域の $\chi^{(2)}$ スペクトルの虚部($\text{Im}\chi^{(2)}$)はブロードな一つの正のバンドを示し、変角領域に正負のバンドの存在を予測した理論計算による $\text{Im}\chi^{(2)}$ スペクトルと明らかに異なっていた。

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

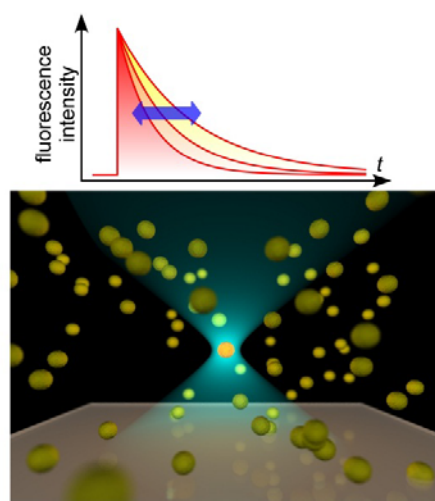


図. 新しい蛍光相関分光による複雑分子のダイナミクスの観測

1. 二次元蛍光寿命相関分光法によるシトクロムcのマイクロ秒構造ダイナミクスの研究 (乙須、石井、田原)

ペプチド鎖からなる蛋白質がどのようなメカニズムで特定の天然構造を取り、生体機能を発揮するのかという問題は蛋白質科学の最重要課題の一つである。この問題を調べるため、これまでに蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) を用いた一分子計測が行われ、蛋白質構造の不均一性やサブミリ秒～ミリ秒の時間スケールの構造間遷移ダイナミクスが調べられてきた。一方、マイクロ秒の時間領域は蛋白質折れ畳みの初期過程に対応しており、またMDシミュレーションと実験の直接比較が可能であることから、分子レベルでのダイナミクス理解において重要な時間領域である。しかしながら従来の一分子計測法ではマイクロ秒領域のダイナミクスの観測は困難であった。本研究では我々が時間分解能の向上を目指し独自に開発した二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) を蛋白質ダイナミクスの問題に初めて適用した。2D-FLCSにより酸変性条件下でのシトクロムcの構造ダイナミクスの計測を行った結果、3つの構造アンサンブルと各アンサンブル内でのマイクロ秒オーダーの遷移を示す相関信号が得られた。この結果は折れ畳みの自由エネルギー地形におけるマイクロ秒ダイナミクスの重要性を示唆するものである。

2. 蛍光相関分光法におけるアフターパルス効果の補正法の開発 (石井、田原)

蛍光相関分光法 (FCS) は、生体分子の自発的な構造揺らぎをマイクロ秒の時間スケールで観測できる強力な手法である。FCSでは蛍光検出器として多くの場合光子計数型アバランシェフォトダイオード (APD) が用いられる。しかし、APDを用いたFCS測定はサブマイクロ秒から数マイクロ秒の時間領域においてアフターパルスと呼ばれる偽の信号の影響を受けることが知られている。本研究ではこの問題を解決するために、蛍光光子の時系列データの時間反転対称性を時間相関光子計数法 (TCSPC) を用いて解析し、相関信号に対するアフターパルスの寄与を定量する方法を開発した。これを以前に報告された方法と比較する実験を行った結果、特に不均一な混合物からなる試料に対して、従来法で見られた系統的な誤差が解消され、より正確な相関関数が得られることが分かった。これにより比較的単純な光学系でサブマイクロ秒までの時間領域の正確な相関計測を行えるようになるため、複雑な生体分子の速いダイナミクスの解明に向けたFCSの幅広い応用につながると期待される。

3. 二次元蛍光寿命相関分光法の測定時間短縮に向けた多焦点共焦点顕微鏡システムの開発 (乙須、石井、田原)

我々が最近開発した二次元蛍光寿命相関分光法 (2D-FLCS) は、蛋白質をはじめとする生体高分子の複雑なダイナミクスを高い時間分解能で定量的に解析することができる新しい手法である。しかしながら、原理的に本手法ではきわめて多くの光子データとそのための長時間測定が必要とされる。本研究では多焦点共焦点顕微鏡システムの開発を行い、同等の光子データを複数の焦点領域から同時取得することによる測定時間の短縮を試みた。本装置では励起レーザー光をビームスプリッターを用いて7つに分割し、対物レンズの無限遠補正光学系を利用して試料上に7つの等価な焦点を形成する。各焦点の像をファイバーバンドルの入射面上に結像し、各ファイバーを別の光子検出器に接続することで、1台の顕微鏡を用いて7回の測定を同時に行う。構築した装置を用いて通常のFCSと2D-FLCSの実験を行った結果、いずれの場合も期待通りのデータを得ることができた。本装置により、2D-FLCSの測定時間を単焦点系の1/7に短縮することが可能となった。

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 molecules 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. Probing Ultrafast Photoreceptive Response inside Photoactive Yellow Protein (PYP) with Time-Domain Raman
(Kuramochi, Takeuchi, Yonezawa, Kamikubo, Kataoka, Tahara)

Unveiling nuclear motions of photoreceptor proteins in action is an ultimate goal in protein science to elucidate their elaborate mechanism achieving optimal selectivity and efficiency. Yet the initial events immediately after photoabsorption remain unclear because of experimental challenges in monitoring nuclear rearrangements on ultrafast time scales, including protein-specific low-frequency motions. Using time-domain Raman probing with sub-7-fs pulses, we obtained snapshot vibrational spectra of photoactive yellow protein and its mutant with unprecedented sensitivity. Our data show a drastic intensity drop of the excited-state marker band at 135 cm^{-1} within a few hundred femtoseconds,

reflecting a weakening of the hydrogen bond that anchors the chromophore.

2. Femtosecond absorption study of the substituent effect on the MLCT excited-state dynamics of Cu(I) complexes

(Hua, Iwamura, Takeuchi, Tahara)

The substituent effect on the excited-state dynamics of bis-diimine Cu(I) complexes was investigated by femtosecond time-resolved absorption spectroscopy with the $S_1 \leftarrow S_0$ metal-to-ligand charge transfer (MLCT) photoexcitation. The time-resolved absorption of $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ (phen = 1,10-phenanthroline) showed a slight intensity increase of the S_1 absorption with a time-constant of 0.1 – 0.2 ps, reflecting the flattening distortion occurring in the S_1 state. The transient absorption of the ‘flattened’ S_1 state was clearly observed, although its fluorescence was not observed in the previous fluorescence up-conversion study in the visible region. The flattened S_1 state decayed with a time constant of ~2 ps, and the S_0 bleaching recovered accordingly. This clarifies that the S_1 state of $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ is predominantly relaxed to the S_0 state by internal conversion. The time-resolved absorption of $[\text{Cu}(\text{dpphen})_2]^+$ (dpphen = 2,9-diphenyl-1,10-phenanthroline) showed a 0.9-ps intensity increase of the S_1 absorption due to the flattening distortion, and then exhibited a 11-ps spectral change due to the intersystem crossing. This excited-state dynamics of $[\text{Cu}(\text{dpphen})_2]^+$ is very similar to that of $[\text{Cu}(\text{dmphen})_2]^+$ (dmphen = 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline). In the ultrafast pump-probe measurements with 35-fs time resolution, $[\text{Cu}(\text{phen})_2]^+$ and $[\text{Cu}(\text{dpphen})_2]^+$ exhibited oscillation due to the nuclear wavepacket motions of the initial S_1 state, and the oscillation was damped as the structural change took place. This indicates that the initial S_1 states have well-defined vibrational structures and that the vibrational coherence is retained in their short lifetimes. The present time-resolved absorption study, together with the previous time-resolved fluorescence study, provides a unified view for the ultrafast dynamics of the MLCT excited state of the Cu(I) complexes.

3. Femtosecond Kerr-gate fluorescence spectroscopic study of the primary photoreaction dynamics of Anabaena sensory rhodopsin

(S. Tahara, Wei, Takeuchi, T. Tahara)

Time-resolved fluorescence measurement with high repetition-rate lasers has been often employed for studies of the excited-state dynamics. However, the scheme is not suitable for molecular systems that involve long-lived intermediates, such as photoreceptor proteins, because the intermediate can be re-excited by the succeeding pulses. To solve this problem, we constructed a femtosecond Kerr-gate fluorescence setup using a 1-kHz repetition-rate laser. Using this setup, we measured time-resolved fluorescence spectra of Anabaena sensory rhodopsins (ASR) having all-trans (AT-ASR) and 13-cis (C-ASR) retinal chromophores. It was found that the fluorescence lifetime of AT-ASR is about 2 ps, whereas that of C-ASR is as short as 200 fs. This large difference in lifetime indicates that the excited-state dynamics of ASR strongly depends on the conformation of the chromophore.

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

1. Counterion Effect on Interfacial Water at Charged Interfaces

(Nihonyanagi, Yamaguchi, Tahara)

Specific counterion effects represented by Hofmeister series are important for a variety of phenomena such as protein precipitations, surface tensions of electrolytes solutions, phase transitions of surfactants, etc. We applied heterodyne-detected vibrational sum-frequency generation spectroscopy to study the counter ion effect on the interfacial water at charged interfaces and discussed the observed effect with relevance to the Hofmeister series. Experiments were carried out for model systems of positively charged cetyltrimethylammonium monolayer/ electrolyte solution interface and negatively

charged dodecylsulfate monolayer/electrolyte interface. At the positively charged interface, the intensity of the OH band of the interfacial water decreases in the order of the Hofmeister series, suggesting that the adsorbability of halide anions onto the interface determines the Hofmeister order. At the negatively charged interfaces, on the other hand, the OH band intensity does not depend significantly on the counter cation whereas variation in the hydrogen bond strength of the interfacial water is well correlated with the Hofmeister order of the cation effect. These results provide new insights into the molecular level mechanisms of anionic and cationic Hofmeister effects.

2. Evaluation of pH at Charged Lipid/Water Interfaces by Heterodyne-Detected Electronic Sum Frequency Generation (Kundu, Yamaguchi, Tahara)

Although the interface pH at a biological membrane is important for biological processes at the membrane, there has been no systematic study to evaluate it. We apply novel interface-selective nonlinear spectroscopy to the evaluation of the pH at model biological membranes (lipid/water interfaces). It is clearly shown that the pH at the charged lipid/water interfaces is substantially deviated from the bulk pH. The pH at the lipid/water interface is higher than that in the bulk when the head group of the lipid is positively charged, whereas the pH at the lipid/water interface is lower when the lipid has a negatively charged head group.

3. Mosaic of Water Orientation Structures at a Neutral Zwitterionic Lipid/Water Interface Revealed by Molecular Dynamics Simulations (Re, Nishima, Tahara, Sugita)

Ordering of water structures near the surface of biological membranes has been recently extensively studied using interface-selective techniques like vibrational sum frequency generation (VSFG) spectroscopy. The detailed structures of interface water have emerged for charged lipids, but those for neutral zwitterionic lipids remain obscure. Previously, our group has shown that there are three distinct water species: phosphate hydrating water, choline hydrating water and water in hydrophobic region. We collaborated with Theoretical Molecular Science Lab and analyze an all-atom molecular dynamics (MD) trajectory of a hydrated 1-palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine bilayer to characterize the orientation of interface waters in different chemical environments. The structure and dynamics of interfacial waters strongly depend on both their vertical position along the bilayer normal as well as vicinal lipid charged groups. Water orientation in the vicinity of phosphate groups is opposite to that around choline groups. The results are consistent with observed VSFG spectra and demonstrate that a mosaic of water orientation structures exists on the surface of a neutral zwitterionic phospholipid bilayer, reflecting rapid water exchange and the influence of local chemical environments.

4. Study of Water Bend Mode at the Neat Water Surface (Kundu, Nihonyanagi, Yamaguchi, Tahara)

Molecular level elucidation of hydrogen bonding network structure at the air/water interface is of essential importance for many fundamental processes. In this work, we observed, for the first time, the imaginary part of 2nd-order nonlinear susceptibility ($\text{Im}\chi^{(2)}$) spectrum of water in the bend frequency region which was experimentally obtained by the use of heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy. The observed $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum shows only one positive peak around 1660 cm^{-1} , contradicting a former theoretical prediction. The peak frequency of the interfacial bend mode is close to that in the IR absorption spectrum of bulk water, indicating that the observed bend mode in the $\text{Im}\chi^{(2)}$ spectrum is due to hydrogen-bonded water at the surface.

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

1. Observation of microsecond structural dynamics of cytochrome c by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (Otosu, Ishii, Tahara)

How polypeptide chains acquire specific conformations to realize unique biological functions is a central problem of protein science. Single-molecule spectroscopy, combined with fluorescence resonance energy transfer, is utilized to study the conformational heterogeneity and the state-to-state transition dynamics of proteins on the submillisecond to second timescales. However, observation of the dynamics on the microsecond timescale is still very challenging. This timescale is important because the elementary processes of protein dynamics take place and direct comparison between experiment and simulation is possible. In this study, we applied a newly developed single-molecule technique, two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy, to the microsecond structural dynamics of a protein, cytochrome c. As a result, three conformational ensembles and the microsecond transitions in each ensemble are observed in the correlation signal, demonstrating the importance of quantifying microsecond dynamics of proteins on the folding free energy landscape.

2. Correction of the afterpulsing effect in fluorescence correlation spectroscopy using time symmetry analysis (Ishii, Tahara)

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) is a powerful method for observing spontaneous fluctuations of biomolecules in the microsecond time scale. In FCS, a photon-counting avalanche photodiode (APD) is usually employed for detecting fluorescence signals from the sample. It is known that APDs have a problem in FCS measurements in submicro- to early microsecond delay time. Namely, the signal pulses are occasionally followed by artificial signals generated within microseconds after the true signal, which are called afterpulses. In this work, we have developed a numerical procedure that eliminates the afterpulsing effect in correlation signals by analyzing the time reversal asymmetry of the photon data recorded with a time-correlated single photon counting device. It was revealed that the afterpulsing effect was completely eliminated using the present method both in a pure dye solution and a mixture solution of two dyes with different fluorescence lifetimes, whereas the previous method significantly underestimated the correlation amplitude of the dye mixture solution. The method introduced in this work enables precise correlation measurements down to the submicrosecond time region with a relatively simple optical setup and will facilitate various applications of FCS toward elucidation of fast spontaneous dynamics of complex biomolecules.

3. Development of multi-focus confocal microscope for high-throughput measurement in two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (Otosu, Ishii, Tahara)

We have recently developed the two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (2D FLCS) which can analyze complex dynamics of biopolymers with an unprecedented time resolution. However, when 2D FLCS is applied to microsecond molecular dynamics, one needs to collect a large number of photons that requires a lengthy measurement. In order to reduce the measurement time of 2D FLCS, we have developed a multifocus confocal microscope system. In this system, we use beamsplitters to split the excitation laser beam into seven equivalent parts and make seven excitation spots on the sample. By imaging these spots onto the entrance aperture of a fiber bundle and detecting the signal from each fiber separately, we can perform seven independent measurements simultaneously. The capability of this system was tested by performing the conventional FCS and 2D FLCS. The results showed that this multifocus system is applicable in both cases, and the data accumulation can be seven times faster than a single-focus system.

Principal Investigator

田原 太平 Tahei Tahara

Research Staff

大澤 正久 Masahisa Osawa
竹内 佐年 Satoshi Takeuchi
石井 邦彦 Kunihiko Ishii
二本柳 聡史 Satoshi Nihonyanagi
乙須 拓洋 Takuhiro Otsu
藤澤 知績 Tomotsumi Fujisawa
倉持 光 Hikaru Kuramochi
井上 賢一 Kenichi Inoue
日下 良二 Ryoji Kusaka
浦島 周平 Shuhei Urashima
坂口 美幸 Miyuki Sakaguchi

Matthew Sartin

Anton Myalitsin

Bidyut Sarkar

Aniruddha Adhikari

Chao-Han Cheng

Achintya Kundu

Cassandra Henderson

Students

田原 進也 Shinya Tahara
菊地 あゆみ Ayumi Kikuchi

Assistant and Part-timer

大里 砂里 Sari Osato
加藤 智子 Tomoko Kato

Visiting Members

藤野 竜也 Tatsuya Fujino
細井 晴子 Haruko Hosoi
岩村 宗高 Munetaka Iwamura
山口 祥一 Shoichi Yamaguchi