

## 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. 分子の核運動を実時間で観る
2. フェムト～ミリ秒で進む複雑な分子過程を理解する
3. 新しい分光計測を開発して、界面など不均一な系を調べる

### 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、複雑分子系、界面、光化学

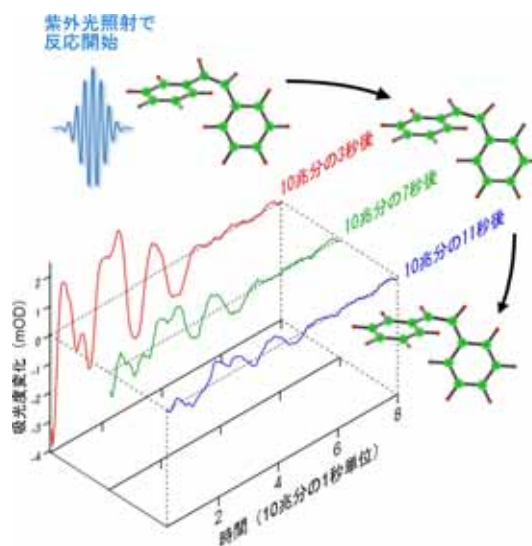
### 研究目的

当研究室では極限的な分子分光実験を行い、凝縮相複雑系のダイナミクスを研究する。凝縮相の分子ダイナミクスを解明するためには、分子の電子状態・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と散逸を総合的に理解しなければならない。このことを念頭におき、様々な最先端の線形・非線形分光手法を駆使し、独自の実験方法論を開発し、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る。具体的には、超高速分光法をベースとして、(1)極短フェムト秒パルスを用いた分子の核運動の実時間観測と制御、(2)分子の電子状態および振動状態に対するフェムト～ミリ秒時間分解分光による凝縮相複雑分子系ダイナミクスの解明、(3)新しい線形/非線形分光を用いた界面をはじめとする不均一複雑系の研究、を行う。

#### A. 極短フェムト秒パルスを用いた分子の核運動の実時間観測と制御

##### 1. シススチルベンの超高速光異性化反応における構造変化の実時間追跡 (竹内, 田原)

化学反応における分子の構造変化 (核の移動) は分子振動と同程度の時間スケールで進行する。分子振動の時間スケールはフェムト秒であって、現在の先進的な超短パルスレーザーを用いれば直接調べることができる時間領域である。しかしながら、このような反応中の分子の連続的な核の動きが観測された例はほとんど無く、通常の研究においては準安定 (電子励起) 状態と、その生成・消滅が観測されているだけである。このような状況のために、われわれの化学反応に対する理解はほとんどの場合 “過度に単純化された” 反応座標の描像にとどまっている。この限界を超えるため、われわれは時間分解インパルスラマン散乱分光を用いて、シススチルベンの超高速光異性化反応を研究した。得られたインパルスラマンスペクトル (時間領域で観測された分光信号の振動成分のフーリエ変換スペクトル) には  $240\text{ cm}^{-1}$  の振動数をもつ特徴的な最低電子励起一重項 ( $S_1$ ) 状態の核運動が観測された。興味深いことに、この核運動の重心振動数は、光励起後の遅延時間  $\Delta T$  とともに  $239\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta T=0.3\text{ ps}$ )  $\rightarrow 224\text{ cm}^{-1}$  ( $1.2\text{ ps}$ )  $\rightarrow 215\text{ cm}^{-1}$  ( $2\text{ ps}$ ) と顕著な低波数シフトを示した。溶媒をヘキサデカンからメタノールに変えると光異性化反応の速度は約2.7倍大きくなる ( $0.77\text{ ps}^{-1} \rightarrow 2.08\text{ ps}^{-1}$ ) が、これに伴ってこの核運動の振動数シフトの速度も同程度速くなった ( $14\text{ cm}^{-1}/\text{ps} \rightarrow 27\text{ cm}^{-1}/\text{ps}$ )。このことは、実験で観測された  $240\text{ cm}^{-1}$  の核運動の振動数変化はシススチルベン  $S_1$  状態の異性化に伴う構造変化によって生じていることを強く示唆している。観測された振動数変化と分子の構造変化の



超高速反応する分子の構造変化の実時間追跡

関係を明らかにするために、密度汎関数法(DFT)および時間依存密度汎関数法(TDDFT)を用いて励起状態のポテンシャル曲面と反応座標にそった瞬間構造での分子の振動構造を調べた。計算結果は $S_1$ 状態での構造変化には2つのフェーズがあることを示していた。まず光励起( $\pi\pi^*$ 励起)直後には中央のCC二重結合が伸長するとともにそれに結合する2つの水素が面外に動き始める。その後、その2つの水素は互いに逆向きに大きく移動し続けることによって中央のCC結合のねじれが実現される。このように量子化学計算によって、シススチルベン $S_1$ 状態の異性化に伴うCC結合のねじれは、フェニル基の大きな運動を伴わない、主として中央のCC結合に結合する2つの水素の面外方向への動きによって実現されることがわかった。この構造変化の途中に現れる瞬間構造について振動数を計算したところ、 $\nu_{33}$ モードが実験と良く一致する振動数変化を示すことがわかった。この一致は、時間分解インパルスラマン分光の実験では、核波束運動の振動数変化を通して異性化とともに連続的に変化していく分子構造を追跡できていることを示している。

## 2. シススチルベン $S_1$ 吸収で観測される量子ビートの機構と非コンドン効果(石井、竹内、田原)

シススチルベンの超高速ポンプ-プローブ分光実験では、光励起直後に $S_n \leftarrow S_1$ 吸収に量子ビートが観測される。この量子ビートが現れる機構を調べるため、プローブ光を波長分散して検出する実験を行った。その結果、シススチルベン $S_1$ 状態の量子ビートは $S_n \leftarrow S_1$ 吸収の全波長域にわたって、同程度の振幅と同じ位相で観測されることがわかった。これによって、この量子ビートは $S_n \leftarrow S_1$ の遷移強度の変調の結果として観測されていることが判明した。実効的線形応答理論に基づいた半定量的シミュレーションを行い、遷移モーメントに核座標依存性を導入したHerzberg-Teller機構を新たに考えることで、実験と同様に過渡吸収のスペクトル全域にわたって同程度の振幅と同じ位相で現れる量子ビートを再現することができた。これによって、シススチルベン $S_1$ 状態の量子ビートは、 $S_n \leftarrow S_1$ 遷移モーメントが核座標に依存すること(非コンドン効果)によって現れていることがわかった。この非コンドン効果は、 $S_n$ 状態が近接する他の高い電子励起状態と強く振電相互作用することによって生じていると結論された。本研究は、高い電子励起状態への遷移が係わる分光実験の信号の解析には、非コンドン効果を考慮する必要があることを強く示唆している。

## 3. シススチルベンの蛍光スペクトルの再検討と反応性 $S_1$ 状態の帰属(中村、竹内、田原)

蛍光スペクトルは分子の最も基本的な分光情報の一つである。われわれは、不純物として試料に微量に含まれるトランス体からの信号を注意深く分離することによって、シススチルベンの定常蛍光スペクトルを測定しなおした。得られた“純粋な”シススチルベンの蛍光は420 nmに極大をもち、700 nmまで裾が広がった幅の広いスペクトルを示した。また、不純物として含まれるトランス体からの蛍光の強度と比較することによってシススチルベンの蛍光の振動子強度を求め、0.17という値を得た。この振動子強度の値は、シススチルベンの $S_1$ 状態が、基底状態からみて光学遷移許容状態であることを示している。この結果は、最近の量子化学計算によって生じた $S_1$ 状態の帰属に関する混乱に答えを与えるものである。

## B. 電子状態および振動状態に対するフェムト~ミリ秒時間分解分光による凝縮相複雑分子系ダイナミクスの解明

### 4. 超高速ポンプ-プローブ分光によるハロロドプシンの反応初期光異性化ダイナミクスのハロゲン依存性の検討(中村、竹内、田原)

ハロロドプシンはHaloarchael細胞膜において光駆動塩素イオンポンプを行うタンパク質である。このタンパク質においては塩素イオンはレチナル発色団の側に位置し、光励起によって誘起される全トランス 13シス異性化によって塩素イオンのポンプが行われる。我々は塩素イオン、臭素イオン、ヨウ素イオンを含む*Natronomonas pharaonis* ハロロドプシン( $pHR\text{-Cl}$ 、 $pHR\text{-Br}$ 、 $pHR\text{-I}$ )の反応初期ダイナミクスを30 fsの時間分解能を持つ超高速ポンプ-プローブ分光によって研究した。 $S_n \leftarrow S_1$ 過渡吸収、基底状態の退色、K中間体(13シス体)、誘導放出に由来する信号が観測された。すでにある報告と一致して、反応初期に3つのダイナミクスが観測された。第一のダイナミクスはフランクコンドン状態から反応性 $S_1$ 状態( $S_{1r}$ )と非反応性 $S_1$ 状態( $S_{1nr}$ )に分岐する過程に帰属される。今回の高い時間分解能の実験によって、この分岐過程の時定数( $\tau_1$ )が50 fs程度であることが判明した。第二のダイナミクスは、できた $S_{1r}$ 状態から13シス体の電子基底状態が生成する過程で、この時定数( $\tau_2$ )は顕著なハロゲンイオン依存性を示した( $pHR\text{-Cl}$ 、 $pHR\text{-Br}$ 、 $pHR\text{-I}$ の $\tau_2$ はそれぞれ1.4, 1.6, and 2.2 ps)。また相対的異性化収率を20 psの信号強度より求めたところ、

この収率もハロゲンによって異なっていた( $p\text{HR}\cdot\text{Cl}$ 、 $p\text{HR}\cdot\text{Br}$ 、 $p\text{HR}\cdot\text{I}$ の相対異性化収率はそれぞれ1.00、1.14、1.35)。これによって、異性化ダイナミクスを加速するハロゲンほど異性化収率が低いことが判明した。この実験結果は、 $S_1$ ポテンシャル曲面では異性化反応座標にそった方向にエネルギー障壁が存在すると考えることで説明ができる。すなわち、バクテリオロドプシンなどで行われている三準位モデルが、ハロドプシンの場合にも適当であることを意味している。われわれは、三準位モデルに基づいて、異性化速度は $S_1$ ポテンシャル曲面のエネルギー障壁の高さによって、また異性化量子収率はフランクコンドン状態と円錐交差点での分岐比によって決まっていると結論した。 $S_1^{\text{nr}}$ 状態の内部転換に帰属できる第三のダイナミクスの時定数( $\tau_3$ )もハロゲン依存性を示した( $p\text{HR}\cdot\text{Cl}$ 、 $p\text{HR}\cdot\text{Br}$ 、 $p\text{HR}\cdot\text{I}$ でそれぞれ4.5、4.6、6.3 ps)。これは $S_1^{\text{nr}}$ 状態の失活も何らかの構造変化を伴っている可能性があることを示している。

#### 5. 蛍光タンパク質enhanced GFPの 隠れた 電子励起状態の検出 (細井、山口、田原)

緑色蛍光タンパク質(GFP)とその変異体であるSapphire-GFP(T203D)と enhanced GFP(S65T/F64L)、およびそれらの発色団のモデル分子である4'-hydroxybenzylidene-2,3-dimethylimidazolinone(HBDI)の精度の高い二光子吸収スペクトルをマルチプレクス二光子吸収分光法を用いて測定した。enhanced GFPとHBDIのアニオン種の二光子吸収スペクトルは、一光子吸収スペクトルの最低エネルギーの吸収帯と比べて顕著に高エネルギー側にシフトしていた。この結果は、GFPの発色団のアニオン種の最低電子励起一重項( $S_1$ )状態のエネルギー近傍に 隠れた 電子励起状態が存在していることを示唆している。この状態の存在が、良く知られているGFPの二光子吸収スペクトルと二光子励起蛍光スペクトルのブルーシフト(一光子吸収スペクトルより青色側に現れること)の原因であると考えられる。

#### C. 新しい線形/非線形分光を用いた界面をはじめとする不均一複雑系の研究

#### 6. ヘテロダイン検出電子和周波分光の開発と界面分子の上向き・下向き配向の直接観測 (山口、田原)

我々は新しい界面選択的偶数次非線形分光を開発し、これによって界面科学のフロンティアを切り拓こうとしている。これまでに界面分子の電子状態に対する新しい分光法として、溶液の吸収スペクトルに匹敵する高い質で界面分子の電子スペクトルを測定できるマルチプレクス電子和周波(ESFG)分光法を開発した。しかしながら、このESFG法では新しい波長に発生する信号光の強度を測定するため(ホモダイン検出)分子情報を直接反映する二次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ そのものではなく、その自乗 $|\chi^{(2)}|^2$ を観測しており、その結果分光信号に含まれている分子の情報を完全に得ることは出来ていなかった。このホモダイン検出の欠点は、信号光を他の標準光(局部発振器、LO光)と位相を確定させて混合させる、いわゆるヘテロダイン検出を行うことで解消できる。そこで、これまでのESFG分光の光学配置をタンデムに拡張し、一つの試料点に測定試料(液体界面)を、また他方に強い和周波光を発生するGaAs基板を置き、その両者から発生する和周波を適当な時間差をつけて分光器内で干渉させることによって、電子和周波のヘテロダイン検出を初めて実現した。このヘテロダイン検出電子和周波(HD-ESFG)分光の開発によって、約100 nmというきわめて広い波長範囲で一度に $\chi^{(2)}$ スペクトルの実部と虚部を測定することができるようになった。 $\chi^{(2)}$ スペクトルには、分子の絶対配向に関する情報を与えることができるという特長がある。そこで、空気/ガラス界面のp-ニトロアニリン(PNA)とN,N'-ジエチル-p-ニトロアニリン(DEPNA)の $\chi^{(2)}$ スペクトル測定を行ったところ、PNAとDEPNAでは、 $\chi^{(2)}$ の虚部のスペクトルが逆の符号をもって現れることがわかった。このことは、PNAではアミノ基がガラス側に、逆にDEPNAではジエチルアミノ基が空気側にと、逆の配向をとっていることを端的に示している。PNAとDEPNAは似た構造をもつ分子であるが、アミノ基のファインな修飾によって界面における分子の配向が大きく変化することが分光学的に直接的に示された。

#### 7. 液体界面での超高速ダイナミクスを研究するためのフェムト秒時間分解電子和周波分光の開発 (関口、山口、田原)

我々は液体界面での超高速ダイナミクスを研究するために、新しい界面選択的時間分解非線形分光であるフェムト秒時間分解電子和周波(TR-ESFG)分光を開発した。従来から行われている時間分解二倍波発生分光に対するこの方法の大きな優位性は、ブロードバンド光とマルチチャンネル検出を組み合わせることで過渡電子和周波信号のマルチプレクス測定を行うことによって、時間分解した“スペクトル情報”を得ることができるという点にある。TR-ESFG法を用いて、空気/水界面での色素分子ローダミン800(R800)の光化学/

物理過程を、時間分解吸収分光で溶液分子のダイナミクスを研究するのと同じ程度の高い水準で研究した。得られた時間分解ESFGスペクトルによって、空気/水界面でのR800の超高速ダイナミクスは3つの特徴的な時定数(0.32 ps、6.4 ps、0.85 ns)を示すことがわかった。このうち0.32psの時定数は光励起によって生成するR800二量体のS<sub>1</sub>状態の寿命に対応する。二量体S<sub>1</sub>状態は単量体のS<sub>1</sub>状態とS<sub>0</sub>状態に解離して消滅するが、この0.32psという時定数はバルク水中の対応する時定数に比べて約1/10になっている。6.4 ps、0.85 nsの2つの時定数は解離反応によって生成した単量体のS<sub>1</sub>状態の空気/水界面での寿命(したがって、S<sub>0</sub>状態の回復の時定数でもある)に対応しているが、0.85 nsはバルク水中の単量体のS<sub>1</sub>状態の寿命とほぼ一致するのに対し、界面で観測された6.4 psのダイナミクスに対応するものはバルク水中では見られない。この実験によって、液体界面の超高速ダイナミクスを研究手段としてTR-ESFG分光法が高いポテンシャルを持っていることが示された。

#### 8. 電子和周波分光によるタンパク質の表面変性の研究(セン、山口、田原)

空気/水界面ではタンパク質の疎水性部分は空気側へ、親水性部分は水側へ向こうとするため、タンパク質のアンフォールディングが起こり、変性する。この現象、すなわち表面変性、は古くから知られた現象である。バルク中でのタンパク質の構造解析がきわめて精力的に行われているのに対して、このような界面でのタンパク質の状態のその場観察は、適当な観測手段がなかったためいままで行われた例がない。我々はESFG分光法を用いて、ヘムタンパクの一つであるチトクローム c を例にとり、空気/水界面および空気/ガラス界面におけるタンパク質の電子スペクトル測定を行った。チトクローム c のヘムのSoret帯の吸収波長はヘム周辺の構造に鋭敏であり、自然状態では410nmに、変性すると394nmにピークが現れるということが知られている。ESFG分光で測定した空気と中性の水の界面(pH=7.0)にあるチトクローム c の電子スペクトルは自然状態のものとも変性状態のものとも異なってきわめて幅が広く、そのピークも自然状態の極大位置と変性状態の極大位置の中間に現れた。このESFGスペクトルは、空気/水界面においてチトクローム c がいろいろなコンフォメーションの混合物として存在していることを示している。このESFGスペクトルは、空気と酸性状態の水(pH=2.0)との界面でもほとんど変わらなかった。これとは対照的に、空気/ガラス界面のチトクローム c のESFGスペクトルは自然状態のスペクトルとほとんど同じで、空気/ガラス界面ではチトクローム c は本来のコンフォメーションを保っていることが判明した。

#### 9. フェムト秒表面プラズモン共鳴を利用した金薄膜のコヒーレント音響フォノンの観測(山口、田原)

新しく開発したフェムト秒ポンプ-プローブ表面プラズモン共鳴(SPR)法を用いて、金薄膜のコヒーレントフォノンの観測を行った。実験では、フェムト秒光パルスの照射によってプリズムに蒸着した金薄膜にコヒーレント音響フォノンを誘起し、これをSPR条件を満たすプローブパルスの反射率の変調として時間領域で検出した。この実験では、35GHzの縦波音響フォノンの基本波のみならず、4倍音までのフォノンが観測された。観測されたコヒーレント音響フォノンは金薄膜中で定在波を立てている縦波音響フォノンに帰属された。

-----  
**Key Sentence :**

1. Observing nuclear motion of molecules in real time.
2. Elucidating complex molecular processes occurring in the femto-millisecond time scale.
3. Examining inhomogeneous systems including interfaces by new advanced spectroscopy

**Key Word :**

Ultrafast spectroscopy, nonlinear spectroscopy, advanced spectroscopy, reaction dynamics, complex molecular systems, interface, photochemistry

**Purpose of Research :**

We study the dynamics of 'complicated systems' using advanced molecular spectroscopy. Especially, we are now focusing on spectroscopy of condensed-phase molecules using ultrashort optical pulses. Current research projects are followings: (1) Observation and control of the wavepacket motion of the condensed-phase molecules using ultrashort optical pulses, (2) femto-millisecond spectroscopic study of the photochemical dynamics of the complicated systems, and (3) linear/nonlinear spectroscopic study of

heterogeneous systems. In the course of these researches, we develop new methods in molecular spectroscopy.

#### A. Observation and control of the wavepacket motion (vibrational coherence) of the condensed-phase molecules using ultrashort optical pulses

##### 1. Spectroscopic tracking of structural evolution in ultrafast stilbene photoisomerization (Takeuchi, Tahara)

Molecular rearrangements in chemical reactions occur on a timescale comparable to nuclear vibrational periods, i.e., from 10 fs to 1 ps. This time scale is now accessible with advanced ultrafast spectroscopy, but, in almost all studies, we only observe structures in stationary (excited) states and the population transfer from one to the other. Continuous changes of the molecular structure are seldom observed, especially for large polyatomic molecules. This situation limits our understanding on chemical reaction to an oversimplified reaction coordinate that neglects global motions across the molecular framework. To overcome this limit, we carried out time-resolved impulsive stimulated Raman scattering (TR-ISRS) measurements of  $S_1$  cis-stilbene that undergoes ultrafast photoisomerization. The ISRS spectra (i.e., Fourier transform of the oscillation observed in the time domain) were recorded at three  $\Delta T$  delays in hexadecane. At  $\Delta T = 0.3$  ps, a broad band appears around  $240\text{ cm}^{-1}$ . This predominant  $240\text{-cm}^{-1}$  band is characteristic of  $S_1$  cis-stilbene as an only band showing a large Raman intensity in the  $200 - 300\text{-cm}^{-1}$  region. The center frequency of the  $240\text{-cm}^{-1}$  motion significantly downshifts with increasing  $\Delta T$  delay, diminishing from  $239\text{ cm}^{-1}$  ( $\Delta T = 0.3$  ps)  $\rightarrow 224\text{ cm}^{-1}$  (1.2 ps)  $\rightarrow 215\text{ cm}^{-1}$  (2 ps). With the change of solvent from hexadecane to methanol, the isomerization rate increased by a factor of 2.7 (0.77 to  $2.08\text{ ps}^{-1}$ ), and the rate of the frequency downshift also nearly doubled (14 vs.  $27\text{ cm}^{-1}/\text{ps}$ ). This correlation confirms that the frequency downshift of the  $240\text{-cm}^{-1}$  mode arises from the structural evolution relevant to the isomerization of  $S_1$  cis-stilbene. To associate the experimental observation with actual structural changes, we calculated the PES and vibrational structure by DFT and time-dependent DFT (TDDFT). The calculation indicated the biphasic structural evolution of the  $S_1$  state: The initial structural change immediately after photoexcitation is dominated by a prompt stretch of the central C=C bond due to  $\pi\pi^*$  excitation and an out-of-plane motion of the two ethylenic hydrogens. In the later time, the two ethylenic hydrogens gradually move in opposite directions to a greater extent so that the twisting angle of the C=C bond increases. The significant twisting around the C=C bond is achieved mainly by the out-of-plane motion of the ethylenic hydrogens without extensive motion of the phenyl rings. We calculated the instantaneous vibrational frequency during the structural evolution of  $S_1$ -stilbene, and found that the  $\nu_{33}$  mode exhibits a frequency change that agrees with the frequency change of the  $240\text{-cm}^{-1}$  motion observed in the TR-ISRS experiments. This agreement strongly bolsters our conclusion that the present experiment tracks the structural evolution of cis-stilbene during the isomerization through accompanying changes in the vibrational structure.

##### 2. Observation of pronounced non-Condon effect as the origin of the quantum beat observed in the time-resolved absorption signal from excited-state cis-stilbene (Ishii, Takeuchi, Tahara)

We carried out wavelength-dispersed time-resolved absorption measurements of cis-stilbene to investigate the mechanism of the appearance of the  $\sim 220\text{ cm}^{-1}$  oscillation that was observed for the  $S_n \leftarrow S_1$  transient absorption measured in ultrafast pump-probe measurements. The observed oscillatory pattern showed almost the same amplitude and phase across the absorption peak at 645 nm, indicating that the modulation of the transition intensity gives rise to the quantum beat. We also carried out a semi-quantitative numerical simulation of the time-resolved absorption spectra based on the effective linear response theory, in which we newly incorporated the Herzberg-Teller coupling model by introducing a coordinate-dependence of the transition moment. The results of these experiment and simulation clearly showed that the intensity of the quantum beat arises from a significant coordinate dependence of the  $S_n \leftarrow S_1$  transition moment, i.e. non-Condon effect. It was concluded that the vibronic coupling of the  $S_n$  state with other adjacent highly excited states is so large that the Herzberg-Teller coupling predominantly contributes to the intensity of the quantum beat of

the totally symmetric  $\sim 220\text{ cm}^{-1}$  vibration. The present work suggests a general importance of the non-Condon effect in spectroscopy involving highly-excited electronic states.

### 3. Revision of fluorescence spectrum of cis-stilbene and nature of the reactive $S_1$ state (Nakamura, Takeuchi, Tahara)

We re-examined steady-state fluorescence of cis-stilbene in solution, by carefully separating the contribution of coexisting trace amount of trans isomer. The obtained “pure” fluorescence spectrum of cis-stilbene shows a broad structureless band (peaked around 420 nm) extending to the wavelength region as long as 700 nm, which is significantly different from the spectrum reported in the literature. Compared to the fluorescence intensity of the co-existing trans isomer, the oscillator strength of the cis fluorescence was evaluated as 0.17, which indicated that the  $S_1$  state of cis-stilbene is an optically allowed state. This solves the controversy on the nature of the reactive  $S_1$  state of cis-stilbene which has been raised by recent quantum chemical calculations.

## B. Femto-milli-second spectroscopic study of photochemical dynamics of the complicated systems

### 4. Ultrafast pump-probe study of the primary photoreaction process in pharaonic halorhodopsin: halide-ion dependence on isomerization dynamics (Nakamura, Takeuchi, Tahara)

Halorhodopsin is a retinal protein that acts as a light-driven chloride pump in *Haloarchaeal* cell membrane. A chloride ion is bound near the retinal chromophore, and light-induced all-trans $\rightarrow$ 13-cis isomerization triggers unidirectional chloride-ion pump. We investigated the primary ultrafast dynamics of *Natronomonas pharaonis* halorhodopsin that contains Cl<sup>-</sup>, Br<sup>-</sup> or I<sup>-</sup> (*pHR-Cl*, *pHR-Br* or *pHR-I*) using ultrafast pump-probe spectroscopy with  $\sim 30$ -fs time resolution. All the temporal behaviors of the  $S_n \leftarrow S_1$  absorption, ground-state bleaching, K-intermediate (13-*cis* form) absorption and stimulated emission were observed. In agreement with previous reports, the primary process exhibited three dynamics. The first dynamics corresponds to the population branching process from the Franck-Condon (FC) region to the reactive ( $S_{1r}$ ) and nonreactive ( $S_{1nr}$ )  $S_1$  states. With the improved time resolution, it was revealed that the time constant of this branching process ( $\tau_1$ ) is as short as 50 fs. The second dynamics was the isomerization process of the  $S_{1r}$  state to generate the ground-state 13-cis form, and the time constant ( $\tau_2$ ) exhibited significant halide-ion dependence (1.4, 1.6, and 2.2 ps for *pHR-Cl*, *pHR-Br* and *pHR-I*, respectively). The relative quantum yield of the isomerization, which was evaluated from the pump-probe signal after 20 ps, also showed halide-ion dependence (1.00, 1.14 and 1.35 for *pHR-Cl*, *pHR-Br* and *pHR-I*, respectively). It was revealed that the halide ion that accelerates isomerization dynamics provides the lower isomerization yield. This finding suggests that there is an activation barrier along the isomerization coordinate on the  $S_1$  potential energy surface, meaning that the three-state model, which is now accepted for bacteriorhodopsin, is more relevant than the two-state model for the isomerization process of halorhodopsin. We concluded that, with the three-state model, the isomerization rate is controlled by the height of the activation barrier on the  $S_1$  potential energy surface while the overall isomerization yield is determined by the branching ratios at the FC region and the conical intersection. The third dynamics attributable to the internal conversion of the  $S_{1nr}$  state also showed notable halide-ion dependence ( $\tau_3 = 4.5, 4.6,$  and  $6.3$  ps for *pHR-Cl*, *pHR-Br* and *pHR-I*). This suggests that some geometrical change may be involved in the relaxation process of the  $S_{1nr}$  state.

### 5. Finding the hidden electronic state of enhanced green fluorescence protein (Hosoi, Yamaguchi, Tahara)

Precise two-photon absorption spectra of the green fluorescent protein (GFP) and the mutants, Sapphire-GFP (T203I) and enhanced GFP (S65T/F64L), as well as a model compound for the chromophore, 4'-hydroxybenzylidene-2,3-dimethylimidazolinone (HBDI) were measured by multiplex two-photon absorption spectroscopy. The observed TPA bands of the anionic forms of enhanced GFP and HBDI were significantly shifted to the higher energy, compared with the lowest energy bands in one-photon absorption spectra. This result strongly suggested the existence of a hidden electronic excited state in the vicinity of the lowest excited singlet ( $S_1$ ) state of the anionic form of the GFP

chromophore, which is the origin of the blue shift of the two-photon absorption spectra as well as two-photon fluorescence excitation spectra.

### C. Linear/Nonlinear spectroscopic study of heterogeneous systems

#### 6. Development of heterodyne-detected electronic sum-frequency generation and the direct observation of the 'up' vs 'down' alignment of interfacial molecules (Yamaguchi, Tahara)

We are developing new interface-selective even-order nonlinear spectroscopies to explore frontiers of interfacial science. So far, we have developed multiplex electronic sum-frequency generation (ESFG) spectroscopy to obtain steady-state electronic spectra at liquid interfaces with unprecedented high quality. ESFG spectroscopy, however, does not provide information of the second-order susceptibility ( $\chi^{(2)}$ ) itself but gives data about its square modulus, i.e.,  $|\chi^{(2)}|^2$ , because the intensity of the nonlinear optical signal is directly detected (homodyne detection). This drawback of the homodyne ESFG spectroscopy can be overcome by heterodyne detection, in which the signal light is mixed with local oscillator with a controlled phase relation. In this year, we extended the original ESFG spectroscopy to heterodyne measurements by utilizing a tandem configuration. In this configuration, a sample to be studied is set at one sample point, and GaAs, which generates LO, is placed at the other. The interference of the SFG signals from the sample and GaAs is detected with a spectrograph and a CCD. With this method, we successfully achieved heterodyne detection of ESFG (HD-ESFG) for the first time and obtained complex electronic  $\chi^{(2)}$  spectra of interfaces for a simultaneous detection bandwidth broader than 100 nm. This HD-ESFG spectroscopy provides linear  $\chi^{(2)}$  spectra that contain unambiguous information on the "up" vs "down" alignment of interfacial molecules. We measured HD-ESFG spectra of *p*-nitroaniline (PNA) and *N,N*-diethyl-*p*-nitroaniline (DEPNA) at the air/fused-silica interface and found that the two molecules gave the imaginary  $\chi^{(2)}$  spectra having opposite signs. This clearly demonstrated that the absolute orientation of PNA and DEPNA are opposite at the air/fused-silica surface: the diethylamino group points upward to the air and the nitro group points downward to the fused silica. PNA and DEPNA are similar molecules, but the fine modification of the amino group brings about the opposite alignments on the fused silica surface.

#### 7. Development of femtosecond time-resolved electronic sum-frequency generation spectroscopy to investigate ultrafast dynamics at liquid interfaces (Sekiguchi, Yamaguchi, Tahara)

We developed a new surface-selective time-resolved nonlinear spectroscopy, femtosecond time-resolved electronic sum-frequency generation (TR-ESFG) spectroscopy, to investigate ultrafast dynamics of molecules at liquid interfaces. Its advantage over conventional time-resolved second harmonic generation spectroscopy is that it can provide spectral information, which is realized by the multiplex detection of the transient electronic sum frequency signal using a broadband white light continuum and a multichannel detector. We studied the photochemical dynamics of rhodamine 800 (R800) at the air/water interface with the TR-ESFG spectroscopy, and discussed the ultrafast dynamics of the molecule as thoroughly as we do for the bulk molecules with conventional transient absorption spectroscopy. We found that the relaxation dynamics of photoexcited R800 at the air/water interface exhibited three characteristic time constants of 0.32 ps, 6.4 ps, and 0.85 ns. The 0.32-ps time constant was ascribed to the lifetime of dimeric R800 in the lowest excited singlet ( $S_1$ ) state ( $S_1$  dimer) that is directly generated by photoexcitation. The  $S_1$  dimer dissociates to a monomer in the  $S_1$  state ( $S_1$  monomer) and a monomer in the ground state with this time constant. This lifetime of the  $S_1$  dimer was ten times shorter than the corresponding lifetime in a bulk aqueous solution. The 6.4-ps and 0.85-ns components were ascribed to the decay of the  $S_1$  monomer (as well as the recovery of the dimer in the ground state). For the 6.4-ps time constant, there is no corresponding component in the dynamics in bulk water, and it is ascribed to an interface-specific deactivation process. The 0.85-ns time constant was ascribed to the intrinsic lifetime of the  $S_1$  monomer at the air/water interface, which is almost the same as the lifetime in bulk water. The present study clearly shows the feasibility and high potential of the TR-ESFG spectroscopy to investigate ultrafast dynamics at the interface.



8. Study of surface denaturation of proteins by electronic sum-frequency generation spectroscopy (Sen, Yamaguchi, Tahara)

When a protein molecule reaches the air-water interface, there is a strong tendency for the hydrophobic parts to go to the air side, which leads to unfolding of the protein. This phenomenon is called surface denaturation and has been well known in natural science from very early days. Although the characterization of structure and conformation of proteins have extensively performed in the bulk, the *in situ* study of protein conformation at the interfaces have not been done due to lack of interface specific technique. We applied ESFG spectroscopy to *in situ* detection of protein conformation at air-water and silica-water interfaces, using cytochrome c as a model protein. Horse heart cytochrome c is a well-characterized globular protein both in the crystalline state and in solution state. The heme absorption band of the protein reflects its conformational state. The heme absorption band is centered at 410 nm and 394 nm for native and denatured protein, respectively. The ESFG spectrum of cytochrome c at the air-water interface (bulk pH=7.0) was quite different from the spectrum of either the native state or denatured state. The spectrum at the interface was very broad and the maximum position was in between the native and denatured-state absorption maxima. This broad Soret spectrum strongly indicated the presence of mixed conformation at the air-water interface. Surprisingly, the ESFG spectrum measured at an acidic condition (pH=2.0) was very similar to the spectrum measured under the neutral condition. In contrast, the ESFG spectrum of cytochrome c at silica-water interface was very similar to the native-state spectrum, indicating that the native structure is retained at the silica-water interface.

9. Study of coherent acoustic phonons in a thin gold film by femtosecond surface plasmon resonance (Yamaguchi, Tahara)

We carried out the detection of coherent phonons in a thin gold film by a new femtosecond pump-probe surface plasmon resonance (SPR) technique. Acoustic coherent phonons were generated impulsively in the gold film on a prism, and they were detected in the time domain through the reflectivity modulation for the probe pulses that satisfy the SPR condition. We observed not only the fundamental vibration of a longitudinal acoustic phonon at 35-GHz but also the overtones up to the 4th. The observed coherent phonons were assigned to the standing waves of the longitudinal acoustic phonons in the thin gold film.



***Head***

田原 太平      Tahei Tahara

***Members***

竹内 佐年      Satoshi Takeuchi  
山口 祥一      Shoichi Yamaguchi  
石井 邦彦      Kunihiko Ishii  
渡邊 秀和      Hidekazu Watanabe  
岩村 宗高      Munetaka Iwamura  
中村 巧      Takumi Nakamura

Zhengrong Wei

***Special Postdoctoral Researchers***

関口 健太郎      Kentaro Sekiguchi  
二本柳 聡史      Satoshi Nihonyanagi  
Omar Mohammed Abdelsaboer

***Visiting Members***

Sudip Kumar Mondal  
Susanne Fechner  
Pratik Sen  
細井(榎木) 晴子      Haruko (Kayaki) Hosoi  
藤野 竜也      Tatsuya Fujino

***Assistant and Part-timer***

江森 桃子      Momoko Emori