

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

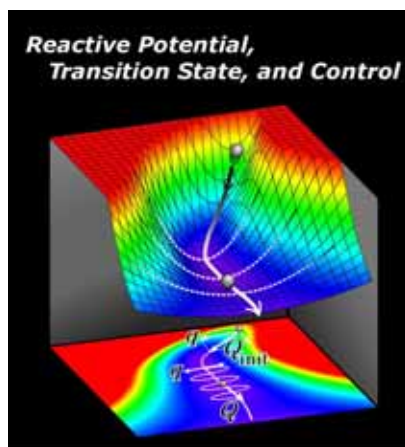


図. 超高速分光による化学反応の研究

1 . フェムト秒時間領域振動分光による有機金属錯体の超高速構造追跡 (竹内、岩村、田原)
銅(I)錯体 $[\text{Cu}(\text{dmphen})_2]^+$ (dmphen = 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline) は、電子基底状態において2つの配位子が互いに直交した構造 (D_{2d} 構造) を持つ。これに対し、電荷移動励起状態ではこの D_{2d} 構造は最安定構造ではなく、このため光励起とともに配位子間の二面角が 90° より小さくなる構造変化が超高速で起こることが示唆されていた。我々が以前に行ったフェムト秒発光分光において構造変形に帰属されるサブピコ秒のダイナミクスが観測され、これによってこの典型的銅錯体の構造変化の時間スケールが初めて明らかになった。さらに、このフェムト秒発光分光の実験において、光励起直後にサブピコ秒というき

わめて短い寿命をもつ D_{2d} 構造を保った励起状態が現れることが示唆された。これまで考えられてきたような擬ヤーンテラー効果による構造変化では、 D_{2d} 構造をもった励起状態が有限の寿命をもって現れることは考えられないため、この発見は金属錯体の構造変化のメカニズムを理解するうえで大変重要な意味を持つ。したがって、この超高速構造変化中に現れるサブピコ秒の寿命の電子励起状態の情報（特に構造情報）を集めることが重要であった。そこで、我々が最近開発しフェムト秒領域で分子の構造変化を追跡することのできるフェムト秒インパルス・ラマン分光を用いて、この電荷移動励起状態における構造ダイナミクスについて研究した。実験によって、光励起とともにいくつかの低波数ラマンバンドが観測され、それが時間とともに変化する様子が観測された。特に光励起直後に強く観測される 125 cm^{-1} バンドが3 psまでに完全に消失することがわかった。この結果は、この低波数振動のラマン強度が1 ピコ以下の時定数ですばやく減少していることを意味しており、フェムト秒発光分光データ、ポンプ - プロブ分光の結果ともよく対応している。この研究によって、最も代表的な有機金属錯体における超高速構造変形ダイナミクスの振動スペクトルによる追跡が実現するとともに、その機構に対する新しい理解を確固たるものにした。

2 .超高速 pump-dump-probe 分光を用いたシアニン色素励起状態における核波束運動の追跡(Wei、中村、竹内、田原)

明確にポテンシャル障壁を持たない超高速反応においては、分子がその構造を徐々に変化させていく様子を観測できる可能性がある。このような分子の構造変化は核波束運動として考えるべきであり、波束の重点の移動に加えて、核波束の広がりも時間とともに変化すると考えられる。我々は超高速反応における分子の核波束運動を実験的に観測することを目的として、シアニン色素の励起状態ダイナミクス（核波束運動）をフェムト秒ポンプ - ダンプ - プロブ分光を用いて研究した。この実験では、通常のポンプ - プロブ分光における電子励起状態への光励起（ポンプ）と信号測定（プロブ）の間に、励起状態を強制的に基底状態に失活させる目的でダンプ光を導入する。実験の結果、基底状態の褪色信号がダンプ光の照射と同時に確かに減少することを確認した。これはポンプ光で生成した励起分子の一部がダンプ光により確かに基底状態に引き戻されていることを意味する。さらに、ダンプ光の波長を変化させて実験を行ったところ、ダンプ効率が最大になる照射時刻はダンプ光波長によって異なり、ダンプ光波長を690 nmから950 nmに変えると100 fsから240 fsへと遅くなることが分かった。この最大効率の時刻は、ダンプ光の光子エネルギーが基底状態と励起状態とのエネルギー差に一致するポテンシャル領域に波束が到着するまでに要する時間といえる。従って、この実験データは反応性励起状態ポテンシャル上を走る波束の動きを定量的に追跡した結果といえる。

3 . フェムト秒誘導ラマン分光による超高速分子過程の研究 (Fechner、竹内、田原)

超高速反応をおこす分子の反応過程を解明するためには十分な時間分解能で振動構造の変化を追跡することが重要である。この目的のため、フェムト秒誘導ラマン分光の装置を製作した。この分光法は、我々が以前独自に開発したフェムト秒インパルス・ラマン分光と相補的な手法であり、これにより、指紋領域を含む高波数ラマンスペクトルをフェムト秒の時間分解能で測定することができる。これまでに 9,9-ピフルオレニリデンの溶液に対する測定を行い、この基底状態分子および溶媒であるシクロヘキサンの非共鳴ラマン信号の観測に成功した。

4 . VCI 法による凝縮相振動緩和ダイナミクスについての研究 (服部、田原)

振動緩和は凝縮相での、ほとんど全ての化学プロセスで本質的な役割を果たしている。近年、IR-Raman ポンプ - プロブ実験による、振動エネルギーフローを実時間観測する研究が行われている。これらの研究ではサブピコ秒の時間分解能が得られているが、振動エネルギーの大部分がどの振動モードへと流れているかについては未だ解明されていない。これは、エネルギーの大部分が暗状態、つまりは構造の無い bath モードと Raman 不活性なモードに流れているためである。本研究は理論化学計算によって、振動緩和ダイナミクスについての包括的な視点を与えることを目的とする。計算では明状態はもちろんのこと、暗状態のダイナミクスを検討することが可能である。振動固有状態は 2 つのステップで計算する。まず、VSCF (vibrational self-consistent field)法により、振動基底状態を 1 モード関数の直積として得、続いて VSCF 関数の線形結合によって VCI (vibrational configuration interaction)波動関数を構築する。振動緩和ダイナミクスは VCI 波動関数を時間発展させることで計算する。非調和性は振動緩和において本質的な役割を演じており、第一原理計算による非調和ポテンシャル計算と VCI 計算によるモード間カップリングとして考

慮に入れる。これまでの計算によると、低振動モードの高振動励起状態が振動緩和には必要であり、十分な振動状態密度を顕に計算に取り込むことが必要であることがわかった。これは従来、構造が無いといわれてきた bath モードに、特異な構造が存在し、低振動モードの振動励起状態として顕に取り扱うことが必要であることを示唆する。

B．新しい非線形分光を用いたソフト界面の研究

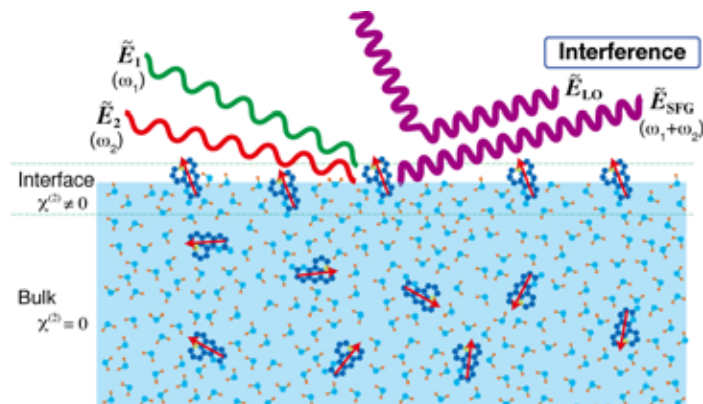


図. 界面選択的な二次の非線形分光：ヘテロダイン和周波分光

5．液体界面の酸塩基平衡（山口、Bhattacharyya、田原）

我々はヘテロダイン検出電子和周波発生分光法を用いて、液体界面の酸塩基平衡を調べた。空気／水界面および空気／界面活性剤／水界面に吸着した pH 指示薬アリザリンイエローR の電子スペクトルのバルク pH 依存性を測定した。界面の pH 指示薬の酸と共役塩基の濃度が、バルク pH によってどのように変化するかを初めて明らかにした。これによって、バルク溶液に対して行われている pH の分光定量と同じレベルの定量測定を、界面に対して行うことが出来るようになった。

6．ヘテロダイン検出振動和周波発生による界面活性剤/電解質溶液界面の研究（二本柳、山口、田原）

空気/界面活性剤/電解質溶液における水の絶対配向と水素結合構造を、ヘテロダイン検出振動和周波発生 (HD-VSFG) 分光法を用いて決定した。まず、一価のイオンのみを含む単純な系においては、界面の水の配向は界面活性剤の電荷の正負に従うことを実験的に明らかにした。さらに、水の配向におけるイオンおよびイオン濃度依存性について検討した。一方、構造を議論するためには分子内カップリングの効果を除去するために同位体希釈した水(HOD)を用いて実験を行った。空気/界面活性剤/電解質溶液における HOD の HD-VSFG スペクトルはバルクの HOD 赤外吸収と酷似しており、帯電した界面における水の水素結合構造はバルクのそれと非常に近いことが強く示唆された。

7．空気／水界面のクマリンの電子スペクトルの定量的解析による溶媒和環境の不均一性の評価（Sudip Kumar Mondal、山口、田原）

我々はヘテロダイン検出電子和周波発生分光法を用いて、空気／水界面の溶質分子クマリン 110 (C110) の電子スペクトルを測定し、界面の溶媒和環境の不均一性の定量的な解析を行った。無極性溶媒であるシクロヘキサン中の C110 の紫外可視吸収スペクトルを固有線幅関数と見なして、この固有線幅関数を連続的にシフトさせ重ね合わせることによって界面の電子スペクトルを再現した。その結果得られた界面の溶媒和環境の分布関数は、バルク水溶液のそれとほぼ同じ幅を有することが分かった。このことは、溶媒和環境の不均一性は界面とバルクでほぼ同等であることを意味している。

8．偏光 SHG による空気／混合溶媒界面のクマリン 110 の配向（Kundu、山口、田原）

我々は第二高調波発生 (SHG) の偏光依存性を用いて、空気／水界面および空気／水-ジメチルホルムアミド (DMF) 混合溶媒界面に吸着した溶質分子クマリン 110 (C110) の配向を調べた。その結果、C110 の $\beta^{(2)}$ テンソル成分の比は、水と DMF の混合比率に依存することが分かった。このことは、界面での C110 の配向角が混合比率に依存しているか、あるいは配向角の分布の幅が混合比率によって変化していること

を意味する。

9. 空気/水界面のクマリン C110 分子の溶媒和構造 (渡邊、山口、田原)

第二次高調波発生(SHG)、当研究室で開発したヘテロダイン検出電子和周波発生(HD-ESFG)といった実験的手法に、分子動力学(MD)、分子軌道法(MO)といった理論的手法を組み合わせ、空気/水界面におけるクマリン C110 分子の挙動を詳細に調べた。MO で計算した超分極率と HD-ESFG から C110 の配向を決定したが、MD で求めた分子配向の分布と一致した。また、二次の非線形感受率 $\chi^{(2)}$ を MO と MD で算出し SHG データを再現したところ、実験結果とよい一致を示した。さらに SHG データから界面の屈折率を見積もると水の屈折率と等しくなることがわかった。また C110 分子のまわりの水和構造を、MD を用いて調べたところ、C110 分子が「半分」だけ水和されていることや、C110 の存在によって外側の水和圏まで作られることがわかった。

10. 空気/水界面の PNA 分子、DEPNA 分子の配向 (渡邊、山口、田原)

分子動力学(MD)を用いて、パラニトロアニリン(PNA)と、ジメチルパラニトロアニリン(DEPNA)の、空気/水界面における配向を求めた。分子の配向分布を求めると、PNA は NO₂ 基の窒素が空気側、DEPNA は NO₂ 基の窒素はバルク側に向いている。これらは HD-ESFG で測定した二次の非線形感受率の虚部 $\text{Im}\{\chi^{(2)}\}$ の結果と一致する。

C. 複雑分子系のフェムト～ミリ秒ダイナミクスの研究

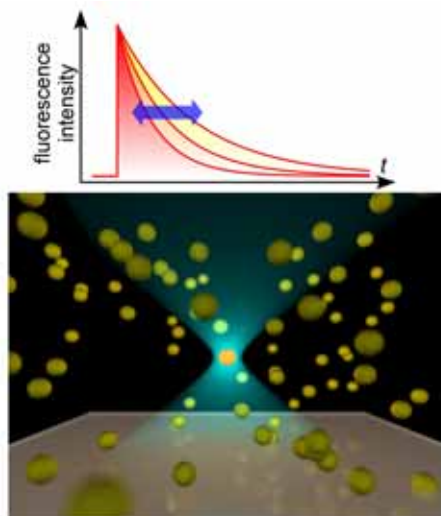


図. 新しい蛍光相関分光による複雑分子のダイナミクスの観測

11. 蛍光寿命の揺らぎを観測する蛍光相関分光法の開発 (石井、田原)

我々は蛍光相関分光法(FCS)と時間相関光子計数法(TCSPC)による蛍光寿命測定を組み合わせ、核酸・タンパク質などの複雑な生体分子の構造ダイナミクスを蛍光寿命の不均一性と揺らぎを通して調べようとしている。複雑な分子の構造変化を鋭敏に反映する蛍光寿命の情報を利用することで、蛍光測定を通して得られる分子の構造揺らぎの情報の質をより高めることができると期待される。本研究では、蛍光寿命の情報を重みとして付加した蛍光相関関数を求め、通常の蛍光強度相関と比較することで、分子の並進拡散運動と分離した形で系の不均一性と複雑分子の構造変化の時間スケールを調べる手法を新たに提案した。この方法を応用して、(1)蛍光寿命の異なる色素の混合物の不均一性、(2)蛍光ラベルしたポリペプチドの蛍光寿命不均一性の環境による変化、を検出することができた。

12. 新規な蛍光相関分光法を用いた蛋白質分解酵素の活性中間体解析に向けた研究 (乙須、石井、田原)

酵素-基質複合体の構造解析は蛋白質研究においての大きな課題のひとつである。本研究においては蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)および当研究室が独自に開発を進めている蛍光寿命の重みをかけた蛍光相関分光

法を用いた蛋白質分解酵素の活性中間体解析を目標として実験系の設計をおこなった。基質としては市販されている色素標識合成ペプチドを用い、これを FRET のアクセプターとした。これとドナー色素を標識した酵素を用い、FRET によるドナー蛍光寿命の減少を実時間観測することで酵素反応の活性中間体解析をおこなうことが可能となる。本研究ではパパインおよびトリプシンを酵素試料とし、そのN末端への色素標識をおこなった。しかしながら、精製後の活性測定の結果それらの酵素は色素標識によりその活性がほとんど失われることが明らかとなった。このことは、これら蛋白質分解酵素においてN末端が重要な役割を有していることを表している。よって、本研究においてはより綿密な色素結合部位の選定が必要であることが分かった。

Key Sentence :

1. Elucidating and controlling ultrafast phenomena in the condensed-phase
2. Studying soft interfaces by new nonlinear spectroscopy
3. Examining the 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. Real-time structural tracking of organometallic complexes by femtosecond time-domain Raman spectroscopy (Takeuchi, Iwamura, Tahara)

A prototypical Cu(I) complex, $[\text{Cu}(\text{dmphen})_2]^+$ (dmphen = 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline), has a perpendicular structure in the ground state, in which the two ligands are perpendicularly attached to the central Cu(I) ion. In the charge transfer excited state, on the other hand, the most stable structure has a ‘flattened’ geometry in which the dihedral angle between the two ligands becomes $75^\circ \sim 65^\circ$. Therefore, ultrafast flattening distortion is expected to occur in this metal complex after photoexcitation. Our previous femtosecond emission study revealed a sub-picosecond dynamics assignable to the flattening distortion and clarified the time-scale of the ultrafast structural change for the first time. Moreover, the obtained femtosecond emission spectra suggested that the perpendicular S_1 state appears before the structural change, which is not expected in the framework of pseudo-Jahn-Teller effect that had been accepted as the relevant mechanism. To obtain structural information of this short-lived excited state, we carried out femtosecond impulsive Raman spectroscopy and measured “instantaneous” Raman spectra with femtosecond time resolution. We found that an intense Raman band at 125 cm^{-1} appears with photoexcitation and decays with a sub-picosecond time constant. This ultrafast change in the Raman spectrum is fully consistent with the femtosecond

emission data, and provides a solid vibrational evidence for the appearance of the perpendicular S_1 state and shed a new light on the potential energy surface that governs the ultrafast structural change.

2. Study of the wavepacket motion in photoisomerization of a cyanine dye by ultrafast pump-dump-probe technique (Wei, Nakamura, Takeuchi, Tahara)

We studied the nuclear wavepacket motion on the excited-state potential energy surface (PES) in photoisomerization of a cyanine dye using the femtosecond pump-dump-probe method. We found that the ground-state bleaching signal decreases instantaneously at each dump time, indicating that a substantial fraction of the excited-state population is driven back to the ground state. Interestingly, the dumping efficiency showed a finite rise time, depending on the dump wavelength. The rise time was evaluated as ~ 100 fs for the dump wavelength of 690 nm, but it was changed to ~ 240 fs for longer dump wavelength of 950 nm. The rise time of the dumping efficiency corresponds to a time for the wavepacket to reach the PES region where the dump photon energy matches the energy difference between the ground and excited states. Therefore, our observation provides intuitive and quantitative information of the wavepacket motion on the excited-state PES of reactive polyatomic molecules.

3. Femtosecond stimulated Raman study of ultrafast molecular processes (Fechner, Takeuchi, Tahara)

To figure out the actual reaction path of molecules that undergo ultrafast reactions, it is crucial to track changes in the vibrational structure with sufficient time resolution. For this end, we constructed a setup for femtosecond stimulated Raman spectroscopy. It is complementary to the femtosecond impulsive Raman spectroscopy developed in this laboratory, and it enables us to observe “instantaneous” high-frequency Raman spectrum including the finger-print region with femtosecond time resolution. So far, we succeeded in observing Raman spectra of 9,9'-bifluorenylidene in the ground state as well as solvent cyclohexane under the non-resonance condition.

4. Study on the vibrational energy relaxation in liquid by the vibrational configuration interaction method (Hattori, Tahara)

Vibrational energy relaxation (VER) plays a fundamental role in nearly all chemical processes in the condensed-phase. Recently, a number of works has been reported, in which real-time observations of vibrational energy flow were realized by using a mid-IR pump and anti-Stokes Raman probe technique. Sub-ps time resolution was achieved in these studies, but the major pathway of the energy flow from initially pumped vibrational modes was not clarified. It means that most of energy goes into dark states, which are considered to be just structureless “bath” modes and/or Raman-inactive modes. The present study tries to provide a more comprehensive picture for VER dynamics by theoretical calculations, which can examine not only dynamics among bright states, but also that including dark states. The vibrational eigenstates are obtained by two steps. First, the vibrational self-consistent field (VSCF) calculation is carried out to obtain the vibrational ground state as a direct product of one-mode functions. Second, the vibrational configuration interaction (VCI) wave function is constructed from a linear combination of VSCF configurations. Then, using VCI eigenfunctions, the time-dependent VCI calculation is performed for simulating VER dynamics. Anharmonicity that plays an essential role in VER is included as *ab initio* anharmonic potential and VCI mode-mode coupling scheme. So far, the calculations suggested that the highly excited low frequency vibrations are necessary for the vibrational energy to flow, and sufficient vibrational density of states should be explicitly included into calculations. This also indicates that the bath has some characteristic structures, and should be treated as explicit low frequency modes.

B. Study of soft Interfaces by new nonlinear spectroscopy

5. Acid-base equilibrium at liquid interfaces (Yamaguchi, Bhattacharyya, Tahara)

We applied heterodyne-detected electronic sum frequency generation (HD-ESFG) spectroscopy to an acid-base equilibrium at liquid interfaces. We measured the $\chi^{(2)}$ electronic spectrum of a pH indicator molecule, alizarine yellow R (AYR), adsorbed at the air/water and air/surfactant/water interfaces, with bulk pH systematically controlled. We successfully observed gradual concentration changes of the acid

and conjugate base of AYR at the interfaces, which allowed us for the first time to perform the pH spectrometric analysis for the interfaces with the same quantitative level as for the bulk solutions.

6. Heterodyne detected vibrational sum frequency generation study of charged surfactant /electrolyte solution interfaces (Nihonyanagi, Yamaguchi, and Tahara)

We have determined the orientation of water molecules at air/charged surfactant/ electrolyte solution interfaces for the first time using the multiplex heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (HD-VSFG) technique. Dipole orientation of interfacial water molecules at charged interfaces simply obeys the charge of the surfactant head group in the system containing only monovalent ions. The effect of various ions and ion concentrations on the water orientation at such charged interfaces were also investigated. In order to determine the hydrogen bond structure, isotopically diluted water (HOD) was used to eliminate effect of intramolecular couplings. The $\chi^{(2)}$ spectrum of HOD molecules resembled the IR absorption spectrum of bulk HOD, indicating that H-bond structure of water molecules near a charged interface is similar to that in the bulk..

7. Quantitative analysis of electronic spectra of coumarin 110 at the air/water interface: Estimation of heterogeneity of solvation environment (Mondal, Yamaguchi, Tahara)

We quantitatively analyzed the electronic $\chi^{(2)}$ spectra of solute molecules at the air/water interface by heterodyne-detected electronic sum frequency generation (HD-ESFG) spectroscopy, to precisely know the extent of heterogeneity of interfacial solvation environment. Using the $\chi^{(1)}$ spectrum of coumarin 110 (C110) in bulk cyclohexane as the intrinsic line-shape function, we obtained the distribution function of the solute over different solvation sites at the air/water interface. The obtained distribution function at the interface shows very similar width to that in bulk water, indicating a very similar heterogeneity of the solvent environment surrounding C110.

8. Orientation of Coumarin 110 at air/solvent mixtures interfaces by polarization SHG (Kundu, Yamaguchi, Tahara)

We have investigated the orientation of coumarin 110 (C110) adsorbed at the air/water interfaces and at air/water-dimethylformamide (DMF) miscible mixtures interfaces by polarization second harmonic generation (SHG). We have found that the ratios of the $\chi^{(2)}$ tensor elements depend on the mixture ratio of water and DMF, which suggests that (i) the molecular tilt angle of C110 at the interfaces depends on the mixture ratio, or (ii) the width of the tilt-angle distribution changes with a change in the mixture ratio.

9. Hydration structure of coumarin C110 molecule at air/water interface (Watanabe, Yamaguchi, Tahara)

Detailed behavior of the coumarin C110 molecule at air/water interface was investigated with the combination of various experimental and theoretical methods. The experimental methods used were the second harmonic generation (SHG) and heterodyne electronic sum frequency generation (HD-ESFG) developed by our group, and theoretical methods were molecular dynamics (MD) and molecular orbital (MO) method. The orientation of C110 molecule was determined with the hyperpolarizability calculated with MO and HD-ESFG, and it was in agreement with the orientation distribution evaluated with MD simulations. The experimental SHG data were well reproduced by the theoretical SHG data calculated with the nonlinear susceptibility $\chi^{(2)}$ evaluated with MO and MD. Moreover, it was suggested that the estimated refraction index of the interface is equal to the refraction index of water, by the comparison between the theoretical and experimental SHG data. To use the MD simulation, the hydration structure around the C110 molecule was inspected in detail. The "half" hydration of C110 molecule was confirmed, and it was found that the external hydration shells are constructed and their structures are mostly determined with the existence of the C110 molecule.

10. Para-nitroaniline (PNA) and dimethyl para-nitroaniline (DEPNA) molecule at the air/water interface (Watanabe, Yamaguchi, Tahara)

The orientation of para-nitroaniline (PNA) and dimethyl para-nitroaniline (DEPNA) at air/water

interface are determined with the MD simulations. In the case of PNA, the nitrogen atom of NO₂ group is towards the air, whereas in the case of DEPNA, the nitrogen atom of NO₂ is towards the bulk. This result is consistent with the imaginary part of the nonlinear susceptibility $\text{Im}\{\chi^{(2)}\}$ observed with HD-ESFG.

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

11. Development of a new fluorescence correlation spectroscopy observing fluctuation of fluorescence lifetime

(Ishii, Tahara)

We are trying to investigate structural dynamics of complex biomolecules, such as nucleic acids and proteins, through monitoring inhomogeneity and fluctuations of the fluorescence lifetime of a fluorophore attached to the target molecule. By combining information of the fluorescence lifetime, which is a sensitive probe of conformational difference, we can learn more about structural dynamics of complex molecules from fluorescence measurements. In this study, we proposed a new spectroscopic method to observe fluctuations of fluorescence lifetime, *lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy*, in which we derive a fluorescence correlation function weighted with lifetime information, and compare it with the ordinary fluorescence intensity correlation function. By using this method, we can extract the inhomogeneity and the conformational change of complex molecules in separation from the signal due to the translational diffusion. Using this method, we succeeded in detecting (1) inhomogeneity in a mixture of two dyes having different fluorescence lifetimes and (2) environment-dependent change of the lifetime inhomogeneity of a dye-labeled polypeptide.

12. The analysis of reaction intermediate state of protease by lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy (Otosu, Ishii, Tahara)

The structural analysis of enzyme-substrate complex is one of the most important subjects in protein science. In this study, we designed the following experiment to analyze the intermediate states of a protease reaction by the lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy, which was developed in our laboratory: Fluorescence resonance energy transfer (FRET) is employed to study the structure of the intermediate states. A commercially available dye-labeled synthetic peptide is used as the substrate and as FRET acceptor. By monitoring FRET efficiency through the change of the fluorescence lifetime of a donor fluorophore, which is attached to the N-terminus of the enzyme, it is possible to analyze the intermediate state of the enzymatic reaction. We chose papain and trypsin as sample enzymes, and attached a donor fluorophore to each enzyme. However, the result of enzymatic activity measurement showed that those enzymes lost most of their activity by the attachment of the fluorophore. This result indicates that N-termini of these enzymes have important roles for the enzymatic reactions. Therefore, much more care is needed for the position where fluorophore is attached.

Principal Investigator

田原 太平 Tahei Tahara

Research Staff

竹内 佐年 Satoshi Takeuchi
山口 祥一 Shoichi Yamaguchi
石井 邦彦 Kunihiko Ishii
二本柳 聡史 Satoshi Nihonyanagi
渡邊 秀和 Hidekazu Watanabe
乙須 拓洋 Takuhiro Otsu
服部 達哉 Tatsuya Hattori

Zhengrong Wei

Sudip Kumar Mondal

Susanne Fechner

Jahur Alam Mondal

Students

Guillaume Darsy

Achintya Kundu

Assistant and Part-timer

江森 桃子 Momoko Emori

穠山 和恵 Kazue Akiyama

Visiting Members

藤野 竜也 Tatsuya Fujino

細井 晴子 Haruko Hosoi

岩村 宗高 Munetaka Iwamura

水谷 由宏 Yoshihiro Mizugai