

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

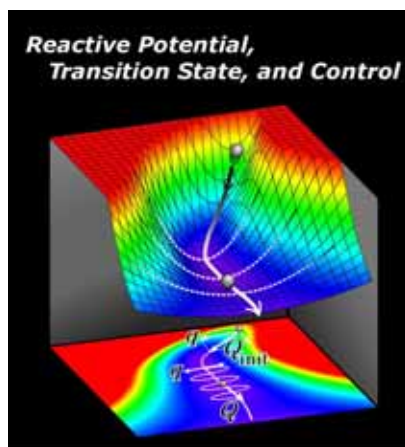


図. 超高速分光による化学反応の研究

1. フェムト秒時間分解電子和周波発生による界面の励起状態ダイナミクスの研究 (P. Sen、山口、田原)
空気/水界面のマラカイトグリーン (MG) の超高速励起状態ダイナミクスをフェムト秒時間分解電子和周波発生 (TR-ESFG) 分光法を用いて研究した。MG の励起状態ダイナミクスは溶媒の粘性に依存することが知られている。つまり、MG は“粘性指示薬”として用いることができる。そこで、界面の MG を TR-ESFG で測定することによって、界面の粘性についての知見を得ることを目的とした。空気/水界面の MG のフェムト秒時間分解電子スペクトルを、バルク溶液の過渡吸収スペクトルと同等の高品質で得ることが出来

た。界面と水グリセロール混合溶媒のバルクについて、基底状態の退色の回復の時定数を比較した。その結果、界面の時定数は、バルク純水中のそれよりも大幅に長く、グリセロールの体積分率 65~80%の混合溶媒中のそれとほぼ同じであることが分かった。このことは、見かけ上、界面はバルクの水よりもずっと高粘性であることを示唆している。しかし、例えば界面の MG のポテンシャルエネルギー曲面がバルク中とは異なる可能性もあり、その場合は長い時定数は必ずしも高い粘性を意味しない。従って、界面の粘性を正確に評価するには、まず粘性指示薬分子自体の性質が界面でどのように変化するかを調べなければならない、ということが分かった。

B. 新しい非線形分光を用いたソフト界面の研究

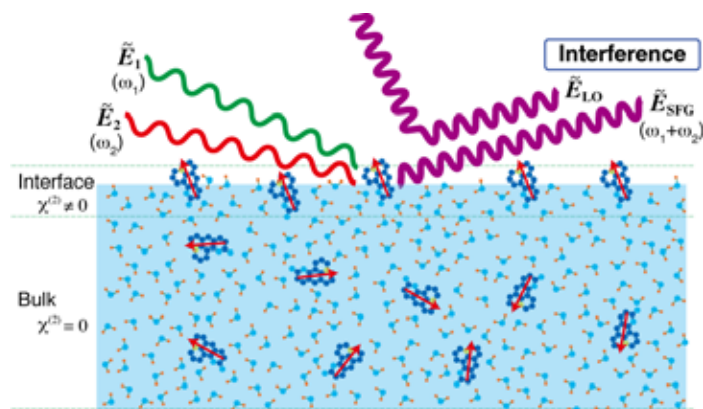


図. 界面選択的な二次の非線形分光：ヘテロダイン和周波分光

2. 二次非線形分光と分子動力学シミュレーションによる界面の水和構造の研究 (渡邊、山口、S. Sen、森田、田原)

空気/水界面の溶質分子の水和構造を実験と理論の両面から研究した。ヘテロダイン検出電子和周波発生と偏光第二高調波発生という 2 つの界面選択的二次非線形分光を用いて、空気/水界面の溶質分子クマリン 110 (C110) の二次非線形感受率テンソル ($\chi^{(2)}$) の絶対符号と成分比を実験的に決定した。また、時間依存密度汎関数法による C110 の超分極率テンソルの計算と、分子動力学 (MD) シミュレーションによる C110 の配向分布の計算を合わせて、 $\chi^{(2)}$ の絶対符号と成分比を理論的に決定した。実験と理論の結果は定量的に良く一致し、MD シミュレーションの信頼性を担保するものとなった。そこで、この MD シミュレーションのデータを用いて、C110 が界面でどのように水和されているのかを計算した。親水的なカルボニル基の周辺は水の密度が高く、疎水的なジエチルアミノ基周辺は密度が低いことが分かった。バルクでの全方位の水和と比較すると、界面では疎水基側の水和水が欠けた、いわば“半分の”水和構造になっていることが分かった。

3. ヘテロダイン検出振動和周波発生による帯電した水界面の水素結合構造の研究 (二本柳、山口、田原)

空気/帯電界面活性剤/水界面の水素結合構造を、ヘテロダイン検出振動和周波発生 (HD-VSFG) 分光法を用いて研究した。水の分子内・分子間カップリングによる OH 伸縮領域の振動スペクトルの複雑化を回避するために、軽水に重水を混合して OH 伸縮領域に共鳴を与える主要な分子種が HOD となるようにした。空気/帯電界面活性剤/水界面の HOD の HD-VSFG スペクトルは、バルクの HOD の IR スペクトルとほぼ同一であることが分かった。このことは、界面の水素結合構造はバルクとほぼ同じであり、従来考えられていた“ice-like”と呼べるような構造は界面に存在しないということを意味している。

4. ヘテロダイン検出振動和周波発生による帯電脂質単分子膜/水界面の水の構造と配向の研究 (J. A. Mondal、二本柳、山口、田原)

空気/水界面に展開した帯電脂質の単分子膜近傍の水の構造と配向を、ヘテロダイン検出振動和周波発生 (HD-VSFG) 分光法を用いて研究した。水の分子内・分子間カップリングによる OH 伸縮領域の振動スペクトルの複雑化を回避するために、軽水に重水を混合して OH 伸縮領域に共鳴を与える主要な分子種が HOD となるようにした。空気/帯電脂質/水界面の HOD の HD-VSFG スペクトルは、空気/帯電界面活

性剤 / 水界面のそれと同一であることが分かった。すなわち、空気 / 帯電脂質 / 水界面においても、水分子の“上下”の配向は脂質親水基の電荷の正負で決まっています、また水素結合構造はバルクとほぼ同じであることが結論された。

5. 線形・非線形光学測定によるガラス基板上的吸着分子の配向分布の研究 (山口、細井、山下、P. Sen、田原)

ガラス基板上に物理・化学吸着したプローブ分子の配向分布を、偏光敏感線形・非線形光学測定によって決定した。線形反射の偏光依存性から配向角の余弦の自乗の分布平均を決め、第二高調波発生の偏光依存性から同じ余弦の3乗と1乗の分布平均の比を得た。これら2つの実験値から、配向分布関数として正規分布を仮定してその平均と標準偏差を決定した。直観とは逆に、化学吸着は物理吸着よりも幅の広い配向分布を与えることが分かった。

6. ヘテロダイン検出電子和周波発生による空気 / 水界面の溶媒和環境の研究 (S. Mondal、山口、田原)

空気 / 水界面に吸着したプローブ分子にとっての水和環境を、バルクの溶媒和環境と定量的に比較した。ヘテロダイン検出電子和周波発生分光法によって測定した界面の分子の電子スペクトルを、バルク溶媒中の分子の電子スペクトルを基に解析した。その結果、界面の水和環境は同等の溶媒極性を有するバルク溶媒の溶媒和環境よりも不均一であることが分かった。これは、バルクよりも界面の方が溶媒和構造の分布が広いことによるものである。その原因として、バルクよりも界面の方が溶媒和に寄与する溶媒分子の数の自由度が大きく、また界面には溶媒分子の配向というバルクには無い自由度が存在する、ということがあげられる。

7. ヘテロダイン検出電子和周波発生による空気 / 水界面の酸塩基平衡の研究 (山口、Bhattacharyya、田原)

空気 / 正帯電界面活性剤 / 水界面での酸塩基平衡をヘテロダイン検出電子和周波発生 (HD-ESFG) 分光法によって研究した。HD-ESFG によって得られた、界面に吸着した pH 指示薬の電子スペクトルは、バルクの pH 指示薬の紫外可視吸収スペクトルと比較して遜色の無い高品質を有するデータで、これによって界面とバルクの pH の差を決定できるようになった。その結果、空気 / 正帯電界面活性剤 / 水界面はバルクよりも pH が 1.4 高いことが分かった。これは、界面活性剤の親水基が正の電荷を有するためにプロトンが界面から遠ざかることと整合している。

C. 複雑分子系のフェムト～ミリ秒ダイナミクスの研究

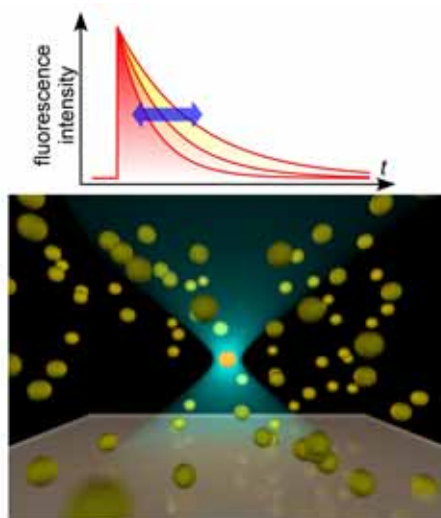


図. 新しい蛍光相関分光による複雑分子のダイナミクスの観測

8. 蛍光寿命の揺らぎを観る新しい蛍光相関分光法を用いた不均一性検出法 (石井、田原)

蛍光寿命揺らぎを観測することができる新しい蛍光相関分光法を開発し、複雑な分子系の不均一性の検出に応用した。まず蛍光寿命の異なる色素の混合物の測定を行った結果、本手法により蛍光減衰曲線に含まれる不均一性を予備知識なしに検出できることが示された。次にこれを色素ラベルしたポリペプチド分子に適用し、環境に依存する不均一性の変化と遅延時間依存性を観測することができた。本手法は複雑系の揺らぎをナノ秒からミリ秒の時間領域で観測するための有力な手段になると期待される。

9. タンパク質の溶媒和ダイナミクスと分子内ダイナミクスの相関の研究(Jha, 石井, Udgaonkar, 田原, Krishnamoorthy)

フェムト秒・ピコ秒時間分解蛍光分光法による溶媒和ダイナミクス測定を蛍光異方性減衰による回転緩和測定と組み合わせて水中のタンパク質のダイナミクスを研究した。蛍光プローブ(acrylodan)をラベルしたタンパク質 barstar の時間分解蛍光測定の結果、溶媒和時間とプローブの回転緩和時間はともにプローブのラベル位置とタンパク質の構造状態(天然状態、変性状態、酸性状態およびプロトフィブリル状態)によって変化したが、これらのダイナミクスは時間スケールが異なるにもかかわらず(溶媒和: 20-300ps、回転: 0.1-3ns) その変化には強い正の相関が見られた。この結果はタンパク質のダイナミクスと溶媒のダイナミクスが結合していることを強く示唆する。

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 dynamics of malachite green at the air/water interface studied by femtosecond time-resolved electronic sum frequency generation (TR-ESFG): An indicator for local viscosity (P. Sen, Yamaguchi, Tahara)

The ultrafast excited-state dynamics of malachite green (MG) at the air/water interface was studied with a newly-developed interface-selective nonlinear optical technique, femtosecond time-resolved electronic sum frequency generation (TR-ESFG) spectroscopy. MG is known as a viscosity indicator because of its well-known viscosity-dependent dynamics in bulk solution. Femtosecond time-resolved electronic spectra of MG at the interface were obtained with nearly the same quality as that of conventional time-resolved absorption spectra in the bulk. The time constants of the ground-state

recovery at the air/water interface were determined and compared with those in bulk glycerol-water mixtures. It was found that the ground-state recovery of MG at the air/water interface is much slower than that in bulk water and almost equivalent to that in the glycerol-water mixture containing glycerol volume fractions as high as 65 - 80%. This result indicates higher local viscosity at the interface than in bulk water. However, it is possible that changes of the molecular properties, e.g. a change of shape of the potential energy surface, of MG at the interface also contribute to the apparent very large viscosity values evaluated. On the basis of the present results, we discussed the applicability of probe molecules to evaluate the physicochemical properties of the liquid interface and noted the importance of the extrinsic and intrinsic factors that make the chemical process at liquid interfaces different from that in bulk solution.

B. Study of soft Interfaces by new nonlinear spectroscopy

2. "Half hydration" at the air/water interface revealed by HD-ESFG spectroscopy, polarization SHG, and MD simulation (Watanabe, Yamaguchi, S. Sen, Morita, Tahara)

A solute-solvent interaction at the air/water interface was investigated both experimentally and theoretically, by studying a prototypical surface-active polarity indicator molecule, coumarin 110 (C110), adsorbed at the air/water interface with heterodyne-detected electronic sum frequency generation (HD-ESFG) spectroscopy, polarization second harmonic generation (SHG), and a molecular dynamics (MD) simulation. The second-order nonlinear optical susceptibility ($\chi^{(2)}$) tensor elements of C110 at the air/water interface were determined experimentally by HD-ESFG and polarization SHG, and information on "intermediate" polarity sensed by C110 at the interface was obtained by HD-ESFG. An MD simulation and a time-dependent density functional theory (TDDFT) calculation were used to theoretically evaluate the $\chi^{(2)}$ tensor elements, which were in good agreement with the experimental results of HD-ESFG and polarization SHG. The microscopic "half-hydration" structure around C110 at the water surface was visualized on the basis of the MD simulation data, with which we can intuitively understand the microscopic origin of the surface activity of C110 and the intermediate polarity sensed by C110 at the air/water interface.

3. Water hydrogen bond structure near highly charged interface is not like ice: a HD-VSFG study (Nihonyanagi, Yamaguchi, and Tahara)

Imaginary $\chi^{(2)}$ spectra of HOD at air/charged surfactant/aqueous interfaces highly resemble the IR spectrum of the bulk liquid HOD, showing no indication of the "ice-like" structure. Clearly, the hydrogen bond structures at the highly charged interfaces are not like ice but very similar to the structure in the bulk.

4. Structure and orientation of water at charged lipid monolayer/water interfaces probed by heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy (J. A. Mondal, Nihonyanagi, Yamaguchi, Tahara)

Cell membrane/water interfaces provide a unique environment for many biochemical reactions, and associated interfacial water is an integral part of such reactions. A molecular level understanding of the structure and orientation of water at lipid/water interfaces is required to realize the complex chemistry at biointerfaces. Here we report the heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (HD-VSFG) studies of lipid monolayer/water interfaces. At charged lipid/water interfaces, the orientation of interfacial water is governed by the net charge on the lipid head group; at anionic lipid/water interface, water is in hydrogen-up orientation and at the cationic lipid/water interface, water is in hydrogen-down orientation. At the cationic and anionic lipid/water interfaces, interfacial water has comparable hydrogen bond strength, and it is analogous to the bulk water.

5. Physisorption gives narrower orientational distribution than chemisorption on a glass surface: A polarization-sensitive linear and nonlinear optical study (Yamaguchi, Hosoi, Yamashita, P. Sen, Tahara)

Linear and nonlinear polarization-sensitive spectroscopic techniques were employed to determine

the orientational distribution of a probe molecule physisorbed and chemisorbed on a fused-silica glass surface. The chemisorption was through a well-known specific reaction between the maleimide group of the probe molecule and the thiol group of the surface. In the physisorption, the molecule was bound to the surface by the weaker van der Waals forces and/or dipole-dipole interaction. Despite the absence of the strong interaction between the molecule and the surface in the physisorption, it was found that the physisorption gives narrower orientational distribution than the chemisorption. The strong covalent bond in the chemisorption is not effective to increase the orientational order. It is highly likely that the present conclusion is applicable to a variety of probe molecules having a functional group for a specific reaction of chemisorption.

6. Molecules at the air/water interface experience more inhomogeneous solvation environment than in bulk solvents: a quantitative bandshape analysis of interfacial electronic spectra obtained by HD-ESFG (S. Mondal, Yamaguchi, Tahara)

To evaluate the inhomogeneity of the solvation environment at the air/water interface, we quantitatively analyzed the shape of the electronic spectra at the air/water interface for the first time. We measured the interface-selective electronic $\chi^{(2)}$ (second-order nonlinear susceptibility) spectra of solvatochromic coumarin molecules at the air/water interface by heterodyne-detected electronic sum frequency generation (HD-ESFG) spectroscopy. The observed imaginary $\chi^{(2)}$ ($\text{Im}[\chi^{(2)}]$) spectra were well reproduced by the convolution of a lineshape function with a Gaussian distribution of a frequency shift, which enabled us to quantitatively determine the peak position and bandwidth of the $\text{Im}[\chi^{(2)}]$ spectra. The effective polarity of the air/water interface, which was determined by the peak position, was found to be dependent on each coumarin, which agreed with our previous homodyne-detected ESFG study. Interestingly, the spectra at the air/water interface showed substantially broader bandwidths than those in equally polar bulk solvents or even bulk water, indicating that solvation environments at the air/water interface is more inhomogeneous than that in bulk solvents. At the air/water interface, the stabilization energy of the solvation not only changes with the change of the position and orientation of the surrounding solvents but also varies with the change of the position and orientation of the solute at the interface. We consider that this unique situation arising from the anisotropy along interface normal brings about a broader distribution of the stabilization energy of solvation at the air/water interface. The present work showed that the air/water interface provides a more inhomogeneous solvation environment than equally polar bulk solvents because of this broader distribution of the local solvation structure at the interface.

7. Acid-base equilibrium at an aqueous interface: pH spectrometry by heterodyne-detected electronic sum frequency generation (Yamaguchi, Bhattacharyya, Tahara)

We applied interface-selective heterodyne-detected electronic sum frequency generation (HD-ESFG) to the pH spectrometry of an air/cationic surfactant/water interface in order to obtain insight into an acid-base equilibrium at the interface. We used an indicator molecule adsorbed at the interface to probe local pH and local effective polarity. We obtained unprecedentedly high quality spectral data of the interfacial pH spectrometry, which clearly indicates that this interface has higher pH than the bulk owing to the positive charge of the head group of the surfactant. In addition, we found that the air/surfactant/water interface and the micelle interface of the same surfactant are essentially equivalent in local pH and local effective polarity.

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

8. Resolving inhomogeneity using lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy (Ishii, Tahara)

Fluorescence correlation spectroscopy (FCS) was extended by incorporating information of the fluorescence lifetime. This new experimental approach called *lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy* enables us to observe fluorescence lifetime fluctuations in the nano- to millisecond time region. The potential of this method for resolving inhomogeneity in complex systems was demonstrated. First, by measuring a mixture of two dye molecules having different fluorescence

lifetimes, it was shown that the lifetime-weighted correlation deviates from the ordinary intensity correlation only when the system is inhomogeneous. This demonstrated that lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy is capable of detecting inhomogeneity in an ensemble-averaged fluorescence decay profile without any a priori knowledge about the system. Second, we applied this method to a dye-labeled polypeptide, a prototypical model of complex biopolymers. It was found that the ratio between the lifetime-weighted and ordinary intensity correlation changes depending upon the environment around the polypeptide. This result was interpreted in terms of environment-dependent conformational inhomogeneity of the polypeptide. Delay-time dependence of the ratio was found to be constant from $\sim 1 \mu\text{s}$ to several milliseconds, indicating that the observed inhomogeneity is persistent in the measured time scale. In combination of fluorescence intensity correlation, lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy allows us to examine conformational fluctuations of complex systems in the time region from nano- to millisecond, being free from the translational diffusion signal.

9. Exploration of the correlation between solvation dynamics and internal dynamics of a protein (Jha, Ishii, Udgaonkar, Tahara, Krishnamoorthy)

Protein function is intimately related to the dynamics of the protein as well as to the dynamics of the solvent shell around the protein. Although it has been argued extensively that protein dynamics is slaved to solvent dynamics, experimental support for this hypothesis is scanty. In this study, measurements of fluorescence anisotropy decay kinetics have been used to determine the motional dynamics of the fluorophore acrylodan linked to several locations in a small protein, barstar in its various structural forms, including the native and unfolded states as well as the acid and protofibril forms. Fluorescence up-conversion and streak camera measurements have been used to determine the solvation dynamics around the fluorophore. Both the motional dynamics and solvent dynamics were found to be dependent upon the location of the probe as well as on the structural form of the protein. While the (internal) motional dynamics of the fluorophore occur in the 0.1 – 3 ns time domain, the observed mean solvent relaxation times are in the range of 20 – 300 ps. A strong positive correlation between these two dynamical modes was found in spite of the significant difference in their timescales. This observed correlation is a strong indicator of the coupling between solvent dynamics and the dynamics in the protein.

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

乙須 拓洋 Takuhiro Otsu

服部 達哉 Tatsuya Hattori

Zhengrong Wei

Sudip Kumar Mondal

Susanne Fechner

Jahur Alam Mondal

Prashant Singh

Linqiang Hua

Matthew Sartin

Students

倉持 光

Achintya Kundu

Assistant and Part-timer

穠山 和恵 Kazue Akiyama

大里 砂里 Sari Osato

関子 明子 Akiko Zushi

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