

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、最も先端的な線形・非線形分光計測法を用い、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

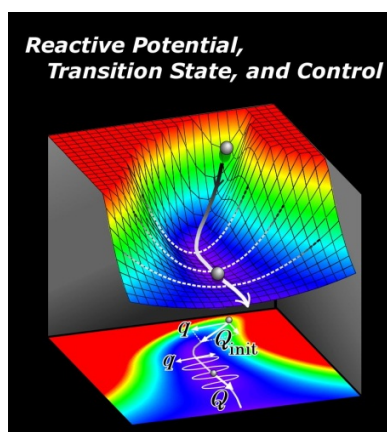


図. 超高速分光による化学反応の研究

1. 時間領域ラマン分光法によるイェロープロテイン光反応初期過程における超高速水素結合ダイナミクスの観測と最初の光サイクル中間体の構造決定
(倉持、竹内、米澤¹、上久保¹、片岡¹、田原)

イエロープロテインは紅色光合成細菌の負の走行性を担う光受容タンパク質であると考えられており、その機能発現の分子機構に興味を持たれている。イエロープロテインの機能は発色団である p-クマル酸 (pCA) の trans-cis 光異性化によって誘起される数百ミリ秒に渡る光サイクルを通じて発現すると考えられているが、その光サイクルには未だに明らかでない点が多かった。特に、フェムト秒～ピコ秒の時間スケールにおける構造ダイナミクスの詳細は実験的困難から現在まで明らかにされてこなかった。我々は独自のフェムト秒時間分解インパルスラマン分光法を用いることにより、フェムト秒スケールにおいて進行する発色団近傍の水素結合構造の変化を明らかにするとともに、機能発現に関わる最初の光サイクル中間体における特異的にねじれた発色団の構造を初めて明らかにした。特に後者については、最近の時間分解 X 線回折を用いた研究で 2 つの異なる構造が報告され、それが論争となっていた。今回の研究結果は、我々の手法がフェムト秒の時間分解能と詳細な構造情報を兼ね備えた唯一無二の手法であることを示している。

¹ 奈良先端科学技術大学院大学

2. 定常および時間分解蛍光分光を用いた新規芳香族ミセルの内部局所環境の研究 (Sartin、近藤¹、吉沢¹、竹内、田原)

新規に開発された芳香族ミセルの内部の局所的な環境を、内部に包摂させた蛍光プローブ分子に対する定常およびフェムト～ピコ秒時間分解蛍光分光により研究した。包摂されたプローブ分子の吸収スペクトルは水溶液の場合よりも長波長側に観測されたため、ミセル内部は極性の高い環境をもつと考えられる。その一方、蛍光のストークスシフトは水溶液の場合よりも小さく、またフェムト秒蛍光分光で観測されたダイナミックストークスシフトは 1 ピコ秒以内に完了した。これらの結果から、プローブ分子の光励起に対するミセル内部の変化は限定的な振幅のすばやい応答によるものと考えられる。また回転緩和時間の測定から、このミセルが柔軟にサイズを変え分子を包摂する特性を有することが明らかになった。

¹ 東工大

3. 深紫外共鳴誘導ラマン分光装置の開発 (倉持、藤澤、竹内、田原)

紫外共鳴ラマン分光法は、深紫外領域 (240 - 300 nm) に強い吸収を示す芳香族アミノ酸残基 (tyrosine, tryptophan, phenylalanine) のラマンスペクトルを共鳴増強効果により選択的に観測することが出来る強力な手法である。この利点を活かし、これまで様々な光受容タンパク質における発色団の光励起に伴った周辺アミノ酸残基の局所構造変化が時間分解紫外共鳴ラマン分光法により研究されてきた。一方でこれらの研究は全て自発ラマン散乱の観測に基づいており、原理的にその利用はピコ秒以降の時間領域で起こるダイナミクスの観測に限定されていた。すなわち、光励起直後、フェムト秒の時間スケールにおける発色団周辺のアミノ酸残基の応答に関する詳細な知見はこれまで得られていない。この状況を打破するためにはフェムト秒の時間分解能と高い波数分解能を兼ね備え、かつタンパク質の局所構造変化を選択的に観測することが出来る新規計測手法の開発が必須である。このような背景のもと、今回我々は新たに深紫外共鳴誘導ラマン分光装置を開発した。狭帯域深紫外ラマン励起光 (<10 cm⁻¹) と広帯域深紫外フェムト秒プローブ光 (>1500 cm⁻¹) を用いた誘導ラマン散乱を用いることで tryptophan、tyrosine の紫外共鳴ラマンスペクトルの観測に成功した。今後光反応開始光を導入することでフェムト秒スケールにおける光受容タンパク質の局所構造変化の追跡が可能になるものと考えられる。

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

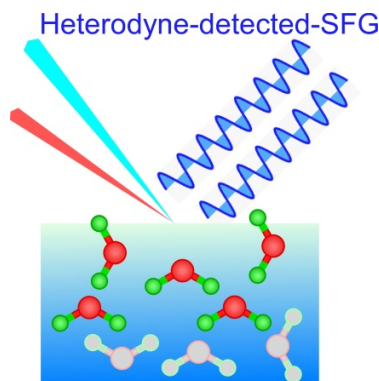


図. 和周波発生を用いた空気/水界面の観測

1. 水表面の溶媒和電子を観測

(松崎、日下、二本柳、山口、永田¹、田原)

溶媒和電子は電子とそれを溶媒和する水のみから形成される最も単純な陰イオンである。これまでにバルク水中の溶媒和電子の構造とダイナミクスについては、実験、理論の両面から極めて精力的に研究されてきたが、界面で溶媒和電子がどのような形で存在しているかについては全く分かっていない。我々は、紫外光励起と界面選択的な振動分光法であるヘテロダイン検出振動和周波発生分光法を組み合わせた新しい分光法「紫外励起時間分解ヘテロダイン検出振動和周波発生分光法」を開発し、これを水表面における溶媒和電子の観測に適用した。267 nmの紫外光照射に伴う水分子の2光子イオン化によって水表面付近に電子を発生させ、紫外光照射からの遅延時間の関数として界面選択的な過渡スペクトルを測定した。その結果、電子を水和している水分子に由来する正の符号を持つ過渡OHバンドが明確に観測された。これは溶媒和電子が水界面に存在することの決定的証拠である。また、OHバンドが正であることは水が水素上向きで配向していることを意味している。さらに、このOHバンドの中心波数は、気相クラスターで観測された値とバルク水中で観測された値の中間に位置している。これらの結果から、水表面の電子は下側半分が部分的に溶媒和された構造をとっていると考えられる。さらに水表面に生じた電子は約100ピコ秒で、水中に拡散していくことが明らかとなった。

¹東大

2. 時間分解ヘテロダイン検出振動和周波発生分光による空気 / 水界面の超高速水素結合ダイナミクス

(井上、石山¹、二本柳、山口、森田²、田原)

空気/水界面における界面水の超高速振動ダイナミクスを時間分解ヘテロダイン検出振動和周波発生分光法 (TR-HD-VSFG) と MD シミュレーションを用いて研究した。最近、ドイツのグループによってエネルギー的に孤立して極めて遅いダイナミクスを示す水素結合した水のOH (HB OH) が 3500 cm^{-1} 付近に存在するという驚くべき報告がされた。このような界面特異的なHB OHの存在の有無を明確にすることは、界面の水分子の構造やダイナミクスを理解する上で不可欠である。本研究では、測定条件に細心の注意を払いながらHB OHバンドの高波数側 (3500 cm^{-1}) と低波数側 (3300 cm^{-1}) を選択的に励起したあとの各々のスペクトル拡散ダイナミクスを比較した。高波数側を励起した場合は、低波数側励起の場合よりも幅の狭いブリーチバンドが励起直後に観測された。しかし、そのような励起波数依存性は 0.5 ps 程度でほとんど消失した。このことはHB OHバンドのスペクトル拡散は励起波数にかかわらず非常に効率よく進行することを意味している。実験結果は、MDを用いた理論計算によりうまく再現された。実験と理論ともに、水表面のスペクトル拡散がフェムト秒領域で進行することを示した。

¹富山大、²東北大

3. 脂質界面におけるフェムト秒の水の揺らぎを観測 (Singh、井上、二本柳、山口、田原)

脂質膜近傍の水分子はドラッグデリバリー、イオン輸送、脂質融合など多くの重要な生物学的過程において本質的な役割を担っている。従って、脂質界面の水の性質を分子レベルで解明することは非常に重要である。我々は、2次元ヘテロダイン検出和周波発生分光法を用いて2種類のイオン性脂質単分子膜と同位体希釈水 (HOD) の界面においてOH伸縮振動の超高速ダイナミクスを計測した。その結果、正に帯電した脂質界面における水の水素結合ダイナミクスはバルク水と同様に100 fs以下の非常に速い揺らぎに支配されているのに対して、負に帯電した脂質界面ではそのような超高速の揺らぎが抑制されていることが初めて見出された。この結果は界面水と負に帯電した脂質のリン酸基との水素結合によって水の揺らぎが抑制されていると説明される。

4. 気水界面の変角振動領域の $\chi^{(2)}$ スペクトル (Kundu、田中¹、石山²、Mohammed、井上、二本柳、澤井¹、山口、森田¹、田原)

界面水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HD-VSFG分光法を用いて様々な水界面における水の構造を研究してきた。これまで、界面水のHD-VSFG分光測定はOH伸縮振動領域に限られていたが、今回我々は初めて変角領域の二次非線形感受率($\chi^{(2)}$)スペクトルの観測に成功した。変角領域の $\chi^{(2)}$ スペクトルの虚部は1650 cm^{-1} を中心として全体的に正であった。さらにNaI溶液表面の $\chi^{(2)}$ スペクトルの虚部も正であり、なおかつ純水表面のそれよりも大きいことを見出した。この結果は、変角領域の $\chi^{(2)}$ スペクトルが界面双極子項由来であれば純水表面とNaI溶液表面とで水の配向方向が変化していないことを意味しており、純水表面とNaI溶液表面において水の配向が異なるという伸縮振動領域から得られた知見と矛盾している。したがって、得られた結果は変角領域の $\chi^{(2)}$ スペクトルが界面双極子項よりもバルク四重極子項に支配されていることを示唆している。

¹東北大、²富山大

5. セラミド界面の水の配向メカニズム (Adhikari、李¹、二島¹、Mohammed、二本柳、Klauda²、杉田¹、田原)

細胞を構成する重要な要素である脂質膜と水の界面は種々の生体反応が起こる反応場であり、脂質/水界面の構造を分子レベルで解明することは生物学的過程を理解するうえで極めて重要である。我々はこれまでにヘテロダイン検出振動和周波発生 (HD-VSFG) 分光法を用いて種々のイオン性脂質膜界面における水の構造を明らかとしてきたが、非イオン性脂質界面の構造についてはいまだにほとんど分かっていない。そこで本研究では非イオン性界面の一例として、セラミドと水の界面についてHD-VSFG分光法とMDシミュレーションを用いて調べた。我々はまずHD-VSFG分光法を用いてセラミド/水界面の水が水素上向きで配向をしていることを実験的に明らかとした。MDシミュレーションを行なった結果、観測されたセラミド界面の水の上向き配向は、セラミド親水基内の分子内水素結合とセラミド-水間の分子間水素結合が誘起する上向き配向と下向き配向の微妙な加減によって生じていることが示唆された。このような分子内水素結合を形成するかどうかは脂質分子のヘッドグループの構造に依存するはずであるから、この結果は中性脂質界面の水の配向も脂質分子のヘッドグループの構造に強く依存することを示している。

¹杉田理論分子科学研究室、²メリーランド大

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

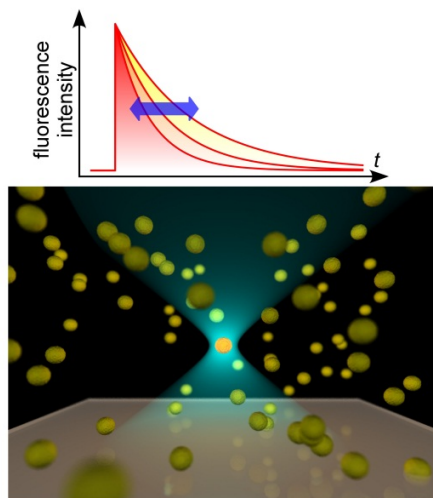


図. 新しい蛍光相関分光による複雑分子のダイナミクスの観測

1. 二次元蛍光寿命相関分光法によるヘアピンRNA/DNAの構造形成・解離機構の研究 (Cheng、石井、田原)

二種類の核酸、RNAとDNAは化学的にきわめて類似しているにもかかわらず、その生体機能は大きく異なっている。そこで本研究では、ヘアピン構造の形成・解離ダイナミクスを対象に、2D-FLCS法を用いてRNAとDNAの比較を行った。今回、構造変化の特徴を熱力学的に検討するため、測定温度を制御できるように既存の2D-FLCS装置を改造した。得られたヘアピン形成速度の温度依存性を検討した結果、DNAではほとんど温度変化が見られない一方で、RNAでは大きく変化することが分かった。このことは、ヘアピン構造形成過程においてDNAではエントロピー障壁が支配的であるが、RNAではエンタルピー障壁が存在することを示している。この結果から、一本鎖DNAのダイナミクスは構造空間のエントロピー的な探索として理解できるが、対照的にRNAは一本鎖状態で準安定的な構造を取っており、そのダイナミクスは自由エネルギー面上の局所的な極小の間の遷移として理解できると結論した。

2. 動的蛍光消光を用いた二次元蛍光寿命相関分光法の開発 (Sarkar、石井、田原)

動的蛍光消光現象を2D-FLCS法と組み合わせ、単一の蛍光色素標識のみを用いて生体高分子のマイクロ秒オーダーの構造ダイナミクスを調べることができる新しい手法を開発した。動的消光現象を利用すると、生体高分子に標識された蛍光色素の溶媒露出度が分子構造によって変化するとき、これを蛍光寿命の違いとして検出できる。これと2D-FLCS法を組み合わせることで異なる構造状態を区別し、それらの交換の時間スケールをマイクロ秒の時間分解能で計測することが可能になる。この手法を単一蛍光標識したヘアピンDNAに適用することで、ヘアピン構造とヘアピンが解離した構造の間の約50マイクロ秒のダイナミクスを検出することができた。この手法は生体高分子の特定の部位の局所的な環境の揺らぎを研究する新しい手段となり、通常一分子FRETにより調べられている生体高分子の大域的な構造変化と相補的な情報を得るために活用できる。

3. 二次元蛍光寿命相関分光法による脂質膜上シトクロム *c* の構造揺らぎの研究 (坂口、山中¹、廣田¹、石井、田原)

ミトコンドリアのタンパク質であるシトクロム *c* (Cyt *c*) は、ミトコンドリア内膜に特異的な脂質、カルジオリピン (CL) を含む脂質膜上でその一部が変性する構造揺らぎを生じる。これはアポトーシスの初期過程

への引き金となることから、注目されている。本研究ではウマCyt c に蛍光色素を標識し、20%CLを含有する脂質膜小胞上での構造ダイナミクスを2D-FLCS法を用いて調べた。その結果、二つの変性構造のアンサンブルが分離して検出され、各アンサンブル内で複数の構造状態を表す蛍光寿命ピークが観測された。各構造状態間の交換の時間スケールは25マイクロ秒より速い一方、二つのアンサンブル間の交換はミリ秒より遅かった。本研究により、脂質膜上で時間的に階層的なCyt c の構造揺らぎが誘起されていることが分かった。

¹奈良先端科学技術大学院大学

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 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 the early stages of photoreception in photoactive yellow protein with ultrafast time-domain Raman spectroscopy
(Kuramochi, Takeuchi, Yonezawa¹, Kamikubo¹, Kataoka¹, Tahara)

Unveiling the nuclear motions of photoreceptor proteins in action is a crucial goal in protein science in order to understand their elaborate mechanisms and how they achieve optimal selectivity and efficiency. Previous studies have provided detailed information on the structures of intermediates that appear during the later stages (>ns) of such photoreception cycles, yet the initial events immediately after photoabsorption remain unclear because of experimental challenges in monitoring nuclear rearrangements on ultrafast timescales, 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 a mutant with high sensitivity, providing insights into the key responses that drive

photoreception. Our data showed a drastic intensity drop of the excited-state marker band at 135 cm^{-1} within a few hundred femtoseconds, suggesting a rapid weakening of the hydrogen bond that anchors the chromophore. We also tracked formation of the first ground-state intermediate over the first few picoseconds and fully characterized its vibrational structure, revealing a substantially-twisted cis conformation.

¹NAIST

2. Local environment inside a novel aromatic micelle investigated by steady-state and femtosecond fluorescence spectroscopy
(Sartin, Kondo¹, Yoshizawa¹, Takeuchi, Tahara)

The local environment within a recently developed anthracene-shelled micelle (ASM), which is a micelle-like nanocapsule composed of anthracene-embedded amphiphiles, was investigated by steady-state and time-resolved spectroscopy of an encapsulated solvatochromic fluorescent probe molecule, coumarin 153 (C153). The absorption maximum of encapsulated C153 (452 nm) is more red-shifted than that of free C153 in water, indicating a highly polar environment inside the micelle. Despite this, the fluorescence Stokes shift of encapsulated C153 ($\sim 3700\text{ cm}^{-1}$) is substantially smaller than that of free C153 in water. Femtosecond time-resolved broadband fluorescence measurements further showed that the dynamic Stokes shift is completed within 1 ps, revealing that the reorganization of the micelle interior following photoexcitation of the C153 probe is characterized by a sub-picosecond, limited-amplitude response. The femtosecond fluorescence anisotropy data showed that the orientational diffusion of the host-guest complex is slower (860 ps) than that of the empty micelle (510 ps), suggesting that the micelle structure is flexible enough to expand when the guest molecule is accommodated and that the micelle rotates with the encapsulated guest molecule. This softness of the micelles further allows some of them to simultaneously encapsulate two C153 molecules, as evidenced by the appearance of blue-shifted, H-dimer-like absorption and fluorescence bands.

¹Tokyo Institute of Technology

3. Development of broadband stimulated Raman spectroscopy in the deep ultraviolet region
(Kuramochi, Fujisawa, Takeuchi, Tahara)

We newly developed a setup for broadband stimulated Raman measurements in the deep ultraviolet (DUV) region, which enables selective probing of the aromatic amino acid residues inside proteins through the resonance enhancement. We combine the narrowband DUV Raman pump pulse ($<10\text{ cm}^{-1}$) at wavelengths as short as 240 nm and the broadband DUV probe pulse ($>1000\text{ cm}^{-1}$) to realize stimulated Raman measurements covering a $>1500\text{ cm}^{-1}$ spectral window. The stimulated Raman measurements for neat solvents, tryptophan, tyrosine, and glucose oxidase are performed using 240- and 290-nm Raman pump, highlighting the high potential of the DUV stimulated Raman probe for femtosecond time-resolved study of proteins.

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

1. Observation of hydrated electrons at the air/water interface
(Matsuzaki, Kusaka, Nihonyanagi, Yamaguchi, Nagata¹, Tahara)

Hydrated electrons are the most fundamental anion species, consisting only of electrons and surrounding water molecules. Although hydrated electrons have been extensively studied in the bulk aqueous solutions, even their existence is still controversial at the water surface. We investigated the hydrated electrons at the air/water interface using new time-resolved interface-selective nonlinear

vibrational spectroscopy, i.e., UV-excited time-resolved heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy. With the generation of electrons at the air/water interface by ultraviolet photo-irradiation, we observed the appearance of a strong transient band in the OH stretch region by heterodyne-detected vibrational sum-frequency generation. Through the comparison with the time-resolved spectra at the air/indole solution interface, the transient band was assigned to the vibration of water molecules that solvate electron at the interface. The analysis of the frequency and decay of the observed transient band indicated that the electrons are only partially hydrated at the water surface, and that they escape into the bulk within 100 ps.

¹Univ. of Tokyo

2. Efficient spectral diffusion at the air/water interface revealed by femtosecond time-resolved heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy.
(Inoue, Ishiyama¹, Nihonyanagi, Yamaguchi, Morita², Tahara)

Femtosecond vibrational dynamics at the air/water interface is investigated by time-resolved heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (TR-HD-VSFG) spectroscopy and molecular dynamics (MD) simulation. The low- and high-frequency sides of the hydrogen-bonded (HB) OH stretch band at the interface are selectively excited with special attention to the bandwidth and energy of the pump pulses. Narrow bleach is observed immediately after excitation of the high-frequency side of the HB OH band at $\sim 3500\text{ cm}^{-1}$, compared to the broad bleach observed with excitation of the low-frequency side at $\sim 3300\text{ cm}^{-1}$. However, the time-resolved spectra observed with the two different excitations become very similar at 0.5 ps and almost indistinguishable by 1.0 ps. This reveals that efficient spectral diffusion occurs regardless of the difference of the pump frequency. The experimental observations are well-reproduced by complementary MD simulation. There is no experimental and theoretical evidence that supports extraordinary slow dynamics in the high-frequency side of the HB OH band, which was reported before.

¹Univ. of Toyama, ²Tohoku Univ.

3. Femtosecond hydrogen-bond dynamics of bulk-like and bound water at positively and negatively charged lipid interfaces revealed by 2D HD-VSFG spectroscopy.
(Singh, Inoue, Nihonyanagi, Yamaguchi, Tahara)

Interfacial water in the vicinity of lipids plays an important role in many biological processes, such as drug delivery, ion transportation, and lipid fusion. Hence, molecular-level elucidation of the properties of water at lipid interfaces is of the utmost importance. In the present study, we apply two-dimensional heterodyne-detected vibrational sum frequency generation (2D HD-VSFG) spectroscopy to study the vibrational dynamics of the OH stretch of HOD at charged lipid interfaces. The data indicate that the spectral diffusion of the OH stretch at a positively charged lipid interface is dominated by the ultrafast ($< \sim 100\text{ fs}$) component, followed by the minor sub-picosecond slow dynamics, while the dynamics at a negatively charged lipid interface exhibit sub-picosecond dynamics almost exclusively, implying that fast hydrogen bond fluctuation is prohibited. These results reveal that the ultrafast hydrogen bond dynamics at the positively charged lipid-water interface are attributable to the bulk-like property of interfacial water, whereas the slow dynamics at the negatively charged lipid interface are due to bound water, which is hydrogen-bonded to the hydrophilic head group.

4. Bend vibration of surface water investigated by heterodyne-detected sum frequency generation and theoretical study: Dominant role of quadrupole.
(Kundu, Tanaka¹, Ishiyama², Ahmed, Inoue, Nihonyanagi, Sawai¹, Yamaguchi, Morita¹, Tahara)

Heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy was applied to the water

surface for measuring the imaginary part of second-order nonlinear susceptibility ($\text{Im } \chi^{(2)}$) spectrum in the bend frequency region for the first time. The observed $\text{Im } \chi^{(2)}$ spectrum shows an overall positive band around 1650 cm^{-1} , contradicting former theoretical predictions. We further found that the $\text{Im } \chi^{(2)}$ spectrum of NaI aqueous solution exhibits an even larger positive band, which is apparently contrary to the flip-flop orientation of surface water. These unexpected observations are elucidated by calculating quadrupole contributions beyond the conventional dipole approximation. It is indicated that the $\text{Im } \chi^{(2)}$ spectrum in the bend region has a large quadrupole contribution from the bulk water.

¹Tohoku Univ., ²Univ. of Toyama

5. Water orientation at ceramide/water interfaces studied by heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy and molecular dynamics simulation

(Adhikari, Re¹, Nishima¹, Mohammed, Nihonyanagi, Klauda², Sugita¹, Tahara)

Lipid/water interaction is essential for many biological processes. The water structure at the nonionic lipid interface remains little known, and there is no scope of a priori prediction of water orientation at nonionic interfaces, either. In the present study, we combined advanced nonlinear spectroscopy and molecular dynamics simulation to investigate the water orientation at the ceramide/water interface. We measured $\chi^{(2)}$ spectrum in the OH stretch region of ceramide/isotopically diluted water interface using heterodyne-detected vibrational sum-frequency generation spectroscopy and found that the interfacial water prefers an overall hydrogen-up orientation. Molecular dynamics simulation indicates that this preferred hydrogen-up orientation of water is determined by a delicate balance between hydrogen-up and hydrogen-down orientation induced by lipid–water and intralipid hydrogen bonds. This mechanism also suggests that water orientation at neutral lipid interfaces depends highly on the chemical structure of the lipid headgroup, in contrast to the charged lipid interfaces where the net water orientation is determined solely by the charge of the lipid headgroup.

¹Theoretical Molecular Science Laboratory, ²Univ. of Maryland

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

1. Study of folding/unfolding mechanism of hairpin RNA/DNA by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (Cheng, Ishii, Tahara)

Two types of nucleic acids, RNA and DNA, have distinct biological functions despite of their similar chemical structures. In this work, we compare the folding/unfolding dynamics of a hairpin-forming single-stranded RNA and a corresponding DNA analog using 2D FLCS. In order to study the thermodynamics of the structure change, we have added a temperature controller to the previous 2D FLCS setup. It was observed that the folding rate of the hairpin DNA was almost insensitive to the temperature, whereas that of the hairpin RNA showed a substantial temperature dependence. This result indicates that in DNA, the reaction barrier in the folding process is dominated by the entropic contribution, while in RNA, there exists an enthalpic barrier. We concluded that the dynamics of single-stranded DNA is described as an entropic search in the conformational space. In contrast, single-stranded RNA takes metastable states and its dynamics is described as transitions among local minima on the free energy landscape.

2. Development of dynamic quenching based two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (Sarkar, Ishii, Tahara)

We developed a new method to study microsecond-resolved conformational dynamics of biopolymers with only single dye labeling by combining dynamic fluorescence quenching and two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (DQ 2D FLCS). Dynamic quenching makes the fluorescence lifetimes of individual conformers of a biopolymer different when the solvent accessibility around the dye is different. 2D FLCS distinguishes these conformers and provides their interconversion timescale with a microsecond time resolution. Applying DQ 2D FLCS to a singly-labeled hairpin DNA, we successfully resolved ~ 50 microsecond dynamics between the 'open' and 'folded' states. This new method can be utilized to study dynamic changes in the local environment of a biopolymer, which is complementary to the information about global dynamics obtained with single molecule FRET.

3. Conformational fluctuation of cytochrome *c* on lipid membrane detected by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy
(Sakaguchi, Yamanaka¹, Hirota¹, Ishii, Tahara)

A conformational fluctuation of cytochrome *c* (Cyt*c*) is induced by its interaction with cardiolipin (CL), which is one of major components of the inner mitochondrial membrane. We studied the structural and temporal details of this conformational fluctuation by two-dimensional fluorescence lifetime correlation spectroscopy (2D FLCS). As a result, two ensembles of partially unfolded forms of Cyt*c* were detected on the lipid membrane. For each of them, several conformational substates were observed as distinct fluorescence lifetime peaks. The fluctuations among these substates were found to occur on a timescale faster than 25 microseconds. On the other hand, interconversion between the two ensembles takes longer than a few milliseconds. It is concluded that a temporally hierarchical structural fluctuation of Cyt*c* is induced on the CL-containing membrane.

¹NAIST

Principal Investigator

田原 太平 Tahei Tahara

Research Staff

竹内 佐年 Satoshi Takeuchi

石井 邦彦 Kunihiko Ishii

二本柳 聡史 Satoshi Nihonyanagi

倉持 光 Hikaru Kuramochi

井上 賢一 Kenichi Inoue

浦島 周平 Shuhei Urashima

坂口 美幸 Miyuki Sakaguchi

平松 光太郎 Kotaro Hiramatsu

田原 進也 Shinya Tahara

Anton Myalitsin

Bidyut Sarkar

Ahmed Mohammed

Kumar Pardeep

Students

張 君輔 Chun-Fu Chang

長谷川 一途 Kazuto Hasegawa

Rohit Vaidya

Jooyoung Sung

Woojae Kim

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

大澤 正久 Masahisa Osawa

乙須 拓洋 Takuhiro Otsu

Prashant Chandra Singh