

## 科学研究費補助金研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2011

課題番号：19056009

研究課題名（和文） 極限的分光計測による複雑系高次分子機能の研究

研究課題名（英文） Study of complex molecular systems by advanced molecular spectroscopy

研究代表者

田原 太平 (TAHARA TAHEI)

独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・主任研究員

研究者番号：60217164

研究成果の概要（和文）：

極限的な分子計測を駆使して複雑分子系の研究を推進した。超高速分光では、シススチルベン異性化の多次元的反応座標の解明、銅 (I) 錯体の超高速構造変化機構の解明、シアニン色素の異性化座標に沿った核波束運動の追跡など、多原子分子の反応初期過程の研究を行った。界面選択的非線形分光では、電子和周波発生と振動和周波発生へのヘテロダイナミクス検出を実現し、生体膜モデル界面を含む水界面での基本現象に関する多くの新しい知見を得た。相関分光では、蛍光寿命測定と蛍光相関測定を組み合わせ、生体高分子の構造揺らぎの研究に高いポテンシャルをもつ新しい方法を開発した。

研究成果の概要（英文）：

We studied complex molecular systems using the most advanced spectroscopy. With ultrafast spectroscopy, we elucidated the multi-dimensional reaction coordinate of isomerization of cis-stilbene, clarified the mechanism of the ultrafast structural change of Cu(I) complexes, and succeeded in tracking nuclear motion along the isomerization coordinate of a prototypical cyanine dye. With interface-selective nonlinear spectroscopy, we developed heterodyne-detected electronic and vibrational sum-frequency generation spectroscopies and obtained a number of new insights into fundamental phenomena at water interfaces including the interface of model membranes. For correlation spectroscopy, we combined fluorescence intensity correlation measurements and fluorescence lifetime measurements to develop a new method that has a very high potential for the study of structural fluctuation of biopolymers.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	29,300,000	0	29,300,000
2008年度	6,900,000	0	6,900,000
2009年度	31,600,000	0	31,600,000
2010年度	6,900,000	0	6,900,000
2011年度	6,900,000	0	6,900,000
総計	81,600,000	0	81,600,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：凝縮相、ダイナミクス、超高速分光、非線形分光、相関分光、複雑分子系、界面、生体関連分子

## 1. 研究開始当初の背景

短パルスレーザーの長足の発達によって、この 10 年間に分子科学研究は飛躍的に進んだ。特に凝縮相の基本分子ダイナミクスの研究では 10 フェムト秒にいたる時間分解能で多様な分光実験ができるようになった。近年、アト秒パルスの発生が報告され注目されているが、これは本質的に軟 X 線領域の実験であることを考えると、可視、紫外光による価電子励起、あるいは熱励起による通常の意味での化学過程の分光学的研究においては、時間分解能向上の挑戦はその限界に達したと言える。したがって、分光計測に基づく分子科学にとっては、単純分子系の研究によって蓄積されてきた知識と技術をいかに新しい問題の解明に向けるかということが重要であった。その最も重要なターゲットの一つが生体系を頂点とする高次構造を有する複雑系における分子の性質と機能の理解と制御であると思われた。

われわれはそれまでに、10 フェムト秒から 1 ピコ秒の時間分解能の時間分解吸収分光、蛍光分光、ラマン分光等を駆使して凝縮相の（主として溶液中での）基本分子のダイナミクスの研究で成果を上げていた。また、先に述べた問題意識のもとに、不均一系を研究するための独自の新しい分光計測法を開発していた。例えば、界面分子の電子スペクトルを飛躍的に高い精度で測定することのできる 2 次非線形分光計測法、マルチプレックス電子和周波（ESFG）法を開発した。この ESFG 法によって、界面分子の電子スペクトルが、溶液中分子の吸収スペクトルに匹敵する高い質で初めて測定できるようになっていた。これら世界的にトップレベルにあるわれわれの分光計測を用いて、生体系を頂点とする高次構造を有する複雑系の分子科学研究を開始することが急務であった。

## 2. 研究の目的

世界的にみてトップレベルにあるわれわれの分光計測技術を駆使し、生体系を頂点とする高次構造を有する複雑分子系に対する研究を行う。具体的には以下の 3 つを骨子とする。

(1) 超高速分光を用いた生体分子を始めとする複雑分子系のダイナミクスの解明と機能発現機構の解明、

(2) 界面選択的な新規非線形分光の開発とそれを用いた液体界面、生体モデル界面の分光計測、

(3) 極限的時空間分光計測法の開発と細胞を含む複雑系における分子ダイナミクスの実測。

これにより、他分野にも大きな影響を与える分子科学の新しい潮流を作ることを目的とする。

## 3. 研究の方法

本研究では、超短パルスレーザーを用いた、(1)超高速分光計測、(2)界面選択的非線形分光計測、(3)時空間分解分光計測、の 3 つの先端分光計測を開発、駆使しながら研究を推進した。具体的には、(1)では 100fs 級の短パルスを用いた時間分解蛍光・吸収分光、10fs 級の極短パルスを用いた時間分解インパルスラマン分光およびポンプ-ダンプ-プローブ分光を用いて研究を推進した。(2)ではわれわれが独自に開発したマルチプレックス電子和周波発生をもとに、信号電場の位相情報を得られるヘテロダイン検出電子和周波発生（HD-ESFG）分光を開発し、電子スペクトルによる界面研究を推進した。さらにそれを振動スペクトル測定に拡張するため、ヘテロダイン検出振動和周波発生（HD-VSFG）分光を開発し、これを用いて振動スペクトルによる界面研究を推進した。(3)では蛍光相関測定の光励起にフェムト秒レーザーを用いて、蛍光寿命測定を組み合わせた新しい蛍光相関分光を開発する研究を推進した。

## 4. 研究成果

全てのテーマで極めて多くの高い成果が上がった。以下にそれぞれのテーマについて、いくつかの代表的な成果について記す。

### (1) 超高速分光計測による研究

10fs 級の超短パルス光を用いた超高速分光を駆使して複雑分子系の光反応初期過程を分子の多次元性に着目しながら研究した。特にシススチルベンについては時間分解インパルスラマン分光と量子化学計算を用いてその多次元的反応座標を明らかにした。銅 (I) 錯体についてはフェムト秒時間分解蛍光分光、フェムト秒時間分解吸収分光、および 10fs 級の極短パルスを用いたポンプ-プローブ分光を用いて、超高速構造変化と光励起直後のコヒーレントな核波束運動の観測を行い、電子励起状態のポテンシャル曲面に対する抜本的な新しい知見を得るとともに、初期核波束運動と構造変化の連関について議論した。シアニン色素の異性化反応については、ポンプ-ダンプ-プローブ分光を用いて異性化座標に沿った核波束運動の実時間追跡に成功した。これら基本複雑分子の研究をベースに生体分子系の研究を行い、フェムト秒時間分解蛍光分光とフェムト秒時間分解吸収分光を駆使して、ハロロドプシンの光

初期過程および蛍光タンパクの電子状態に対する新しい知見を得た。さらに超分子についても研究を行い、フェムト・ピコ秒領域のエネルギー移動過程を明らかにした。

#### (2) 界面選択的非線形分光による研究

このテーマでは、われわれのもつ高い超短パルスレーザー分光技術を最大限に生かして、分野を刷新する一群の新しい界面選択的偶数次非線形分光を開発した。具体的には、界面で発生する信号光の電場位相情報を得ることのできる、電子和周波発生と振動和周波発生へのヘテロダイン検出を実現し (HD-ESFG、HD-VSFG と名付けた)、二次の非線形感受率 ( $\chi^{(2)}$ ) そのもののスペクトルの測定を可能にした。この新しい方法で得られる  $\chi^{(2)}$  の虚部スペクトルは、 $\chi^{(1)}$  の虚部スペクトルである溶液中の紫外可視吸収スペクトルおよび赤外・ラマンスペクトルと直接比較できる界面の電子スペクトルと振動スペクトルである。加えて、 $\chi^{(2)}$  の虚部スペクトルは正、または負の符号をもって得られるが、これから界面分子の絶対配向に関する情報を得ることができる。HD-ESFG を用いて水界面の溶質分子の電子スペクトルを測定し、溶質が置換基の違いによって空気/水界面で分子配向を逆転する様子や、同じ空気/水界面でも分子配向の違いによって溶質分子は異なる実行的極性を感じていることなど、いくつもの界面特有の基本現象を初めて明らかにした。HD-VSFG に用いては水界面の水の OH 伸縮振動領域の振動スペクトルを測定し、帯電した水界面での水分子のフリップフロップ現象を初めて直接観測するとともに、空気/水界面にはこれまで存在すると考えられていた“氷的な”水構造は無いことを明らかにした。さらに生体膜モデル界面である脂質膜/水界面の測定に成功し、脂質のヘッドグループの荷電によってその周囲の水和水は配向を変えていることを明らかにした。

#### (3) 時空間分解分光計測による研究

このテーマでは蛍光寿命測定と蛍光相関測定を組み合わせ、生体高分子の構造揺らぎの研究に高いポテンシャルをもつ新しい相関分光法を開発した。具体的には、蛍光相関分光法 (FCS) の励起にフェムト秒レーザーを用い、信号検出に時間相関光子計数法 (TCSPC) を用いることで、蛍光光子が光励起後どれくらいの時間の後に発せられたかという蛍光寿命測定を、強度相関測定と同時にを行い、得られた光子情報の解析から、系が単一種からなるか複数種を含むかを明確に区別する方法 (寿命重み付き蛍光相関分光) および、2 点相関データを寿命情報を利用して 2 次的に展開することによって単一分子的挙動を示す化学種の蛍光減衰曲線を選択的に取得する方法 (二次元蛍光相関) を開発した。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 46 件)

- 1) K. ISHII, T. TAHARA  
“Extracting decay curves of the correlated fluorescence photons measured in fluorescence correlation spectroscopy”  
Chem. Phys. Lett. **519-520**, 130-133 (2012) 査読有
- 2) S. YAMAGUCHI, H. WATANABE, S. K. MONDAL, A. KUNDU, T. TAHARA  
““Up” versus “down” alignment and hydration structures of solutes at the air/water interface revealed by heterodyne-detected electronic sum frequency generation with classical molecular dynamics simulation”  
J. Chem. Phys. **135**, 194705 (2011) 査読有
- 3) S. NIHONYANAGI, T. ISHIYAMA, T. K. LEE, S. YAMAGUCHI, M. BONN, A. MORITA, T. TAHARA  
“Unified Molecular View of Air/Water Interface Based on Experimental and Theoretical  $\chi^{(2)}$  Spectra of Isotopically Diluted Water Surface”  
J. Am. Chem. Soc. **133**, 16875 - 16880 (2011) 査読有
- 4) Z.R. WEI, T. NAKAMURA, S. TAKEUCHI, T. TAHARA  
“Tracking of the Nuclear Wavepacket Motion in Cyanine Photoisomerization by Ultrafast Pump-Dump-Probe Spectroscopy”  
J. Am. Chem. Soc. **133**, 8205-8210 (2011) 査読有
- 5) S. YAMAGUCHI, K. SHIRATORI, A. MORITA, T. TAHARA  
“Electric quadrupole contribution to the nonresonant background of sum frequency generation at air/liquid interfaces”  
J. Chem. Phys. **134**, 184705 (2011) 査読有
- 6) M. IWAMURA, H. WATANABE, K. ISHII, S. TAKEUCHI, T. TAHARA  
“Coherent nuclear dynamics in ultrafast photoinduced structural change of bis-diimine copper (I) complex”  
J. Am. Chem. Soc. **133**, 7728-7736

- (2011) 査読有
- 7) S. YAMAGUTHI and T. TAHARA  
 "Acid-base equilibrium at an aqueous interface: pH spectrometry by heterodyne-detected electronic sum frequency generation"  
 J. Phys. Chem. C, **115**, 4168-4173 (2011)  
 査読有
- 8) S. K. MONDAL, S. YAMAGUCHI, T. TAHARA  
 "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"  
 J. Phys. Chem. C, **115**, 3083-3089 (2011) 査読有
- 9) A. JHA, K. ISHII, J. UDGAONKAR, T. TAHARA, G. KRISHNAMOORTHY  
 "Exploration of the correlation between solvation dynamics and internal dynamics of a protein"  
 Biochemistry, **50**, 397-408 (2011) 査読有.
- 10) K. ISHII, T. TAHARA  
 "Resolving inhomogeneity using lifetime-weighted fluorescence correlation spectroscopy."  
 J. Phys. Chem. B, **144**, 12383-12391 (2010). 査読有
- 11) S. YAMAGUCHI, H. HOSOI, M. YAMASHITA, P. SEN, T. TAHARA  
 "Physisorption gives narrower orientational distribution than chemisorption on a glass surface: A polarization-sensitive linear and nonlinear optical study"  
 J. Phys. Chem. Letters **1**, 2662-2665 (2010). 査読有
- 12) J.A. MONDAL, S. NIHONYANAGI, S. YAMAGUCHI, and T. TAHARA  
 "Structure and orientation of water at charged lipid monolayer/water interfaces probed by heterodyne-detected vibrational sum frequency generation spectroscopy"  
 J. Am. Chem. Soc., **132**, 10656-10657 (2010). 査読有
- 13) S. NIHONYANAGI, S. YAMAGUCHI, and T. TAHARA  
 "Water hydrogen bond structure near highly charged interfaces is not like ice" J. Am. Chem. Soc., **132**, 6867-6869 (2010). 査読有
- 14) P. SEN S. YAMAGUCHI and T. TAHARA,  
 "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"  
 Faraday Discussion, **145**, 411-428 (2010). 査読有
- 15) H. WATANABE, S. YAMAGUCHI, S. SEN, A. MORITA, T. TAHARA  
 "Half hydration" at the air/water interface revealed by HD-ESFG spectroscopy, polarization SHG, and MD simulation" J. Chem. Phys., **132**, 144701/1-144701/9 (2010). 査読有
- 16) K. ONO, J. K. KLOSTERMAN M. YOSHIZAWA, K. SEKIGUCHI, T. TAHARA, and M. FUJITA  
 "ON/OFF red emission from azaporphine in a coordination cage in water" J. Am. Chem. Soc., **131**, 12526-12527 (2009) 査読有
- 17) K. ISHII, S. TAKEUCHI and T. TAHARA  
 "Infrared-induced coherent vibration of a hydrogen-bonded system: Effects of mechanical and electrical anharmonic couplings" J. Chem. Phys., **131**, 044512/1-044512/9 (2009) 査読有
- 18) K. NAKASHIMA, T. NAKAMURA, S. TAKEUCHI, M. SHIBATA, M. DEMURA, T. TAHARA, and H. KANDORI,  
 "Property of Anion Binding Site of pharaonis Halorhodopsin Studied by Ultrafast Pump-Probe Spectroscopy and Low-Temperature FTIR Spectroscopy" J. Phys. Chem. B., **113**, 8429-8434 (2009) 査読有
- 19) J. KLOSTERMAN, M. IWAMURA, \*T. TAHARA and M. FUJITA,  
 "Energy transfer in a mechanically trapped exciplex"  
 J. Am. Chem. Soc., **131**, 9478-9479 (2009) 査読有
- 20) S. TAKEUCHI, S. RUHMAN, T. TSUNEDA, M. CHIBA, T. TAKETSUGU, \*T. TAHARA,  
 "Spectroscopic tracking of structural evolution in ultrafast stilbene photoisomerization" Science, **322**, 1073-1077 (2008). 査読有
- 21) T. NAKAMURA, S. TAKEUCHI, N. SUZUKI, T. TAHARA  
 "Revised steady-state fluorescence spectrum and nature of the reactive S<sub>1</sub>

- state of cis-stilbene in solution"  
Chem. Phys. Lett., **465**, 212-215 (2008)  
査読有
- 22) P. SEN, S. YAMAGUCHI, \*T. TAHARA,  
"New insight into the surface denaturation of proteins: electronic sum frequency generation study of cytochrome c at water interfaces"  
J. Phys. Chem. B, **112**, 13473-13475 (2008). 査読有
- 23) S. YAMAGUCHI, T. TAHARA,  
"Heterodyne-detected electronic sum frequency generation: 'Up' vs 'down' alignment of interfacial molecules"  
J. Chem. Phys., **129**, 101102 (2008). 査読有
- 24) T. NAKAMURA, S. TAKEUCHI, M. SHIBATA, M. DEMURA, H. KANDORI, T. TAHARA  
"Ultrafast pump-probe study of the primary photoreaction process in pharaonis halorhodopsin: Halide-ion dependence and isomerization dynamics" J. Phys. Chem. B, **112**, 12795-12800 (2008). 査読有
- 25) H. HOSOI, S. YAMAGUCHI, H. MIZUNO, A. MIYAWAKI, and T. TAHARA  
"Hidden Electronic State of Enhanced Green Fluorescence Protein"  
J. Chem. Phys. B, **112**, 2761-2763 (2008) 査読有
- 26) K. SEKIGUCHI, S. YAMAGUCHI, T. TAHARA,  
"Femtosecond time-resolved electronic sum-frequency generation (TR-ESFG) spectroscopy: A new method to investigate ultrafast dynamics at liquid interfaces" J. Chem. Phys., **128**, 114715/1-114715/8 (2008) 査読有
- 27) S. YAMAGUCHI, T. TAHARA,  
" $\chi^{(4)}$  Raman spectroscopy for buried water interfaces"  
Angew. Chem. Int. Ed. **46**, 7609-7612 (2007) 査読有
- 28) M. IWAMURA, S. TAKEUCHI, T. TAHARA  
"Real-time observation of the photoinduced structural change of bis-2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline copper (I) by femtosecond fluorescence spectroscopy: A realistic potential curve of the Jahn-Teller distortion"  
J. Am. Chem. Soc., **129**, 5248-5256 (2007) 査読有
- (2007) 査読有 他
- [学会発表] (127 件、うち国際会議 75 件)
- 1) T. TAHARA (招待講演)  
"Molecular behavior at water interfaces revealed by heterodyne-detected sum-frequency generation"  
The Third Asian Spectroscopy Conference (ASC2011)  
(Xiamen, China, November 28-December 28-December)
- 2) T. TAHARA (招待講演)  
"Seeing the unseen with ultrashort optical pulses"  
New Zealand Institute of Chemistry Conference 2011 (NZIC2011)  
(Hamilton, New Zealand, November 27-December 1)
- 3) T. TAHARA (招待講演)  
"Water interfaces studied by steady-state and time-resolved heterodyne-detected vibrational sum-frequency generation"  
The Federation of Analytical Chemistry and Spectroscopy Societies conference (FACSS 2011)  
(Reno, USA, October 2-7, 2011)
- 4) T. TAHARA (招待講演)  
"Nuclear dynamics of reacting excited states studied by multi-pulse time-domain spectroscopy"  
5th International Conference on Coherent Multidimensional Spectroscopy (CMDS)  
(Minneapolis, Minnesota, USA, Aug. 17-20, 2010).
- 5) T. TAHARA (基調講演)  
"Vibrational Spectroscopy Using Short Optical Pulses: Coherence, Transients and Interfaces"  
XXII International conference on Raman spectroscopy (ICORS2010)  
(Boston, Massachusetts, USA, Aug. 8-13, 2010).
- 6) T. TAHARA (招待講演)  
"Multiplex heterodyne-detected electronic and vibrational sum-frequency generation and their application"  
Telluride Science Research Conference (TSRC) on Nonlinear Optics at Interfaces  
(Telluride, Colorado, USA, June 21-25, 2010).
- 7) T. TAHARA (招待講演)

- “Observing structural evolution of reacting molecules: ultrafast photoisomerization of *cis*-stilbene”,  
Femtochemistry IX,  
(Beijing, China, August 8-13, 2009)
- 8) T. TAHARA (基調講演)  
“Ultrafast photochemical dynamics studied by femtosecond time-resolved fluorescence spectroscopy”  
Fluorescence 2009  
(Mumbai, India, March 16-19, 2009).
- 9) T. TAHARA (招待講演)  
“Looking for the reaction coordinate of photoisomerization of *cis*-stilbene”  
Gordon Conference on Vibrational Spectroscopy  
(South Hadley, Massachusetts, USA, August 3-8, 2008).
- 10) T. TAHARA (招待講演)  
“Development of new even-order nonlinear spectroscopy and its application to explore novel phenomena at liquid interfaces”  
9th Biennial Trombay Symposium on Radiation and Photochemistry (TSRP-2008)
- 11) T. TAHARA (基調講演)  
“Temporal vibrations of short-lived excited states observed by femtosecond time-domain spectroscopy”  
13<sup>th</sup> International Conference on Time-resolved Vibrational Spectroscopy (TRVS)  
(Freising, Germany, May 19-25, 2007)
- 12) T. TAHARA (招待講演)  
“New nonlinear electronic and vibrational spectroscopy to study liquid interfaces”,  
CLEO/QELS 2007  
(Baltimore, USA, May 6-11, 2007)

ほか

[図書] (計6件)

1. 山口祥一、細井晴子、田原太平  
“二光子吸収材料の非線形光学スペクトル測定”  
高効率二光子吸収材料の開発と応用  
(シーエムシー出版, 2011), 61-73
2. \*田原太平  
“II-2-3-5 偶数次非線形分光”  
現代界面コロイド科学の事典—サンプルから宇宙まで、  
(丸善、2010)
3. T. FUJINO and T. TAHARA, CRC Press,  
“Ultrafast Fluorescence Microscopes”, In

*Biochemical Application of Nonlinear Optical Spectroscopy*, 2009, Chapter 3, 20 pages (p.53-72)

他

[その他]

ホームページ等

<http://www.riken.jp/lab-www/spectroscopy/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田原 太平 (TAHARA TAHEI)

独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・主任研究員

研究者番号：6 0 2 1 7 1 6 4

(2) 研究分担者

竹内 佐年 (TAKEUCHI SATOSHI)

独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・専任研究員

研究者番号：5 0 2 8 0 5 8 2

山口 祥一 (YAMAGUCHI SHOICHI)

独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・専任研究員

研究者番号：6 0 2 5 0 2 3 9

石井 邦彦 (ISHII KUNIHICO)

独立行政法人理化学研究所・田原分子分光研究室・研究員

研究者番号：8 0 3 9 1 8 5 3

細井 晴子 (HOSOI HARUKO)

東邦大学・理学部生物分子科学科・講師

研究者番号：0 0 3 1 3 3 9 6

森田 明弘 (MORITA AKIHIRO)

東北大学・理学研究科・教授

研究者番号：7 0 2 5 2 4 1 8

浅野 素子 (ASANO MOTOKO)

首都大学東京・理工学研究科・准教授

研究者番号：8 0 2 0 1 8 8 8

(3) 連携研究者

なし