

エクストリームフォトンクス研究 Extreme Photonics Research

代表研究者 緑川 克美
MIDORIKAWA, Katsumi
(緑川レーザー物理工学研究室)
(Laser Technology Laboratory)

新しい光は新しい科学・技術を創成します。「光の世紀」と呼ばれる 21 世紀においては、新しい科学技術分野を創成かつ牽引し、新しい産業技術を支える基盤技術として未踏の光領域の開拓とその利用が広く社会から求められています。当研究推進グループでは、これまで理研が独自に開発を推進してきた軟 X 線アト秒パルスレーザーや近接場ナノ光源、テラヘルツ光源等に関するポテンシャルを活かし、これらの光源開発を更に推進すると同時に、物理、化学、工学、生物、医科学にわたる理化学研究所の総合性を活かして様々な光に関する応用研究との強力な連携による新しい光科学を開拓します。

1. 高強度軟 X 線アト秒パルス研究

研究担当者：緑川克美、須田 亮、鍋川康夫、高橋崇治、杉岡幸次、永田 豊、神成文彦^{*4}、山口 滋^{*4}、清水俊彦^{*1}、金井恒人^{*1}、加来昌典^{*4}、花田修賢^{*1}、Z. Wang^{*2}、S. Saugout^{*5}、M. Nurhuda^{*4}、山内 薫^{*3}、川瀬晃道^{*3}、石川頭一^{*4}、沖野友哉^{*4}、大石裕^{*2}、林伸一郎^{*2}、陳建芳^{*2}、馬日^{*2}、磯部圭佑^{*2}、中嶋聖介^{*2}、G. Sansone^{*5}、E. English^{*5} (緑川レーザー物理工学研究室) 平山秀樹、石橋幸二 (石橋極微デバイス研究室)、大森 整、片平和俊 (大森素形材工学研究室)、宮脇 敦史 (脳科学総合研究センター)

(1) 超短パルス高強度レーザーと物質の相互作用に関する研究

(a) サブ 10 フェムト秒高強度レーザーの開発に関する研究

超短パルス高強度レーザーと物質の相互作用に関する研究、特に高次高調波発生への応用を目的としてフェムト秒高強度レーザーの開発を行っている。パルス幅を 10 フェムト秒以下にしたレーザー光を用いて高調波発生を行うと、ターゲットガスのイオン化が抑制されるので、位相整合条件を保ちながら高強度レーザー光とターゲットガスとの相互作用が可能となり、より短波長の高調波発生が効率よく行えると期待されている。また発生する高調波のパルス幅は 1fs を切る光パルス、所謂アト秒パルスとなる。従ってレーザーシステムとして目標とする仕様は 10 フェムト秒を切るパルス幅と高調波発生に十分なピーク強度である。

増幅器中のスペクトル狭帯を補償する光学素子(誘電体多層膜フィルター)については、昨年度の時点で既に幾つかの試作品に対してテスト共振器で性能試験を行っている。また、実際の増幅器で用いる高破壊閾値の広帯域チャープミラーも製作した。本年度はこれらを用いて増幅器の構築を行った。レーザーシステムの構成は以下のとおりである。パルス幅約 7fs のモード同期発振器から発生した種光を Offner 型のストレッチャーにより 200ps 程度のパルス幅に延ばし、液晶位相変調器(SLM)を用いた位相補償装置を通す。その後、種光は上記高破壊閾値の広帯域チャープミラーで構成した共振器による再生増幅器で増幅され、さらにマルチパス増幅器で増幅され、回折格子対によるコンプレッサーでパルス圧縮される。

これまでの所、再生増幅器からの出力でパルスエネルギー約 70μJ を得(繰返し 1kHz)、スペクトル幅は 200nm を超えている。また、これをマルチパス増幅するとパルスエネルギーは 30mJ を超え(繰返し 10Hz)、スペクトル幅も 200nm 近くを維持する事ができた。なお、3 種類の誘電体膜を利用した特殊コーティングの折返しミラーを、このマルチパス増幅器の為に新たに開発した。スペクトル幅自体はサブ 10 フェムト秒を得るのに十分であったが、スペクトル形状に問題があり、圧縮後のパルスに大きなベダスタルが発生する事が予想されたので、再生増幅器中の誘電体多層膜フィルターを交換・調整して、幾分狭いスペクトル幅の状態にパルス圧縮を行った。主に高破壊閾値の広帯域チャープミラーを起源とする位相振動は位相補償器で取り除かれ、ほぼフーリエ限界に近い 12fs のパルス幅を得る事ができた。圧縮後のパルスエネルギーは 11mJ である。今後、誘電体多層膜フィルターを改良して、サブ 10 フェムト秒で 1TW のピーク強度を持つレーザーシステムを構築する予定である。

(b) 軟 X 線アト秒パルス列の干渉実験に関する研究

最近のフェムト秒高強度レーザー技術の発展と高次高調波発生に関する物理的理解の進展により、高次高調波は極端紫外～軟 X 線領域でのコヒーレントな高輝度光源としての地位を確立しつつある。そこで、この高次高調波を用いることにより従来の光源では不可能であった短波長領域での非線形光学現象の観測を目的として研究を行っている。また複数の次数の高調波を重ね合わせるとアト秒領域のパルス列(アト秒パルス列)が生成されるので、超高速現象を観測する光源としてもその特性を明らかにし、時間分解分光への応用を進めて行く事を目指している。

昨年度は窒素分子の 2 光子クーロン爆発を利用してアト秒パルス列のフリンジ分解自己相関測定によって、世界で初めてアト秒パルス列の電場対称性を直接観測する事ができた。この研究の成功の鍵は、(i) 2 光子クーロン爆発そのものの観測、(ii) 空間分割による 2 つレプリカアト秒パルス列の生成、そして(iii)自己相関の包絡線上に現れた干渉縞、である。このなかでも特に電場干渉が重要である事を認識したので、本年度はアト秒パルス列の電場干渉を観測し、アト秒パルス列全体の時間構造を明らかにする研究を行った。

アト秒パルス列の波長は極端紫外～軟 X 線領域にあり干渉実験は容易ではない。この波長域で透明な基板材料が無い場合、通常の可視～赤外の干渉計で用いられている部分反射鏡の作成が事実上不可能である事がその理由である。我々が自己相関に用いた空間分割の手法では、集光点での干渉効果は確認できたものの、集光しなければ空間的な重なりが無い場合、時間的な可干渉性を観測するのは一見難しく見える。しかしながら、2 つの高調波分離鏡の境界付近で反射されるアト秒パルス列はフレネル回折によって空間的に広がりながら伝播するので、適切な距離で空間プロファイルを観測すれば、干渉縞が現れる。2 つのレプリカアト秒パルス列間の遅延を変化させれば、この空間干渉縞も変化するので、これを記録すれば時間領域の干渉縞が得られる事になる。

実験では高調波分離鏡反射後の 2 つのレプリカアト秒パルス列を 2mm のアパーチャーを通して長軌道起源の高調波成分を取り

除いた後、金属フィルターで極僅かに残っている基本波レーザー光を除き、スリットイメージ転送型のXUV分光器で、空間・スペクトルのスペクトログラフを測定した。アパーチャーから分光器までの距離は1.28mとした。分割位置に近い中心付近の空間プロファイルを抽出し、バックグラウンドノイズを取り除いた後、強度揺らぎを補正したものを遅延に従って並べていくと、時間領域の干渉波形を得る事が出来た。干渉波形の振幅から求められる可干渉時間は10フェムト秒前後であり、高調波発生に用いたタンサファイアレーザーのパルス幅(40フェムト秒)よりもかなり短い事が分かった。また、各次数毎に干渉波形をフーリエ変換する事により、高調波のスペクトル形状が得られる。これらのスペクトル形状をXUV分光器で観測したスペクトルと比較すると、細かい形状がはっきりと見えており、通常のXUV分光器よりも分解能が高いと考えられる。なおこの結果は、我々の知る限り、極端紫外～軟X線領域で行われた初めてのフーリエ分光である。

さらに、各次数の高調波成分の干渉波形を足し合わせるとアト秒パルス列の電場干渉波形が現れた。列中のパルスの電場干渉の幅はほぼ(極端紫外の波長に対して)1周期程度にまで短くなっており、アト秒パルス列のパルス幅がフーリエ限界値で1サイクル程度にまで届く事が証明出来た。また、干渉縞の形は隣同士で反転しており、パルス幅の限界値と合わせて、アト秒パルス列の特異な性質を観測する事が出来たとと言える。特に干渉波形の性質については時間領域の干渉を用いなければ直接見る事の出来ない性質である。今後この干渉法で、アト秒パルス列の発生条件等を詳しく調べる予定である。

(c) 超短パルス高強度レーザーと物質の相互作用に関する研究

中空ファイバースパルス圧縮は、10 fs以下のいわゆる数サイクル領域の高強度パルスを発生させる効果的な手段である。これまで、中空ファイバースパルス内にガスを流すことにより光の伝搬方向に圧力勾配を設け、高強度化の問題点であった自己集束を抑制し、自己位相変調によるスペクトルの広帯域化のみを効果的に引き起こすことを可能とした。本年度は、Ti:Sレーザーシステムに改良を加えてビーム品質を改善するとともに、新たに開発したビームロック装置を用いてレーザー光と中空ファイバースの結合効率を高め、スペクトルのさらなる広帯域化と同時にその安定化を図った。その結果、中空ファイバース入射端におけるビームの揺らぎを1 μm (rms)に抑えることが可能となり、300 nmを超える広いスペクトルを持つパルスが2.7 mJの高いエネルギーと1.1% (rms)の安定性と共に得られるようになった。また、その後の分散補償により光電場の2サイクルに相当する5.4 fsの超短パルスに圧縮することに成功した。さらに#2.4の非軸放物面鏡を用いてパルス圧縮後のビームを集光したところ、ほぼ回折限界のビームであることが確認された。この時、ウエストにおけるスポットサイズは2.5 μmであり、これより集光強度は 5×10^{18} W/cm²に達していると思われた。一方、さらなる高強度化を目指して、中空ファイバースパルス圧縮を進展させた中空プレーナー導波路パルス圧縮の技術開発にも着手した。

(d) 蛍光タンパク質の二光子励起蛍光の制御に関する研究

2光子蛍光イメージングは、生細胞の観察に欠かせない技術である。本年度は、超広帯域フェムト秒レーザーパルスの位相変調法を用いた選択的励起を含む2光子蛍光の制御が、FRET(蛍光共鳴エネルギー移動)イメージングやマルチカラーイメージングに有用であることを検証した。まず、2種類の蛍光タンパク質に対して適応制御を用いることにより、各々を選択的に励起するための最適位相マスクを探索した。蛍光タンパク質 SeBFP と EGFP を用いた場合には、得られた位相マスクにより最大でコントラスト比 SeBFP : EGFP = 1 : 16, 8 : 1 を得た。同様に ECFP と Venus を用いた場合には、ECFP : Venus = 2 : 1, 1 : 12 を得た。さらに、最大コントラスト比の範囲内において位相変調法により、一方の蛍光タンパク質の蛍光強度を保った状態で、任意のコントラスト比を得られることも見出した。これらの結果は、生体試料に標識された蛍光タンパク質の濃度に大きく依存されることなく、FRET イメージングやマルチカラーイメージングにおける像コントラストを制御可能であることを示している。

(2) コヒーレント軟 X 線の開発と応用に関する研究

(a) 高次高調波の発生に関する研究

超短パルスレーザーを希ガス媒質に集光照射して得られる高次高調波は、テーブルトップサイズのコヒーレント軟 X 線光源として注目されている。我々は軟 X 線域における非線形光学研究を目的とし、それを可能にする高出力・高次高調波光源の開発を行ってきた。これまで光子エネルギー 40 eV でサブマイクロジュール、90 eV で数十ナノジュールの出力を持つ高調波発生に成功している。本年度より、更なる高調波の短波長化を目指し“水の窓”域(280 - 540 eV)の軟 X 線発生研究に着手している。本研究では励起レーザーとして近赤外線域(NIR)の高強度・超短パルスレーザーを開発し、レーザー場から電子が受け取るエネルギーを上昇させることで高調波の短波長化を行う。

光パラメトリック増幅(OPA)を用いた NIR 光発生により、波長 1.4 μm においてパルス幅 60 fs, 出力エネルギー 7 mJ/pulse を得ることに成功した。開発された光源は 1.2 ~ 2.1 μm の範囲で波長可変であり、全帯域で 1mJ/pulse 以上の出力が可能である。全出力エネルギー(シグナル光+アイドラー光)は 12 mJ/pulse であり、OPA 増幅における変換効率率は 30% に達している。開発された近赤外・超短パルスレーザー光は、OPA ベースの NIR 光源として世界最高の出力エネルギーを持つ。また開発された光源を用いて高調波発生を行い、Xe 媒質において 60 eV, Ar 媒質において 120 eV の高次高調波を得ることに成功した。

(b) 軟 X 線非線形光学とアト秒パルスに関する研究

高次高調波は、現時点では、極端紫外から軟 X 線(以下 XUV)領域において非線形光学現象を引き起こすことができるような強力なアト秒パルスを発生可能な唯一の光源であるばかりでなく、高次高調波の発生自体が原子・分子内で起こるアト秒領域の超高速現象の観測を可能とする非常にユニークな物理現象でもある。我々は、この高次高調波によるアト秒パルスの発生とその発生過程を利用した原子・分子のアト秒ダイナミクスの観測する研究を行っている。

高次高調波の発生は、それ自体が基本波レーザーの1サイクル内で起こる超高速現象であり、この時、光電場中で振動する電子波束はアト秒の精度で親原子あるいは分子と相互作用し、高調波スペクトルには瞬間的な原子・分子の量子状態が反映される。逆に言えば、高調波の発生自体を通して、発生媒質である原子・分子の超高速な量子状態の変化をアト秒精度で観測することが可能である。最近、我々は、高次高調波発生に初めて混合ガスを用いることを提案し、高次高調波の発生制御と電子波束の運動時間の計測に成功した。実験では、He と Ne の混合ガスを非線形媒質として用いることにより、高調波次数に依存して現われる破壊的干渉パターンから光電場内の電子の軌道運動の実時間をアト秒精度で計測することに初めて成功した。

(3) 短波長・短パルスレーザープロセッシング

ガラスなどの透明材料に高強度のフェムト秒レーザー光を照射すると、多光子吸収によって内部改質が行えることが知られている。この特徴を利用してこれまで感光性ガラス(Forturan ガラス)内部に3次元中空マイクロ構造を作製する技術や光導波路を描画する技術を開発し、光学的手法を利用したバイオ分析を行うためのマイクロチップ作製に活用していることを試みている。本年度はこれまで開発を行ってきた技術を駆使し、1枚のガラスチップ内にマイクロ流体素子、マイクロレンズ、光導波路を集積化したバイオフォトニックマイクロチップの試作を試みた。作製したマイクロチップを用いて化学物質の蛍光観察や吸収計測に応用した結果、集積化していないものに比べて数倍以上高感度の分析が行えることを確認した。

このようなマイクロチップデバイスの基板として、軽量でかつフレキシブルといった観点から、PMMAやPDMSなどのポリマーを利用することが近年注目されている。チップ上で行う光を用いた分析では、可視領域のみならず紫外から赤外領域までの幅広い波長領域で利用できることが望まれている。しかしPMMAやPDMSといった従来ポリマーは、その吸収端から紫外領域での利用が困難である。一方、アモルファスフッ素樹脂に分類されるCYTOP(株式会社旭硝子)は紫外(200 nm)から近赤外領域(2000 nm)まで極めて高い光透過性を有し、また屈折率が水に極めて等しいことから新しいバイオチップ材料、特に細胞観察・分析用バイオチップとして有望である。そこで、今年度は選択的に細胞をCYTOP基板上に固定化し、紫外光による光刺激を与えることを目的としたバイオフォトニックマイクロチップの作製を試みた。CYTOP基板上への細胞配列化ではF₂レーザーによるCYTOP基板の表面改質を行い、レーザー照射領域のみにHeLa細胞の培養を行うことに成功した。また、固定化した細胞に光刺激を与えるため、フェムト秒レーザーによるCYTOP内部への光導波路作製を行った。伝送損失は355 nmのレーザー光に対して0.5 dB/cmであった。従って、これらの選択的細胞配列化技術と光導波路描画技術を組み合わせることにより、細胞観察・分析用バイオフォトニックマイクロチップが実現されると期待される。

(4) テラヘルツ光の発生と応用

(a) マイクロチップNd:YAGレーザー励起による光注入型波長可変テラヘルツ光パラメトリック光源

遠赤外光とマイクロ波の中間領域であるテラヘルツ (THz) 光は、従来、電磁波の未開拓領域として取り残されてきた。近年、光源および検出器の発展に伴って応用研究が加速し、多様な分野で新しい技術が検討されている。本研究では、励起光源をこれまで使用していた、大型のフラッシュランプ励起 Q スイッチ Nd:YAG レーザーの代わりに、非常にコンパクトで高い性能を持つ半導体レーザー励起固体レーザー (分子科学研究所と浜松ホトニクスとの共同開発によるマイクロチップ Nd:YAG レーザー) を励起光源として導入し、非線形光学結晶を用いたパラメトリック波長変換によるテラヘルツ光源 (光注入型テラヘルツ光パラメトリック発生器) のさらなる小型高性能化を行った。励起光強度が 550 μJ/pulse (1.3 MW: 尖頭値) の時、光注入 (100 mW: 連続波) を行った場合、周波数約 1.9THz のとき最高出力約 60 mW (尖頭値)、波長可変範囲 0.9 – 3 THz、発振線幅 10 GHz 以下のコヒーレントテラヘルツ光を発生し、シリコンポロメーターおよび室温動作のショットキーバリアダイオード (SBD) により検出した。励起光源を含む光源全体のサイズを 100 × 250 mm 程度と非常にコンパクトに構成することが可能であった。検出に SBD を用いた場合、これらはすべて室温動作可能であることから、応用研究にとって重要な光源になり得るものと考えている。

(b) テラヘルツ近接場光による液体資料測定

近年、THz光を利用した様々な応用研究が各分野で進んでおり、多くの有意義な結果を残している。しかしながら、対象となる試料がたんぱく質やDNAなどの生体関連分子の場合、その吸収や散乱の影響で透過測定を行えなくなってしまう。そこで本研究では、THz光をシリコン製円柱導波路に入射し、最低次モード (EH₁₁) で伝播させることによって導波路表面外側近傍に均一な近接場を発生させ、この近接場光と試料の相互作用により、導波路内を伝播する透過THz光強度の変化からD-グルコース水溶液濃度、アピジン-ピオチン反応のリアルタイム計測などを行った。水溶液の濃度の違いや抗原・抗体反応などに起因する導波路周辺の複素屈折率変化を、導波路近傍の近接場光との相互作用による透過率変化として観測できるこの手法は、THz光が試料を透過することなく分光計測や試料表面近傍の分光イメージングも可能となるため、THz光を利用した分析の新しいツールとして有効な手法になると期待している。

¹基礎科学特別研究員、^{*2}協力研究員、^{*3}客員主管研究員、^{*4}客員研究員、^{*5}訪問研究員

2. リアルタイム生体イメージング研究

研究担当者：中野明彦、齊藤知恵子、黒川量雄、時田公美^{*1}、市原 昭^{*2} (中野生体膜研究室)、前田雄一郎^{*3}、山本明弘、D.Popp^{*2}、中村志芳^{*2}、岩佐充貞^{*2}、銭 旻浩^{*2} (宮野構造生物物理研究室)、小林俊秀、阿部充宏、石塚玲子、村瀬琴乃、上田善文 (小林脂質生物学研究室)、今本尚子、前島一博、高木昌利、小瀬真吾、船越智子^{*4}、田原清志^{*5}、渡邊 愛^{*6} (今本細胞核機能研究室)、石川哲也、西野吉則 (石川 X 線干渉光学研究室)、伊藤和輝 (高田構造科学研究室)、徳永万喜洋 (RCAI分子システム研究ユニット)、十河久美子 (RCAI 1 分子イメージング研究ユニット)、佐甲靖志、広島通夫^{*4}、日比野佳代^{*4} (佐甲細胞情報研究室)、平野達也、小野教夫、李 智博^{*4} (平野染色体ダイナミクス研究室)、和田智之、斎藤徳人^{*4}、小川貴代^{*6} (固体光学デバイス研究ユニット)

(1) 可視光レーザー顕微鏡による新しい時空間解析法の開発および細胞内小胞輸送の可視化と解析

高速高感度共焦点顕微鏡システムのさらなる高性能化を図り、画像増感の SN 比の劇的な向上を達成した。また、多色分光のための理想的なフィルターシステムを開発した。これらのシステムにより酵母細胞内のタンパク質輸送をリアルタイムで観察した。小胞体からの COPII 小胞形成過程およびゴルジ体の形態形成を可視化したところ、出芽酵母 *S. cerevisiae* にも ER exit site と同様の機能をもつ構造が存在することが示唆された。この構造はゴルジ体の形態形成にも重要な役割を果たしていると考えられる。また、蛍光共鳴エネルギー移動のシステムで、低分子量 GTPase Ypt31/32p とその標的分子 Sec2p の相互作用が娘細胞の先端部に限局していることを示した。Ypt31/32p は、Sec4p の娘細胞への輸送には関与しないが、娘細胞の先端部への集積に働いていることを明らかにした。

(2) Gateway System を適用した植物用光刺激型蛍光タンパク質発現系の開発

植物培養細胞と植物個体それぞれで、光刺激型の蛍光タンパク質により細胞小器官を可視化するための基本ベクター系を構築した。Gateway System を適用し、迅速・簡便に多種多様な融合タンパク質発現コンストラクトを作製できるようにした。それらを用いて、液胞、細胞質と核、ゴルジ体のそれぞれを可視化するためのコンストラクトとを作製した。一過的発現で発現を確認したのち、形質転換植物を確立した。またこの系を応用して、花粉内の精細胞を光刺激型蛍光タンパク質で可視化し片方だけをラベルすることに成功した。本研究は、名古屋大学大学院理学研究科の東山哲也教授および東京大学大学院理学系研究科の浜村有希氏との共同研究によるものである。

(3) 蛍光 1 分子方位決定法

本研究で開発した TIRF 顕微鏡を使って、アクチンおよびそれと類似のフィラメントの会合動態の実時間解析をおこなった。昨年の年報で既に報告した成果のそれぞれを論文発表すると同時に、今年度は特に ParM の研究に多くの時間を割き、重要な知見を得た。ParM は細菌の分裂にあたってプラスミドを両娘細胞に均等に分配する機能を担う。機能的には高等生物の微小管に近いが、タンパク質構造的にはアクチン類似のタンパク質である。本研究ではまず (i) TIRF 顕微鏡を使って重合と脱重合の速度論的解析を行い、ParM の機能はこれまで考えられていたように ATPase で駆動するのではなく、GTPase によって駆動することを明らかにした。(ii)

GMPPNP 結合型 (GTP 結合型に類似と考える), GDP 結合型の ParM 単体の結晶構造を解明し, ATP 結合型 (AMPPNP, ADP 結合型) と構造に大きな変化がないことを確認した。(iii) さらに高濃度・高度配向ゾルを調製してその X 線繊維回折強度と (iv) クライオ電子顕微鏡によるフィラメントの単粒子解析から (v) GMPPNP 結合型 (GTP 結合型に類似と仮定) の ParM フィラメントの原子構造モデルを構築した (これらの構造は ATP 結合型と大きな差はないものと考えられる)。ParM はヌクレオチド非結合でも安定であるが, その構造は大きく変化し Nd 結合溝が開く (先行研究)。(vi) 重要なことは, 上記のフィラメントの原子モデルにこの開いた構造をあてはめることはできないことを発見した。すなわち, GTP 結合型にする ATP 結合型にする, フィラメント内で加水分解され GDP 結合型ないしは ADP 結合型となるが, さらに GDP ないしは ADP を放出する反応はフィラメントの一端でのみ可能であり, 端でフィラメントの脱重合 (崩壊) が起きる。ここで GTPase と ATPase の間に大きな差が生じる。(vii) 高圧下での X 線小角散乱実験の結果は次のように解釈できる。ATPase の場合 端のサブユニットが ADP 結合型から ADP を放出する速度は遅く, 新たに ATP 結合型が端に結合して rescue する (再度伸長に転じる) ことが可能であるが, GTPase では GDP 結合型から GDP を放出する反応が数倍速く崩壊が停止することはない。つまり rescue は起きない。実際, 重合・脱重合の速度論的解析はこの予測と一致した。以上の GTP-ParM フィラメントの振る舞いは細菌内でのプラスミドの移動をうまく説明する。またこの ParM の知見によって, 重合脱重合によって駆動させる分子運動の機能原理についての理解が深化した。

(4) STM による脂質膜の観察

走査型トンネル顕微鏡を用い, チオール修飾した金表面に形成させた脂質膜を観察した。Au(111)面上に形成した 1-オクタチオール上に 1,2-ジヘキサノイル-*sn*-グリセロ-3-ホスホコリンを中性 0.05 M NH_4ClO_4 懸濁液として添加した。脂質の構造は添加電圧によって変化し, 0.0 V では流動層であるのに対して +0.2V と -0.2V を交互に添加すると特徴的なストライプ構造が観察された。観察された構造変化は脂質の集合状態の変化に起因することが示唆された。

(5) AFM による脂質膜の観察と脂質プローブのキャラクタリゼーションおよびその応用

モデル膜を AFM 観察することによりコレステロールの脂質ドメイン形成における役割を解析した。コレステロールは膜濃度 10-25% ではドメイン形成 (脂質ラフト形成) を促進したが, 40% 以上になると脂質ラフトは消失した。コレステロールに結合することが知られているフィリピンと α -毒素のモデル膜への結合の AFM による解析の結果, フィリピンはコレステロール濃度 10% 以上の膜に結合出来るのに対して, α -毒素は 40% 以上のコレステロールを含む膜にのみ結合することが示された。 α -毒素とフィリピンを用いることにより, コレステロール濃度 40% 以上のドメインが細胞の接着や細胞分裂に重要な役割を果たしていることが示された。

(6) 細胞内低発現系を利用して同定した核・細胞質間輸送システムの新たな作用点

生きた細胞内で分子やオルガネラの挙動を観察するためには, 1 種類もしくは複数種類の蛍光タンパク質を効率よく導入して安定発現株を得ることが必要になる。この際, しばしば問題になるのは, 導入しようとする因子が過剰発現によって細胞毒性を示すことである。核・細胞質間輸送経路の 1 つ (importin / 輸送経路) で運搬される基質として同定したクロモキネシン Kid/Kinesin-10 も, そのようなタンパク質の 1 つである。部位特異的組換え反応 (Flp/*FRT*) を利用して, 染色体上の特定部位に 1 ~ 数個の遺伝子を効率よく組み込む原理を利用した発現ベクターを用いて, 内在性の Kid タンパク質よりも低い発現を示す Venus-Kid (とその核局在化シグナル変異体) の安定発現株を樹立するのに成功した。

その安定発現株を利用して, Kid の挙動を FRAP 並びに FLIP で解析した結果, 核局在化シグナルが不活化すると, Kid と分裂期染色体との相互作用が低下することが判明した。再構築系で調べると, Kid が, 運搬体分子 importin / に結合するとはじめて分裂期染色体にターゲットし, 染色体上で局所的に産生される低分子量 GTPase RanGTP に共役して分裂期染色体上に蓄積していくことを見つけた。Kid は DNA 結合活性をもつモータータンパク質で, 分裂期染色体腕を分列面へと押し上げる機能があることが知られている。RanGTP の作用は, 染色体にターゲットした Kid から importin と importin を解離させることで, 染色体上の必要な場所に必要量の Kid を乗せることにあると思われる。全体の反応を見ると, 間期で見られるのと全く同じ輸送のサイクルののって, Kid が分裂期染色体にローディングされるのがわかった。これは, 核一細胞質間輸送システムが核膜のない細胞分裂期で, 染色体の構築と機能の制御に寄与するという, 思いがけない可能性を示す最初の例であるとともに, 核膜のない細胞分裂期で, 運搬体と基質の相互作用がどのように時空的に制御されるのかといった問題を改めて浮き彫りにするものである。現在, こうした問題提起を踏まえて, 分裂期細胞内の RanGTP 濃度勾配の局在変化を, これまでよりも高い時間・空間分解能で調べようとしている。

上記の発現ベクターに転写干渉を防ぐインシュレーターを組み込み, 複数の cDNA を効率よく同時に細胞内に導入して発現させるマルチ遺伝子発現システムを開発した。この発現システムで得た複数の核膜孔複合体構成因子の安定発現株を利用して, 核膜孔複合体構築の最初のステップに Pom121 という膜貫通型の核膜タンパク質が必須なことを証明した。また, 複合体の中で最も安定に存在する NUP133-YFP の発現株では, 488 nm レーザーをもちいて核膜表面のある核膜孔領域を bleach することができ, 新たに形成された核膜孔を可視化できるようになった。この手法と細胞周期の阻害剤を組み合わせることによって, 間期の核膜孔形成が, 細胞周期によって厳密にコントロールされていることが示された。本研究は, 大阪大学微生物学病研究所の今本文男教授, 矢幅一英博士, 曽根岳史博士, 西海史子博士, 東京大学医科学研究所の山本 雅教授, 大杉美穂博士, 渡海紀子博士, 堀内保臣氏との共同研究によるものである。

(7) 1 分子可視化技術を利用した核膜孔複合体と運搬体分子の相互作用の解析

顕微鏡の視野に細胞の厚みよりも薄い光 (厚み 7 ~ 10 ミクロン程度) でスポット照明する薄層斜角照明法を開発し, 核膜孔複合体と運搬体分子の相互作用を調べた。核膜孔複合体は, 500 ~ 1000 個のポリペプチド鎖から形成される, 総重量 ~ 66MD にもおよぶ巨大なタンパク質複合体である。GFP に結合した運搬体 1 分子と, その運搬体を結合させた核膜孔複合体の蛍光強度の定量的解析をおこなった。その結果, アセンブルした 1 つの核膜孔複合体に, およそ百 ~ 2 百分子の運搬体分子が結合すること, また, 核膜孔複合体と運搬体分子の結合定数が 1 nM 以下から数十 nM と極めて高いことがはじめて明らかになった。運搬体分子は数 msec のオーダーで核膜孔複合体を通過すると現在考えられている。強い相互作用をもつ核膜孔複合体の中を, 運搬体分子がどのようなメカニズムで素早く通過するのかといった問題を新たに投げかける結果でもある。

(8) X 線を利用したヒト分裂期染色体構造の解析

染色体は細胞が分裂する際, 複製された遺伝情報 (DNA) を 2 つの娘細胞に正確に分配するために必要な構造体である。それでは, 分裂期染色体はどのようにして 1 本の長いクロマチン繊維から折り畳まれているのだろうか? これまで, 分裂期染色体の高次構造解明のために, 主として電子顕微鏡を用いた構造解析がなされてきた。しかしながら, 顕微鏡観察は試料中における観察範囲が限定され, 内在する規則性構造の全体像を捉えることが非常に困難である。このため SPring-8 BL45XU で X 線小角散乱解析 (SAXS) を行っている。SAXS は, 計測したい非結晶試料に X 線を照射し, その散乱パターンからその試料に内在する構造や規則性を知る手段である。現在までに染色体中に, コアヒストンの幅, ヌクレオソームの直径に相当する 6 nm と 11 nm の散乱のピークを検出したが, それ以上の大きな構造は検出できなかった。このことから, 染色体内には古くからのモデルが提唱するような明確な階層構造は

存在しないのではないかと考えている。さらに、SPRING-8 BL29XULのコヒーレント X線による単一のヒト染色体のイメージングも行っている(CXDM)。最近、このCXDMを用いてヒト染色体の3次元電子密度マップの作製に成功した。

(9) 1分子蛍光可視化法の改良と細胞内反応計測への応用

1分子蛍光可視化法を改良しさらに発展させるために、1分子反応時系列データの解析法開発と、1分子可視化の空間分解能の改善を行った。1分子可視化による反応計測では、2種の分子の共有結合から結合・解離の時系列データを得て反応速度論の詳細を検討する。生体高分子間の反応の複雑性を抽出するため、反応の多状態性と非ランダム性を評価する方法を考案した。多状態性は、反応の待ち時間分布を複数指数関数の和もしくは引き延ばされた指数関数で近似し、両者の適合度から評価する。非ランダム性は非マルコフ関数によって評価できるが、多状態性と反応記憶それぞれが与える非ランダム性を区別して評価するための数値計算による反応シミュレーション法を開発した。これらの方法をEGF受容体とGrb2の認識反応の解析に応用した。本研究は大阪大学大学院生命機能研究科の森松美紀氏、奈良県立医科大学の高木拓明氏との共同研究である。

分子の共有結合や細胞内分布をより正確に計測するため、1分子可視化の空間分解能向上に取り組んでいる。全反射蛍光顕微鏡で得られた点像分布関数による逆畳み込みにより、空間分解能を260 nmから180 nmまで向上させることに成功した。

(10) 細胞内1分子蛍光共鳴エネルギー移動可視化法の開発

分子細胞生物学において、蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)法は生体高分子間の相互作用や高分子の構造計測に利用されている。特に、単一の分子間、あるいは分子内でFRETを検出する1分子FRET法は、分子反応や分子構造変化のダイナミクスを検出する上で非常に強力であり、我々は、生細胞における1分子FRET計測技術の開発に取り組んでいる。

生細胞での特異的な蛍光標識には、GFP等の蛍光蛋白質と目的分子との融合遺伝子を細胞に発現させる方法が有力である。我々は、細胞内で最も安定な1分子可視化が可能な蛍光蛋白質の組み合わせであるeGFPとeYFPを1分子FRET計測の蛍光標識とした。多分子計測でよく用いられるCFP/YFP等の組み合わせに比べ、GFP/YFPの組は蛍光励起・吸収スペクトルの差がいずれも小さい。両者の吸収、発光を区別するため、光学系の最適化と、画像処理法の開発を行った。

この方法を評価するため、リン酸化酵素cRaf1のN末端、C末端にそれぞれeGFPとeYFPを融合したFRETプローブ(G-Raf-Y)を作成し、cRaf1の活性化に伴う構造変化の1分子検出を試みた。両末端が近接したclosed状態から、活性化に関連して末端間が離れたopen状態に変化すると予想されている。図に示すように、我々の方法によってRasの活性化によるcRaf1の構造変化をプローブの1分子発光スペクトル変化として可視化し、さらに画像処理によって個々の分子のFRET効率を計算することが可能になった。これによって、cRaf1の構造変化は、細胞膜で活性化型Rasに結合する際に起こっていることが明らかになった。本研究は広島大学大学院理学研究科の柴田達夫氏との共同研究である。

(11) 体細胞分裂と減数分裂におけるコンデンシン複合体の動態解析

体細胞分裂周期における2つのコンデンシン複合体(コンデンシンIとコンデンシンII)の時空間制御を理解するため、コンデンシンの修飾と活性化の分子メカニズムに加え、染色体側の諸因子(塩基対組成、ヒストンの修飾、DNAトポロジ等)との関係、さらに複製タイミングとの機能関係について、高解像度イメージング技術を用いて解析を進めている。さらに、哺乳類の減数分裂におけるコンデンシン複合体の役割を明らかにすることを目的に、マウス・コンデンシンの全サブユニット(計8個)に対する抗体の作製を試み、免疫蛍光染色法において2つの複合体を共通に認識する抗体、およびそれぞれを識別する抗体を作製することに成功した。次年度からの本格的な解析を見据え、マウス卵母細胞の体外培養系のセッティングと卵母細胞の染色体観察に不可欠リアルタイム共焦点レーザー顕微鏡での画像取得にも取り組んでいる。

(12) 小型可視高速波長可変光源の開発

昨年度に続き、1台のレーザーから紫外線から可視域において高速かつランダムに容易に波長を切り替えることができる電子制御による可変波長光源の開発を推進した。光源は、Ti:sapphireレーザーの共振器内に波長選択素子として音響光学波長選択フィルター(AOTF)を挿入することにより、高速に連続かつランダムに波長選択が可能な電子制御波長可変Ti:sapphireレーザーを利用した。このレーザーを連続波(cw)光源で励起することにより、電子波長制御によるピコ秒パルスを広い波長可変域を維持した状態で発振可能であることを示し、その第2高調波により紫外線から可視域の波長可変光源を実現した。本年度は、この新しい超短パルス光の発生メカニズムを明らかにした。共振器内のAOTFでレーザー光は、音響波の周波数だけ周波数がシフトする周波数シフト帰還型レーザーであるので、周波数がシフトした複数の光波が共振器内に存在することを仮定して、その重ねあわせを計算することにより、絶えず共振器内にビートが発生することを明らかにした。このビートが、レーザー結晶であるTi:sapphire結晶にカー効果誘導することで安定なモード同期を発生させていることがわかった。この解析の結果は、本レーザーはフェムト秒領域においても世界初の電子波長可変レーザーが可能であることを示唆している。この光源が実現されれば、2光子顕微鏡においても、細胞内の複数の物質のリアルタイム観測が可能となる。一方SHGによって得られる350-550nmに加え、波長領域を拡張するために、Nd:YAGレーザーを1.3ミクロンで発生させTi:sapphireレーザーと和周波を発生することにより通常SHGで生えられない黄色から赤色領域においても波長可変光を得ることができるシステムを考案し、共振器内和周波システムの開発を推進した。

*1基礎科学特別研究員、*2客員研究員、*3客員主管研究員、*4協力研究員、*5研究補助員、*6協力技術員

3. 超高速分子マニピレーション

研究担当者：田原太平、竹内佐年、石井邦彦、細井晴子*1、岩村宗高*1、中村巧*1(田原分子分光)、鈴木俊法、藤貴夫、鈴木喜一*2、堀尾琢哉*1、Ying Tang*1(鈴木化学反応)和田達夫、川本益揮、志賀名月*3、池田滋(和田超分子科学)

(1) 超高速分光計測による凝縮相分子ダイナミクスの解明と制御

10fsパルスを用いた時間分解インパルスラマン分光を行い、代表的なpush-pull型分子であるp-ニトロアニリンの電荷移動励起状態の生成過程およびその後の電子緩和過程における超高速分子構造変化を研究した。誘導放出遷移に対するインパルスラマン測定によりニトロ基のねじれ運動に対応するビート成分の観測に成功するとともに、その振動数が電荷移動過程と同じ時間スケールで著しく低波数シフトすることを明らかにした。この結果は、p-ニトロアニリンの電荷移動過程でC-NO₂結合が弱くなること、すなわち、この分子が数百フェムト秒以内にねじれ型構造をもつ電荷移動状態に変化することを強く示している。また銅(I)錯体[Cu(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)]²⁺の超高速過渡吸収信号の波長分散測定により、核波束運動を反映したビート信号が波長によらず同位相で現れることが分かった。このことは、MLCT励起状態で起こるヤーン・テラー構造変化と同じ対称性に属する振動が光励起によって誘起されることを示唆している。シスチルベンフェムト秒時間分解蛍光分光による研究では、蛍光の時間分解強

度の解析から反応性 S_1 状態の振動子強度を 0.16 と決定した。この結果は S_1 状態が一光子許容状態であることを示し、 S_1 状態の帰属に関するこれまでの論争に決着をつけた。さらに蛍光タンパク質 (eGFP) の発色団と同じ構造を持つ有機化合物 (HBDI) についてマルチプレックス二光子吸収分光を行い、一光子吸収スペクトルと二光子吸収スペクトルとの間に顕著な違いを観測した。このことから、eGFPのアニオン種には二光子許容性の強い隠れた電子励起状態が存在すると結論した。

(2) 超高速光電子分光による気相化学反応力学の研究

光電子角度分布の理論を、超高速時間分解画像観測法と多チャンネル量子欠損理論に適合した形で展開した。回転の波動関数は明示的に取り込んだ。光電子角度分布の公式を、電場の統計テンソルと分子軸分布の整列度パラメーターで展開することに成功し、展開係数として、 b パラメーターが得られた。 b パラメーターには、光イオン化ダイナミクスの全ての情報が含まれる。分子固定系の光電子角度分布との比較から、線形従属な複数の b パラメーターが、線形分子、 C_s 点群対称性分子に関して特定された。 b パラメーターに関しての特異値分解から、その他には線形従属なものがないことも確認できた。線形独立な b パラメーターに基づいて光イオン化の動力学パラメーターの完全決定に向けた、効果的な実験手順を提案した。

深紫外領域(200~300nm)で 10fs 程度のパルスを生ずる装置を開発した。チタンサファイアレーザーを光源とし、その二倍波と基本波を希ガス中にゆるやかに集光することによって、四光波混合による波長変換を行った。入射光パルスが高ピークパワーであるため、フィラメンテーション効果を起こり、パルスが集光されたまま希ガス中を長い距離にわたって伝播するため、効率のよい波長変換ができた。500uJ の 2 倍波に対して、260nm で 20uJ、200nm では 4uJ の出力が得られた。発生した深紫外光パルスは、回折格子を用いた圧縮装置によって圧縮し、260nm で 12fs、200nm で 16.5fs のパルスが得られた。200nm の波長領域では、これまで 200fs のパルスしか発生できていなかったが、それを 1 桁以上短くすることができた。また、同様の方法によって、中赤外光パルスを生ずさせた。屈折率の波長依存性が少ない気体を用いた波長変換であるため、広帯域なスペクトル(2.5~7um)が得られた。中赤外領域では、空気中でも分散が少ないため、ならん圧縮器を使用することなく、パルスが 13fs になっていることを測定した。このパルス幅も、中赤外光領域では世界最短のものである。深紫外光は、多くの小さい分子の励起状態に共鳴しており、中赤外光は多くの分子振動準位と共鳴しているため、ここで開発したレーザー装置は、基礎的な化学反応の研究で非常に有用である。

(3) 光応答キラル化合物の光マニピュレーション

光マニピュレーションとして光による軸不斉制御を行っている。より大きな分子ねじれ力へ変換可能な、アゾベンゼンの 3,3'-部位をピナフチルと環状に結合した 3,3'-置換環状化合物 (R -体, S -体) を新たに合成し、その光応答を検討した。また、非環状モデル化合物との反応速度定数を比較したところ、環状構造は *cis-trans* 戻り異性化反応を阻害することがわかった。1,4-ジオキサン中における CD スペクトル測定より、334 nm の輝線を照射すると、ピナフチルの不斉軸に由来する 238 nm の円二色性比()が増加し、続いて 436 nm の輝線を照射したところ、スペクトルは初期状態へと戻った。3,3'-置換環状化合物は光によって分子ねじれを誘起することが明らかとなった。一方、CD スペクトルの温度依存性を測定したところ、 は温度の上昇とともに減少した。昇温、降温を繰り返しても同様の挙動を示したことから、3,3'-環状化合物は光だけでなく、熱に対しても分子ねじれを生じると考えた。また、環状化合物は異なる外場刺激に対して二面角が逆方向に変化することを示唆した。

*1 協力研究員 *2 基礎科学特別研究員 *3 研修生

4. 近接場光ナノフォトニクス

研究担当者：河田聡，早澤紀彦，田中拓男，タルン・アルバラード，石飛秀和，田口敦清，小野篤史，齊藤結花，池田勝佳，奈良岡亮，藤田克昌（河田ナノフォトニクス）

(1) 近接場ラマン分光の高感度化

金属-金属のナノスケールギャップを形成することによりギャップモードのプラズモンを励起し、これを近接場ラマン分光の高感度に用いる手法を提案・開発した。提案手法では、50nm 厚の銀フィルムをラジアル偏光に制御したビームを高開口数対物レンズで集光・照明する。この場合、集光表面プラズモンが励起され、集光スポット上に極めて強い増強電場が発生する。この増強電場上に金属プローブを配することで、ギャップモードのプラズモンを励起し、ギャップに存在する物質からのラマン信号が増強できることが確認された。

(2) 近接場ラマン分光による結晶歪みのナノスケール評価

近接場ラマン分光により次世代 LSI 基板として注目される歪みシリコンの表面歪み分布測定と応力解析を行った。反射型近接場ラマン分光顕微鏡を構築し、金属チップ近傍でのプラズモン励起による増強電場を利用した結晶表面における近接場歪みマッピングの報告を行った。さらなる高感度化のために、チップでの偏光解消効果を利用することで高 S/N 比を達成した。

(3) シリコン系材料の近接場ラマン分析のためのプローブの開発

近接場ラマン分析に用いるプローブは、シリコン製 AFM カンチレバー表面に金属薄膜を形成して作製する。そのため、半導体や MEMS 分野で重要となるシリコン系材料の近接場ラマン分析を行う場合には、見たい試料のシリコン由来のラマンピークに加えて、プローブ自体からのラマンピークが信号に重なり、これがバックグラウンドになってシリコン系材料の分析を難しくしていた。この問題に対処するために我々は従来のプローブ作製法を改良し、シリコン製カンチレバーを熱酸化シアルムファス化した後、金属薄膜を形成した近接場ラマンプローブを開発した。その結果、プローブのシリコン由来のラマンピークが消失することを実験的に確認した。また、熱酸化を行った後でも先端径が劣化することはなく、きわめて先鋭で良質なプローブが作製できることがわかった。

(4) 金属ナノロッドアレイによる 2 次元ナノイメージング

金属ナノロッドアレイを用いた拡大画像伝送が可能であることを FDTD 法により示した。拡大倍率は、物体面側のアレイピッチと、像面側のアレイピッチとの比率によって決まる。高効率かつ長距離の画像伝送を実現するため、ロッドを多層化した。多層構造により個々の金属ナノロッドのプラズモン共鳴とロッド間のギャップ効果との相乗効果により高効率イメージングが可能となる。計算では、高さ 50nm 直径 20nm の銀ナノロッドを層間隔 10nm で配列させた。1 層、3 層、5 層と層数が奇数時のとき、共鳴周波数はシフトすることなく帯域が広がることが分かった。

(5) プラズモニック・メタマテリアル

金属イオンの 2 光子還元を用いてプラズモニック・メタマテリアルの試作を行った。試作したメタマテリアルは、水晶基板上に作製した銀ナノロッドペアアレイ構造である。試作したメタマテリアルの電磁気学的な応答特性を、遠赤外 FT-IR 分光器によって分光計測することで評価した。その結果、16THz の中赤外周波数領域において、試作したメタマテリアルが光波の磁場成分と直接相

相互作用することで生じた信号を確認することに成功した。

(6) 2光子還元法を用いた三次元ナノ金属構造加工

フェムト秒レーザーを光源に用いた2光子還元法において、その加工分解能を向上させる手法の検討を行った。2光子還元法では、レーザー光の照射によって銀イオンを還元してナノサイズの銀微結晶を生成する。これまでの方法では、生成されたナノ結晶はレーザー照射後も成長し、最終的にはサブミクロンサイズの金属微粒子になる。そしてこの結晶のサイズが最終的な加工分解能を決める。そこでこの金属結晶の成長を制御・抑制し、金属パターンを構成する金属微粒子のサイズを微細化することで加工分解能の向上を図った。具体的には加工材料である銀イオン水溶液に銀結晶の表面に効率よく結合する界面活性剤を添加することにより、生成された金属ナノ結晶の表面を界面活性剤でコートすることで金属結晶の結晶成長を抑制した。その結果、光の回折限界を大幅に超える120nmの加工解像度を実現した。

(7) 金属表面近傍に配置した単一蛍光分子の双極子放射パターンと蛍光寿命測定による分子配向解析

CdSe/ZnS量子ドットは高い量子収率と、有機蛍光色素と比べて高い安定性をもつため、蛍光ラベル、単一光子光源、レーザー利得媒質などへの応用が研究されている。通常の蛍光分子とは異なり、CdSe/ZnS量子ドットにおけるエキシトン光学遷移過程は結晶の対称性から結晶軸(c 軸)方向には禁制となり、その結果、遷移双極子モーメントは c 軸に垂直な向きの2次元平面内に縮退する。CdSe/ZnS量子ドットを各種ナノフォトニックデバイスに用いるためには、その特殊な2次元双極子を考察しなければならない。本研究では誘電体界面近傍に存在する2D双極子の蛍光放射について、蛍光のデフォーカス像測定とシミュレーションと、蛍光寿命測定を合わせて行うことで、界面からの反射場による摂動について調べた。理論との良い一致が得られ、これらの知見はナノフォトニックデバイスの発展に貢献すると期待される。

Discovery of novel light sources creates new scientific research fields. Opening up unexplored wavelength region of the light spectrum has been yearned as basic technology supporting promotion of scientific advance and industrial development. In Extreme Photonics Research Group, we further pursue the potential of novel light sources being developed in RIKEN such as intensity soft-x-ray attosecond pulses near-field photons, and tera-hertz light waves. Using advantages of RIKEN's research complex covering physics, chemistry, engineering, biology and medical science, applications of these light sources are also pursued to explore new scientific fields.

1. Intense coherent soft x-ray attosecond pulses

(1) Interaction of intense ultrashort laser pulses with matters

(a) Development of a sub 10-fs intense laser system

It is important to build novel ultrafast and intense laser sources because they can be applied to investigate many sorts of interactions with matters under the strong light field. In particular, the reduction of pulsewidth into sub 10-fs regime can significantly suppress the ionization of atoms interacting with the laser field, so that the photon energy of the generated high-harmonic fields from these atoms should be drastically increased by avoiding the disturbance of the phase matching condition with the ionization. Furthermore, the pulse width of the harmonic field can be shorter than 1 fs. We call this extremely short bunch of light field an attosecond pulse.

We have started to develop a new laser amplification system having a pulse duration being less than 10 fs (sub-10-fs pulse) last year. One of the significant issues for the amplification of the sub-10-fs pulse is the spectral narrowing caused by the limit of the bandwidth of the reflectivity of a high-damage-threshold (HDT) mirror and the spectral shape of the gain in the amplifier medium. Another issue is the compensation of high-order dispersions in an amplified pulse suffered from the transmitted materials during the amplification. We have solved the former issue by fabricating two kinds of specially designed optical element; a HDT chirped mirror pair and dielectric filters for the regenerative pulse shaping.

This year, we have developed a chirped pulse amplification (CPA) laser system by using these special optics. The laser system consists of a commercial Ti:S oscillator having a pulse duration of 7 fs, an Öffner type pulse stretcher which lengthens the pulsewidth into ~200 ps, and a spectral phase compensator with a spatial light modulator, two stages of amplifier chain, and the grating pair compressor. We obtain more than 200nm spectral width of the amplified pulse from the regenerative amplifier due to the wideband reflectance of the HDT chirped mirrors composing the cavity of the amplifier and an optimized design of the filter for the regenerative pulse shaping. The output pulse from the regenerative amplifier with an energy of ~70 μ J was further amplified in the second Ti:sapphire crystal with a multi-pass configuration. We have developed novel folding mirrors with HDT and low dispersion by adopting three kinds of dielectric materials for this multi-pass amplifier. The resultant energy of the amplified pulse exceeds 30 mJ and the spectral width can nearly reach 200 nm. In spite of the successful amplification of the broadband pulse in the sub 10-fs regime, the spectral shape was not appropriate for suppressing pedestals arising near the main peak of the pulse. Thus, we have somewhat reduce the spectral width by adjusting the filter in the regenerative amplifier and compressed the amplified pulse from the multi-pass amplifier with the grating pair compressor. High-order dispersion arising from the optical elements in the amplifier and the phase modulation originating from the group-velocity-dispersion oscillation of the HDT chirped mirrors were eliminated by the spectral phase compensator. The resulting pulse width of 12-fs is the shortest in the amplified pulses with the CPA system of Ti:sapphire laser with an energy of more than 10 mJ. We will improve the dielectric filter for further shortening of the pulse width in the sub 10-fs regime.

(b). Interferometry of an attosecond pulse train in soft X-ray region

Recent progress of the research for investigating interactions of an intense femtosecond laser field with a matter enables us to generate an intense XUV light pulse as a harmonic field. We study the distinct features appeared in nonlinear interactions induced with the harmonic fields in order to find the novel phenomena. In particular, extremely short bunches of the light pulse formed with the Fourier synthesis of harmonic fields, which is so-called attosecond pulse train (APT), is one of the most interesting research topics in laser science because it can be useful to reveal ultrafast dynamics of matter.

We demonstrated the interferometric autocorrelation measurement of an APT by utilizing the two-photon double ionization of nitrogen molecule last year. The key features of this experiment are (i) observation of the two-photon Coulomb explosion of nitrogen molecule, (ii) the generation of the replica pulses by spatial split of the measured APT, and (iii) interferometric fringes appearing on the correlation envelope. In particular, the time translation symmetry of the interferometric fringes proved the conclusive evidence of the phase-locking of high harmonic fields and manifested the origin of the high-harmonic generation from an electron.

We recognized the importance of the interference of an APT in time domain from this result, hence, we investigated the full characteristic of the temporal coherence of the APT this year. The most significant issue for the interferometry of the APT is how we make the two replica of the APT to be interfere, because we cannot use any partial mirrors, which are conventionally used in an interferometer for visible~infrared light field, due to the lack of transparent substrate materials in the XUV~soft X-ray region. Although the spatial split setup in our autocorrelation measurement of the APT does not seem, at a glance, to yield linear interference fringes without spatial overlap of two replicas, it is feasible for observing the interference in time domain owing to the fact that the spatial fringes, which is caused by the superposition of the diffracted two replicas from the boundaries of the beam separator mirrors, move with the change of delay.

In the experiment, the reflected harmonic fields from the two harmonic separator mirrors go through an aperture with a diameter of 2 mm to eliminate the undesired portion of the harmonic fields originating from the so-called long-trajectory electrons, and then they are filtered with a thin metal film, the material of which is chosen so that a relevant range of XUV or soft X-ray light can be observed, to remove the remaining pumping laser field. The spatial profile and the wavelength of each harmonic field are measured using an XUV/soft X-ray spectrograph placed 1.28 m away from the aperture. We obtained the temporal interference fringes by extracting the central part of the spatial fringes of each harmonic fields at each delay time with an appropriate subtraction of noise and the compensation of the intensity fluctuation. We determined that the coherence time of each harmonic field should be within a range of ~10 fs, which is much shorter than the pulse width of the driving laser field (40 fs), from the measured interference fringes. The Fourier transform of each interference trace exhibited the exact spectrum of the harmonic field, the resolution of which was expected to be higher than that of the XUV spectrograph, because we observed the modulation of the spectrum in detail that could not be found in the the XUV spectrograph. This is, to the best our knowledge, the first demonstration of Fourier spectroscopy of the XUV~soft X-ray light without using half mirrors.

In addition to the notable result of the Fourier spectroscopy, the fringe traces themselves gave us the significant information concerning the intrinsic property of the APT electric field. The sum of the interference traces of all the harmonic fields revealed the short bunches of fringes, the width of which nearly attained the single-cycle period of XUV light, showing the potential to form the single-cycle pulse train at the Fourier limit. We also found that the phase of the fringe in a bunch was π -flipped to that of the next bunch. These were the peculiar characteristics of the APT field and could not be directly observed without time-domain interferometry.

We will investigate further detail of the APT field under the various conditions with this spectroscopic method.

(c) Interaction of intense ultrashort laser pulses with materials

Hollow fiber pulse compression is a powerful technique to generate intense sub-10 fs pulses, which are so called few-cycle pulses. We demonstrated that a pressure-gradient hollow fiber technique enables to broaden the spectrum of intense femtosecond pulses without self-focusing which limits the energy scaling. In order to further broaden the spectrum with high stability, we improved the beam quality of our Ti:S laser and enhance the coupling efficiency between the input beam and the hollow fiber using a newly developed beam-lock system. As a result, the beam fluctuation at the fiber entrance was successfully stabilized within 1 μm (rms), resulting in spectral broadening in excess of 300 nm with a pulse energy of 2.7 mJ and an energy stability of 1.1% (rms). After dispersion compensation, the pulse duration was as short as 5.4 fs, which corresponds to two cycles of the optical field. Then, we focused the beam after pulse compression using an $f/2.4$ off-axis parabolic mirror and found that the beam was focused to a nearly diffraction-limited spot size. From the spot size of 2.5 μm at the waist position, the focused intensity was evaluated to be 5×10^{18} W/cm², which enables one to study laser-matter interactions in the relativistic regime. Moreover, we started to develop a gas-filled planar waveguide for the generation of few-cycle pulses with an unprecedented peak power.

(d) Coherent control of two-photon excitation of fluorescent proteins

Modulating the spectral phase of an ultrabroadband laser pulse, we controlled the two-photon fluorescence signals of fluorescent proteins. First we achieved the selective excitation of EGFP or SeBFP by adaptive control to maximize or minimize the fluorescence intensity ratio of SeBFP/EGFP. The maximum and minimum ratio of SeBFP : EGFP were 8 : 1 and 1 : 16, respectively. In the case of a pair of ECFP and Venus, we obtained the fluorescence intensity ratio of ECFP : Venus to be 2 : 1 and 1 : 12. Moreover, we also achieved the arbitrary intensity ratio ranging from the maximum ratio to the minimum ratio. These results suggest that the image contrast of a multi-labeled sample can be controlled by modulating the spectral phase of an ultrabroadband pulse without depending on the concentration of fluorescent proteins in the sample.

(2) Generation and application of intense coherent soft x-ray pulses

(a) High-order harmonic generation

High-order harmonic generation (HHG) using an ultrashort high-peak power laser is a powerful method for generation of extreme-ultraviolet and soft x-ray light. In previous works, we focused on increasing the output harmonic energy to realize nonlinear optics experiments in soft x-ray region. Thus, we succeeded the generation of 0.3 μJ soft x-ray radiation at the 27th harmonic (40 eV) in Ar, and 50 nJ at the 59th harmonic (92 eV) in Ne. This year, we have started to develop a new IR laser system with the aim of extending the harmonic energy to “water window” (280 eV) region. Since the ponderomotive energy is proportional to not only the linear of the pump laser intensity (I) but also the square of the driving laser wavelength (λ), a longer-wavelength intense infrared laser allows generating higher-energy harmonic photons.

High-energy IR source is accomplished in two-stage optical parametric amplification (OPA) with type-II BBO crystal. Output energy exceeding 7 mJ with 60 fs pulse width is achieved at a signal wavelength near 1.4 μm . Total output energy (signal + idler) of 12 mJ is recorded with 30 % conversion efficiency. To our knowledge these are the highest energy and peak power pulses ever produced 1.2 ~ 2.1 μm region by the ultrafast OPA scheme. Using the developed high-energy 1.4 μm OPA pulses, we have performed a proof-of-principle HHG experiment for Xe and Ar. We have successfully generated the 60 eV harmonics in Xe and the 120 eV harmonics in Ar under the phase-matched conditions, respectively.

(b) XUV nonlinear optics and application of attosecond pulses

High-order harmonic generation (HHG) has been recently recognized as one of the best methods of producing an ultrashort coherent light covering a wavelength range from the vacuum ultraviolet to the soft X-ray (XUV) region. High-order harmonics (HH) are applied to a variety of applications, e.g., ultrafast spectroscopy in the XUV region, solid-state and plasma physics, and microscopy and holography with nanometer resolution. Moreover, HH sources have successfully opened new research areas, such as *attosecond science* and *nonlinear optics in the XUV region*. Thus, HHG in *pure* gases pumped with intense ultrashort lasers is widely accepted as a robust method to obtain ultrashort intense coherent radiation in the XUV region.

Physics of HHG in pure gases is now well understood by the so-called three-step model. HHG in mixed gases, however, has not been noticed both theoretically and experimentally, although it contains profound aspects of HHG. Recently, we have introduced *mixed* gases as nonlinear media for HHG for the first time and observed destructive and constructive interference (DI and CI) of harmonics in a mixed gas of He and Ne. We determined the excursion times of the electron responsible for HHG in the attosecond region by measuring interference modulation due to the difference between the phase of the harmonics generated in He and Ne gases. By preparing two gases with different ionization potentials, we can measure the individual phases of harmonics in a robust way because the relative phase takes the simple form, the product of the excursion time and the difference of ionization potentials. The phases, which the freed electrons accumulate during their different quantum paths, are transferred to the harmonics through the coherent process of HHG and lead to the interference. Thus, the intensity modulation of the individual harmonics cause by DI and CI, which takes place when the phase difference π and 0 respectively, provides the novel method for observing the attosecond electron dynamics.

(3) Short wavelength and short pulse width laser processing

Femtosecond laser can perform internal modification of transparent materials due to multiphoton absorption. By using this feature, we have developed the techniques that can form three-dimensional (3D) hollow microstructures and optical waveguides embedded in photosensitive. This year, we applied these techniques to fabricate biophotonic microchips by integrating microfluidics, microlenses, and optical waveguides in a single glass chip. The integrated microchip was used for demonstration of photonic biosensing such as fluorescence and absorption measurements, showing several times higher sensitivity as compared with the nonintegrated microchips.

In the meanwhile, recently, much attention is being paid to polymers as substrates of the biophotonic microchips since it is light and highly flexible. In addition, for some of photonic sensing, use of substrates transparent from deep UV to IR is highly desired. Most of commercially available polymers such as polymethylmethacrylate (PMMA) and polydimethylsiloxane (PDMS), however, cannot transmit light in deep-UV region shorter than 300 nm. Amorphous fluorine-polymer called CYTOP developed by Asahi glass Co. Ltd. has the transmission range from 200 nm to 2 μm . Another advantage of this polymer is that a refractive index of 1.34 is comparable to that of water, which is very important when observe cells placed in water with the optical microscope. Therefore, we tried to use CYTOP for manufacture of biophotonic microchips. For selective cell culturing on the CYTOP, F₂ laser beam was irradiated to the surface to modify to hydrophilicity. Then, HeLa cells were successfully cultured on the laser irradiated area of CYTOP polymer. Meanwhile, optical waveguide that can transmit UV light was fabricated inside of the CYTOP by femtosecond laser direct writing. Propagation loss of the waveguide was evaluated to be 0.5 dB/cm at a wavelength of 355 nm. Thus, combination of F₂ laser modification and femtosecond laser waveguide writing would be very attractive for manufacture of biophotonic microchip that can perform observation of the cultured cells selectively stimulated with UV light.

(4) Generation and applications of Tera-Hertz wave

(a) Tunable Terahertz-wave Parametric Generation pumped by Microchip Nd:YAG Laser

In recent years, Terahertz (THz) wave sources have received considerable attention for use in many applications. Especially, recent researches using THz waves, transparency imaging and fingerprint spectra have had an important contribution in the bioengineering or security fields. In this report, we developed injection-seeded terahertz wave parametric generator pumped by microchip Nd:YAG laser. This is the half palm-sized, LD-pumped single-mode microchip Nd:YAG laser, delivers 1.3 MW peak power pulses (550 μ J/pulse) with 430 ps pulse width at 100 Hz repetition rate. This THz wave source generated tunable, narrow-linewidth THz wave with injection seeding by external cavity diode laser (ECDL) for the idler-wave. We observed maximum output energy of THz wave was about 60 mW (peak) at frequency of 1.9 THz, tunable range from 0.9 to 3 THz, linewidth of less than 10 GHz. We think that its palm sized (100 \times 250 mm), portable source offer good advantages for many applications.

(b) Terahertz-wave absorption in liquids measured using the evanescent field of a silicon waveguide

The range of application is likely to expand even further with the increased availability of many absorption spectra peculiar to specific chemicals, such as DNA and proteins that can be obtained only from liquid solution. But the high absorption of water poses a problem for the direct measurement of transmitted spectroscopy for it. In this study, we presented a new method for measuring the optical properties of the liquid sample in the THz region, relying on the interaction between the samples and the uniformly distributed evanescent wave of the surface layer of silicon rod waveguide with lowest propagating mode. Compared with the traditional transmitted measurement, the technique that is presented here overcomes the immeasurability of the optically thick liquid materials, which caused by the strong absorption of the water and the interference between the two sides of the thin cell. We observed the growth of the concentration of the D-glucose solution and real-time sensing of avidin-biotin binding. While still at the experimental stage, we believe that it would be a new rapid technique for measurement of other liquid sample like bimolecular in THz region.

2. Real-time Bio-imaging

(1) Development of new laser microscopes for spatio-temporal analysis and visualization of intracellular membrane traffic

Using a newly developed high-speed high-sensitivity laser confocal scanning microscope, we visualized COPII budding sites on the ER membrane. From live imaging analysis, we suggested the existence of the structure that was equivalent to the ER exit site (ERES) in *S. cerevisiae*. Moreover, we found that the localization pattern of the ERES was important for formation of the Golgi cisternae. By using a FRET imaging system, we visualized that the interaction between Ypt31p and Sec2p was restricted only at the tip of the bud during the bud emerging and the bud growth. We also demonstrated that Ypt31/32p was not required for Sec4p moving into the bud, but for it accumulating at the bud tip.

(2) Development of a vector system for the expression of photoactivatable IFP in plant cells using Gateway System.

We constructed a series of basic vector systems to express intrinsic fluorescent protein (IFP) in plant cells, especially with a focus on photoactivatable molecules. For rapid construction and broad application capacity, we utilized Gateway System to make those constructs. We made two lines of destination vector systems for transient expression in *Arabidopsis* suspension culture cells and for establishment of transgenic plants. Using this system, we established several transgenic lines which visualize cytoplasm/nucleus, vacuole, and the Golgi. We also utilized this system to visualize two sperm cells in pollen by photoactivatable IFP and succeeded in labeling only one sperm cell by photoactivation.

(3) Determination of the direction of a single fluorophore

By employing the TIRF microscope developed during this project, this year we concentrated on elucidation of the DNA segregation mechanism in bacteria driven by polymerization-and-depolymerization of actin like protein ParM. We discovered that ParM filament dynamics is driven by GTPase not ATPase, as hitherto believed. (i) Using the TIRF microscope, kinetics of polymerization and depolymerization in the presence of GTP and ATP was studied. (ii) Monomeric crystal structures of GMPPNP-ParM and GDP-ParM have been obtained. (iii) From X-ray fiber diffraction of highly oriented GMPPNP-ParM filament, and (iv) the single particle analysis of cryo-EM pictures of isolated GMPPNP-ParM filament, (v) we constructed an atomic model of the ParM filament (so far the structures are not significantly different from AMPPNP-ParM filament). (vi) Interestingly, we discovered that Nd free ParM (with the open Nd binding cleft) can not be accommodated in the filament due to steric hindrance. (vii) SAXS experiments under high-pressure indicated that Nd release from ADP-ParM is much slower than that from GDP-ParM. Altogether, we now know that depolymerization occurs only at one end of the filament where XDP-ParM resides, and that the end with ADP-ParM can accept fresh ATP-ParM which rescue the filament, while the end with GDP-ParM cannot. This is consistent with the dynamics of ParM filament in the cell. This work has shed light on the novel mechanism of polymerization-depolymerization driven dynamics of filamentous proteins. (D.Popp et al., *EMBO J.* in press)

(4) Observation of lipid membranes by STM

Electrochemical scanning tunneling microscopy (EC-STM) was applied to observe phospholipid layers over thiol-modified gold substrates as a model biological cell membrane. On a monolayer of 1-octanethiol on Au (111), a synthetic lipid, 1, 2-dihexanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine, was introduced in a neutral 0.05M NH_4ClO_4 buffer solution. The lipid molecules formed a fluidic layer at 0.0V vs. RHE of the substrate electrode potential. By cycling the electrode potential between +0.2V and -0.2V, the lipid layer reversibly changed over between the fluidic phase and a striped/grainy structure. This structural change might involve partial decomposition and oligomerization of phospholipids. This method will contribute for molecular biology by revealing the nanometer-scale structure of cell membrane.

(5) Observation of lipid membranes by AFM, characterization of lipid probes and their applications

Using AFM, we characterized the role of cholesterol on membrane domain (raft) formation. 10-25 mol% cholesterol in the model membrane accelerates the domain formation whereas 40 mol% cholesterol inhibits raft formation. The binding property of established cholesterol probes, filipin and θ -toxin, was studied using AFM. Whereas filipin binds membranes containing 10-40 mol% cholesterol, θ -toxin binds membranes only when cholesterol is more than 40%. Using these properties of cholesterol probes, we showed that high-cholesterol membrane domain plays important roles in cell adhesion and cell division.

(6) A novel mitotic role of importin β and small GTPase Ran

Nucleocytoplasmic transport factors mediate various cellular processes, including nuclear transport, spindle assembly, and nuclear envelope/pore formation. In this study, we identified human chromokinesin Kid (hKid) as an import cargo of the importin- α/β transport pathway and determined its nuclear localization signals (NLSs). Upon the loss of its functional NLSs, hKid exhibited reduced interactions with the mitotic chromosomes of living cells. In digitonin-permeabilized mitotic cells, hKid was bound only to the spindle and not to the chromosomes themselves. Surprisingly, hKid bound to importin- α/β , was efficiently targeted to mitotic chromosomes. The addition of Ran-GDP and an energy source, which generates Ran-GTP locally at mitotic chromosomes, enhanced the importin- β -mediated chromosome loading of hKid. Our results indicate that the association of importins- β and - α with hKid triggers the initial targeting of hKid to mitotic chromosomes and that local Ran-GTP-mediated "cargo-release" promotes the accumulation of hKid on chromosomes. Thus, this study demonstrates a novel nucleocytoplasmic transport factor-mediated mechanism for targeting proteins to mitotic

chromosomes.

(7) Interaction of nucleocytoplasmic transport receptor and nuclear pore complexes examined using highly inclined and thin beam illumination.

We developed a simple illumination method of fluorescence microscopy for molecular imaging. Illumination by a highly inclined and thin beam increases image intensity and decreases background intensity, yielding a signal/background ratio about eightfold greater than that of epi-illumination. A high ratio yielded clear single-molecule images and three-dimensional images using cultured mammalian cells, enabling one to visualize and quantify molecular dynamics, interactions and kinetics in cells. Using this method, we found that 100-200 molecules of importin β is capable to bind a single assembled nuclear pore complex with dissociation constant ranging from 0.3 ± 0.2 - 0.1 nM to 70 ± 50 - 30 nM. A mechanism concerning how importin β can rapidly transit through NPCs, which provide such high affinity binding sites for this molecule, remains to be elucidated.

(8) Structure analysis of mitotic chromosomes using small angle X-ray scattering analysis

Mitotic chromosomes are essential structures for the faithful transmission of the genetic information at each cell division. However, how the two meters of DNA that is present in each human cell is packaged into compact mitotic chromosomes (a 10,000-fold shortening) remains largely unknown. To address this question, at RIKEN SPring-8 we are investigating chromosome structure using small angle X-ray scattering analysis (SAXS), which makes it possible for us to detect internal regular structures in non-crystal materials in solution.

(9) Single-molecule imaging techniques for analysis of intracellular reactions

Techniques to evaluate multiplicity of the reaction states and non-randomness from single-molecule reaction time series were developed. Multiplicities can be evaluated using multiple-exponential and stretched exponential functions to describe reaction kinetics. Non-randomness under the presence of multiplicities requires comparison between non-Markovian functions from experiments and simulations of reaction models. These techniques were applied for analysis of interactions between EGF receptor and Grb2. To increase the detectability of single-molecule imaging, deconvolution with PSF was applied for TIR fluorescence microscopy and resulted in improvement of the spatial resolution by a factor of about 30%.

(10) Intracellular single-pair FRET imaging

To image single-pair (sp) FRET inside living cells, technique to detect changes of the fluorescence emission spectrum was developed for eGFP (donor)-eYFP (acceptor) pair. The optics were optimized and method to calculate FRET efficiency from single-molecule images were conceived. This technique was successfully applied for detection of conformational changes of cRaf1 upon activation in living cells.

(11) Spatial and temporal regulation of the condensin complexes in the mitotic and meiotic cell cycles

To understand how two condensin complexes are subjected to differential regulation during the mitotic cell cycle, we study their spatial and temporal dynamics by using high-resolution imaging techniques in human tissue culture cells. We are also preparing essential tools (e. g., specific antibodies and fluorescently tagged proteins) to investigate the role of condensin complexes during meiosis using mouse oocytes as a model system. Fruitful outcomes including real-time imaging are anticipated in the coming year.

(12) Development of compact coherent light sources in the visible region for real-time biological imaging

Ultrashort pulse tunable coherent light source in the ultraviolet-blue region are of importance for real-time biological imaging. Especially, if rapid and random wavelength tuning of the lasers were realized, their application fields will be extended. In previous works, we demonstrated a rapid and random wavelength tuning of the ns-pulsed Ti:sapphire laser with acousto-optic tunable filter (AOTF) in the cavity. We also realized the ps-pulse generation with electronically tuning of laser wavelength only by the cw laser pumping.

In this work, we investigated the mechanism of ultra-short pulse generation of the electronically tuned Ti:sapphire laser. It was found that intensity beats were stimulated by the summation of frequency shifted radiation in the cavity. The beats of the radiation in the cavity cause Kerr effect of the laser crystal. Finally, we found that short pulse generation was induced by the Kerr effect. This result suggests that we can also realize the electronically tuned Ti:sapphire laser in the fs region. On the other hand, we also investigate expand of tuning range of laser. By using SHG of the Ti:sapphire laser, tuning range from 350 to 550 nm was obtained. In this work, we introduced intra-cavity sum frequency mixing with 1.3 mm from the Nd:YAG laser and tunable radiation from the Ti:sapphire laser. With the laser system, wavelength region was extended to the yellow and red region.

3. Ultrafast manipulation of molecules

(1) Elucidation and control of molecular dynamics in the condensed phase by ultrafast spectroscopy

Ultrafast structural dynamics in a prototypical push-pull molecule, *p*-nitroaniline, was studied by femtosecond impulsive Raman spectroscopy using 10-fs pulses. A slowly-oscillating beat component was successfully observed, which corresponds to a twisting motion of the nitro group in the excited state. It was found that the frequency of the twisting motion shows a significant downshift as the charge transfer state is generated. This experimental result strongly suggested that the C-NO₂ bond is weakened in the charge transfer process of *p*-nitroaniline, i. e. the formation of a twisted charge transfer excited state. Wavepacket dynamics in the MLCT excited state of a copper(I) complex, [Cu(2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline)₂]⁺, was studied by wavelength-dispersed ultrafast absorption spectroscopy. It was found that an oscillatory component due to the wavepacket motion appears with a common phase, irrespective of the observation wavelength. This result suggests that the wavepacket motion is assigned to a non-totally symmetric vibration, which has the same symmetry as the coordinate of the Jahn-Teller distortion of this complex. Time-resolved fluorescence intensity of S₁ *cis*-stilbene was measured by femtosecond up-conversion method, and the corresponding S₁-S₀ fluorescence oscillator strength was evaluated as 0.16. The obtained value clearly indicated that the S₁ state is one-photon allowed, which allowed us to finalize the controversy about the assignment of the reactive S₁ state of *cis*-stilbene. Electronic structure of a model compound of the GFP chromophore (HBDI) was investigated by a multiplex two-photon absorption spectroscopy. It was revealed that the two-photon absorption spectrum of HBDI shows a significant wavelength shift compared to the one-photon absorption, just as the case of GFP itself. It was concluded that a new excited state with high two-photon absorptivity is located near the strongly fluorescent state of the anionic form of GFP proteins.

(2) Ultrafast Photoelectron Spectroscopy of Chemical Dynamics in the Gas Phase

A theoretical formulation was developed for the photoelectron angular distribution, in the adapted form for the ultrafast time-resolved photoelectron imaging and the multichannel quantum defect theory. The rotational wave functions were treated explicitly. The photoelectron angular distribution was doubly expanded by the state multipoles of the field and the alignment parameters of the molecular axis distributions, with coefficients, *b* factors, which contains full information about the photoionization dynamics. From the viewpoint of the molecular frame photoelectron angular distributions, the linearly independent *b* factors were identified for the linear and the C_{2v} point group symmetry. By the singular value decomposition, we confirmed that there are no other linearly dependent *b* factors. Based on the linearly independent *b* factors, we proposed an efficient experimental scheme for the complete determination of the photoionization dynamical parameters.

We have developed 10-fs deep-ultraviolet (DUV, 200-300nm) pulse generator. The second harmonic and the fundamental of Ti:sapphire laser pulses

were gently focused into rare gas and frequency conversion occurred in the gas by four-wave mixing process. Since the input pulse had high peak intensity, filamentation effect occurred, which fact was that the pulse propagated long distance with the focused diameter. As a result, high conversion efficiency with long interaction length was achieved. The pulses with 20 uJ energy at 260 nm and 4 uJ energy at 200 nm were generated with a 500 uJ pump pulse (400 nm). The generated pulses were compressed by a grating compressor down to 12 fs at 260 nm and 16.5 fs at 200 nm, respectively. In particular, the 200 nm pulse is the shortest in the world since 200 fs was shortest in the wavelength region so far. Additionally, we have succeeded in generating mid-infrared (MIR) pulses by using the same scheme. Since gases, whose dispersion is much lower than solids, were used in the frequency conversion scheme, very broad spectrum (2.5-7 μm) was obtained. Thanks to the low dispersion of air in the wavelength region, the pulse width of the generated pulses was measured as 13 fs without any compressors. The pulse width is also the shortest in the wavelength region. These pulses are useful for fundamental chemical dynamics research since the DUV pulses are resonant to the lowest excited state of many simple molecules and the MIR pulses are resonant to the vibration of many molecules.

(3) Photomanipulation behavior of photoresponsive chiral materials

For photomanipulation in axial chirality, we are developing the novel cyclic azo-compounds. We synthesized and characterized 3,3'-cyclic azo-compounds with efficient transformation of trans-cis photoisomerization to axial chirality of the binaphthyl moiety. In comparison with acyclic azo-compounds, the cis-trans thermal isomerization was suppressed because of the steric hinderance of the cyclic linkage. Reversible switching behavior in molecular twisting was obtained by the alternative irradiation of light at 334 nm and 436 nm. The circular dichroism studies indicated dichroic ratios $\Delta\epsilon$ at 238 nm increased with photoirradiation. On the other hand, $\Delta\epsilon$ decreased with increasing temperature. We have successfully developed novel 3,3'-cyclic azo-compounds with the independent control of molecular twisting by light and heat.

4. Near-field Nanophotonics

(1) Higher sensitivity in near-field Raman spectroscopy

We developed a method to achieve higher sensitivity in near-field Raman spectroscopy by using a gap-mode plasmon excitation. Illuminating a 50nm-thick silver thin film by radially polarized beam can excite focused surface plasmon polaritons, which result in an enhanced electric field. When a metallic tip is adjusted onto the enhanced electric field, gap-mode plasmon is excited, which can further boost the Raman signals of the molecules at the gap.

(2) Characterization of nano-scale strain of crystals by near-field Raman spectroscopy

Reflection-mode tip-enhanced Raman scattering (TERS) has the advantage to characterize any samples, particularly opaque, bulk and multilayered samples. However, the background signal in reflection-mode TERS is huge due to large focus spots associated with objective lens that has long working distance. Moreover, for a multilayered and bulk sample, the Raman signal from the bulk layer interferes with the Raman signal on a thin surface layer. This unwanted bulk background signal reduces the sensitivity of the measurement and makes it difficult to get high-contrast TERS image in reflection-mode. We used Raman tensor analysis to quantify the far-field Raman intensity at different polarization states of the polarizer and analyzer at varying sample azimuth. The polarizer, analyzer and sample azimuth combination that gives minimum far-field background signals with high contrast in SERS was utilized in TERS experiment to obtain high contrast near-field Raman signal. Both the field enhancement effect and depolarized detection were considered to obtain a high signal-to-noise TERS signal. We found out that for Raman active and thin crystalline samples assembled in bulk materials, depolarization effect outweighs the field enhancement effect in getting high-contrast Raman signal.

(3) Oxidization of silicon cantilever for the near-field Raman characterization of silicon-based semiconductor

We propose a novel technique of oxidizing silicon cantilever tips to characterize silicon-based semiconductors by near-field Raman measurements. The silicon cantilever tip is thermally oxidized before the metal coating to change crystalline silicon into amorphous. This technique is aimed for the suppression of Raman scattering from the silicon tip itself that may otherwise overwhelm the Raman signal of the target sample. Using the oxidized tip, we experimentally verified that silicon Raman vibration was completely suppressed.

(4) Two-dimensional nano imaging using metallic nanorod array

Magnification in image transfer using metallic nanorod array has been demonstrated by FDTD (finite-difference time-domain) algorithm. The magnification is determined by the ratio between array pitch at the entrance and the exit. The nanorod array is arranged in cascade with nanogap to transfer image with high efficiency and with long distance. Plasmon resonance on individual metallic nanorods at each layer and gap effect between the rods contribute to the imaging in multi-layered structure. We found that the odd number of layer enables a broadband spectrum transfer without shift of resonant frequency.

(5) Plasmonic Metamaterials

We fabricated plasmonic metamaterial by using two-photon induced metal-ion reduction method. The metamaterial structure was an array of pairs of silver nano-rod, and it was fabricated on the quartz substrate. The electro-magnetic properties of the metamaterial was examined by using far-infrared FT-IR spectroscopy. In the experiment, we have successfully confirmed that the fabricated metamaterial interacted directly with the magnetic component of the far-infrared waves of 16THz in frequency.

(6) Two-photon reduction for fabricating three-dimensional micro/nano metal structures

We tried to improve the spatial resolution of the two-photon reduction technique which uses a femto-second ultra-short pulse laser as a light source. In the conventional system, when a high-intensity Ti:Sapphire laser is focused into a silver nitrate aqueous solution, nano-scale silver crystals are created in the focused laser beam spot. Even after stopping the laser irradiation, the created silver nano-crystals grow and become sub-micron size silver particles. The size of silver particles determines the final spatial resolution. We tried to decrease the size of the silver crystals by inhibiting their growing process in order to improve the spatial resolution. We added the surfactant molecules which adhere to the silver surface to silver nitrate aqueous solution. From the experimental results, we succeeded in realizing 120nm resolution which exceeds the spatial resolution calculated by Rayleigh criterion.

(7) Orientation analysis of single molecules near the metal surface by dipole radiation pattern and fluorescence lifetime measurements

CdSe/ ZnS semiconductor quantum dots (QDs) have high stability and comparable high quantum yield compared with usual organic dye molecules. Thus, QDs have attracted a great deal of interest, because they can be used as the fluorescent labels for bio-molecules, single photon emitter, gain materials for laser emissions and so on. The transition dipole moment of CdSe/ ZnS QDs is quite different from that of usual organic fluorescent molecules. According to the axially symmetric structure of Wurtzite lattice, the excitonic transitions are not allowed along the *c*-axis (dark axis) of the lattice. Wurtzite lattice structure results in two-dimensional degeneration for the excitonic transition dipole moment. In order to utilize the QDs for many kinds of photonic applications, we have to consider the particular 2D degenerated dipole moments, because the quantum yields and decay constants strongly depend on the position and orientation to the interface. Understanding the radiative decay mechanism for a single 2D dipole, near an interface,

leads to the growth of the nano-scale photonic applications. In this work, we studied the fluorescence emission pattern and lifetime of single 2D dipole, placed in front of a dielectric interface, for the purpose of constructing the theoretical model for 2D dipole emissions. We adopt our theoretical concepts to the experimental results of fluorescence pattern and lifetime of single QDs. Statistical analysis for the lifetimes and emission patterns show a good agreement with our theoretical calculations. These results can be utilized for the development of nano-photonic applications.