

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26390046

研究課題名(和文) 光機能性バイオナノマテリアルの2光子吸収過程 機構解明とデバイス開発に向けて

研究課題名(英文) Application of photo-receptor bio-nano materials

研究代表者

横山 泰範 (Yokoyama, Yasunori)

名古屋大学・工学研究科・助教

研究者番号：80402486

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：光機能性のバイオマテリアル・バクテリオロドプシン(bR)を用いた新規な光書込みデバイス開発にとって、核となる技術であるbRの固体化に取組んだ。bRを光記録デバイスに応用するためには、固体中でもbRの光反応による光書込みが可能で、かつ高密度書込みのために記録層(bR膜)の積層が重要となる。親水性高分子であるポリビニルアルコール(PVA)を固定媒体として作製した固体試料に対し、bRの機能・構造上の特徴を検討した。固体試料中のbRは溶液系とほぼ同一の光応答を示し、かつ天然で形成する高次構造を維持していた。また、PVAのゲル化に伴いbR膜の積層が起き、PVA系は将来的な応用に有用であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：To apply a light-induced chromophore color change of a photo-receptor protein bacteriorhodopsin (bR) to a novel optical memory device, it is necessary that bRs are immobilized as maintaining its structure and function. A poly(vinyl alcohol) (PVA) hydrogel with physical cross-linkages (hydrogen bonding) by the freezing-and-thawing (FT) method was used as an immobilization medium. To investigate effects of the PVA gelation on structure and function of bR in purple membrane (PM), spectroscopic techniques were employed against PM/PVA immobilized samples. Time-resolved absorption spectroscopy showed that bR photocycle in the immobilized samples was almost identical to that in suspension. Circular dichroism spectroscopy and X-ray diffraction experiments indicated not only retaining of the native-like 2D crystal of bR but PM stacking during gelation. These results showed that the PVA hydrogel is appropriate to immobilize membrane proteins in terms of maintaining their structure and function.

研究分野：生物物理学

キーワード：ナノバイオ 先端機能デバイス 蛋白質 生物物理

## 1. 研究開始当初の背景

生命のナノ分子機械として広く知られるタンパク質は、生細胞内における様々な生命活動に関連した役割を果たす。酵素のように高反応効率で基質特異的に生体内の化学反応を触媒するもの、受容体タンパク質のように熱・光・化学物質・力学刺激など外界からの様々な刺激に対して応答するものが存在する。これらの優れた機能の応用を考えたとき、「タンパク質の分子構造は周囲の環境変化に極めて敏感である」という克服しなければならない問題が存在する。これは、タンパク質の構造が自身のポリペプチド鎖や周囲の水分子間に働く分子内・分子間の相互作用の微妙なバランスの上に形成されるためである。したがって、タンパク質の天然状態での分子構造・機能性を担保した上での適切な固定化方法の発見が必須である。

そのため、バイオナノマテリアルの開発研究は、構造が安定で取扱い易く機能機構も明らかでないタンパク質が中心となってきた。その1つに古細菌の細胞膜中から発見されたバクテリオロドプシン(bR)という光受容タンパク質がある。bRは天然において自己組織化し細胞膜中に格子定数6.27 nmの2次元結晶(図1左)を自発的に形成し<sup>1</sup>、原子レベルの分解能での分子構造(図1右)が解かれている<sup>2</sup>。bRは熱やpHに対する安定性が極めて高く、結晶中では100℃までその構造を保持できるので<sup>3</sup>、デバイスに必須の高い耐湿熱性を備える数少ないタンパク質の1つである。bR分子内に結合した色素レチナールが可視光吸収により*cis*-*trans*の光異性化し、過渡的に最大吸収波長が大きく(~150 nm)変化する<sup>4</sup>。これまでのbRのデバイスへの応用として、この性質を利用した光変調素子・光メモリ・光センサー・非線形光学素子などへの応用がこれまでに試みられてきている<sup>5-8</sup>。

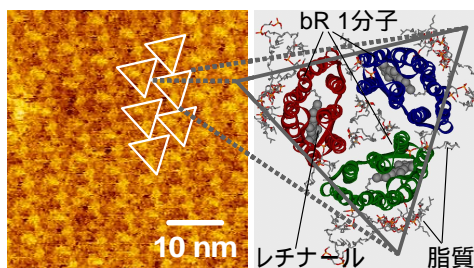


図1. bRの2次元結晶(左)とbR 3量体の分子構造(右)。左図中の三角形はbRの3量体を表わす。

研究代表者は、これまで試みられてきたbRのデバイスとは全く異なる機構による、新規な光書込みデバイスを提案した。それは、研究代表者が行ってきたbR構造・機能・構造安定性に関する生物物理学的研究から、bRの2次元結晶の結晶性低下に伴って機能時の構造安定性が著しく低下し、可視光照射によりbRが変性し色素レチナールの退色(吸収波長の200 nmもの短波長シフト)が促進されることを見出した<sup>9,10</sup>ことによる。さらに、

温度変化に起因した脂質2重層膜のゲル液晶相転移に伴いbRの結晶状態が可逆に変化する系<sup>11</sup>を利用して、光誘起の不可逆な色素退色を温度で制御可能であることも示した<sup>12</sup>。光照射によりブルーシフトした色素を青色光で励起すると、部分的にはあるが元の紫色に再生することが報告されており<sup>13</sup>、書込み・消去の両方が可能なランダムアクセスメモリとしての応用が見込める。bR機能機構の解明を研究目的にする場合、変性や色素退色は機能発現に好ましくなく無視される。その一方、研究代表者は逆に現象を積極的に捉え、光を当てた部位の色素の色だけを変える光書込み現象としてデバイスへの応用を着想するに至った。

タンパク質の構造・機能を保ち得る適切な固定化媒体の選択が応用のために重要となる。特に、bRの光サイクルが系の含水量に敏感であるため<sup>14</sup>、水分を豊富に含む固定化試料作製が必要となる。このため、固定化媒体として親水性高分子に注目し、ハイドロゲル中に固定化することを考えた。その中でもポリビニルアルコール(PVA)は、以下の点で優れた性質を持つ:(a) 透明性、(b) 高い弾性、(c) 高い生体適応性、(d) 凍結融解(FT)法による水素結合を架橋とした(物理架橋)ゲル化能力、である<sup>15</sup>。物理架橋によるゲル形成能力は、化学架橋剤(ポリマー鎖間の共有結合を化学反応により形成する)を一切使わずにゲル構造形成が可能という点で利点となり得る。不適切な化学架橋による固定の場合、タンパク質に対する反応のためその機能活性を低下させる恐れがあるためである。これまでに乾燥PVAフィルム中でのbRの特徴に関する多くの研究<sup>16,17</sup>が存在するのに対して、FT法によるPVAゲル構造形成途中のbRの機能・構造に関する報告はなく、実現可能性の検討が必要である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、バイオナノマテリアルであるbRを応用し、次のような新規な光書込みデバイスを開発することにある：

「bR光誘起変性をbR結晶性により制御し、それに伴う色素変色を書込み原理とした、不揮発でランダムアクセスな光記録デバイス」

そのため、本研究課題では次の3つの項目を設定し、デバイス開発実現に向けて取り組んだ：(1) bR機能を担保した固体化試料の作製、(2) 固体試料中でのbR結晶性の制御、(3) 青色光による色素再生率の向上。

## 3. 研究の方法

### (1) 試料調製

和光純薬工業より購入したPVA(平均重合度: 2000、けん化度: 98 mol%以上)を、オートクレーブ(121℃, 15 min)により超純水に溶解した。標準的な方法<sup>18</sup>に従って高度好塩菌*H. Salinarum*, R1M1株の紫膜を精製し、20 mM リン酸緩衝液(pH 7.0)中に再懸濁し

た。PVA 溶液は室温まで冷却した後、体積比 1:1 で紫膜懸濁液と混合した。ゲル化の目的で、混合液を石英セル中に移し、一晚冷凍庫内で  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$  で保存した（凍結ステップ）。凍結した試料はその後冷凍庫から出され、室温で 3 ~ 4 時間放置した（融解ステップ）。FT サイクル、つまり凍結ステップと融解ステップの反復を、少なくとも 3 回行った。

#### (2) 吸収・CD 分光法

紫膜/PVA 試料の吸収・CD スペクトルは、Agilent 8453 分光光度計（アジレントテクノロジー）および J-820 分散計（日本分光）によって測定した。ゲル試料は組立セルを用いて作製した。吸収・CD スペクトルは、融解ステップの直後に室温において測定した。CD スペクトルは 400 ~ 700 nm の波長範囲、掃引速度 100 nm/min、データ取得時間 1 s で測定し、8 回の測定を平均化した。

#### (3) 時間分解吸収分光法

紫膜/PVA 試料の時間分解吸収変化を、コンピュータ制御のフラッシュ・フォトリス測定装置により測定した。試料は定常分光法と同じ手法で作製した。370 ~ 700 nm の波長範囲において、20 回のレチナール吸収の時間発展を平均化した。

#### (4) X 線回折実験

高エネルギー加速器研究機構フotonファクトリー (KEK-PF) のビームライン BL-6A、BL-10C において、放射光を利用した X 線回折測定を行った。試料は 1 mm 厚のテフロンスペーサーと 2 枚の薄い (100  $\mu\text{m}$ ) 石英窓板を用いて作製した。溶液状の試料は、ソーダガラス製のマークチューブ（外径 1 mm、肉厚 10  $\mu\text{m}$ ）中に封入して測定した。BL-6A、BL-10C において、X 線の波長はそれぞれ 0.15 nm、0.10 nm であり、試料検出器間距離はそれぞれ約 90 cm、約 50 cm であり、典型的な露出時間 300 s で記録した。

### 4. 研究成果

#### (1) bR 機能を担保した固体化試料の作製

FT サイクルの繰り返しにより、PVA ハイドロゲルで固定した紫膜試料調製に成功した。薄い組立セル中に作製した紫膜/PVA ゲル試料の写真および吸収スペクトル (図 2(a)) は、この固体試料が透過分光法による分析のために十分な透明さを有していることを示す。図 2(b) は、この試料が組立セルから取り出した際にも形状を保つのに十分な力学強度を有することを示す。

2 次元結晶格子状におけるレチナールの配置に起因する CD 信号が、可視領域の CD ス

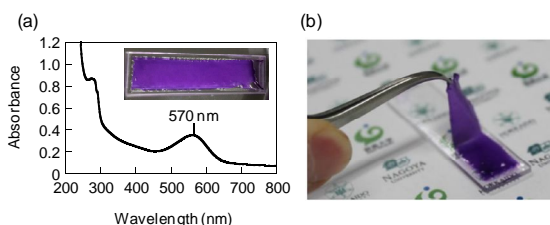


図2. (a) 紫膜/PVAゲル試料の吸収スペクトルと写真。(b) 組立セルから取り外した紫膜/PVAゲル試料の写真。

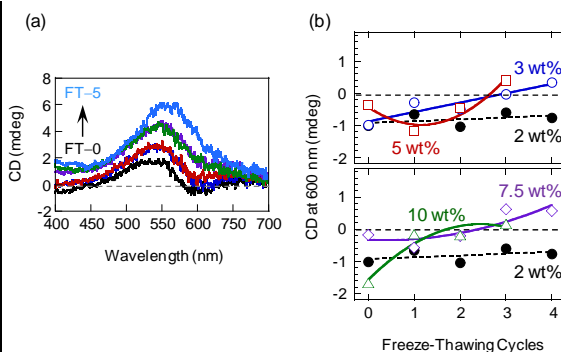


図3. (a) 紫膜/PVAゲル試料の可視CDスペクトル。(b) 各PVA濃度条件での600 nmにおけるCD強度のFTサイクル依存性。

ペクトルに反映されることが知られている<sup>19</sup>。したがって、PVA ハイドロゲル中で bR の 2 次元結晶が保たれているか調べるために、固体試料の可視 CD スペクトルを測定した。図 3(a) に FT サイクル回数を変化させたときの紫膜/PVA 試料の可視 CD スペクトルを示す。試料を凍結する前の試料（紫膜/PVA ゾル試料）の可視 CD スペクトルは、懸濁液系<sup>19</sup>と同様 2 つの（正と負の）CD ピーク（エキシトン型）の特徴を有していた。しかしながら、FT サイクル回数の増加とともに、可視 CD スペクトルの形状はエキシトン型から単一のポジティブ型へと変化していった。このスペクトル変化と同様の結果は、電場印加により配向した紫膜フィルムにおいて報告されている<sup>20</sup>。これは、レチナールの励起子遷移が bR 3 量体の  $C_3$  対称性によって厳密に解消されたためである<sup>20</sup>。つまり今回の結果は、物理架橋形成によるゲル化の過程において紫膜が積層あるいは配向したことを強く示唆するものである。図 3(b) は、様々な PVA 濃度における紫膜/PVA 試料の可視 CD スペクトルの 600 nm（負のピーク）での CD 強度の FT サイクル回数依存性を示す。全ての PVA 濃度において、紫膜/PVA 試料は 4 回の FT サイクルの後にゲル化した（紫膜/PVA ゲル試料）。興味深いことに、PVA 濃度 2 wt% の試料においては、ゲル化しているのに紫膜の積層は観測されなかった。

PVA ハイドロゲル中の紫膜における bR の結晶性ならびに紫膜の積層に関する詳細な構造情報を得るため、放射光を利用して X 線回折実験を行った。FT サイクルを 5 回繰り返した紫膜/PVA ゲル試料に対する X 線回折の 1 次元プロファイルを、紫膜/PVA ゾル試料・紫膜懸濁液・PVA 溶液のデータとともに図 4 に示した。bR 3 量体の 2 次元結晶由来

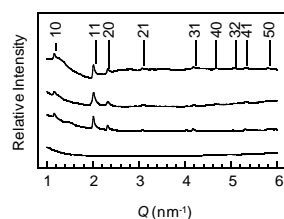


図4. bR 3 量体の 2 次元結晶に起因する X 線回折プロファイル。(i) PVA 水溶液。(ii) 紫膜/PVA ゾル試料。(iii) 紫膜/PVA ゲル試料。(iv) 紫膜懸濁液。

の等方的な回折ピークは過去の報告<sup>1,21</sup>とよく一致し、紫膜中の bR 2 次元結晶は PVA ハイドロゲル中で FT サイクルの進行によらず保たれていた。紫膜/PVA ゾルおよび紫膜/PVA ゲル試料と紫膜懸濁液のより小角側の 1 次元プロファイルを図 5(a)に示す。紫膜/PVA ゾル試料について、PVA 溶液や紫膜懸濁液試料では見られなかった、 $0.2 < Q < 0.4 \text{ nm}^{-1}$  の範囲における特徴的な等方的反射が観測された。以下の 2 つの事実によって、この反射は紫膜断片同士の間隔の規則的構造によるものと判断した。第一に、この反射の周期は約 20 nm であり、過去に報告された bR 3 量体の 2 次元結晶格子の反射<sup>1,21</sup>に比べて明らかに長い距離である。第二に、この反射の周期が PVA 濃度を保ちながら紫膜濃度を薄めた時に広がったことである(図 5(b))。

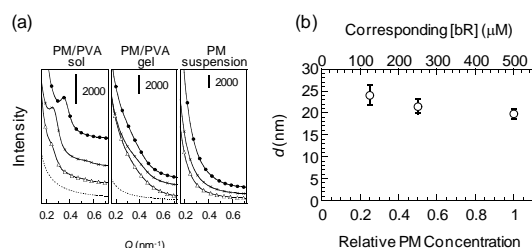


図5. (a) 小角側領域における紫膜/PVAゲル試料・紫膜/PVAゾル試料・紫膜懸濁液のX線回折プロファイル。(○: [bR] = 500  $\mu\text{M}$ , ×: [bR] = 250  $\mu\text{M}$ , □: [bR] = 125  $\mu\text{M}$ )。破線はPVA水溶液。(b) 紫膜/PVAゾル試料においてみられた小角側領域の構造周期の紫膜濃度依存性。

この結果は、紫膜は PVA 溶液中において PVA 高分子鎖との間に何らかの相互作用を生じ、紫膜間の長周期構造を形成することを強く示唆している。一方興味深いことに、この長周期構造は紫膜/PVA ゲル試料において不明瞭になった(図 5(a)中央)。この結果は、紫膜の規則構造に関する 2 つの可能性を与える。(1) ゲル構造形成の過程でこの紫膜の等方的な規則構造が消失した。(2) この規則構造は異方的になった。この点について、可視 CD データ(図 3(a))との整合性を考えたとき、「PVA ハイドロゲル形成過程における PM の積層」以外に合理的な解釈は存在しない。

紫膜/PVA 試料中の bR におけるレチナルの光反応を調べるため、時間分解吸収分光測定が行われた。図 6(a)は、異なる時間領域 (M 中間体の生成過程(上)と M 中間体の減衰から bR 基底状態(BR)の復元過程(下))における紫膜/PVA ゲル試料の時間分解差分スペクトルを示す。同様に測定した紫膜/PVA ゾル試料ならびに紫膜懸濁液についての対応する差分スペクトルから、紫膜/PVA ゲル試料、紫膜/PVA ゾル試料、紫膜懸濁液の間でレチナルの光化学反応にほとんど差がないことが示された。図 6(b)に、代表的な波長(570 nm: BR, 410 nm: M, 650 nm: O)における紫膜/PVA ゲル試料の吸光度変化を示した。これらの吸光度変化は紫膜懸濁液のもの<sup>22</sup>と極めて良く一致した。単一緩和式によるカーブフィッティングから、これらの吸光度変化の時定数を評価した。M の生成・減衰過

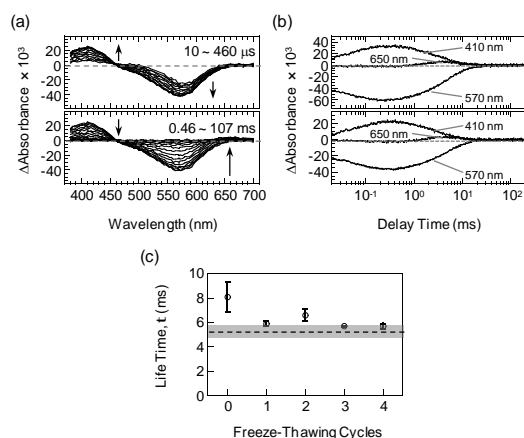


図6. (a) 紫膜/PVAゲル試料の時間分解差分スペクトル。(b) 代表波長におけるレチナル吸収の時間発展。(上)紫膜/PVAゲル試料、(下)紫膜懸濁液。(c) BR復元過程の時定数のFTサイクル回数依存性。破線と影は紫膜懸濁液のデータと誤差。

程の時定数と FT サイクル回数の増加との間には関係性が見られなかったのに対し、BR 復元過程の時定数が FT サイクル回数の増加に従って減少した。図 6(c)に BR 復元過程の時定数の FT サイクル回数依存性と、比較のため紫膜懸濁液の対応するデータを共に示す。これらの結果は、PVA ゲル構造形成の進行に伴い BR への復元過程が水中での紫膜のそれと同一になっていく様子を示している。このことは、図 5(a)に示した紫膜間の長周期構造にも関係しているかもしれない。

物理架橋 PVA ハイドロゲルのゲル化機構とともに、本研究によって得られた実験結果から PVA ゲル構造形成に伴う紫膜の整列に関するモデルを提案した。図 7 は、FT サイクル前(a)と後(b)での紫膜間の位置関係についてのモデル図である。紫膜/PVA ゾル試料では(図 7(a))紫膜は PVA 溶液中にランダムに分散し、紫膜間に約 20 nm の規則構造を形成している。この規則構造は紫膜懸濁液中では観測されない(図 5(a))。等方的な紫膜の配向は、紫膜/PVA ゾル試料の可視 CD スペクトルによっても支持される(図 3(a))。PVA ポリマーネットワーク構造が多数の数  $\mu\text{m}$  の空隙を持っている事<sup>15</sup>を考え合わせると、FT サイクルの繰り返しで形成される PVA ゲル構造は、図 7(b)に示したように紫膜/PVA 混合物中で紫膜を取り囲むようになることが考えられる。今回の結果は、FT サイクルの繰り返しによる PVA ゲルネットワーク形成の進行が、ゲル中における紫膜の配置を制限することを強く示唆している。

ここで、紫膜(1~2  $\mu\text{m}$  (長軸) × 1  $\mu\text{m}$  (短軸) × 4~6 nm (厚さ))がなぜ規則正しく整列するのか?という疑問が生じてくる。今回の結果は、紫膜の積層が厚さ ~1 mm の試料全体で起きていることを示している。さらに、同じ組立セルで作製した紫膜/アガロースハイドロゲルの可視 CD スペクトルから、紫膜はアガロースハイドロゲル中では積層しなかった。積層機構の第一の可能性は、石英セル表面からの影響である。表面からの引力的な力により、PVA 鎖の実効的密度はバルク中

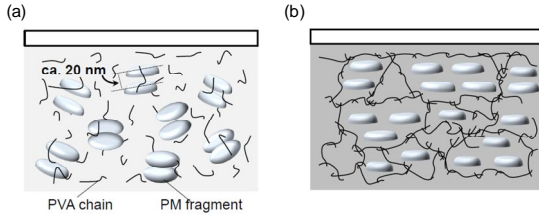


図7. 物理架橋PVAゲル構造形成に伴う紫膜積層メカニズムの模式図。(a)ゲル構造形成前。(b)ゲル構造形成後。

よりも増加する<sup>23</sup>ので、PVA鎖は表面近傍で容易に架橋点を形成する。この引力的な表面力の及ぶ範囲はたかだか1~2nmであるが<sup>23</sup>、表面に沿ってできた規則的なPVA構造は試料全体の規則構造の基点となり、紫膜を取り囲むようにPVAゲルネットワークが形成される。表面張力も紫膜の整列に影響を及ぼす可能性がある。多孔質構造が表面に平行な方向に異方的に引っ張られた場合、PVAの多孔質構造への異方的な歪みが紫膜の異方的な整列の手助けとなる。第二の可能性は、紫膜表面の静電的電荷の分布の非対称性<sup>2</sup>から生じる、紫膜の電気双極子モーメントの影響である。紫膜の細胞質側表面には負に帯電したアミノ酸残基が多く存在する<sup>2</sup>。pH4付近で紫膜が凝集するという過去の報告<sup>24</sup>は(可溶性bRの等電点: pI 3.93~5.49<sup>25</sup>) 中性pHにおける紫膜断片間の静電斥力の効果を強く支持する。PVAのゲル構造形成とともに、紫膜は狭い多孔質の空間の中でお互いに細胞質側表面間の斥力を避けるように並ぶのかもしれない。静電相互作用は長距離に及ぶため、試料全体での紫膜の配向に繋がる。紫膜の積層機構は現時点で明らかではないが、応用を考えた際に重要な点となる。詳細な機構について、今後の研究の進展を期待する。

## (2) 固体試料中でのbR結晶性の制御

紫膜/PVAゲル試料と同等の作製法により、dimyristoylphosphatidylcholine (DMPC)、dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)で作成したベシクル中にbRを再構成したプロテオリポソームについて、PVAハイドロゲルによる固体試料を作製した。DPPCにbRを再構成したベシクルでは、脂質膜のゲル液晶相転移が38°Cで起こることが分かっているため<sup>12</sup>、この前後の温度において可視CDスペクトルを測定した(図8)。

DPPC-bR再構成膜がゲル相を取る25°Cにおいては、ゲル試料の可視CDスペクトルの形状はエキシトン型であった。これは、紫膜が平面膜であり、ゲル化に伴い積層してエキシトンカップリングの効果が検出に掛らなくなったのに対して、再構成膜では球状の

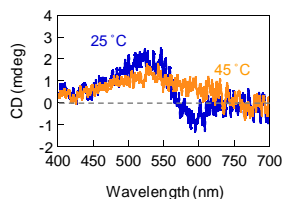


図8. bR再構成膜(DPPC-bR)/PVAゲル試料の可視CDスペクトル。25°C:ゲル相、45°C:液晶相

膜にbRが再構成されているため、その形状の特徴からカップリングの効果がスペクトルに現れたものと考えられる。一方、再構成膜が液晶相を取る45°C<sup>12</sup>においては、可視CDスペクトルの形状はポジティブ型となった。このスペクトル変化は、懸濁液系の場合と同様、液晶相で2次元結晶が融解したためである。このゲル試料に対して時間分解吸収測定を行ったところ、ゲル相をとる25°Cと液晶相を取る45°Cの温度条件において、それぞれ懸濁液系でのレチナル吸収変化と同一の変化であった。これらの結果から、脂質膜のゲル液晶相転移が固体試料中においても起こり、bRの2次元結晶が温度によって制御可能であることが明らかとなった。

## (3) 青色光による色素再生率の向上

紫膜bRに対する先行研究では、青色光によるレチナル色素の再生率は60~70%程度にとどまっていた<sup>13</sup>。メモリとして使用する際、書込み・消去のサイクルを無限に可能とするために、レチナル再生率を100%まで向上させる必要がある。そこで、まずは懸濁液系において、青色光による色素再生効率の向上を試みた。DMPCならびにDPPCからなるリポソームにbRを再構成し試料とした。それらについて高温での黄色光照射によりレチナルを部分的に退色させ、青色光照射により色素再生を試みたが、再生時の温度を変化させて再生率の変化を調べた。

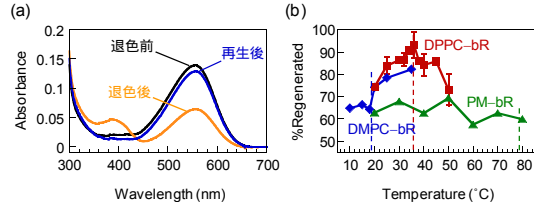


図9. (a) DPPC-bR再構成試料の退色・再生前後の吸収スペクトル。(b) DMPC-bR再構成試料、DPPC-bR再構成試料、紫膜懸濁液における、退色からの青色光による再生率。破線はそれぞれの環境におけるbR結晶の融解温度。

図9(a)にDPPC-bR懸濁液試料の退色前後ならびに36°Cにおいて青色光を15分間照射した後の吸収スペクトルを示す。黄色光により約50%まで退色したレチナルが、青色光によりほぼ完全に退色前のスペクトルに復元していることがわかる。図9(b)に、DMPC-bR、DPPC-bR、紫膜bRの3種類の懸濁液試料について、横軸に再生時の温度、縦軸に再生率をプロットした図を示した。各試料におけるbRの結晶融解の中点<sup>12</sup>を破線で示している。紫膜bRについては結晶の状態に依存せず、先行研究<sup>13</sup>と同じく70%程度の再生にとどまっていた。一方、DMPC-bRならびにDPPC-bRでは、紫膜bRの場合よりも著しい再生率の向上が見られた。特に、DMPC-bRの場合については、ゲル液晶相転移に伴い再生率が向上する結果となった。DPPC-bRでは、脂質膜相転移と再生率の関係ははっきりよくわからなかったが、転移中点付近において最大の再生率を示し、高温側

で再生率が低下する結果であった。DMPC-bR と比較すると、脂質膜が液晶相を取る温度が 20 °C 程度高くなっており、再生過程の分子種の熱安定性の問題が存在する可能性がある。再生率向上のメカニズムは現時点では不明であるが、メモリへの応用を考えると書込みと同じ枠組みで消去することが可能となるため、このメモリの優位性の極めて高い点であるということが出来る。今後、PVA ハイドロゲルなどの固体試料中において退色・再生実験を行い、メモリの実現可能性を高める必要がある。

【参考文献】<sup>1</sup>R. Henderson, *J. Mol. Biol.* **93**, 123 (1975). <sup>2</sup>K. Mitsuoka et al. *J. Mol. Biol.* **286**, 861 (1999). <sup>3</sup>M. B. Jackson & J. M. Sturtevant, *Biochemistry* **17**, 911 (1978). <sup>4</sup>J. K. Lanyi, *Annu. Rev. Physiol.* **55**, 665 (2004). <sup>5</sup>R. R. Birge, *Annu. Rev. Phys. Chem.* **41**, 683 (1990). <sup>6</sup>J. Y. Huang et al. *J. Phys. Chem.* **93**, 3314 (1989). <sup>7</sup>D. Oesterhelt et al. *Q. Rev. Biophys.* **24**, 425 (1991). <sup>8</sup>T. Miyasaka et al. *Science* **255**, 324 (1992). <sup>9</sup>Y. Yokoyama et al. *J. Biochem.* **131**, 785 (2002). <sup>10</sup>Y. Yokoyama et al. *Proteins* **54**, 442 (2004). <sup>11</sup>R. J. Cherry et al. *J. Mol. Biol.* **121**, 283 (1978). <sup>12</sup>Y. Yokoyama et al. *J. Phys. Chem. B* **114**, 15706 (2010). <sup>13</sup>Z. Dancsházy & Z. Tokaji, *FEBS Lett.* **476**, 171 (2000). <sup>14</sup>R. Korenstein & B. Hess, *Nature* **270**, 184 (1977). <sup>15</sup>F. Yokoyama et al. *Colloid Polym. Sci.* **264**, 595 (1986). <sup>16</sup>K. Bryl et al. *FEBS Lett.* **285**, 66 (1991). <sup>17</sup>G. Váró, *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* **32**, 301 (1981). <sup>18</sup>D. Oesterhelt & W. Stoerkenius, *Methods Enzymol.* **31**, 667 (1974). <sup>19</sup>M. P. Heyn et al. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**, 897 (1975). <sup>20</sup>D. D. Muccio & J. Y. Cassim, *Biophys. J.* **26**, 427 (1979). <sup>21</sup>K. Hiraki et al. *Biochim. Biophys. Acta* **647**, 18 (1981). <sup>22</sup>G. Váró & J. K. Lanyi, *Biochemistry* **30**, 5008 (1991). <sup>23</sup>J. N. Israelachvili, *Intermolecular and Surface Forces, 2<sup>nd</sup> Edition* (Academic Press, 1992) p. 289. <sup>24</sup>D. D. Muccio & J. Y. Cassim, *J. Mol. Biol.* **135**, 595 (1979). <sup>25</sup>J. J. Plantner & E. L. Kean, *Biochim. Biophys. Acta* **670**, 32 (1981).

## 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 3 件)

- (1) Y. Yokoyama, H. Tanaka, S. Yano, H. Takahashi, T. Kikukawa, M. Sonoyama, K. Takenaka, Spontaneous stacking of purple membranes during immobilization with physical cross-linked poly(vinyl alcohol) hydrogel with retaining native-like functionality of bacteriorhodopsin, *J. Appl. Phys.*, 査読有, in press.
- (2) T. Koyama, T. Matsuno, Y. Yokoyama, H. Kishida, Photoluminescence of poly(3,4-ethylenedioxythiophene)/poly(styrenesulfonate) in the visible region, *J. Mater. Chem. C*, 査読有, **3**, 8307-8310, 2015.  
DOI: 10.1039/C5TC01531F
- (3) Y. Yokoyama, K. Yamada, Y. Higashi, S. Ozaki, H. Wang, N. Koito, N. Watanabe, M. Sonoyama, S. Mitaku, Dependence of purple membrane curvature on pH and ionic strength analyzed using atomic force microscopy combined with solvent exchange, *J. Phys. Chem. B*, 査読有, **118**, 9322-9328, 2014.  
DOI: 10.1021/jp5036234

〔学会発表〕(計 6 件)

- (1) 田中輝, 横山泰範, 高橋浩, 菊川峰志, 園山正史, 竹中康司, Effects of immobilization of bacteriorhodopsin with poly(vinyl alcohol) hydrogels on its structural and functional properties, 日本生物物理学会第 54 回年会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2016.11.25~27.
- (2) 矢野俊介, 茂木健太郎, 田中輝, 横山泰範, 園山正史, 竹中康司, Effects of lipid phase transition on chromophore regeneration of bleached bacteriorhodopsin in bilayer vesicles by blue light irradiation, 日本生物物理学会第 54 回年会, つくば国際会議場(茨城県つくば市), 2016.11.25~27.
- (3) 田中輝, 横山泰範, 高橋浩, 園山正史, 竹中康司, ハイドロゲル中に固定化された紫膜バクテリオロドプシンの機能・構造特性, 第 43 回生体分子科学討論会, 名古屋大学(愛知県名古屋市), 2016.6.24~25.
- (4) 田中輝, 横山泰範, 園山正史, 竹中康司, Structural and functional characteristics of bacteriorhodopsin immobilized with poly(vinyl alcohol) gel studied by spectroscopic methods, 日本生物物理学会第 53 回年会, 金沢大学(石川県金沢市), 2015.9.13~15.
- (5) 高橋知嘉, 野村典正, 横山泰範, 滝口陽子, 滝口金吾, Multiple membrane interactions and vesicle deformations elicited by melittin, 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014.9.25~27.
- (6) 横山泰範, 山田浩輔, 東陽介, 尾崎聡, 王浩然, 小糸直樹, 園山正史, 美宅成樹, Dependence of purple membrane bump curvature on pH and ionic strength analyzed by atomic force microscopy combined with solvent exchange, 日本生物物理学会第 52 回年会, 札幌コンベンションセンター(北海道札幌市), 2014.9.25~27.

## 6. 研究組織

- (1) 研究代表者  
横山 泰範 (YOKOYAMA, Yasunori)  
名古屋大学・大学院工学研究科・助教  
研究者番号: 80402486
- (2) 連携研究者  
岸田 英夫 (KISHIDA, Hideo)  
名古屋大学・大学院工学研究科・教授  
研究者番号: 40311633
- (3) 研究協力者  
園山 正史 (SONOYAMA, Masashi)  
高橋 浩 (TAKAHASHI, Hiroshi)  
菊川 峰志 (KIKUKAWA, Takashi)  
竹中 康司 (TAKENAKA, Koshi)  
田中 輝 (TANAKA, Hikaru)  
茂木 健太郎 (MOTEGI, Kentarou)  
矢野 俊介 (YANO, Shunsuke)