

タンパク質を利用する受光素子

「場と反応」 小山 行一

1 研究の背景と目的

われわれ人間を含む脊椎動物の網膜にはロドプシンという視物質が光の受容器として外界から来る光の明暗、もしくは色の情報の識別に必要な機能をつかさどっているが、それ以外に動画抽出、輪郭強調といった視覚認識の最も基本的な情報処理を実施し、これを電気信号として視神経を經由して脳に伝達する機能が備わっている。したがって網膜には一種の画像圧縮の機能を有している。このような視覚機能を持ったデバイスが開発されれば、雑多な画像情報の中から必要な要素を取り出して特徴化することが可能となるし、真の意味での人工網膜の開発にもつながる。

このような観点で、われわれが目したの視物質ロドプシンと同じレチナールを発色団にもつタンパク質、バクテリオロドプシン(BR)である。このBRの薄膜を利用して作製した図1に示す構造の電気化学セルに可視光を照射すると、図2に示すような網膜で見られる特徴的な光信号と類似の光電応答が得られ(Koyama et al. *Science* 255 342 1992)、図2に示すセルを256画素に拡張したエリアセンサーが視覚情報処理機能を有することも確認した(Miyasaka and Koyama *Appl. Opt.*, 32 6371 1993)。

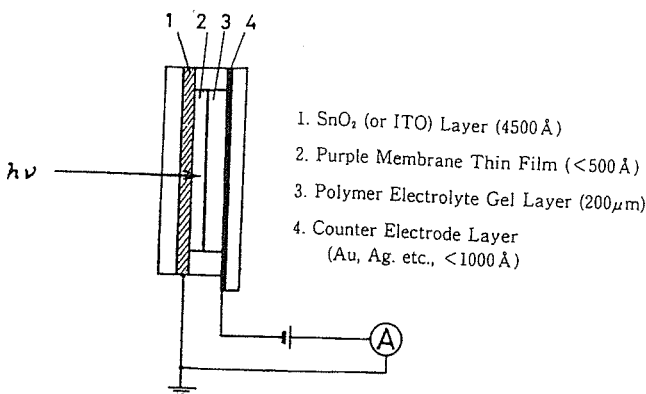


図1: BR薄膜を用いたセルの構造

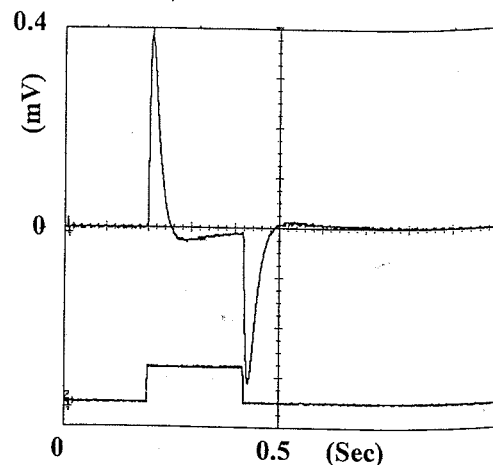


図2: BRセルからの光電応答パターン

本研究では、なぜBRがこのような特異的な光応答を示すのか、さらに光電応答がBRの光反応サイクルのどの段階に対応しているのかという機構上の問題点を分子レベルで解明し、そのオリジンが何かを明らかにすることを目的とする。

2 バクテリオロドプシン(BR)について

BRは高度好塩菌の細胞膜に3量体を一つの単位として存在し、それが六方格子状に規則正しく配列した2次元結晶膜を作り、この膜を紫膜と呼んでいる。紫膜は、平均直径

0.5~1 μm 程度の膜断片として、破碎された菌からショ糖密度勾配遠心などの容易な手段で、ほぼ純品の形で手に入れることができる。

BRのアミノ酸配列はすでに決定され、アミノ酸残基248個の一本のペプチド鎖からなる分子量26,000のタンパク質で、その296番目のリジン(Lys)残基にレチナールが発色団として、1分子結合した構造をとっている。

BRは通常568 nmに極大吸収を持っている。この状態は発色団のレチナールが全トランス型の立体配座をとっていて、BRが光を吸収すると図3に示すような光反応が開始される。光が関与するのは最初のK中間体に至るプロセスだけで、その際にレチナールの化学構造が全トランスレチナールから13-シスレチナールへと異性化する。その後いくつかの中間状態を経て最終的に13-シスレチナールから全トランスレチナールに再異性化し、全工程10 msec程度の速度で最初の状態に戻る。これをBRの光反応サイクルと呼ぶ。

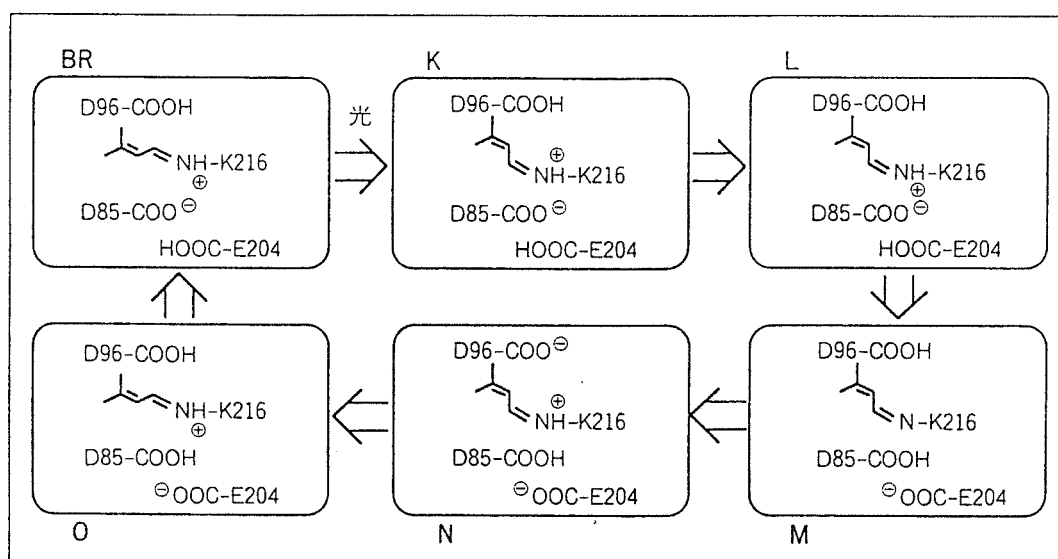


図3: BRの光反応サイクルとプロトン結合基の解離状態変化

BRに光が照射されると細胞内のプロトンが細胞外に汲み出され、細胞の内外でプロトンの濃度勾配を生じる。好塩菌はこの濃度勾配をATP合成に利用してエネルギーを獲得している。

3 研究結果

3.1 レチナールの化学構造と光電応答

BRは図3に示されるように、光照射で反応がスタートし、電子励起状態において全トランス型から13-シス型へ構造変化を起こす。その後、種々の中間体を経て、最終的にまた全トランス型へ戻る。このときBRを暗中に放置すると全トランス型が徐々に13-シス型に異性化し最終的に約1:1の存在比で平衡状態に達する。光電応答がどちらの異性体によって起こるのかを調べる目的で電気化学セルを暗中に放置して、経時による応答強度を

比較した(図4)。この図ではBRを含む電気化学セルの明順応状態(L)、明順応後、暗中で各15、30、45、60分後の、そして完全暗順応状態(暗中で6時間放置)での応答強度を示す。この図から、レチナールの構造が全トランス型から13-cis型へ異性化するにつれて応答強度が減少する。つまりBRからの光電応答は全トランス型のみが寄与し、13-cis型は全く応答に寄与しないことが明らかになり、光反応サイクルの中での出来事に起因することが明確になった。

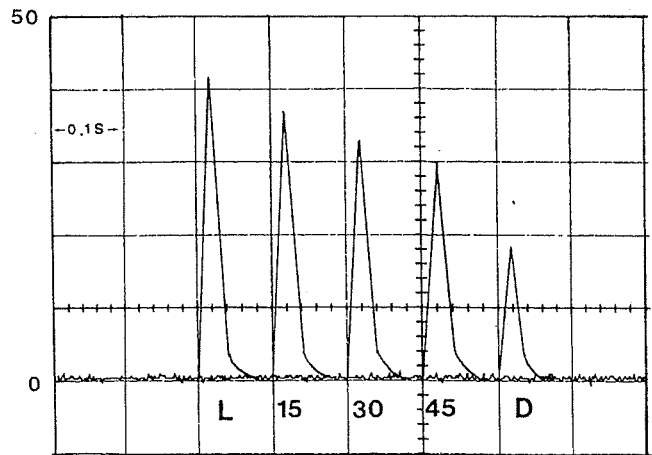


図4: 暗中所けるBRの応答強度変化

3.2 応答速度

図3から分かるように、BRが光励起されてから各中間状態に達する時間経過はこれまでの研究で明らかになっている。もし応答の立ち上がり速度を算定できれば、応答のオ

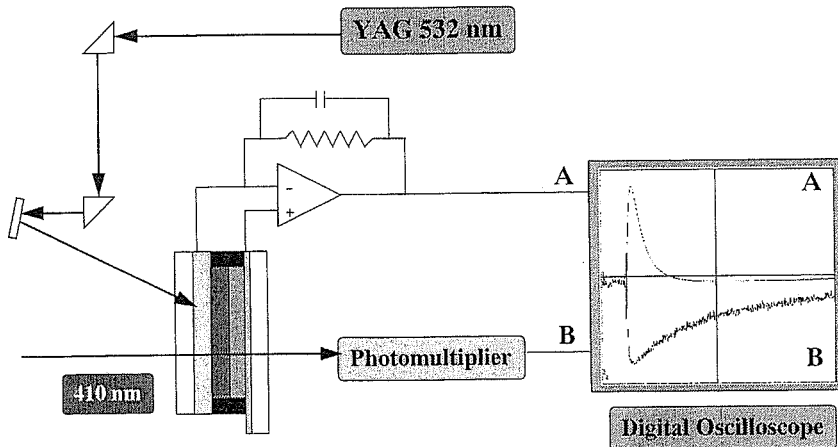


図5: 光電応答と吸収変化の同時測定システム

リジンが光反応サイクルの中で少なくともどの中間体に基づいているのかを特定することができる。そこでパルスレーザーを用いてBRを励起し、高速の応答をモニターすることを試みた。レーザーはBRの吸収極大付近に励起波長を有するYAGの2倍波(532 nm)を用いた。さらにより詳細な情報を得るために応答速度とBR自体の吸収変化を同時に測定できるように装置を工夫した。図5に示すように、レーザーからの励起光がBR膜を固定した電気化学セルに照射され、発生した電流は電流電圧変換器で電圧に変換された後、オシロスコープでモニターされる。一方、吸収変化の測定はモニター光として410 nmの光をバンドパスフィルターを通して電気化学セルを透過させ、フォトマル高圧回路に導く。レーザー光で励起されたBRは基底状態の極大吸収(568 nm)を減少させ、410 nm吸収極大を持つM中間体が生成する。応答とM中間体の生成を同時に測定した結果を図6(上が光電応答、下が吸収変化)に示す。応答は約100 μs の速度で立ち上がる。同時に

410 nm の吸収が増大する (透過率の変化をモニターしているため吸収の増加は透過光量を減少させる)。応答は 410 nm の生成前にすでに立ち上がっており、明らかにこの速度は M 中間体より前に起きている。さらに応答速度は光反応サイクルの L から M への速度に相当し、このプロセスはプロトンが細胞外側に輸送される際の時定数に一致する。したがって応答のオリジンはタンパク質内部から放出されたプロトンらしいことは上記実験事実から推定される。

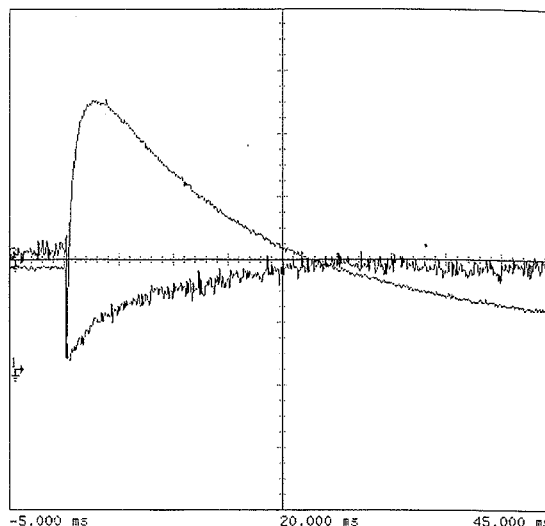


図 6: BR の応答と吸収変化の同時測定

3.3 変異タンパク質による応答比較

プロトン輸送の機構は変異蛋白質の利用によって分子レベルでの解明が進んでいる。ごく最近の研究では、レチナールの異性化に伴い、①シッフ塩基のプロトンが Asp-85 (85 番目のアミノ酸残基) に移動する。次いで②細胞外側に位置する Glu-204 からプロトンが放出される。この現象は光反応サイクルの L から M 状態への移行時に 70~100 μ s 程度の時間軸で進行する。③M \rightarrow N 遷移では細胞質側で Asp-96 からシッフ塩基へのプロトン移動が起こり (~ms)、④最後に細胞質側から Asp-96 へプロトンが供給される (N \rightarrow O)。このように BR は光を吸収してから 1 個のプロトンを放出する間に 13 桁に及ぶ時間軸上で様々なイベントが展開される (図 7)。

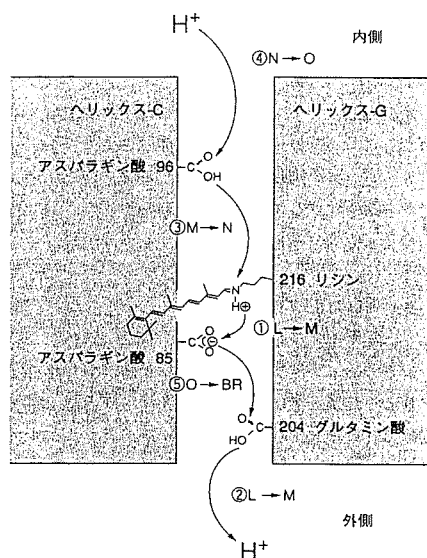


図 7: BR の推定プロトン輸送経路

われわれは約 20 種類の変異タンパク質からの応答を調べた。応答プロフィールは、やはりプロトンの輸送に直接関わっているアミノ酸残基の変更によって大きな影響を受ける。以下に代表的な変異タンパク質からの応答プロフィールを示す。

Asp-85 \rightarrow Asn 変異体 (D85N, BR の N 末端側から数えて 85 番目の酸性のアミノ酸、アスパラギン酸を中性のアスパラギンに変更、以下同じ) では応答強度はほとんど消失 (BR の 1/30-1/50) する (図 8)。これは本来 Asp-85 のカルボキシル基が解離していてシッフ塩基のプロトンを受け取ることができるのであるが (図 7 の ①)、この部分が中性のアミノ酸に置換されているためにこの経路が遮断されプロトン輸送が極端に遅れ、事実上シグナルは検出されない。

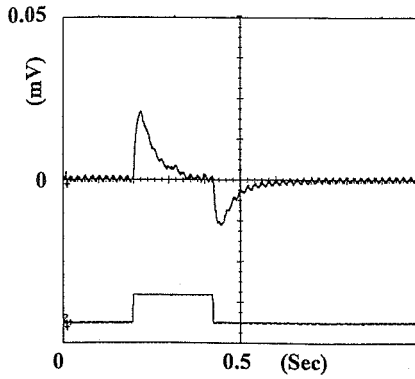


図 8: Asp-85→Asn

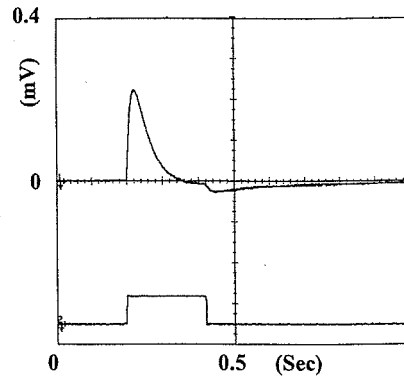


図 9: Asp-96→Asn

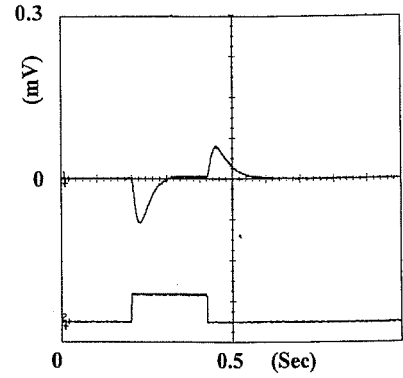


図 10: Glu-204→Gln

Asp-96→Asn 変異体は光ON時では野生株と同様の応答を与えるが光OFF時の応答が極端に抑制される(図9)。この理由は、光反応サイクルの①及び②のプロセス(図7)は正常に機能し、プロトンが放出されるが、サイクルの後半(M→N段階)で、Asp-96からシッフ塩基へのプロトンの供給が断たれる(③)。この結果、光反応はM段階で止まり、細胞質側からのプロトンの供給が大幅に遅れ、光OFF時の応答が消失する。

最近、長年の懸案とされていたプロトンの放出に直接関係するアミノ酸残基がGlu-204であると特定された(Brown et al. *J. Biol. Chem.* 270 27122 1995)。図10にGlu-204→Gln変異体からの応答プロフィールを示す。応答は野生株のそれ(2)と完全に逆転している。この解釈は次のように理解される。図7で、①のプロセスは進行するが②のプロセスでGlu-204にプロトンが存在しないためプロトンはこの段階で放出されない。ところが①のルートは成立しているため細胞質側からタンパク質内部へのプロトンの取り込みは起こる(④、N→O段階)。この取り込みが光ON時の負応答に対応する。その後、サイクルの最終段階(O→BR)でプロトンの放出が遅れて起こる。

3.4 光電応答の機構

応答速度がタンパク質からのプロトン放出のタイミングと一致していることと種々の変異タンパク質からの応答パターンから、BRからの光電応答機構は図11のように示すこと

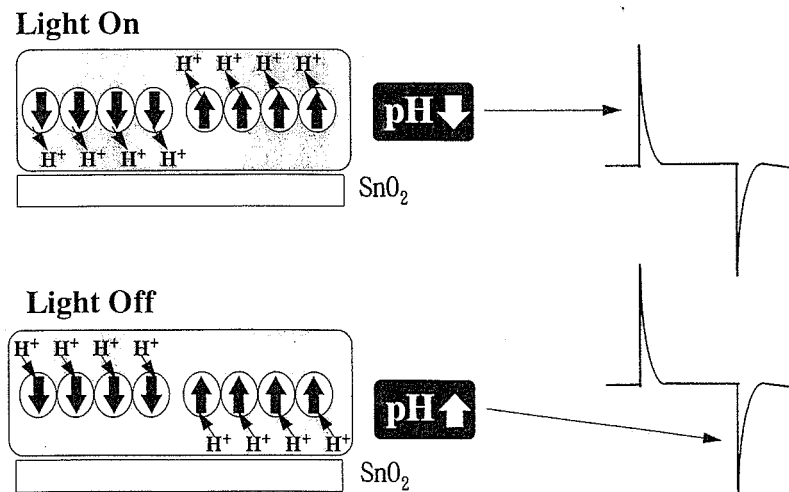


図 11: 光電応答のメカニズム

ができる。すなわち正方向の応答はBRから放出されたプロトンの影響で電極近傍のpHが下がることに基づき、逆方向の応答はプロトンがBR内部に取り込まれるためにpHが上昇するためである。従って、本研究での電気化学セルは電極近傍での微小なpH変化をとらえることにより電極内部に一種の容量電流を発生させると結論づけられる。

4 今後の展開

本研究によってBR光電変換素子の応答機構がほぼ解明された。この素子からの光応答がプロトンの放出と取り込みを正確に反映していることから、タンパク質自体の機構解明にも大いに貢献できることが判明した。従って、本研究を通して構築された技術が他のイオンを輸送するタンパク質の機構解明にも利用されることが期待される。

工学的な観点としては、光刺激により、より効率的にプロトンを放出できるからくりを人為的に構築できれば、より高感度の微分応答性センサーの開発が可能となり、最終目標である人工網膜への発展が期待される。

5 論文リスト

1. 小山 行一、“人工光受容体システム-人工網膜をめざして-”、「現代化学」7月号 p24-31 (1995)
2. Koyama, K., Yamaguchi, N. and Miyasaka, T., “Molecular organization of bacteriorhodopsin films in optoelectronic devices”, *Adv. Mater.* 7 590-594 (1995)
3. 宮坂 力、小山 行一、“感光性タンパク質の電極修飾とデバイスへの応用” 「表面技術」46 317-323 (1995)
4. 小山 行一、“機能性タンパク質の二次元配向制御”、「日本油化学会誌」45 715-722 (1996)
5. Koyama, K., “Direct measurements for isomer ratio of retinal in bacteriorhodopsin by an electrochemical method” *Photochem. Photobiol. in press* (1997)
6. Koyama, K., Sumi, M., Kamo, N. and Lanyi, J. K., “Photoelectric response from halorhodopsin” submitted.
7. Koyama, K., Tokunaga, F., Needleman, R. and Lanyi, J. K., “Photoelectrochemical evidence for proton release and uptake in bacteriorhodopsin and its mutants” submitted.
8. Koyama, K., Tokunaga, F., Needleman, R. and Lanyi, J. K., “Photovoltaic effects of bacteriorhodopsin and its mutants; The relationship between the photoresponse and the M intermediate” to be submitted.