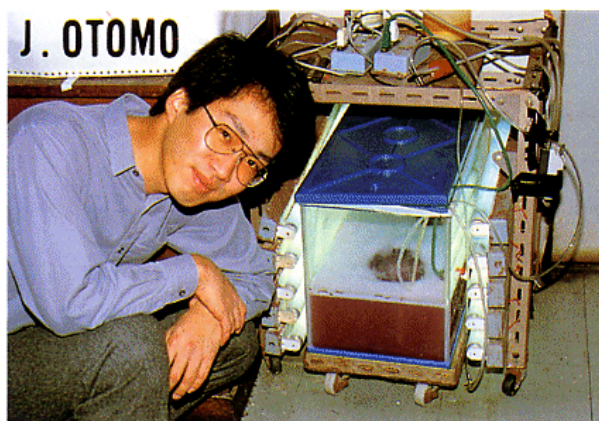


生体光素子：バクテリオロドプシン

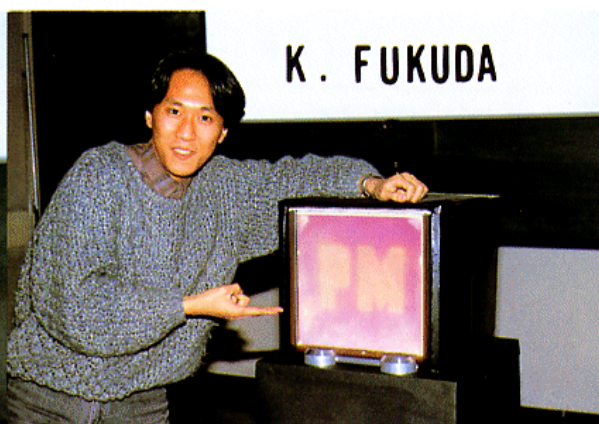
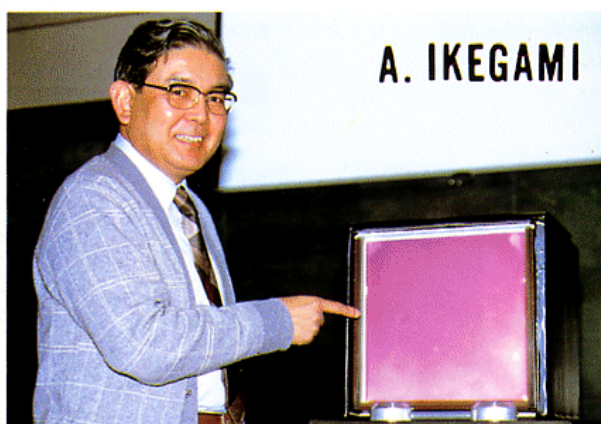
理化学研究所 生物物理研究室

木 下 一 彦

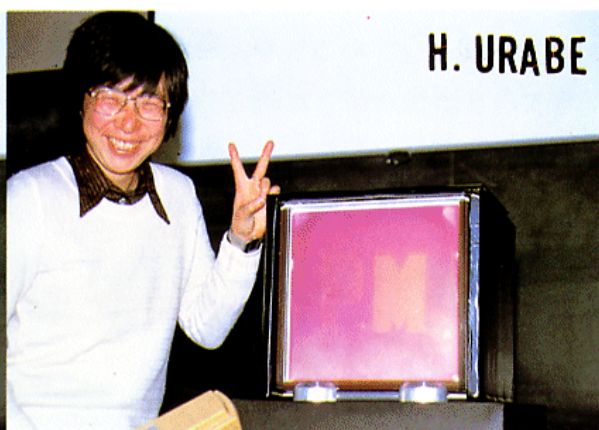
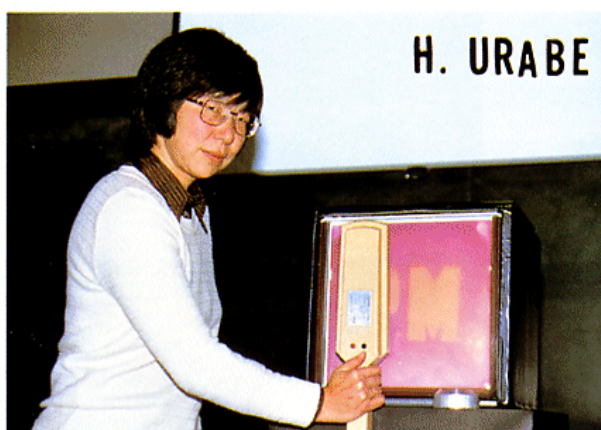
生体光素子：バクテリオロドプシン
—木下一彦氏の講演から—



▲培養中の好塩菌。この写真も含め、写真中の登場人物は、一緒に好塩菌を研究している仲間のうちで快く肖像権をリリースしてくれた人たち (p.97)



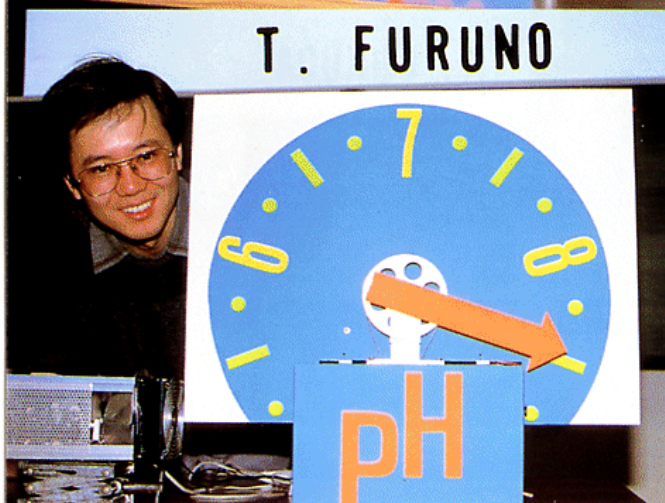
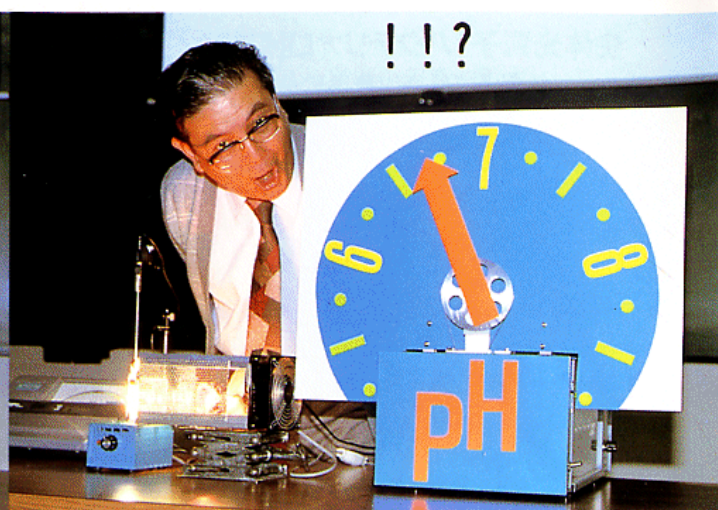
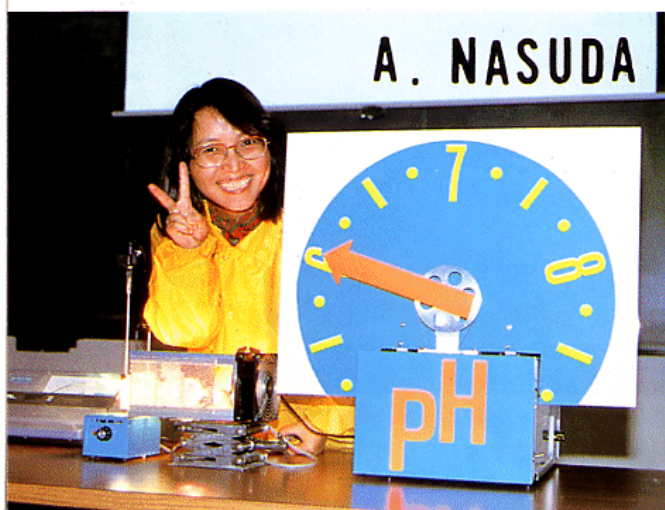
▲紫膜の光メモリー作用 (p.98)



▲紫膜メモリーの紫外線ランプによる消去 (p.99)

▼光-プロトンポンプ実験の準備。右の写真で手の下にあるガラス棒がpH電極 (p.100)





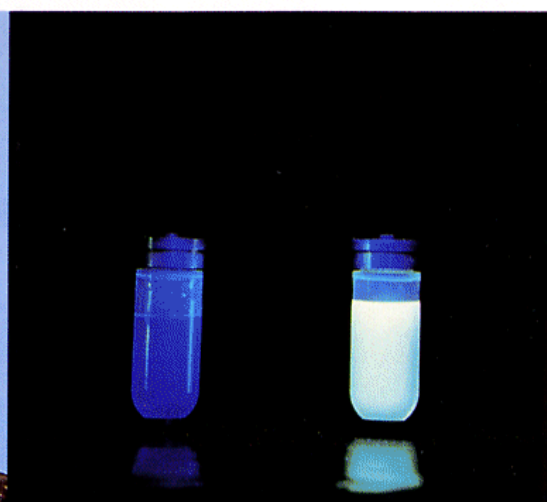
特製pHメーターによる光-プロトンポンプの
デモンストレーション (p.101)



▲蛍光現象 (p.105)



▲天然の紫膜(右手)と蛍光性に変えた紫膜(左手) (p.107)



生体光素子：バクテリオロドプシン

理化学研究所 生物物理研究室

木 下 一 彦

1. 好塩菌

高度好塩菌（学名 *Halobacterium halobium*）というバクテリアがあります。読んで字のごとく塩が大好きで、海水の10倍くらい濃いような飽和食塩水の中に棲んでいます。

そんな塩の濃いところにほかのバクテリアは棲めませんから、好塩菌を飼うのは非常に簡単で、実験室の金魚鉢の中で飼うことができます。図-1は、私たちの実験室で実際に飼っているようすで、水槽の中の紫色の部分に好塩菌が百兆匹くらい入っています。紫色なのは何も紫色の栄養素を与えているわけではなくて、好塩菌自身が紫色なのです。なお、水槽のまわりに蛍光灯を並べてある理由は少し後でおわかりになると思います。

図-2に示しますように、好塩菌は大きさ千分の1mmくらいの細長い単細胞生物です。細胞のまわりを包む細胞膜に、斑点状に紫色になった部分があり、この部分を紫膜（purple membrane）と呼びます。これがあるおかげで好塩菌の培養液が紫色になるのです。

この紫膜には、いろいろおもしろい性質があります。それをこれからお目にかけましょう。



図-1 （カラーページ参照）

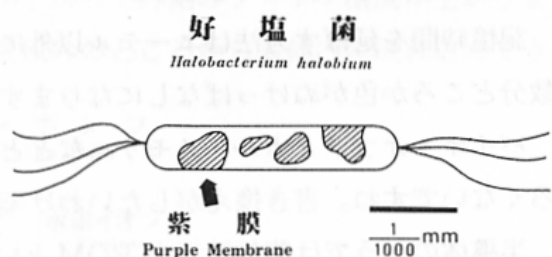


図-2 好塩菌の模式図

2. 紫膜の光メモリー作用

図-3Aで、私の所属する研究室の主任が指さしているのは、紫膜を寒天で固めたものです。ここに、プロジェクターを使って強い光をあててやります。Purple Membraneですから、PMという文字の形に照らしましょう。そして光を消すと、PMの部分が白く抜けたまま残ります(図-3B)。光によって紫色が消えてしまったのです。



図-3A (カラーページ参照)

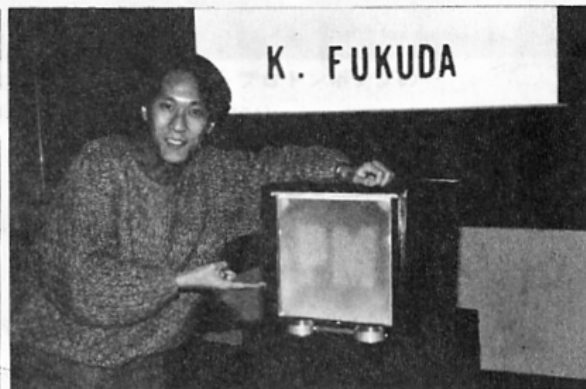


図-3B (カラーページ参照)

強い光をあてることによりパターンを書き込める。そしてそのパターンが目に見える、ということはすなわち弱い光でパターンを読み出せる。さらに材料はというと生物からとってきたそのまま。となるとこれは、バイオ・オプティカル・メモリー (bio-optical-memory) とでもいえないでしょうか？

このパターンは数分間でだんだん消えて、もとの紫色に戻ります。実は、この紫膜にはほんの僅かエーテル麻酔をかけてあるから数分間もつので、何もしないと百分の1秒くらいでもとに戻ってしまいます。紫膜の光メモリー作用の本来の寿命は百分の1秒というわけです。もっとも百分の1秒というのはコンピュータにとっては非常に長い時間で、その間に何百万回も計算ができます。

記憶時間を延ばす方法はエーテル以外にもいろいろあって、たとえば低温にしてやると数分どころか色がぬけっぱなしになります。この場合、温めてやると紫色に戻ります。

バイオ・オプティカル・メモリーなどといって、書き込んで読み出せるだけではおもしろくないですね。書き換えがしたいわけです。

半導体のほうでは紫外線消去 ROM というのがあるそうです。そこで我が紫膜メモリーにも紫外線をあててみましょう(図-4A)。安物の紫外線ランプなので少し時間がかかりますが、うまく消すことができました(図-4B)。これで、自由に書換えができます。強力なレーザー光でも使えば瞬間的に書き込み消去ができるでしょう。



図- 4 A (カラーページ参照)



図- 4 B (カラーページ参照)

瞬間的といっても、紫色を白く抜くのに最低1万分の1秒くらいはかかってしまいます。実は、速くて目にはとても見えませんが、光があたると紫膜の色は青、赤紫、(少し黄色みを帯びた) 白と変化していて、ここまでに1万分の1秒くらいかかるのです。紫膜を液体窒素温度まで冷やしてやると青色になったところで反応がとまるので、オレンジ色の光(紫膜がよく吸収する)をあてて紫から青色にし、次に赤色の光(青い状態の膜がよく吸収する)をあてて紫色に戻す、という芸当ができます。この紫-青オプティカル・メモリーなら、1兆分の1秒単位でスイッチングできるはずです。

3. 光-プロトンポンプ

紫膜の本来の役目はメモリーではなく、好塩菌は紫膜をもっと本質的なことに使っています。それは光-プロトンポンプ作用と呼ばれるものです。

図- 5 で丸を好塩菌とすると、まわりの細胞膜のところに紫膜があります。好塩菌はそもそも塩田に棲んでいるのですが、太陽の光を浴びると紫膜の部分がその光を吸収し、光のエネルギーを使って細胞の内側から外側へ水素イオン、すなわちプロトンを汲み出します。どんどん汲み出すと、内側のプロトン濃度が下がって外側のプロトン濃度が上がります。いずれ外側の濃いプロトンは、細胞膜の紫膜以外のところから菌体内に流れ込んでき

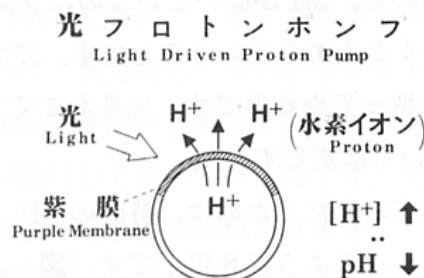


図- 5 紫膜の光-プロトンポンプ作用

ます。この流れ込むときの力を利用して、好塩菌は ATP（生体内のエネルギー通貨ともいうべき化学物質）を作ったり、栄養分を取り込んだり、いらぬものを放り出したり、いろいろな仕事をします。

つまり好塩菌は、太陽光を第一のエネルギー源とし、それをまずプロトンの流れさらに濃度差に換えて、その濃度差を第 2 段階のエネルギー源として生きているのです。光からプロトン濃度差へのエネルギー変換作用を担うのが紫膜というわけです。

プロトン（水素イオン）はプラスの電気を持っており、それが細胞の内側から外に向けてどんどん汲み出されるわけですから、結果として細胞内側はマイナスになり外側はプラスになります。ですから、ある意味では太陽電池といってもよいのです。太陽電池としてどのくらいの効率があるかということ、数%から10%くらいです。アモルファスのシリコン太陽電池と似たようなものでしょうか。

それではこれから光—プロトンポンプ作用をお目にかけましょう。

図-6Aで、うっとりしているK氏が手に持っている小ビンの中には、彼のご自慢のお



図-6A （カラーページ参照）



図-6B （カラーページ参照）

手製紫スープが入っています。好塩菌の中身を出してしまっただ袋状の細胞膜だけにしたものが、いっぱい浮かんでいます。ポンプ作用は膜だけあればよいので、余計な中身は捨ててしまったのです。図-5の丸そのものと思ってください。

この小ビンに pH メーターの電極を突っ込みます（図-6B）。pH というのはご承知のようにプロトン濃度を表すもので、pH が高いというのはプロトン濃度が低いということ、pH が低ければプロトンがたくさんあるということです。ですから、pH メーターを使って紫膜の運びだすプロトンを測ってやるのです。光をあててプロトンがどんどん袋の外に出てくれば、pH が下がっていくはずで。

今回は大勢のみなさまに見ていただくために、特製の pH メーターを用意しました。まずこの試料の pH ですが、ごらんのように8以上です（図-7A）。pH 7が中性ですから、かなりアルカリ性ということになります。さてこの試料に強力なプロジェクターからの光



図-7A (カラーページ参照)

図-7B (カラーページ参照)

図-7C (カラーページ参照)

をあてますと、pH がだんだん下がっていきます。pH が1下がったとすると、外側の液体のプロトン濃度が10倍になったということです。2下がれば100倍です。普通この手の実験でpHが変わったといって大喜びするのはせいぜい0.1とかそんなものですが、ごらんのようにもう1以上下がりました。プロにとってもビックリなのです(図-7B)。2, 3分もすると外側のプロトンは数百倍にも濃縮され、液は酸性に変わります(図-7C)。機械がこわれるのでこのへんで止めますが、最終的にはpH変化は3以上、プロトン濃度にして1000倍以上になります。

これを電気の言葉でいいますと、pHが1変わることは膜の内と外との間に少なくとも60ミリボルトの電位差が生じるということに相当します。いまpHが3以上変わりますから、0.2ボルトから0.3ボルトの起電力が発生しているのです。立派な太陽電池です。

4. 紫膜の研究

光-プロトンポンプ作用が紫膜の大切な働きで、先ほどの光メモリー効果はポンプ作用に付随して起こる現象です。いずれにしても、紫膜とはおもしろいものだということがわかりいただけたでしょうか。

私たちは、このように生き物がすばらしい働きをするのを見て、これを金儲けに使おうと考えるわけではなく、純粹に感動して、いったいどういう仕掛けなのかどうしても知りたくなるのです。

和田先生がのちほど「総力戦としてのバイオテクノロジー」という講演をされますが、紫膜の研究は、私にいわせれば「総力戦としてのテクノ・バイオリジカル・サイエンス」です。ありとあらゆる実験技術を全部かき集めて、皆でよってたかって紫膜の仕組みを攻めている。世界中の研究者が協同して攻めているのです。ですから、生物物理的技術、生化学的技術、遺伝学的技術などの展示場の感があります。

以下、だんだん学問的な話に移らせていただきます。

5. バクテリオロドプシン

ともかく、働きを理解しようと思ったら、まず紫膜の構造を知らなければなりません。紫膜は厚さが20万分の1mm、すなわち50オングストローム、という薄い膜です（原子の大きさにしても、一番小さいもので1オングストローム以上あります）。紫膜を1枚ペラッと払って電子顕微鏡で見たらどうなるかを示したのが図-8です。これは電子顕微鏡写

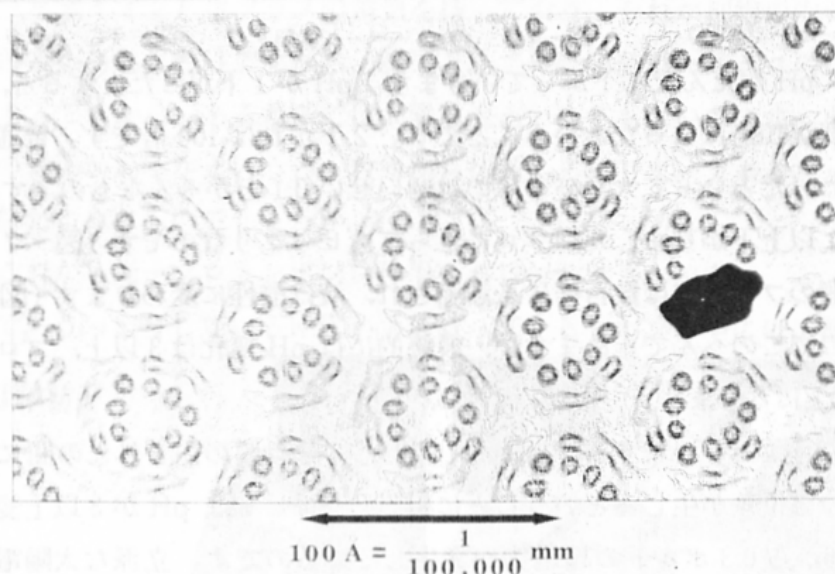


図-8 紫膜の平面図。Unwin & Henderson による電子顕微鏡像より改変

真そのものではなくて、紫膜の中にもものがどのくらい詰まっているかを等高線で表示したものです。山の頂に相当するところには、ものがいっぱいあることになります。紫膜の中にはものが規則的に並んでいることがわかりでしょう。

これは、タンパク質の分子が非常に規則的に並んでいるのです。図-8で黒く塗りつぶしたところがタンパク質の1分子です。バクテリオロドプシン（Bacteriorhodopsin）という名前のタンパク質です。3分子ずつが単位になって、ぎっしり詰っています。人工的に配列させたわけではなく、バクテリアの中でもともとこうなっています。紫膜は、バクテリオロドプシンの平面状結晶といってもよいのです。

バクテリオロドプシンの1分子を電子顕微鏡で見ますと、図-9のような立体構造になっています。もちろん、こんな小さなものが電子顕微鏡で直接見えるわけではなくて、次の若林先生のお話にも出ると思いますが、最高級のテクニックを駆使して、それこそ見えないものを見るのです。

バクテリオロドプシンの大きさは50オングストロームすなわち20万分の1mmに満たない。

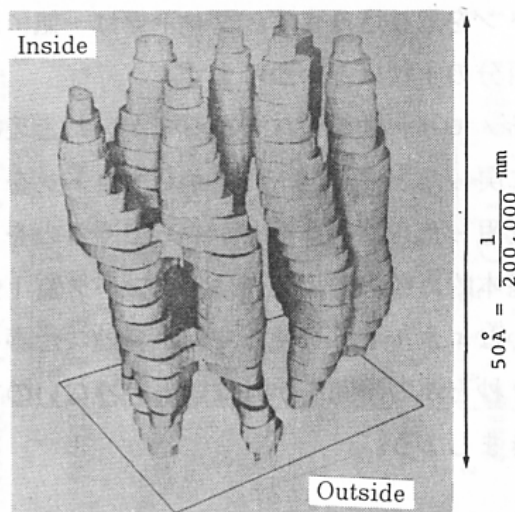


図-9 バクテリオロドプシンの立体構造。上方が細胞内側，下方が外側。四角形は紫膜の膜面の向きを表す。Henderson & Unwin (1975) による

この小さな分子が1個だけで、先ほどの光メモリー効果を示し、この分子1個だけで、光を吸ってプロトンをどんどん運んでくれるのです。モレキュラーデバイス（molecular device）という言葉が最近はやっていて、わりと特殊な意味に用いられているようですが、この言葉を文字どおりに解釈するなら、バクテリオロドプシンは、好塩菌の持つ、好塩菌のために働く、好塩菌が作った、モレキュラーデバイスといってよいでしょう。受光素子であり、記憶素子であり、そして何よりもエネルギー変換素子です。

東京工業大学の軽部先生のところでは、バクテリオロドプシンを光センサーとして利用することをお考えとうかがいました。センサーといえば、私たちの目の中にはバクテリオロドプシンとよく似たロドプシンというタンパク質があって、まさに光センサーとして働いています。また好塩菌の細胞膜にはセンサリーロドプシンというタンパク質もあって、文字どおりの光メモリー作用を担っています。札幌医科大学の津田先生ほかの方々が見つけられたのですが、自分がいままでどんな色の光に照らされていたのかを、記憶する役目をしています。ポンプ作用もバクテリオロドプシンの専売特許ではなく、大阪大学の向畑先生のグループが見つけられたハロロドプシンというタンパク質は、光エネルギーを使って塩素イオンを運びます。ポンプ、メモリー、センサーと、ロドプシン族は多芸です。

バクテリオロドプシンに光をあてると何がおきるか。バクテリオロドプシン自身が紫色をしているわけですが、まず色が変わって最後に白くなって、これとほぼ同時に細胞の外側にプロトンを放出します。しばらくすると色がまたもとの紫色に回復しますが、この時

に細胞の内側からプロトンを取り込みます。プロトンは一気に運ばれるわけではないのですね。このサイクルに百分の1秒ほどかかります。

先ほどからいっているメモリー効果がなぜあるのか。たとえば、光があたってパッと色が消えてパッとすぐ元に戻ったとすると、内側からプロトンをつかまえてくるヒマがない。プロトンを汲み出そうと思ったら、プロトンがやってくるのをしばらく待っていてやらないといけない。もっと基本的に私が考えるには、タンパク質1分子のような非常に小さな分子機械が、非常に僅かなエネルギーを使って何か有効な仕事をしようとする、やはり百分の1秒とか千分の1秒とかの時間をかけないといけないのではないか。この話は難しくなるのでここでおきましょう。

バクテリオロドプシンが、プロトンをポンプする時に、分子の中で何が起きているのか。ポンプの仕掛けがわかるためには、まずバクテリオロドプシンの中の構造を見ないといけません。

6. バクテリオロドプシンの構造

バクテリオロドプシンは図-9のように、7本のほぼ膜に垂直に走っている円柱状の部分からなります。

一方、バクテリオロドプシンというタンパク質の中でアミノ酸がどのようにつながっているかはわかっていて、図-10のA, B, C, . . . と順番にたどっていったら、全部で248個のアミノ酸がつながっています。このアミノ酸の配列をコンピュータに入れて解析しますと、だいたい図-10のA, B, C, . . . の四角で囲った部分がらせん構造をとりやすいはずだという予測がつかます。

そうしてみると、図-9の7本の円柱はアミノ酸の鎖がらせん状に巻いたものを見ていられるだろう。それぞれが図-10のA, B, C, . . . のどれかに相当するに違いない。ここまではいまわっているのです。ただ両方の図の7本のどれがどれに対応するのかがわかっていません。

もっと重要なことは、図-10の7番目のGらせんのところにレチナールという色素が付いていて、この色素のおかげでバクテリオロドプシンが紫色になるのです。レチナールはプロトンポンプの肝心かなめの部品で、光はまずレチナールに吸収されます。するとレチナールに変形が起きて、それがまわりのタンパク部分に次第に伝わっていったら、最後にポンプ作用が起きるわけです。レチナールが光でどんなふうに変形するかはだいたいわかっています。

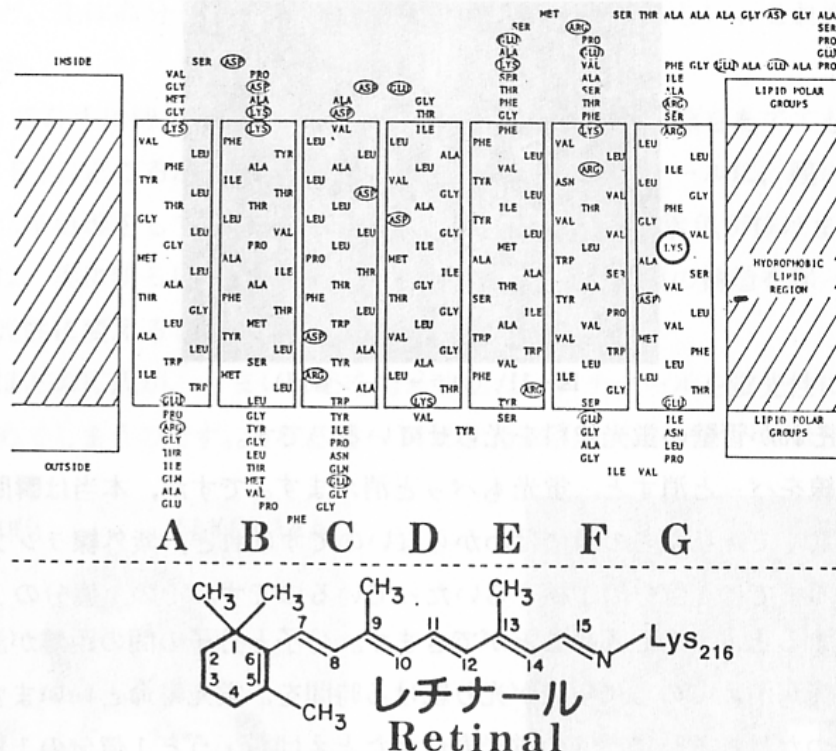


図-10 バクテリオロドプシンのアミノ酸配列（上）とレチナルの分子構造（下）。上図は紫膜の断面に相当し、上側が細胞内側、下側が細胞外側。A-Gの7つの四角で囲まれた部分はらせん構造をとりやすいと予想（池上による）される配列。各アミノ酸は3文字のアルファベットで表示している。Gらせん中の丸印はレチナルの結合しているアミノ酸

しかし、レチナルがバクテリオロドプシンの中のいったいどこにあり、細長いレチナル分子がどちら向きについているのかは、電子顕微鏡では見えません。レチナルは小さすぎるのです。そこで私たちは、なんとかレチナルのありかを突き止めてやろうと考えました。一番大事な部品ですし、レチナルはGらせんに付いていることがわかっているのですから、レチナルの位置が決まれば図-9と図-10の対応がつけられるかもしれません。

私たちは、蛍光法を使うことにしました。

7. 蛍光法によるレチナルの位置の決定

先ほどの pH メーターに紫外線をあててみましょう。いろいろな色に光りますね（図-11）。実は蛍光塗料が塗ってあるのです。目に見えない紫外線をあてると、目に見える赤や緑の可視光になって出てくる。こんな現象を蛍光といいます。蛍光灯も、管の中で紫



図-11 (カラーページ参照)

外線が出て、それが管壁の蛍光塗料を光らせているのです。

もとの紫外線をパッと消すと、蛍光もパッと消えます。ですが、本当は瞬間的に消えているわけではなくて、私たちの目にはわからないのですけれど、紫外線ランプが消えてから蛍光が消えるまでに1億分の1秒くらいたっているのです。その1億分の1秒をもし正確に測れたとすると、おもしろいことができます。分子と分子の間の距離が測れるのです。

あてている光が消えてのちに蛍光が光り続ける時間を、蛍光寿命といいます。ある蛍光色素分子が一つだけある時に、その蛍光寿命がたとえばちょうど1億分の1秒だったとしましょう。ところが、この分子のすぐ近くにたまたま他の色素分子（こちらは無蛍光性でよい）がある場合には、蛍光寿命が短くなってしまいます。たとえば2億分の1秒になってしまう。これは、隣の分子のほうに蛍光のエネルギーを奪われてしまうからで、蛍光エネルギー移動と呼ばれる現象です（図-12）。

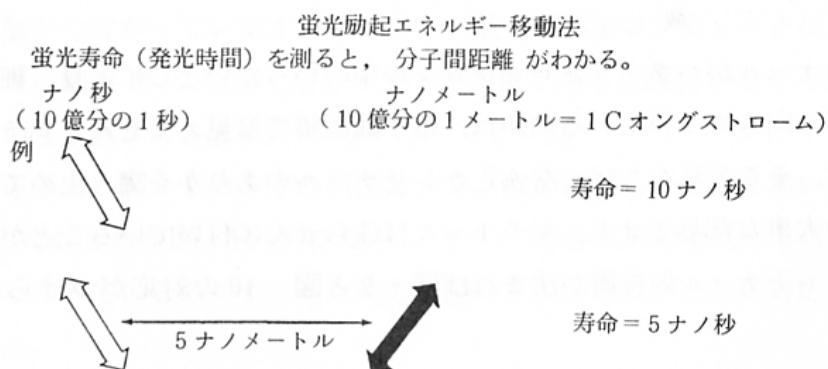


図-12 蛍光エネルギー移動法の原理。白矢印は蛍光色素分子を、黒矢印はその近くにある別の色素分子を表す

このときの蛍光寿命の短くなりかたは、隣の色素分子までの距離によります。距離が短いほど寿命が短くなります。ですから、1億分の1秒という時間を厳密に測ってやることであれば、蛍光分子と隣の分子の間の距離がわかります。だいたいナノメートル、すなわち10オングストローム、を単位にして計るような距離に非常に敏感ですので、タンパク

質や核酸など，生体高分子の構造を研究するのに具合がよろしい。これを紫膜に応用したいわけです。

図-13 Aで右手に持っているのが紫膜ですが，これは紫外線をあてても蛍光を出さない（図-13 B）。ところがバクテリオロドプシンの中のレチナールに，膜の状態のままではほんの少し化学処理をしてやると，図-13 Aの左手のように紫色が抜けます。そしてこちらのほうは，実に明るい蛍光を出します（図-13 B）。紫膜の構造を保ったままでレチナールを蛍光性に変えることができるのです。

そこで先ほどのK氏が，うまいことを考えました。レチナールを蛍光性にする化学変化を途中で止めてしまうのです。すると図-14のように，あるレチナールは蛍光性，残りの



図-13 A （カラーページ参照）



図-13 B （カラーページ参照）

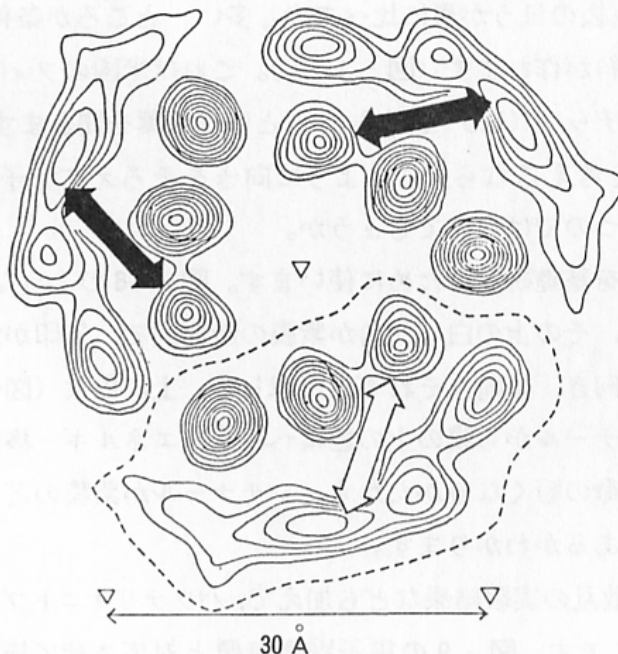


図 14 紫膜の平面図（図-8）の拡大図。バクテリオロドプシン3分子のみを示した。矢印はレチナールの位置と向きを表し，白抜きは蛍光性レチナール，黒は天然のままのレチナール

レチナールはもとのまま無蛍光性ということになって、蛍光性のレチナールから無蛍光性のレチナールへの蛍光エネルギー移動が起きます。その結果、蛍光性レチナールの蛍光寿命が短くなります。それを測って、隣り合うレチナール同士の間の距離を決めることができました。先ほどは省略しましたが、実は距離だけでなくお互いの向きの関係もわかるので、それらを総合すると、バクテリオロドプシン分子内でのレチナールの配置が決まります。図-14の矢印は、こうして得られた結果です。細長いレチナール(図-10)の位置と向きを表しました。つい最近、外国で中性子散乱という非常に大がかりな測定が行われて、私たちの結果が正しいことが支持されました。

以上は、紫膜の膜面内の位置と向きの話です。今度は膜の深さ方向で、どのへんにあるか知りたいですね。そこで少し高級テクニックを使いました。

図-15は、厚さたった20万分の1mmの紫膜を1枚1枚ガラスに貼ったものの電子顕微鏡写真です。よく見て下さい。直線的な割れ目のいっぱい入った膜と、比較的スムーズでアバタがポチポチあるのと、2種類ありますね。割れ目のたくさん入ったほうが紫膜の表側、すなわち細胞の外側に面したほうです。スムーズでアバタのあるほうが、紫膜の裏側、細胞の内側に面したほうです。図-15Aの左端、図-15Bの左上隅にはたまたま折りたたまれた膜が写っていて、1枚の膜が表の顔と裏の顔と両方見せています(割れ目やアバタはもともとあるわけではなく、表裏の見分けがつきやすいように小細工をした結果です)。

図-15Aのほうは、表のほうが裏に比べて少し多い。ところが条件を変えると、ほとんどが裏向きという試料が作れます(図-15B)。これは米国のフィッシャー博士が開発した方法です。バイオチップ(bio-chip)などという言葉を聞きますが、そんなものをもし本当に作ることを考えるなら、このように向きをそろえて分子一層の膜を貼り付けるような技術が役に立つのではないのでしょうか。

私たちは、この技術を基礎研究のために使います。図-16のような実験をするのです。斜線部分がガラス基板、その上の白い四角が紫膜の断面図で、矢印が蛍光性にしたレチナールのつもりです。表向き、裏向きそれぞれ用意して、上に色素(図の黒丸)をのせます。こうしておいて、レチナールから膜上の色素への蛍光エネルギー移動を測ってやる。それぞれの場合の蛍光寿命の短くなりかたから、レチナールが紫膜のどちらの表面からどれだけの深さのところにあるかわかります。

さらに、偏光ラマン散乱の実験結果なども加えて、バクテリオロドプシンの立体構造を推定してみたのが図-17です。図-9の電子顕微鏡像と対応させて描いてあります。レチナールの配置だけでなく、7本のらせんのつながり具合も描きこんでいることにご注目下さい。アミノ酸の鎖は、左下から始まって、A, B, C, ...と各らせんごとに上下

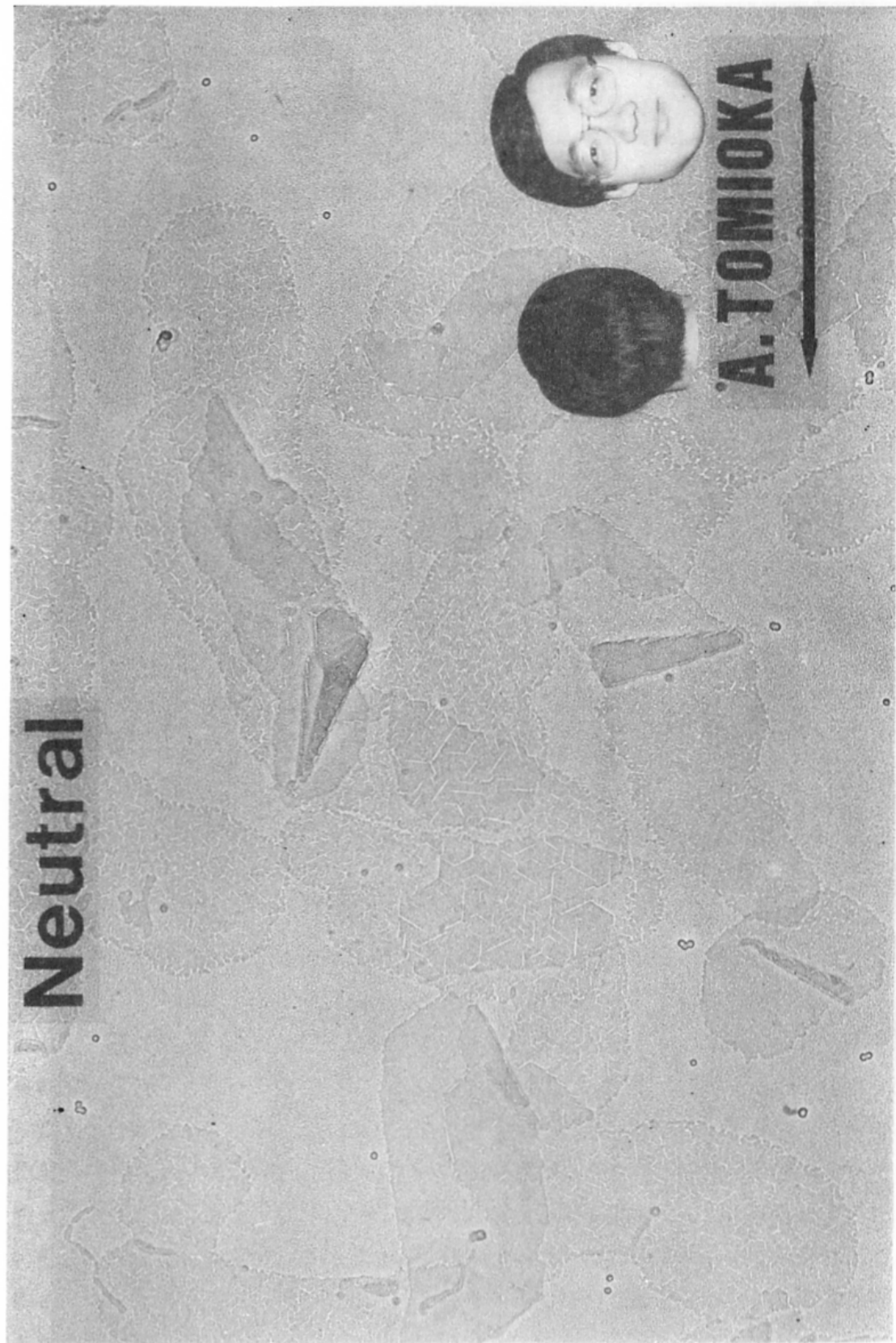
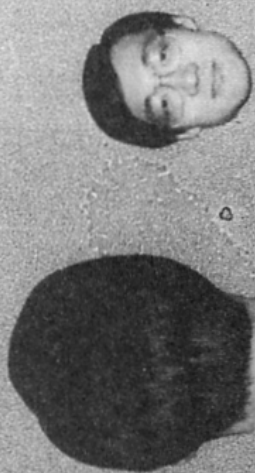


図-15 A ガラス基板上に貼り付けた紫膜の電子顕微鏡像。矢印は千分の1 mm。東京大学若林研究室との共同研究

Acidic



A. TOMIOKA



図 - 15 B

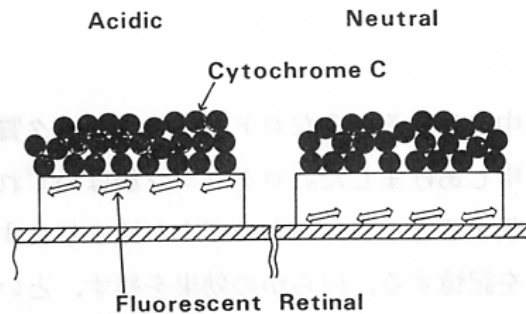


図-16 紫膜の深さ方向でのレチナールの位置を決める実験

'85 MODEL

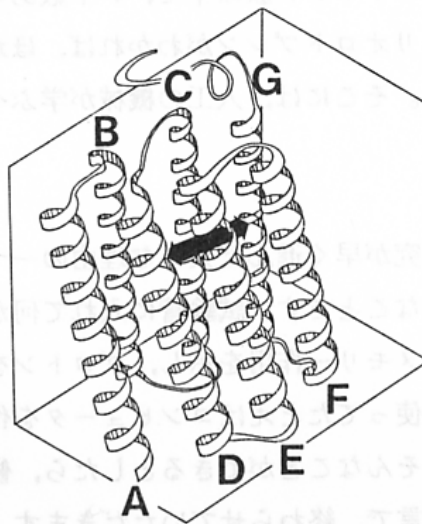


図-17 バクテリオロドプシンの立体構造モデル。上が細胞内側、下が外側

し、最後のGらせんの端は尻尾のように水の中（細胞の内側）に飛び出します。レチナールは、Gらせんの中ほどより少し上、細胞内側に寄ったところに付いていて、そこから少し上方、斜め23度くらいの方向に伸びています。まわりのタンパク部分にしっかりと抱えられています。

ここまでわかってくると、バクテリオロドプシンを作っているアミノ酸のどれがどこに位置しているか、だんだん見当がついてきますから、バクテリオロドプシンが一体どうやってプロトンを運ぶのか、分子内でのできごとを推定できることになります。私たちもいろいろ考えていますが、まだ予想の段階ですので、時間の関係もあり、今日はここまでにさせていただきます。年が明ければ、'86モデルに基づく推定をお話する機会を持てるかもしれません。

8. おわりに

話の途中で、生き物の中にはいろいろなロドプシンタンパク質があり、光を使ってさまざまな仕事をしていると申しあげました。ロドプシン族はいずれもレチナールを色素に持ち、レチナールが光を吸収するところからものが始まります。

光を吸収してそのことを記憶する、何らかの効果を残す、というだけならレチナール単独でもできます。レチナール分子そのものに、光により変形を起こす性質があるからです。しかしそれを有効な仕事に換えるには、タンパク質がいる。その仕掛けがどうなっているのか。それを明らかにするのが生物物理の重要課題です。

バクテリオロドプシンは、ロドプシン族の中で、いや数ある膜タンパク質の中で、一番研究が進んでいます。バクテリオロドプシンがわかれば、ほかの生体分子機械も次々に仕掛けがわかっていくでしょう。そこには、人工の機械が学ぶべきことがたくさんあるはずです。

バクテリオロドプシンの研究が早く進んだ大きな理由の一つは、紫膜がとても生物からとったとは思えないほど丈夫なことです。試験管に入れて何か月も机の上に放りっぱなしにした紫膜でも、ちゃんと光メモリー作用を示し、プロトンを運びます。私は、生き物から取り出した分子をそのまま使ったたとえばコンピュータを作る、といった可能性などはほとんど信じませんが、万々そんなことができるとしたら、候補はバクテリオロドプシンかもしれない。などという戯言で、終わらせていただきます。