

新 制
理
816

京大附図

学位申請論文

今元 泰

学位申請論文

高度好塩菌の青緑色光受容蛋白質
フォボロドプシンの光反応機構



京都大学大学院理学研究科生物物理学専攻

今元 泰

学位申請論文
高度好塩菌の青緑色光受容蛋白質・フォボロドプシンの光反応機構

[目次]

本研究の概要	1
略語表	2
1. 本研究の背景	3
1-1. 高度好塩菌とレチナル蛋白質	4
1-1-1. 好塩菌の光受容蛋白質	4
1-1-2. 好塩菌のレチナル蛋白質の役割	4
1-2. 好塩菌の光走性と光受容蛋白質	7
1-2-1. 光走性とそのメカニズム	7
1-2-2. pRとppR	10
1-2-3. レチナル蛋白質の一般的性質	11
1-2-4. pRとppRの研究経過	12
2. 低温スペクトル法によるpRの光反応サイクルの解析	14
2-1. 目的	15
2-2. 試料の調製と測定法	15
2-2-1. pR膜試料の調製	15
2-2-2. pRオプシン/グリセリン試料の調製	15
2-2-3. pR/グリセリン試料の調製	16
2-2-4. 低温スペクトル法	16
2-3. 結果	19
2-3-1. pR試料の吸収スペクトル	19
2-3-2. pRの絶対吸収スペクトル	19
2-3-3. pRの光反応初期過程	22
2-3-4. pR _K 以降の反応	27
2-3-5. pR _L の検索	32
2-3-6. pRと中間体の絶対吸収スペクトル	35
2-4. まとめと考察	39
3. ppRと中間体の発色団の構造解析	43
3-1. 目的	44
3-2. 試料の調製と実験法	46

3-2-1. ppR 試料の調製	46
3-2-2. 蛋白質部分の変性と発色団の抽出	46
3-2-3. 高速液体クロマトグラフィー	47
3-2-4. 分光測定	47
3-3. 結果	48
3-3-1. 暗順応型 ppR の発色団構造	48
3-3-2. 反応中間体の発色団構造	52
3-4. 考察	55
3-4-1. 光反応サイクルでの発色団の挙動	55
3-4-2. 立体選択的反応	56
4. ナノ秒レーザー閃光分解による ppR の光反応サイクルの解析	60
4-1. 目的	61
4-2. 試料調製と測定法	61
4-2-1. ppR 試料の調製	61
4-2-2. レーザー分光	61
4-3. 結果	62
4-3-1. 励起後の過渡吸収スペクトル	62
4-3-2. ppR と反応中間体の絶対吸収スペクトル	65
4-4. 考察	68
5. まとめ	73
5-1. フォボロドプシンの光反応機構	74
5-2. 今後の展望	77
6. 引用文献	80
7. 謝辞	85
8. 主論文	
9. 参考論文	

本研究の概要

本研究は、高度好塩菌の負の光走性に関与する光受容蛋白質である phoborhodopsin (pR) を、*Halobacterium halobium*、あるいは、*Natronobacterium pharaonis* から調製し、その分光学的性質、及び発色団の立体構造を調べたものである。

一般にレチナル蛋白質の吸収スペクトルは、なだらかな釣鐘型であるが、pR のものはバンド幅が狭く、振動構造がみられた。この事は、pR の発色団と蛋白質部分の間に、他のレチナル蛋白質にはない、特異的な相互作用のあることを示している。そこで、*Halobacterium halobium* の膜断片試料を用いた低温スペクトル法により、pR の光反応過程を解析し、他のレチナル蛋白質の光反応過程と比較したところ、初期中間体である K 中間体の安定温度が高いこと、L 中間体に対応する中間体が観測されないこと等の特徴を見いだした。

続いて、*Natronobacterium pharaonis* 由来の pR (ppR) の精製標品を試料として、発色団レチナルの構造解析を行った。その結果、ppR の発色団は全トランス型レチナルであり、暗順応によるレチナルの熱異性化は起こらないことがわかった。好塩菌の光駆動イオンポンプである bacteriorhodopsin や halorhodopsin では、暗順応によりそれらの発色団は全トランス型と 13 シス型の間で平衡混合物になる。一方、pR と同じく光センサーである sensory rhodopsin では、このような熱異性化はみられない。そのため、暗中で異性化が起こらないことが、光センサーとして働くレチナル蛋白質に共通な性質であると考えられた。さらに、ppR の光反応中間体の発色団構造を調べた結果、M 中間体の発色団は 13 シス型で、O 中間体で全トランス型に戻ることがわかった。このことから、pR でも bacteriorhodopsin 等と同じく、光を吸収すると発色団の異性化が起こることがわかった。

さらに ppR 試料を用いて、ナノ秒レーザーパルスを用いた閃光分解法を行い、室温での光反応過程を解析した。その結果、低温では観測されなかった KL、L 中間体の生成がみられ、それらの崩壊の時定数は、bacteriorhodopsin の光反応サイクルで生成する中間体のものとよく一致した。低温でこれらの中間体が観測されないのは、KL 中間体の前駆体である K 中間体が、低温では KL、L 中間体よりも安定性が高まるためであると考えられる。しかし、KL、L 中間体が室温で観測されることは、ppR の K 中間体の室温での寿命は、bR の K 中間体と近い事を示している。つまり、ppR の K 中間体の崩壊速度は、温度によって大きく影響を受けることがわかり、その活性化エントロピー、活性化エンタルピーが大きいことが示唆された。これは、ppR の蛋白質部分に β イオン環固定部位があるために、発色団の自由度が小さいことが原因であると考えられる。

以上の知見から、pR の吸収スペクトルに振動構造が現れることや、低温で L 中間体を欠くことなどの特徴は、蛋白質部分に発色団の β イオン環固定部位があり、発色団と特殊な相互作用をするためであると考えられた。

略語表

pR	phoborhodopsin from <i>Halobacterium halobium</i>
ppR	phoborhodopsin from <i>Natronobacterium pharaonis</i>
bR	bacteriorhodopsin from <i>Halobacterium halobium</i>
hR	halorhodopsin from <i>Halobacterium halobium</i>
sR	sensory rhodopsin from <i>Halobacterium halobium</i>
HEPES	<i>N</i> -(2-hydroxyethyl)piperazine- <i>N'</i> -2-ethanesulfonic acid
HPLC	high performance liquid chromatography
Ts	all- <i>trans</i> ,15- <i>syn</i> retinal oxime
Ta	all- <i>trans</i> ,15- <i>anti</i> retinal oxime
13s	13- <i>cis</i> ,15- <i>syn</i> retinal oxime
13a	13- <i>cis</i> ,15- <i>anti</i> retinal oxime

中間体の命名 本論文では、レチナル蛋白質の光反応中間体を、その光反応前の状態と添え字の組み合わせで表わす。例えば、bRのK中間体は bR_K 、pRの光反応過程において bR_K に対応する中間体は pR_K と表わしている。

第1章

本研究の背景

[1-1 高度好塩菌とレチナール蛋白質]

1-1-1 好塩菌の光受容蛋白質

好塩菌とは、4 M程度の高塩濃度に生息する細菌群である。その中には何種類か知られているが、最も研究が行われている菌は、*Halobacterium halobium* である（図1-1）。*Halobacterium halobium* の場合、その光受容蛋白質はこれまでに4種類報告されており、それぞれ、bacteriorhodopsin (bR)、halorhodopsin (hR)、sensory rhodopsin (sR)、phoborhodopsin (pR)^(注) と命名されている（図1-2 a）。これらの光受容蛋白質の発色団は、光合成系の光受容蛋白質のような金属原子を持ったポルフィリン環ではなく、動物の網膜の光受容蛋白質と同じくレチナール（ビタミンAアルデヒド）である。そのため、視覚研究のモデル系としてその研究が発展してきた一面がある。実際、好塩菌の光受容蛋白質も、網膜の光受容蛋白質も、そのポリペプチド部分は7本の α ヘリックスからなる膜蛋白質であること、その7番目のヘリックスのリジン残基に発色団が結合している事等、構造上の共通点が多い。

しかしながら、好塩菌の光受容蛋白質と網膜の光受容蛋白質の最も大きな違いは、その発色団レチナールの構造と光反応過程にある。レチナールの構造は、網膜の光受容蛋白質ではすべて天然では11シス型であるのに対して、好塩菌では基本的に全トランス型である（図1-2 b）。また、網膜の光受容蛋白質は光を受けると、発色団は11シス型から全トランス型に異性化し、その後いくつかの光反応中間体をへて全トランス型レチナールと蛋白質部分に分解（退色）する。しかし、好塩菌の光受容蛋白質では、光吸収によって発色団が全トランス型から13シス型に異性化し、いくつかの中間体をへた後、もとの全トランス型に戻るため、退色しない。すなわち、光反応サイクルを示す。

1-1-2 好塩菌のレチナール蛋白質の役割

上記のように、好塩菌はいくつかのレチナール蛋白質を持っているが、それらの生理的役割は二つに大別されている。一つは光駆動のイオンポンプ機能で、光エネルギーを用いて細胞膜の内外にイオン勾配を形成し、そのエネルギーからATPを合成する。*Halobacterium halobium* では、bRがプロトンポンプとして機能し（Stoeckenius

^(注) phoborhodopsin を sensory rhodopsin II (sR II) と呼ぶ研究者も多い。その場合は、sensory rhodopsin を sensory rhodopsin I (sR I) として区別する。詳しくは後述する。

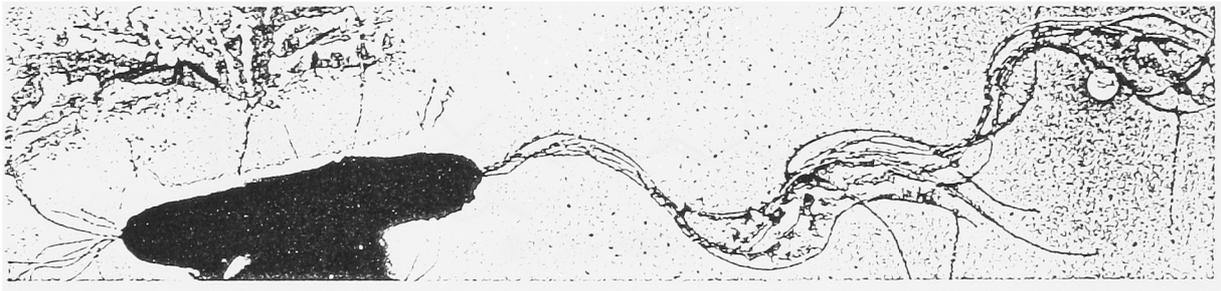


図1-1 高度好塩菌*Halobacterium halobium*の電子顕微鏡写真。

Halobacterium halobium は、長さ40 μm 程度の桿菌で、菌体の両側に鞭毛をもっている。この鞭毛を回転させることにより、泳ぐことができる (Alam & Oesterhelt, 1984 より)。

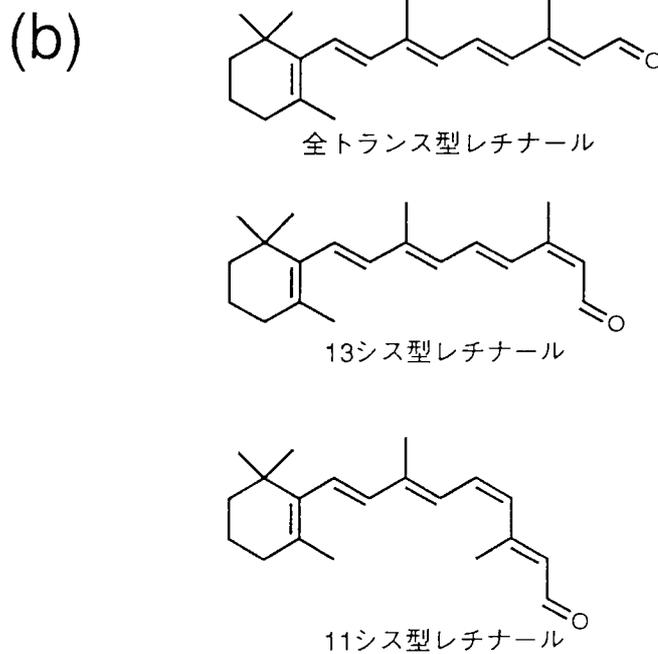
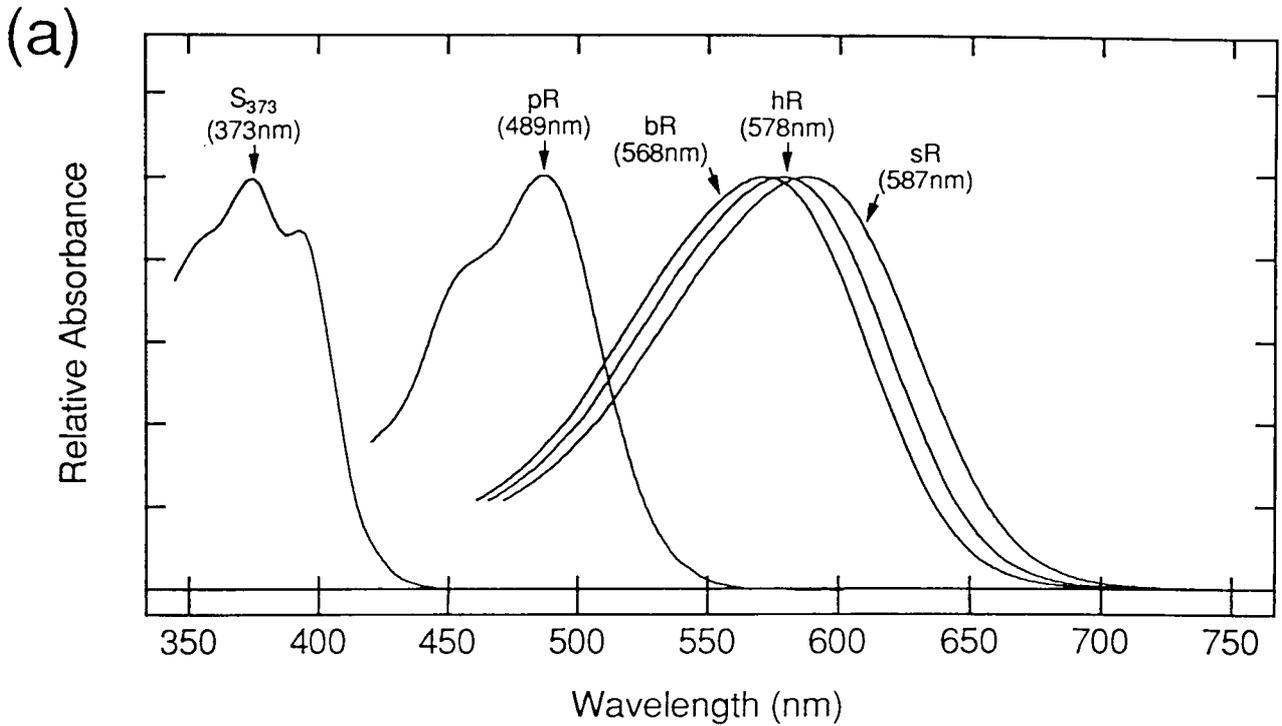


図1-2：高度好塩菌の光受容蛋白質と発色団の構造。

(a) *Halobacterium halobium* に存在する4種類のレチナール蛋白質、bR、hR、sR、pR、及びsRの長寿命中間体 S_{373} の吸収スペクトルの比較。それぞれの吸収極大波長を括弧内に示している。pR、 S_{373} 以外は570~590nmに吸収極大を持ち、なだらかな釣鐘型である。sRは正の光走性のため光受容蛋白質、pRと S_{373} は負の光走性のため光受容蛋白質である。

(b) レチナール（ビタミンAアルデヒド）の構造。上から全トランス型、13シス型、11シス型。

& Bogomolni, 1982)、hRがクロライドポンプとして機能している (Lanyi, 1986)。もう一つの役割は、bRやhRが効率よく機能できる光条件を探し、近紫外光など、菌体に有害な光条件から逃れるという光走性 (phototaxis) のための光センサーである。*Halobacterium halobium* では、sRとpRが光走性のための光受容蛋白質として機能している (Spudich & Bogomolni, 1988)。

以上は*Halobacterium halobium* の例であるが、他の好塩菌で見いだされた光受容蛋白質も、おおむねこの4種類のいずれかに類別されている。例えば、本論文で扱う好塩好アルカリ菌 *Natronobacterium pharaonis* では、hR様の光受容蛋白質 (phR) と、pR様の光受容蛋白質 (ppR) が見いだされている (Bivin & Stoeckenius, 1986)。本研究において研究の対象としたのは、この内でpRとppRである。

[1-2 好塩菌の光走性と光受容蛋白質]

1-2-1 光走性とそのメカニズム

本研究において研究の対象としたのは、pRとppRなので、それに関連して以下に好塩菌の光走性について、最も研究の進んでいる*Halobacterium halobium* を例にとってもう少し詳しく述べる。

Halobacterium halobium が環境光の種類によって、正または負の光走性を示すことは先に述べたが、その行動は、直進と反転の組合せでなされている (高橋と津田, 1989)。*Halobacterium halobium* の菌体の両側には、それぞれ数本の鞭毛があるが、片方は短くてほとんど機能していないことが多いと言われている (図1-1)。*Halobacterium halobium* はこの鞭毛を時計周り (clockwise)、あるいは反時計周り (counter-clockwise) に回転させることによって泳ぐことができる (Alam & Oesterhelt, 1984)。暗の中では数10秒に1回程度の割合で鞭毛回転を反転させ、逆向きに方向を転換 (reverse) する。ところが、黄～赤色領域の光 (有益) に入ったとき、この反転の頻度は低下する。また、青～近紫外領域の光 (有害) から抜け出したときも、頻度が低下する。これらが好塩菌の示す正の光走性の応答である。一方、青～近紫外領域の光 (有害) に入ったとき、あるいは黄～赤色領域 (有益) から抜け出したとき、この反転の頻度は高くなる。これが負の光走性の応答である。しかし、どのような光条件でも、同じ条件におかれていると、その行動は次第に暗中之のものに近づき、順応を示す。

つまり、普段は時折泳ぐ方向を変えながら、菌体に有利な光条件を探していると

考えればよい。それが泳いでいる間に、暗い所から有益な光（黄～赤色光）に出た時、あるいは有害な光（青～近紫外光）から逃れたときは、そのまま直進し、その光条件下にとどまる。しかし、有益な光から出てしまった時、あるいは有害な光に入ってしまった時には反転し、もとの環境に戻るということである。その結果として、菌体は青～近紫外領域の光から逃れ、黄～赤色光のもとに集まってくるのである。光の波長によって行動を変えることから、これは極めて原始的な色覚の一例と言える。

これらの反応の分子的基礎の研究も近年進んでいる。まず、好塩菌の正の光走性のための光受容蛋白質は sR である（図 1-2 a）（Bogomolni & Spudich, 1982）。sR は、587 nm を極大として、緑～黄～赤色光領域に吸収帯をもち、この領域の光を受けたとき、菌体の反転の頻度が下がる（正の光走性）。

一方、負の光走性のシステムは 2 種類あり（Sundberg et al., 1986）、それぞれが近紫外光、青緑色光領域をカバーしている。まず、近紫外光に対する光受容蛋白質は、sR の光反応中間体（明順応状態）である S_{373} （吸収極大 = 373 nm）である（図 1-2 a）（Bogomolni & Spudich, 1982; Takahashi et al., 1985a, b）。 S_{373} は寿命が 1 秒程度の中間体であるが、 S_{373} が光を吸収すると、菌体の反転頻度は高くなる。 S_{373} が sR の光反応中間体であることからわかるように、菌体が近紫外光からの負の光走性を示すためには、sR に光があたっていること（back ground light）が必要である。また、青緑色光に対する光受容蛋白質は、本研究で扱う pR（吸収極大 = 489 nm）である（図 1-2 a）（Tomioka et al., 1986; Wolff et al., 1986; Sundberg et al., 1986; Marwan et al., 1987）。

sR、 S_{373} 、あるいは pR が光を吸収した後は、その信号を鞭毛に伝える伝達系が存在する。その伝達は、網膜の光受容蛋白質 ロドプシン等と同じく、これらの光反応中間体のあるものが、後続の酵素系を活性化することにより行われていると考えられている（図 1-3）。sR では S_{373} がこれにあたり、正の光走性の信号を伝える（McCain et al., 1987）。一方、 S_{373} は負の光走性の光受容蛋白質でもあり、光を吸収すると負の光走性を起こす光反応中間体（ S_{373}^* ）になると考えられているが、どの中間体かは特定されていない。pR では P_{350} と P_{530} と呼ばれる 2 つの中間体（1-2-4 参照）が、負の光走性の信号を伝えるといわれている（Yan et al., 1991）。

これ以降の伝達過程では、まだほとんど明かにされていない。Spudich らが提唱したモデルによると（図 1-3 上）、sR と S_{373} の系の伝達経路（sR-transducer）は、

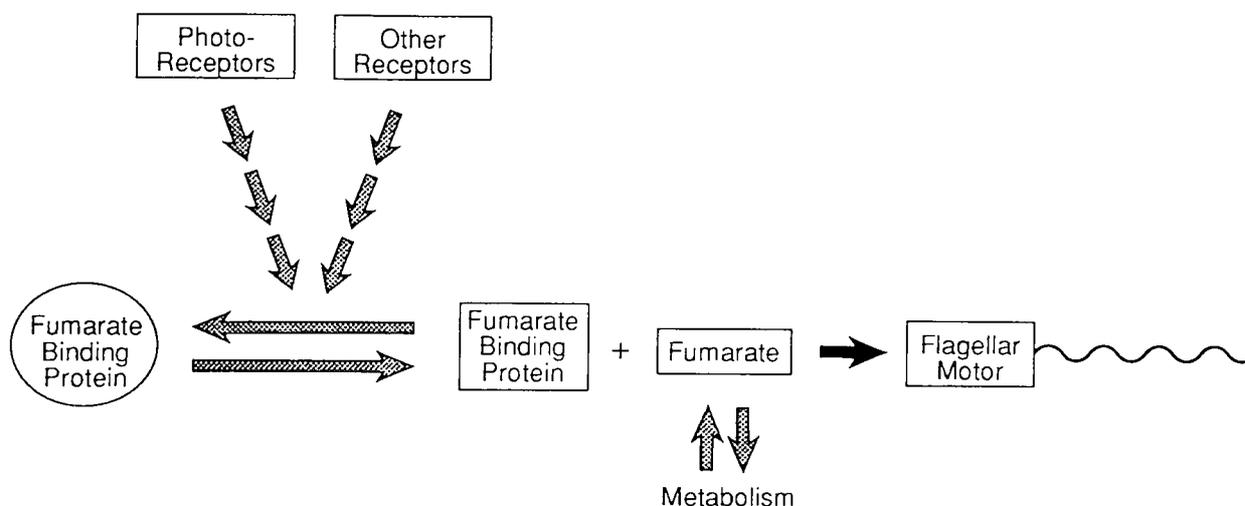
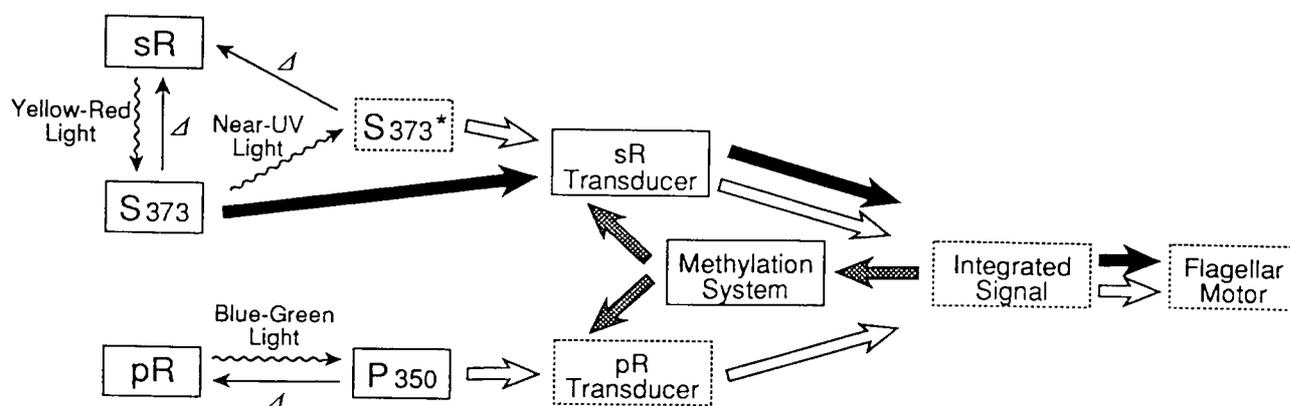


図1-3: *Halobacterium halobium* の光情報伝達システムのモデル。

上 Spudich らが提唱している、*Halobacterium halobium* の光情報伝達システムのモデル (Spudich et al., 1989 より改変)。光受容蛋白質として、sR、S₃₇₃、pRがある。実線で囲んだものは、すでに存在が確認されているもの、破線で囲んだものは、その存在が示唆されている蛋白質である。脱メチル化はsignal integrator から起こり、トランスデューサーに作用し、順応が起こる。図中黒い矢印は正の光走性の信号、白い矢印は負の光走性の信号を意味する。

下 Oesterhelt らのモデル。光受容蛋白質、あるいは他の受容体蛋白質からの信号は、フマル酸結合蛋白質のフマル酸解離に関与してると考えられている。フマル酸が欠落した株では、鞭毛の反転は起らない。(Marwan et al., 1990 より改変)。

pRの系での経路 (pR-transducer) と独立しており、その後の段階で sR と pR の双方の系からの信号が統合され (Integrated signal)、鞭毛に伝えられると考えられている。実際、正の光走性を示す条件と、負の光走性を示す条件を同時に与えた時、例えば暗条件から赤色光と青緑色光を同時に照射した時には、それぞれの相対的強度に応じて正負どちらが起こるかが決ってくる (Spudich et al., 1989)。また、光受容蛋白質である sR はもっているが、sR あるいは S₃₇₃ に由来する光走性を示さず、pR 由来の光走性のみを示す突然変異株が単離されている (Takahashi et al., 1985c)。これは sR 系の伝達過程 (sR-transducer) の欠落した株であり、統合の前に sR と pR でそれぞれ別個の伝達経路があるということを意味している。

伝達過程に関する知見としては、正負いずれの光走性を示す時にも、伝達過程に参与する蛋白質の脱メチル化が起こっていることが示唆されている (Spudich et al., 1989)。大腸菌でも走化性 (chemotaxis) を示すときにメチル化が関与することが知られているが、大腸菌では正の走化性ではメチルエステラーゼの活性が下がり、負の走化性ではメチルエステラーゼの活性が上がるといわれているため (Kehry et al., 1984)、好塩菌とはメカニズムが違っている可能性がある。また、暗中でも鞭毛回転の反転を示さない突然変異株を単離し、それにいろいろな化合物を与えて欠落因子を同定しようとした実験では、フマル酸を与えると、反転が回復することがわかっている (Marwan et al., 1990)。そのため、フマル酸が鞭毛回転の switching factor として働いている事が示唆されている (図 1-3 下)。しかし、それが second messenger なのか、機能性蛋白質の補欠因子なのかは明らかにされていない。

1-2-2 pR と ppR

以上のレチナル蛋白質の中で、本研究で扱うのは青緑色光受容蛋白質 pR である。pR の吸収極大は 489 nm であるが (2-3-2 参照)、好塩菌の他の光受容蛋白質の吸収極大は 570 ~ 590 nm であるので (図 1-2 a)、pR の吸収極大値はむしろ動物のロドプシン (~ 500 nm) に近い。一方、好塩菌の他の光受容蛋白質やロドプシンの吸収スペクトルは、釣鐘型のなだらかな形をしているが、pR の吸収スペクトルでは、489 nm に鋭いピークがあり、460 nm 付近にショルダーがみられる (図 1-2 a)。最近ではクラミドモナスのレチナル蛋白質が同様のショルダーをもった形状のスペクトルをもつと言われているが (Beckman & Hegemann, 1991)、いずれにしてもこのような振動構造をもつスペクトルは、極めて特異的である。

また、細胞内に含まれる pR の含量は非常に少ない。bR hR sR pR の含量比はおよそ 1000 100 10 1 であると言われている。この比から推定される pR の分子数は、菌体一つあたり数 10 分子である。その上、pR は、界面活性剤、温度、pH 等、種々の要因に対して不安定なため、可溶化して精製することが出来なかった。また bR のような二次元結晶構造をつくっていないため、密度勾配遠心等の手法も使えなかった。そのため、われわれが pR の研究を始めた時には、bR、hR、sR、カロチノイドを産生しない突然変異株を単離し、その細胞破碎液を試料として用いた。

その後、pH 8 ~ 10 程度のアルカリ条件に生息する好塩好アルカリ菌 *Natronobacterium pharaonis* の pR 様光受容蛋白質 (ppR) の精製法が、北海道大学のグループによって確立された (平山、1991)。ppR の吸収極大は 498 nm にあり、pR よりも 9 nm 長波長側だが、吸収スペクトルに振動構造が現れることや、ミリ秒領域での中間体の挙動が、pR とよく似ている。しかし、pR とは違って界面活性剤に対しては非常に安定性が高く、コール酸、オクチルグルコシド等で安定に可溶化できる。さらに、細胞内での含量も pR の 5 倍程度あるため、ppR に関してはカラムクロマトグラフィーによる精製法が確立された。われわれの研究も途中からはこの精製標品を用いた。

1-2-3 レチナル蛋白質の一般的性質

好塩菌の光受容蛋白質は、動物の網膜の光受容蛋白質と同じくレチナルを発色団としている。それらの間には、発色団の構造が 11 シス型と全トランス型という違いはあるが、共通点は多い。まず、その蛋白質部分は 7 本の α ヘリックスを持ち、膜を 7 回貫通した構造をとっている。また、N 末端から数えて 7 本目のヘリックスには、リジン残基があり、ここが発色団レチナルの結合部位である。レチナルはこのリジン残基とシッフ塩基結合を介して結合している。この部位は、これまで調べられた全てのレチナル蛋白質でプロトン化している。発色団レチナルは 7 本の α ヘリックスに囲まれており、まわりにある蛋白質のアミノ酸残基から、静電的、あるいは立体的な影響を受ける。

発色団がリジン残基とプロトン化したシッフ塩基結合をすること、また、まわりのアミノ酸残基と相互作用することは、可視部に吸収帯をもつ光受容蛋白質を形成する上で不可欠である。有機溶媒中のレチナルの吸収極大は、その異性体構造にかかわらず 380 nm 付近にある。リジンの側鎖にあたるブチルアミンとレチナル

をシッフ塩基結合させると、吸収極大は360nmになる。しかし、これを酸性条件におき、シッフ塩基結合部位をプロトン化させると、吸収極大は約440nmに移動する。好塩菌のレチナール蛋白質や動物のロドプシンは、これよりも長波長側に吸収極大を持つが、それはレチナールの共役二重結合系と蛋白質部分の相互作用による。この、蛋白質部分によってどれだけ長波長に吸収極大が移動しているかは、発色団と蛋白質の相互作用の状態を議論する上で重要なパラメータとなる。そこで、それぞれの光受容蛋白質の吸収極大が、その発色団であるレチナールのプロトン化シッフ塩基の吸収極大から、どれだけ長波長に移動しているかを、エネルギー、すなわち波数 (cm^{-1}) で表した値をopsin shift と呼び、広く用いられている。

pR、ppRの吸収極大は、bR等と比べて短波長側にあり、opsin shift、すなわち発色団/蛋白質間の相互作用の状態が、bR等とはかなり異なっていることを意味する。さらにその吸収スペクトルには振動構造が現れ、特殊な相互作用が存在することを示唆している。本論文では、以上の知見をふまえて、pR、ppRの特異性について議論する。

1-2-4 pRとppRの研究経過

以上に述べたことは、本稿の執筆段階での知見である。本研究を始めた時には、pRが発見されてからまだ日が浅く、多くのことは明らかにされていなかった。

pRが発見される前は、好塩菌の負の光走性に関与する光受容蛋白質は、sRの光反応中間体である S_{373} しか知られていなかった。しかし、菌体の光走性を調べてみると、青緑色光に対する負の光走性が観測されるので、 S_{373} の他にも負の光走性に関与する光受容蛋白質の存在が示唆されていた。pRの存在を実際に確認したのは、北海道大学薬学部のグループで、pRのみに由来する光走性を示す突然変異株を単離したことによる。北海道大学のグループでは、青色光に対する忌避反応 (phobic reaction) の受容蛋白質であることから、phoborhodopsin (pR) と呼ぶことを提唱した (Tomioka et al., 1986)。ほぼ同じころ、米国のグループでもpRを同定したが、こちらではsensory rhodopsin II (sR II) と命名し、sRをsR Iと呼ぶことを提唱した (Wolff et al., 1986)。この混乱は現在も続いており、同じ蛋白質でありながら、日本のグループはpRと呼び、欧米のグループはsR IIと呼んでいるので、欧文雑誌を読むときには注意が必要である。

話をもとに戻すと、pRが発見されたと同時に、その膜断片を用いたミリ秒領域の閃光分解も行われ、350nmに吸収極大を持ち、寿命が100ミリ秒である中間体

(P_{350})と、530nmに吸収極大を持ち、寿命が300ミリ秒である中間体(P_{530})が観測された。また、当初から、背景光の波長に対する光走性の作用スペクトルには460nm付近にショルダーがみられたが、レチナル蛋白質の吸収スペクトルは釣鐘型であるというのが常識であったし、実験的にもpRの絶対吸収スペクトルが求められていなかったために、一般にはpR自身のスペクトルが振動構造をもつとは思われていなかった。実際、pRの吸収スペクトルが、釣鐘型であると報告された事例もある。本研究が始まったのはこの頃である。

申請者はバクテリアの光走性に関与する光受容蛋白質に興味をもち、それらにはイオンポンプとして働く光受容蛋白質にはない、独特の光反応サイクルをもつのではないかと考えた。幸い北海道大学薬学部のグループから、*Halobacterium halobium*のpR試料の提供を受けることができることがわかり、研究を始めることができた。初期の段階では、pRの精製ができていなかったため、試料は細胞破碎液そのままであり、当然試料の濁度が高く、チトクロムが含まれ、しかもpR含量は試料の吸光度の100分の1程度であった。このような試料では、ミリ秒以下の閃光分解は難しく、低温スペクトル法がその光反応初期過程の解析には最も適した手法であった。そこで、この方法を用いて、pRの光反応過程に関する研究を開始した。

低温スペクトル法によってpRの光反応サイクルの解析を終えたが、さらにこの研究を進めるためには、純度の高い試料が必要になった。一方北海道大学では、pR様蛋白質の精製法に関する研究を進めていて、好塩好アルカリ菌のもつpR様蛋白質 ppRの精製法を確立し、この試料を使うことが可能になった。ところで、名前の混乱はppRになっても引き継がれ、日本のグループでは*phraonis* phoborhodopsin、略してppRと呼んでいるが、欧米では*pharaonis*のsensory rhodopsin IIであるということで、psR IIと呼んでいるので、これについても注意が必要である。それはともかく、このppRの精製試料を用いて、ナノ秒レーザーによる閃光分解、発色団抽出実験など、低温スペクトル法の他にも、さらに詳細な研究が可能となった。

以上の経緯により、本研究は、北海道大学薬学部薬品物理学講座の小島陽之助 教授(故人)、加茂直樹 教授、高橋哲郎 博士(現サントリー生物有機化学研究所)、富岡寛顕 博士(現理化学研究所)、平山順一 博士(現米国 シラキュース大学)、藤川和久 氏(現(株)中埜酢店 中央研究所)との共同研究により、試料の提供を受けた。また、以下の分光測定は京都大学理学部生物物理学教室において、七田芳則 博士、吉澤 透 教授(現京大名誉教授 電気通信大学)のもとで、申請者が行ったものである。

第 2 章

低温スペクトル法による pR の光反応サイクルの解析

[2-1 目的]

pR は高度好塩菌 *Halobacterium halobium* の負の光走性に関与する光受容蛋白質である。すでに述べたように、高度好塩菌は環境光の色（波長）を区別し、それに応じた反応を示す。このような反応をトリガーする蛋白質とは、どのようなものかを明らかにするため、その光反応過程の解析から始めることにした。pR は精製が困難であり、試料の純度が低いため、低温スペクトル法が最も適した解析法である。本研究では、pR の光反応過程を低温スペクトル法によって解析し、好塩菌の光受容蛋白質である bR や、網膜の光受容蛋白質ロドプシンと比較することにより、その特徴を明らかにすることを試みた。この章に述べる成果は、主論文 1 として本論文に添付してある (Imamoto et al., 1991)。

[2-2 試料の調製と測定法]

2-2-1 pR 膜試料の調製

実験には、*Halobacterium halobium* の突然変異株で、pR 以外のレチナル蛋白質を含まず、レチナル等のカロチノイドの産生量が少ない、Flx3-b1 (Takahashi et al., 1988)、または Flx 株から新たに単離された ON1-bW 株を用いた。

Flx3-b1 または ON1-bW を、ペプトン培地 (Oesterhelt & Stoeckenius, 1974) のなかで好気条件下、39°C で培養した。対数増殖期にある菌体を遠心分離によって集め、凍結融解法によって破砕した。得られた膜断片を、4M NaCl 溶液中に懸濁した。DNase I を加えて室温で放置した後、透析によって DNA を除去した。膜断片を緩衝液 (4M NaCl / 20mM HEPES / pH 7.0) に懸濁し、遠心と懸濁を繰り返して、膜断片を洗浄した。得られた pR 膜試料は 2 分割し、以下の pR オプシン / グリセリン試料、及び pR / グリセリン試料の調製に用いた。

2-2-2 pR オプシン / グリセリン試料の調製

pR 膜試料には、発色団であるレチナルを持たない pR 分子 (pR オプシン) が約 80% 含まれていた (2-3-1 参照)。残りの pR を完全に pR オプシンにするため、終濃度 100mM のヒドロキシルアミン (NH₂OH) を加えて光照射した。

遠心と懸濁を繰り返し、ヒドロキシルアミンを除去した。遠心によって得られたペレットと等しい体積のグリセリンを加え、テフロンホモジナイザーで懸濁し、濁度を低下させ、pR オプシン/グリセリン試料として用いた。

2-2-3 pR/グリセリン試料の調製

pR 膜試料に全トランス型レチナールを加え、室温で 24 時間暗保し、pR オプシンを pR に再生させた。遠心と懸濁を繰り返して膜断片を洗浄した後、遠心によってペレットを得た。ペレットの体積の 2 倍量のグリセリンを加え、テフロンホモジナイザーで懸濁した。この試料は、分光測定を行うには濃度が低いので（2-3-1 参照）、再度 $100000 \times g$ で 14 時間遠心し、遠心管の底近くに集まった部分を回収した。回収した試料は、テフロンホモジナイザーで懸濁し、濁度を低下させ、pR/グリセリン試料として用いた。

2-2-4 低温スペクトル法

吸収スペクトルの測定は、日立製 330 型、または島津製 MPS-2000 型自記分光光度計に図 2-1 a のような測定系を組み込んで行なった。分光光度計は、NEC-PC9801 型パーソナルコンピュータと接続し、データの保存・解析を行った。分光光度計の試料室に、ガラス製のクライオスタット（図 2-1 b）（Yoshizawa & Shichida, 1982）をセットし、暗箱で遮光した。クライオスタット内に、銅ブロックから削り出した試料セルホルダー（図 2-1 c）を取り付け、試料を冷却できるようにした。冷媒には液体窒素を用いた。

-170 °C でのスペクトル測定では、試料の凍結によるクラックのために測定光が散乱され、正確な測定ができないので、散乱を打ち消すために、試料セルの光電子増倍管側はオパールガラス（乳白色のガラス板）とし、対照光側にも同じオパールガラスを置いた。-80 °C 以上の測定で、オパールガラスを用いないときには、対照光側にも同じサンプルセルをおき、試料を充填して、測定光と対照光の光強度を揃えた。

分光光度計の外板、及び光電子増倍管の前にシャッターを置き、電動ミラーを用いることにより、分光光度計の試料室に試料をセットしたままで試料を照射できるようにした。照射光源として 1000 W のスライドプロジェクタ（Sanko）を用いた。また、プロジェクタと試料の間に 5 cm の水層を置き、プロジェクタから出る赤外線のカットした。照射波長は各種光学フィルタを用いて選択した（図 2-1 a）。

(a)

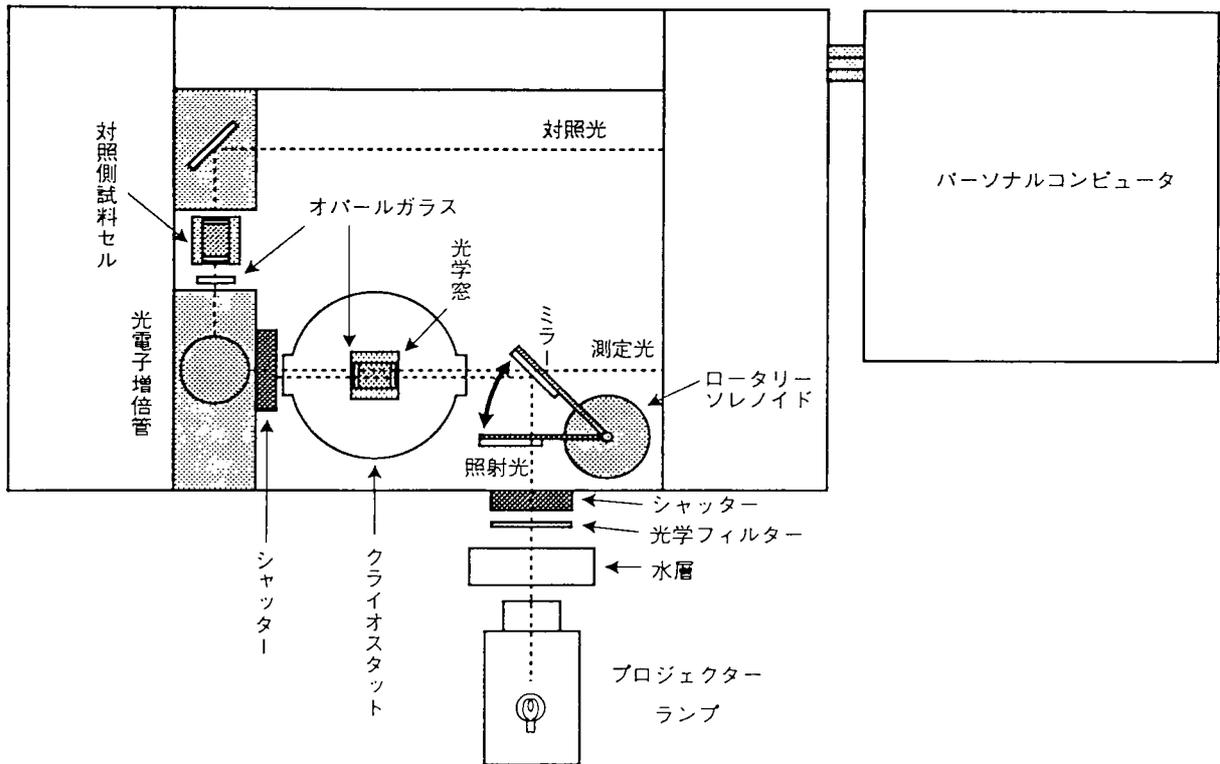
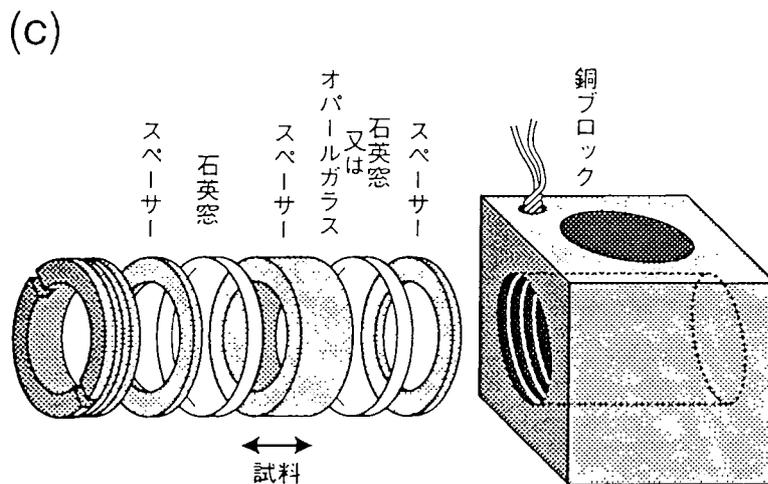
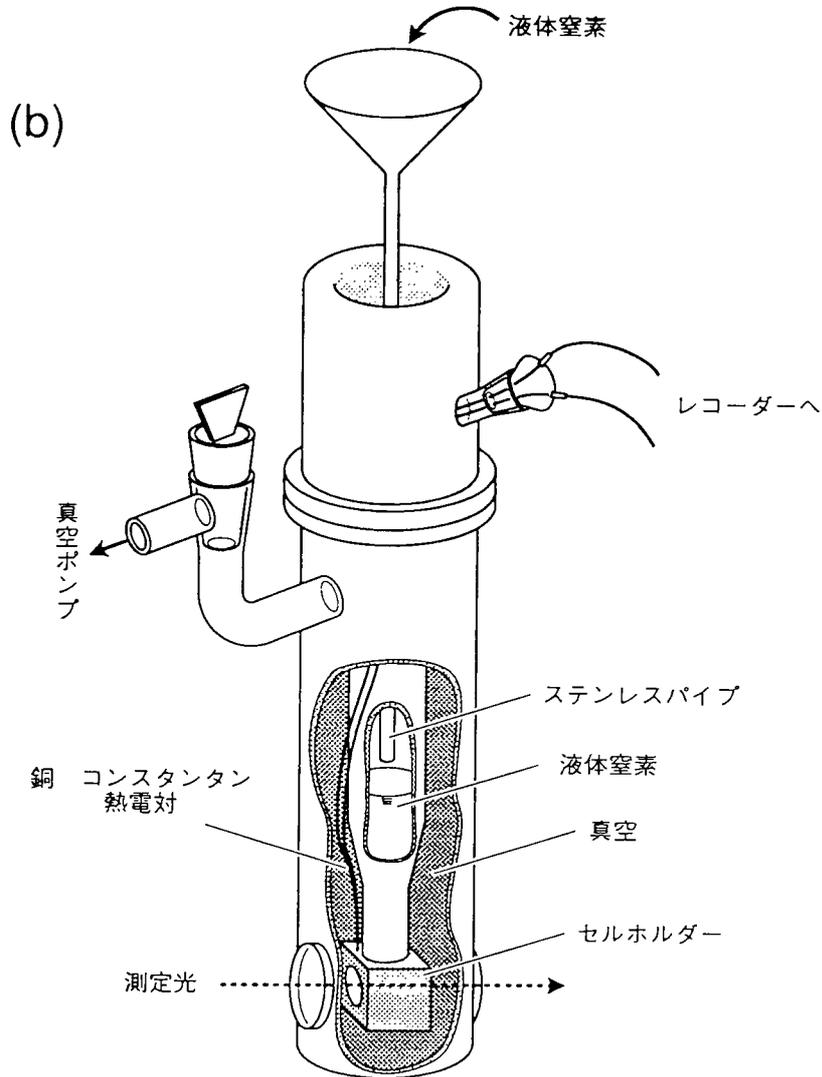


図 2-1 : 低温スペクトル法に用いる実験装置。

(a) 分光光度計内のセットアップ。分光光度計のふたを取り除き、クライオスタットを立てた。その部分は塩化ビニル製の暗箱でおおって遮光した。照射光源には 1000W のスライドプロジェクターを用い、各種光学フィルタを組合せ、波長を選択した。分光光度計の外板に穴をあけ、照射光を導いた。電磁石で可動するミラーを置き、照射時には測定光と同軸に照射出来るようにした。照射しない時の遮光のため、外板の穴には電磁シャッターを置いた。また、照射時に光電子増倍管を保護するため、ここにもシャッターを置いた。試料セルの片側をオパールガラスにしたときには、光量を揃えるため、対照光側にもオパールガラスを置いた。オパールガラスを入れていない時には、対照側試料セルに試料を充填した。測定データはパーソナルコンピュータに転送し、保存、解析を行なった。



(b) ガラス製クライオスタットの構造。本体は二重構造になっており、間を真空ポンプで真空に保つことにより断熱した。冷媒には液体窒素を用い、滴下量を加減することによって温度を制御した。
 (c) 試料セルホルダーの構造。熱伝導性がよく、熱容量の大きい銅製ブロックから削り出して製作されている。シリコンゴム製のスペーサーと石英窓、またはオパールガラスを組合せ、その間に試料を充填した。それを銅ブロックに入れ、ねじどめた。銅ブロックに銅 コンスタンタン熱電対を取り付け、温度をモニターした。

[2-3 結果]

2-3-1 pR 試料の吸収スペクトル

用いた pR 試料の吸収スペクトルを図 2-2 に示した。pR 膜試料のスペクトル（カーブ 1）は、420 nm 付近に鋭いピークを示したが、これは試料中に含まれるチトクロムの吸収である。また、500～550 nm にみられる波うったスペクトルは、試料に含まれるバクテリオルベリン（カロチノイドの一種）に由来する。pR の吸収極大は 489 nm にあるが（2-3-2）、試料の吸収スペクトルには pR の存在を示す吸収があらわれていない。そこで、試料を 0℃ に保ち、>480 nm 以上の光で 1 分間照射した後の 480 nm の吸光度の回復によって、含まれる pR の量を見積った（挿入図）。pR 膜試料では、吸光度の回復は 0.001 程度であるが（トレース a）、これに全トランス型レチナールを加え、試料中の pR オプシンを再生させた後では、0.006 に増大した（トレース b）。この試料をグリセリンに懸濁して、超遠心（ $100000 \times g$ 、14 時間）で濃縮した後の試料では、吸光度の回復は 0.015 に増大した（トレース c）のと同時に、試料自体の吸光度が減少し、バクテリオルベリンも除去できた（カーブ 2）。また、トレース c の S/N 比は最も高く、低温スペクトル法による測定に用いることができた。しかし、チトクロムに由来する高い吸光度のため、440 nm 以下の領域では、正確なスペクトルを測定することが出来なかった。

2-3-2 pR の絶対吸収スペクトル

上記のように、試料中に多量の不純物が混在しているため、試料のスペクトルを測定しても、pR の絶対吸収スペクトルを求めることができなかった。そこで、以下の方法により決定した。

まず、pR オプシン/グリセリン試料に、エタノールに溶解した全トランス型レチナールを加え、室温で 30 分間暗保した後のスペクトルを記録した。次に、別の pR オプシン/グリセリン試料に、等量のエタノールのみを加えたスペクトルを記録した。これらの二つのスペクトルの差を計算すると、再生した pR と、pR オプシンとの差スペクトルが得られる。このスペクトルの可視領域は、pR のスペクトルと見なすことができる（図 2-3 a）。このスペクトルでは、吸収極大は 491 nm に位置し、460 nm 付近に振動構造に由来するショルダーが見られた。しかし、レ

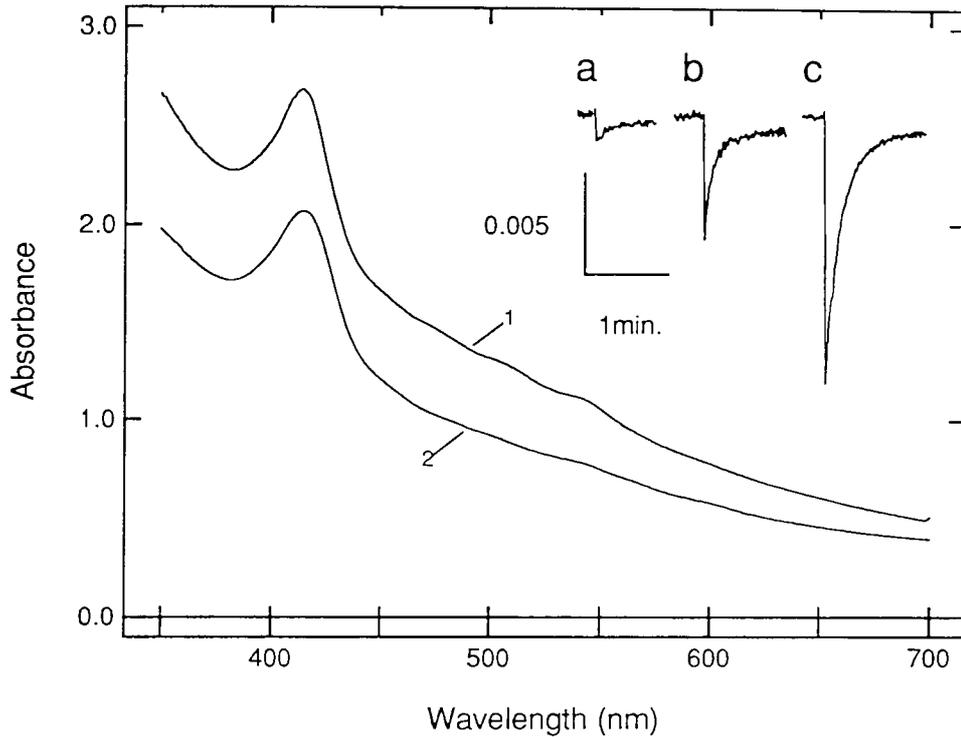


図2-2：実験に用いた pR 試料の吸収スペクトル。

カーブ1は ON1-bW株の膜断片懸濁液の吸収スペクトル、カーブ2は低温スペクトル法に用いた pR/グリセリン試料のスペクトルである。それぞれの試料に含まれる pR の量は、試料を 0℃、 $> 480\text{nm}$ の光で 1 分間照射し、その後の 480nm での吸光度の回復から見積った（挿入図 a～c）。ON1-bW株の膜断片では a のようになった（カーブ1に対応）。この試料に全トランス型レチナールを加え、試料中の pR オプシンを再生させると、b のように含量が約 5 倍になった。超遠心による濃縮で、c のようにさらに濃度が増すと同時に、濁度が低下した（カーブ2に対応）。c の S/N 比が最も高かった。

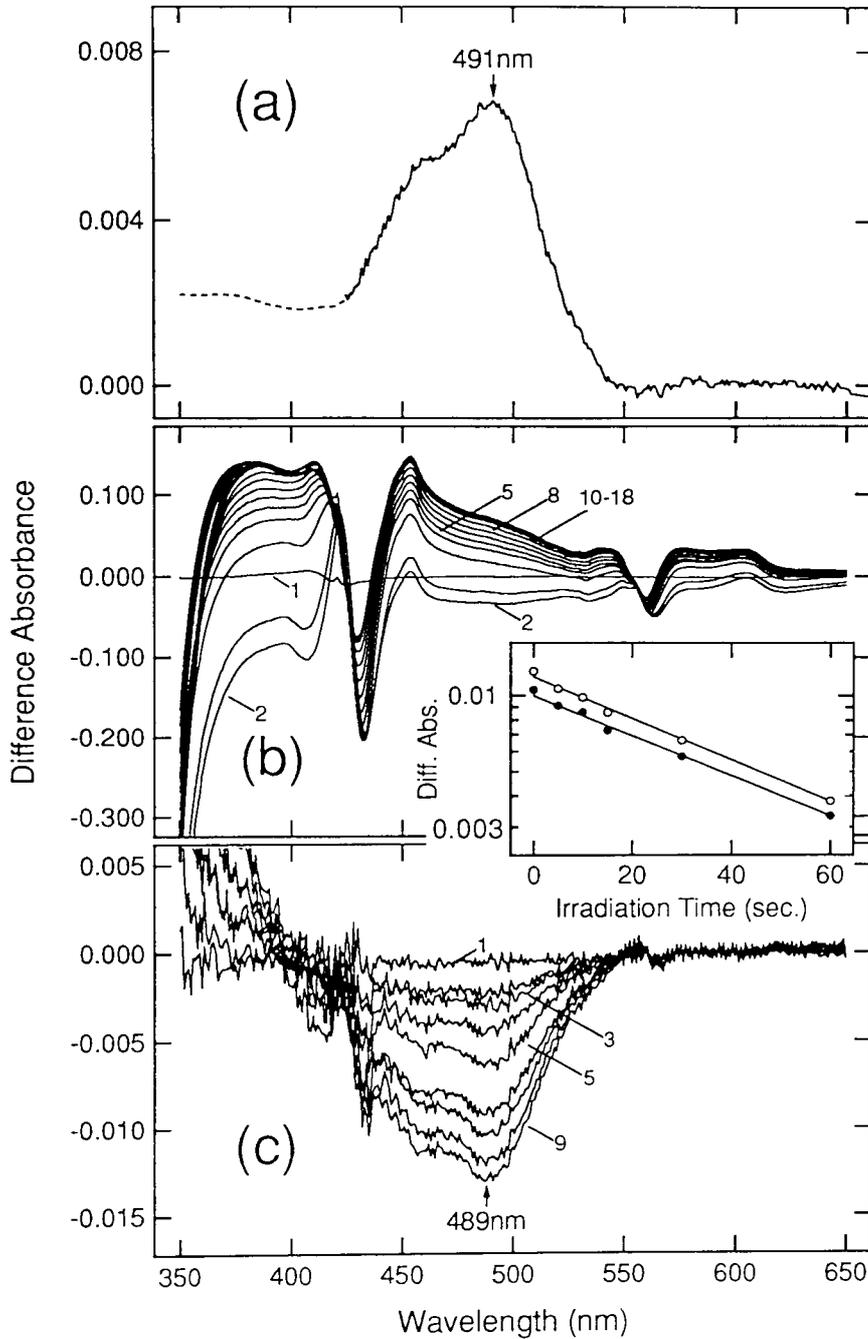


図2-3 pRの絶対吸収スペクトルの決定。

(a) pRオプシン/グリセリン試料に全トランス型レチナルを加える前後の差スペクトル。吸収極大波長は491nmであった。

(b) pR/グリセリン試料(カーブ1)に、0℃で終濃度それぞれ2mMの $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ と10mMのヒドロキシルアミンを加えて、チトクロムを還元したときのスペクトル変化。測定間隔は30分である(カーブ2~18)。

(c) (b)で還元反応の終了した試料をベースラインとして記録した(カーブ1)。次に、501nmの光で順に合計5、10、15、30、60、120、240、480秒照射し、pRを光退色させた時のスペクトル変化を記録した(カーブ2~9)。

(挿入図) (c)での吸光度変化を、照射時間に対してプロットした。白丸は吸収極大波長である490nm、黒丸はショルダーである460nmでの値である。いずれもほぼ平行な直線上に乗り、ショルダーが混入成分のものではなく、pR自身に由来することが確認できた。

チナール蛋白質の吸収スペクトルにこのような振動構造が現れることは特異的である。また、試料中にはチトクロム等の多量の不純物があり、これがエタノール等によってスペクトル変化を起こし、見かけ上、振動構造が現れた可能性もある。そのため、このスペクトルは他の方法によって、さらに確認する必要があると考えられた。そこで、pR/グリセリン試料をヒドロキシルアミン存在下で光退色させたときの差スペクトルを求めた。

ヒドロキシルアミンには還元作用があるため、その存在下では試料に多量に含まれるチトクロムの還元反応によるスペクトル変化が大きく観測され、pRの退色に伴うスペクトル変化が隠れてしまう。そこで、終濃度10mMのヒドロキシルアミンを試料に加えると同時に、チトクロムの還元に広く用いられているナトリウムジテトラヒドロ硫酸イットナトリウム ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 終濃度2 mM) を加えた。その後試料を、0℃、暗中で8時間放置し、チトクロムの還元反応を完了させた(図2-3b)。その後、501nmの光で照射し、pRを退色させ、その前後の差スペクトルを求めた(図2-3c)。求めた差スペクトルでは、吸収極大は489nmであり、再生から求めた値(図2-3a)と誤差範囲内で一致した。また、吸収極大である490nmと、ショルダーである460nmの吸光度変化を照射時間に対して片対数プロットすると、平行な2本の直線になった(図2-3、挿入図)。このことから、460nmのショルダーがpR自身に由来するものであり、pRが二成分のものの混合物ではないことが確認できた。

2-3-3 pRの光反応初期過程

続いてpRの光反応過程の解析を行った。図2-4、5には、pRの-170℃での光反応過程を示している。実験では、まず、試料の吸収スペクトルをベースラインとして記録し、その後のスペクトル変化は、もとのpRとの差スペクトルの形で記録した。実験で得られた差スペクトルは、各パネルの挿入図に示している。また、試料中のpR量を見積り(2-3-6 参照)、そのスペクトルを足し合わせたスペクトルをメインパネルに示している。メインパネルのスペクトルは、不純物のスペクトルをベースラインとして記録したときと同じ、つまりpR自身のスペクトル変化と考えて差し支えない。

pR/グリセリン試料をクライオスタット内の試料セルにセットし、-170℃に冷却した。この試料に436nmの光を照射したところ、520nmを極大とする吸光度の増大と、490nm、450nmを極小とする吸光度の減少と観測された(図2-

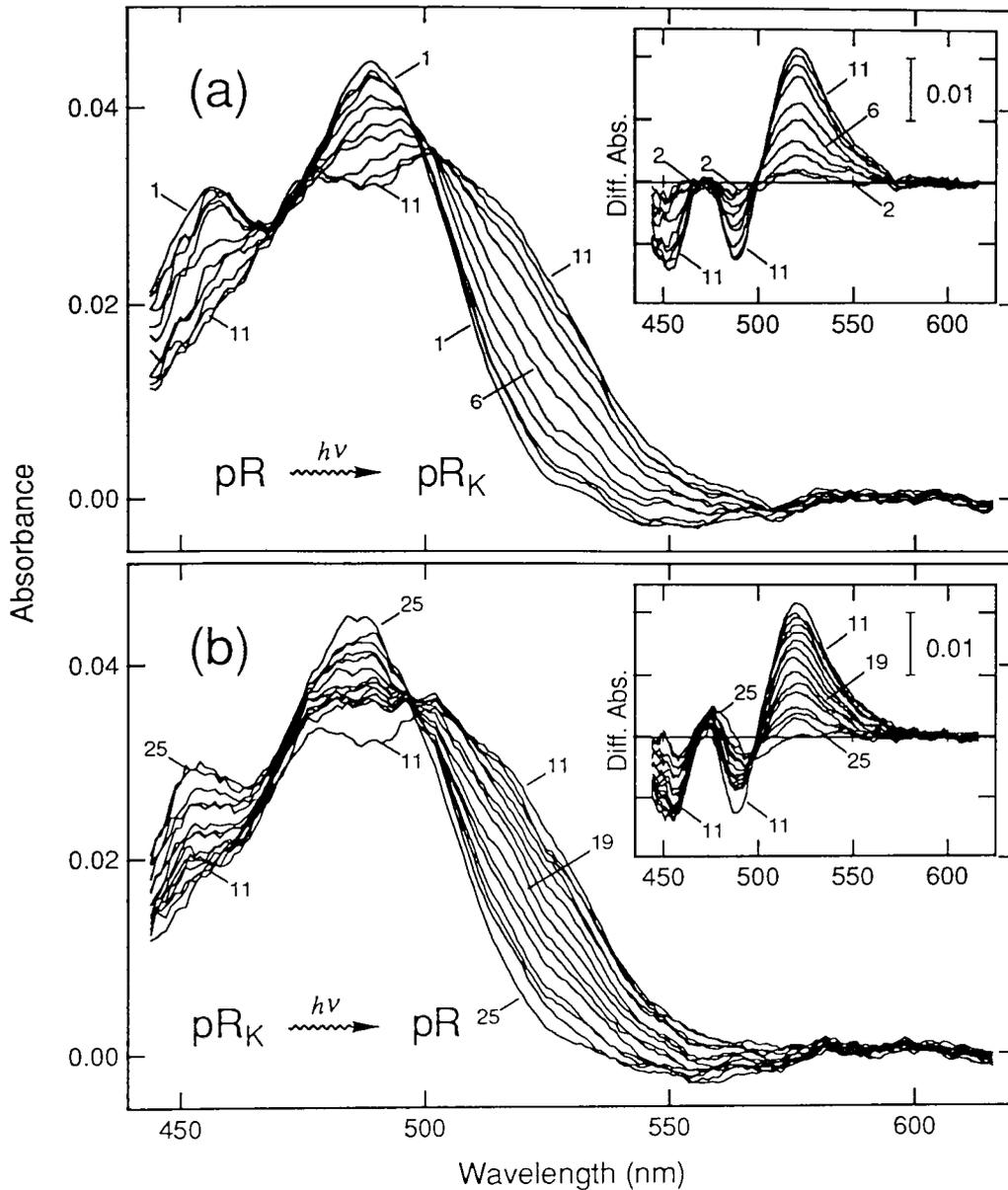


図2-4 pRの-170℃での光反応によるpR_Kの生成。

以下の実験では、初めに試料の吸収スペクトルをベースラインとして記録し、照射後の差スペクトルを測定した。その実験データを挿入図に示している。また、その差スペクトルを、後で求めるpRの絶対吸収スペクトルと合成して、pRのスペクトル変化のみをあらわしたものをメインパネルに示している。挿入図とメインパネルで、カーブ番号はそれぞれ対応している。

(a) 挿入図：pR/グリセリン試料を-170℃に冷却し、そのスペクトルをベースラインとして記録した。次にこの試料を436nmの光で順に合計5、10、20、40、80、160、320、640、1280秒照射し、照射前との差スペクトルを測定した(カーブ2~11)。図挿入図の差スペクトルを、pRのスペクトルに足し合わせたスペクトル。長波長産物(pR_K)の生成が見られる。

(b) 挿入図 (a)のカーブ11の試料を、-170℃、>590nmの光で順に合計5、10、20、40、80、160、320、640、1280、2560、5120、10240、20480秒照射し(カーブ12~24)、その後、>560nmの光で160秒間照射した(カーブ25)。図挿入図の差スペクトルを、pRのスペクトルに足し合わせたスペクトル。pR_Kは消失するが、ベースラインには戻らず、他の産物が生成していることを示す。

4 a、挿入図)。極小が2つ見られたのは、もとの pR のスペクトルが振動構造を持つことに由来する。この変化が吸収スペクトルの長波長シフトに由来することは、メインパネルのスペクトル変化から明かである。このスペクトル変化はやがて飽和するが(図2-4 a、カーブ11)、これは、pR よりも長波長側に吸収極大をもつ中間体を主に含む、光平衡混合物が生成したことを示す。この中間体は、液体窒素温度近くで生成する長波長産物という点で、bR のK 中間体に対応することから、ここでは pR_K と呼ぶ^(註)。この試料を、 $>580\text{ nm}$ の光を照射すると、スペクトルは短波長側にシフトし、もとの pR のスペクトル(ベースライン) に近づいていった(図2-4 b、挿入図)。しかし、十分に光を照射して生成した産物のスペクトル(カーブ25) は、完全にはベースラインに一致しないことから、 $-170\text{ }^\circ\text{C}$ における光反応では、pR、 pR_K 以外の産物が生成することがわかる。

次に、pR、 pR_K 以外の産物がどのようなものかを明らかにするため、pR/グリセリン試料を、 $>480\text{ nm}$ の光で照射した(図2-5 a、挿入図)。今度は 490 nm と 450 nm を極小とする吸光度の減少と、 470 nm を極大とするわずかな吸光度の増大が見られた。メインパネルで明らかのように、このスペクトル変化は、pR から、そのスペクトルの形はそのままに、約 10 nm 短波長シフトした光産物が生成したことを表している。この中間体は、短波長側にシフトしていることから、ここでは pR_H と呼ぶ(H Hypso = 短波長)。この試料を 436 nm の光で照射すると、スペクトルが長波長側にシフトし、pR を 436 nm で照射したときと同様のスペクトルが得られた(図2-5 b、挿入図)。このことから、 $-170\text{ }^\circ\text{C}$ では、pR、 pR_K 、 pR_H の3つが互いに光平衡状態にあることがわかった。

次に pR_K と pR_H の熱反応を解析した(図2-6)。まず、pR/グリセリン試料を、 $-170\text{ }^\circ\text{C}$ で $>480\text{ nm}$ の光で照射し、 pR_H を主に含む光平衡混合物を生成させた(図2-6 a、カーブ2)。この試料の温度を $10\text{ }^\circ\text{C}$ ずつ上げ、その都度 $-170\text{ }^\circ\text{C}$ に冷却してスペクトルを測定した(図2-6 a、挿入図)。その結果、 pR_H は温度の上昇にともない、ベースラインに近づいていった。このことは、メインパネルで明らかのように、 pR_H は熱反応によって pR に戻った事を示している。完全にはベースラインに一致しないが、これは $-170\text{ }^\circ\text{C}$ で生成した光平衡混合物に、少量の

^(註) 参考論文1、3の公表段階では、pRの絶対吸収スペクトルが求められていなかったので、pRのことを、その差吸収極大から pR_{480} と呼んでいた。その後、絶対吸収極大を 489 nm と決定したので、主論文1では pR_{490} と呼んでいる。また、 pR_H は、主論文1では、その吸収極大から P_{480} と呼んでいるので、 pR_{480} との混同に注意されたい。 pR_K 、 pR_M 、 pR_O はそれぞれ主論文、参考論文中での P_{520} 、 P_{350} 、 P_{530} のことである。

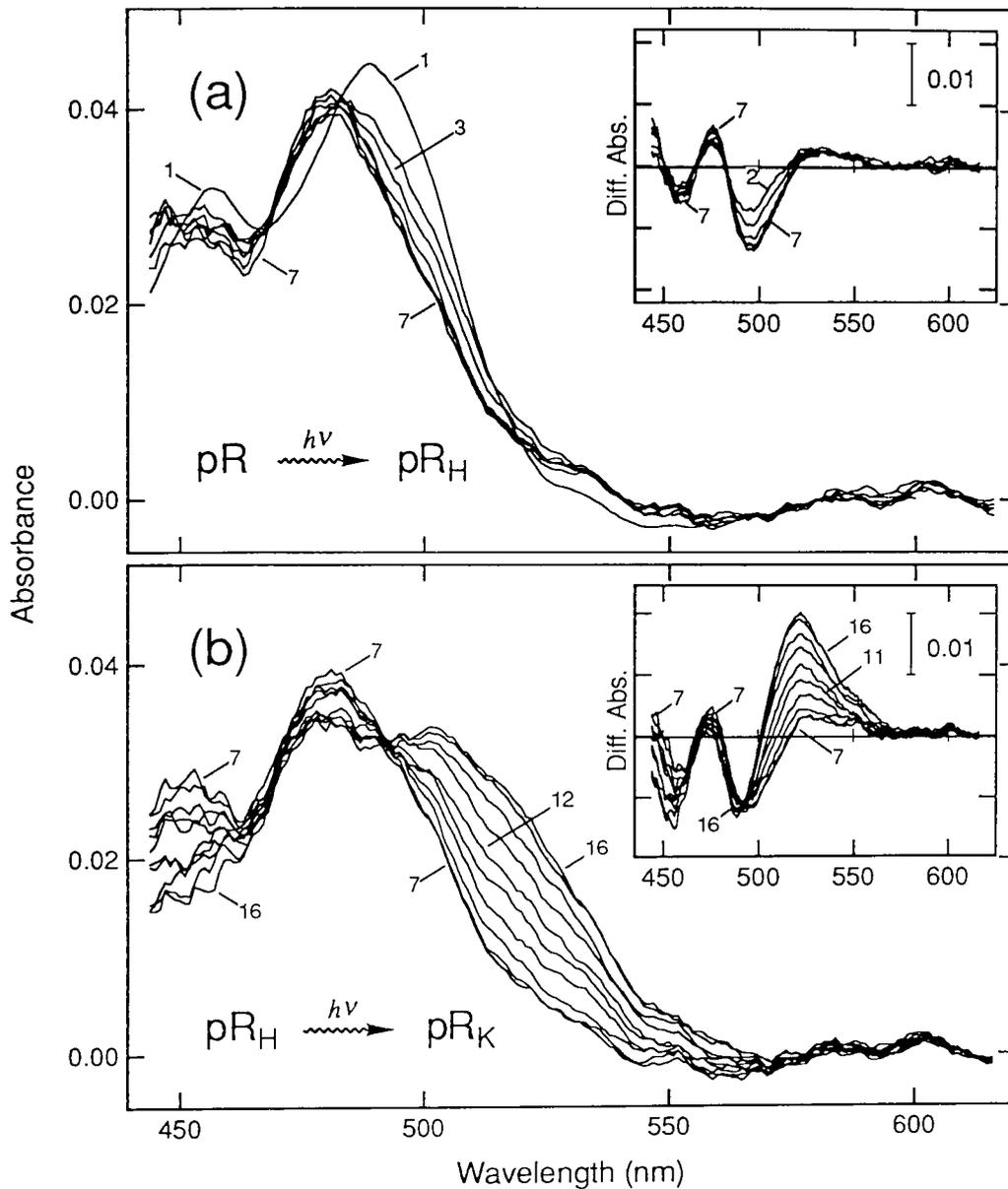


図2-5 pRの -170°C での光反応による pR_H の生成。

図2-4と同じく、初めに試料の吸収スペクトルをベースラインとして記録し、照射後の差スペクトルを測定した。その実験データを挿入図に示している。また、その差スペクトルを、後で求めるpRの絶対吸収スペクトルと合成して、pRのスペクトル変化のみをあらわしたものをメインパネルに示している。挿入図とメインパネルで、カーブ番号はそれぞれ対応している。

(a) 挿入図 pR/グリセリン試料を -170°C に冷却し、そのスペクトルをベースラインとして記録した。次にこの試料を436nmの光で順に合計5、10、20、40、80、160秒照射し、照射前との差スペクトルを測定した(カーブ2~7)。図:挿入図の差スペクトルを、pRのスペクトルに足し合わせたスペクトル。短波長産物(pR_H)の生成が見られる。

(b) 挿入図: (a)のカーブ7の試料を、 -170°C 、436nmの光で順に合計5、10、20、40、80、160、320、640、1280秒照射し、もとのpRとの差スペクトルを測定した(カーブ8~16)。図:挿入図の差スペクトルを、pRのスペクトルに足し合わせたスペクトル。再び pR_K の生成が見られ、pR、 pR_K 、 pR_H の3成分が光平衡状態にあることがわかる。

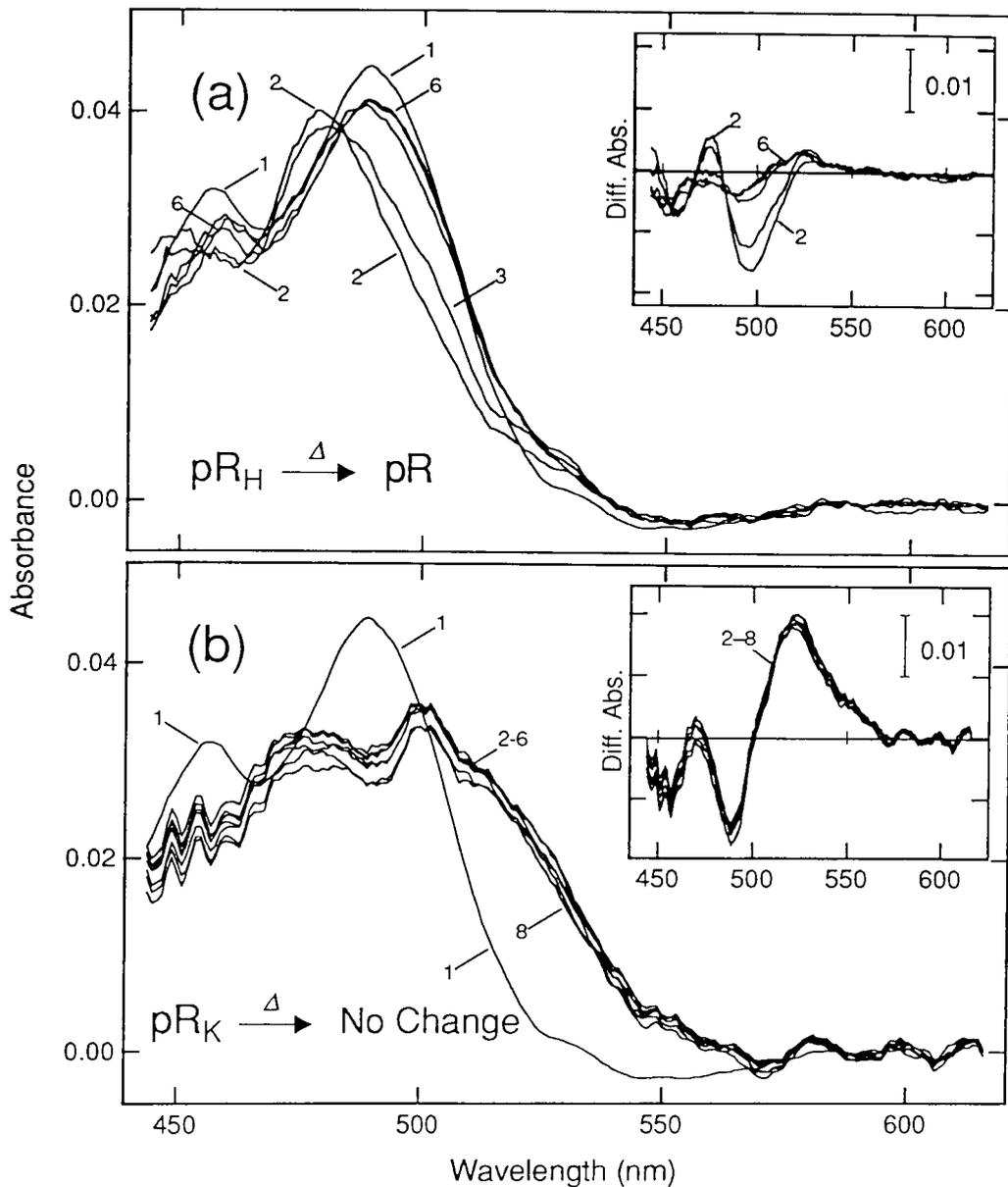


図2-6: pR_K 、 pR_H の熱反応の解析。

(a) pR_H の熱反応。挿入図 pR 試料を -170°C に冷却し、その吸収スペクトルをベースラインとして記録した(カーブ1)。その後、 $> 480\text{ nm}$ の光で秒間照射し、主に pR_H を含む光平衡混合物を生成させた(カーブ2)。続いて、試料の温度を順に -160 、 -150 、 -140 、 -130°C まで温め、その都度試料の温度を -170°C まで冷却してスペクトルを測定した(カーブ3~6)。図: 挿入図の差スペクトルを、 pR のスペクトルに足し合わせたスペクトル。 pR_H は熱反応によってもとの pR に戻った。

(b) pR_K の熱反応。挿入図: pR 試料を -170°C に冷却し、その吸収スペクトルをベースラインとして記録した(カーブ1)。その後、 436 nm の光で1280秒間照射し、主に pR_K を含む光平衡混合物を生成させた(カーブ2)。続いて、試料の温度を順に -160 、 -150 、 -140 、 -130 、 -120 、 -110 、 -90°C まで温め、その都度試料の温度を -170°C まで冷却してスペクトルを測定した(カーブ3~9)。図 挿入図の差スペクトルを、 pR のスペクトルに足し合わせたスペクトル。 pR_K は -90°C 以下では安定であった。

pR_Kが含まれていたためであると考えられる。

一方、pR_Kの熱反応を調べるため、まず、pR/グリセリン試料を-170℃で436nmの光で照射し、pR_Kを生成させた(図2-6b、カーブ2)。次に試料の温度を徐々に上げ、その都度-170℃に冷却してスペクトルを測定した(図2-6b、挿入図)。ところが、-90℃まででは有為なスペクトル変化は観測されなかった(図2-6b)。そのことから、pR_Kは少なくとも-90℃以下では安定であることがわかった。

一般に、一旦液体窒素温度に冷却した試料を、-100~-60℃付近まで温めると、試料中の水分子が結晶構造をとるため試料が白濁する(Micro crystals)。そのため、この実験でも、-90℃以上に温度を上げた後でのスペクトル変化を測定することはできなかった。

2-3-4 pR_K以降の反応

pR_K以降の光反応過程を明らかにするため、-90℃以上の熱反応を観測する必要があるが、上記の方法ではベースラインの乱れが大きすぎて、正確なスペクトルを測定できなかった。そこで、-80~-30℃の温度領域で、温度を固定したまま試料を照射し、そのスペクトル変化から、生成する中間体の挙動を観測した。照射光はいずれも436nmである(図2-7)。

-80℃では(図2-7a)、520nmを極大とする吸光度の増大が観測され、光照射によってスペクトルの長波長シフトがおこることがわかった。このスペクトル変化は、-170℃でpRを光照射し、pR_Kを生成させた時(図2-4a、挿入図)とほとんど同じであった。さらに、pR_Kが-90℃まで安定であった事から考え合わせると、-80℃で生成した中間体は、-170℃で生成したのと同じくpR_Kであると考えられる。-70℃でも同様のスペクトル変化が観測された(図2-7b)。-60℃(図2-7c)、-50℃(図2-7d)では、520nmの吸光度の増加量が、-80℃、-70℃よりも少なく、生成するpR_Kの量が少ない事をあらわしている。これは、一旦生成したpR_Kが、-60℃以上では不安定であり、次の中間体に変化してしまったためであると考えられる。-40℃では、pR_Kの生成はほとんど見られなかった(図2-7e)。この時の差スペクトルのマイナス側の形は、極小が490nmにあり、460nmにショルダーが見られる。つまりpRの絶対吸収スペクトルと同様の形をしている。そのため、-40℃で生成した中間体は、ここで測定した440nm以上の波長領域では、吸収をもたないと考えられる。室温ではす

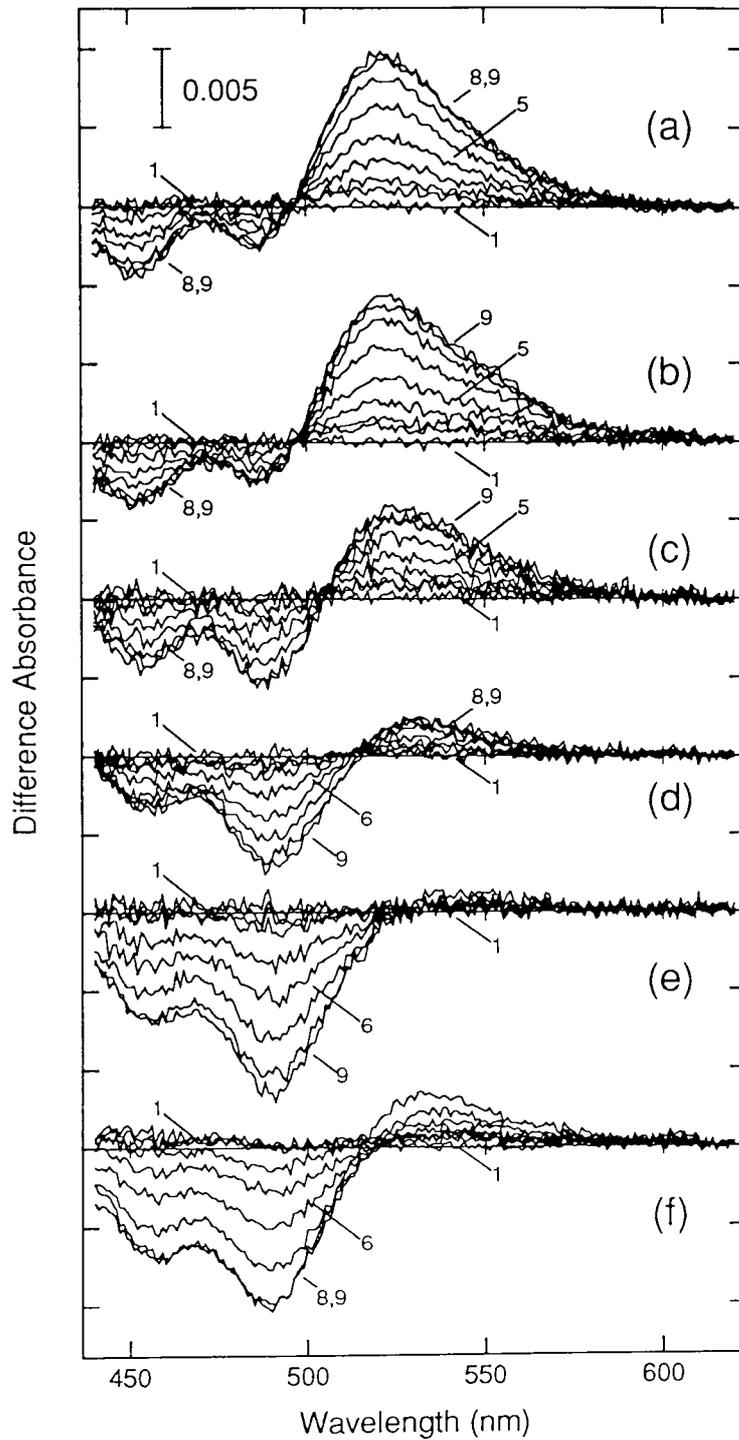


図2-7 -80°C ～ -30°C の温度領域でのpRの光反応。

各々のパネルで、照射温度以外の実験条件は全て同じである。まず、各温度でpR/グリセリン試料のスペクトルをベースラインとして記録した(カーブ1)。続いて試料を436nmの光で合計5、10、20、40、80、160、320、640秒間照射した(カーブ2～9)。各パネルでの照射温度は以下の通りである。(a) -80°C 。(b) -70°C 。(c) -60°C 。(d) -50°C 。(e) -40°C 。(f) -30°C 。

で、350nmに吸収極大をもち、440nm以上の波長領域に吸収をもたない中間体 pR_M (P_{350}) の生成が観測されている (Tomioaka et al., 1986)。そのため、 -40°C でのスペクトル変化は、pRから pR_M への変化に由来すると考えられる。 -30°C では、再び長波長シフトした中間体の生成が観測された (図2-7f)。この中間体は、室温で観測されている、吸収極大を530nmにもつ pR_O (P_{530}) であると考えられる (Tomioaka et al., 1986)。

以上の測定では、光照射時における中間体の生成を観測したが、 pR_M 、 pR_O の崩壊過程を観測することはできなかった。通常のスเปクトルの測定には数分を要するので、 pR_M や pR_O の崩壊を観測しようとする、反応が完結するまでに数時間を要するような温度に設定しなければ、正確なスペクトル変化は測定できない。ところが、今回のように濁度の高い試料では、数時間たつとベースラインの乱れが無視できなかつた。そこで、分光光度計の測定波長を固定して吸光度変化を測定した。このような測定では、照射後数秒からデータを得られるので、より速い反応に対応でき、ベースラインが乱れる前に反応が完結するような温度に設定できた。本実験では、試料の温度を -10°C に設定し、10分程度で反応が完結するようにした。

まず、試料を -10°C に冷却し、 $>480\text{nm}$ の光で1分間照射し、その後の吸光度変化を610nm~440nmまでの、10nmおきの各波長で測定した。そして、測定した吸光度変化の、一定時間後の値を波長に対してプロットし、スペクトルの時間変化を表した (図2-8)。その結果、照射直後~2分以内では、480nmを中心とした吸光度の回復が見られた (図2-8a)。また、2~8分の時間では、510nmに等吸収点をもち、530nmの産物から、480nmの産物への変化過程が観測された (図2-8b)。これらの変化過程を特徴づける、典型的な波長での吸光度変化を図2-8cに示した。530nmでは、一度吸光度が増加し、その後減少している。480nmの吸光度の回復は、2成分反応で近似される。また、2~8分後の反応の等吸収点にあたる510nmの吸光度変化は、一次反応で近似できた。これらのことから、 -10°C で試料を照射すると、照射直後~10分間には、2つの反応が含まれていることがわかった。吸光度変化の起こる波長領域から、一つの反応は pR_M から pR_O への反応で、もう一つは pR_O から、もとのpRへの反応であると考えられる。0~2分では、この両者が複合した反応が観測されている。また、2~8分では、 pR_M から pR_O への反応は完結しており、 pR_O からpRへの反応のみが観測されている。非線形最小自乗法により、 -10°C での pR_M と pR_O の崩壊の時定数を求めたところ、それぞれ50秒と160秒であった。室温での時定数は、それぞれ

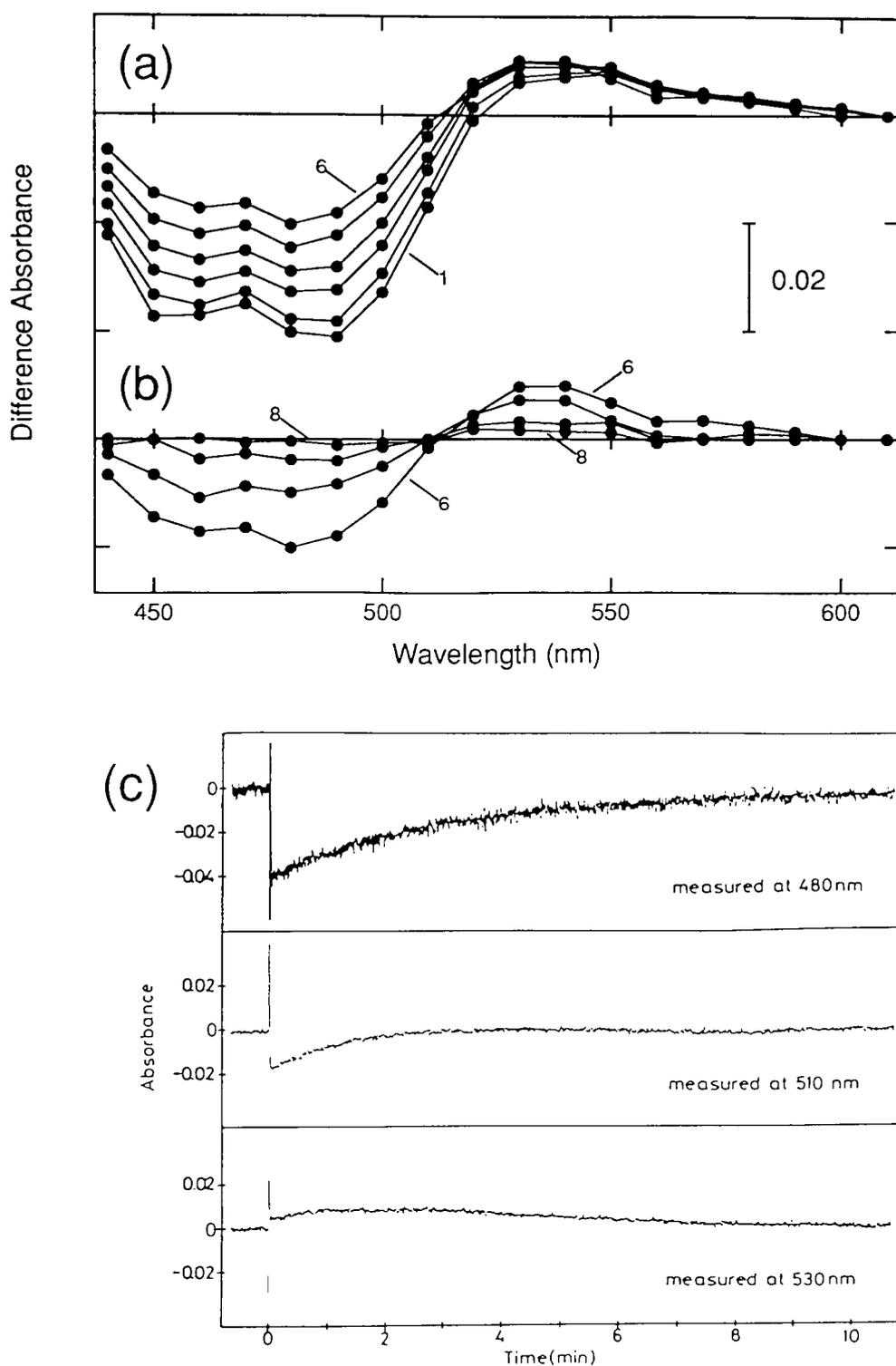


図2-8：pR_Mの熱反応過程。

試料を -10℃ に冷却し、> 480nm の光で 1 分間照射した。その後、分光光度計の波長を固定し、照射後の吸光度の変化を記録した。測定は、610 ~ 440nm の間で、10nm おきに行った。その後、以下の時間での差吸光度を、波長に対してプロットし、差スペクトルをあらわした。

(a) 照射後、10 秒、20 秒、40 秒、1 分、2 分後の差スペクトル (カーブ 1 ~ 6)。主に pR_M から pR₀ を経て pR に戻る過程が観測された。

(b) 照射後 2 分、4 分、6 分、8 分後の差スペクトル (カーブ 6 ~ 9)。主に pR₀ から pR への変化過程が観測された。

(c) 480nm、510nm、530nm における典型的な吸光度変化のトレース。

2-3-5 L 中間体の検索

図2-7に示した実験では、 -80°C と -70°C の光照射では、pRと pR_K の差スペクトルが得られ、それらが一致することから、 pR_K は -70°C までは安定に生成すると考えられる。一方、 -40°C の光照射では、 440nm 以上の吸光度の増加が無視できることから、 pR_M のみが生成すると考えられる。つまり、もし pR_L が存在するのであれば、それは -70°C と -40°C との中間の温度領域、例えば -60°C で生成しているはずである。そこで、以下の方法により、 pR_L が存在するかどうかを検討した。

まず、 -60°C で試料を照射した前後の差スペクトルでは、少量の長波長産物が生成するが(図2-7c)、これが pR_K のみに由来するのかどうかをスペクトルの形状から検討した(図2-9)。始めに、pR試料を -80°C に冷却し、 436nm の光で640秒照射し、 pR_K を主に含む光平衡混合物を生成させた(図2-9a、カーブ1)。この試料に $>540\text{nm}$ の光を照射すると、 pR_K からpRへの反応がおこるので、その前後の差スペクトルを計算することにより、 pR_K とpRの差スペクトルが得られた(図2-9b、カーブ1')。次に、同様の方法により、 -80°C での光照射によって pR_K を生成させた後、 -60°C で30分暗保し、再び -80°C でスペクトルを記録すると、 pR_K の崩壊が起こっている事がわかった(図2-9a、カーブ2)。この時、図に示したように、 450nm 以上では、全体的に吸光度が減少しているので、 450nm 以上に吸収を持たない中間体、すなわち pR_M が生成していると考えられる。 pR_L は pR_M の前に生成する中間体であり、 pR_M よりも長波長側に吸収極大を持っていると期待される。また、図2-9aのカーブ2には、 520nm を極大とする長波長成分が残存しているため、この長波長成分には pR_L が含まれている可能性がある。そこで、長波長成分を -80°C で、 $>540\text{nm}$ の光で照射し、その前後の差スペクトルを計算した(図2-9b、カーブ2')。この差スペクトルを、 -80°C で得られたpRと pR_K の差スペクトルと比較した(図2-9c)。その結果、両者は非常によく一致したので、長波長成分は pR_K のみであり、少なくともこの長波長成分には pR_L は含まれていないことが明らかになった。

次に、コンピュータシミュレーションにより、 -60°C の差スペクトルに pR_L の寄与が含まれていないかどうかを検討した(図2-10)。pRを 436nm の光で照射する前後の差スペクトルを、 -80 、 -60 、 -40°C の3つの温度で測定した(図2-7a、c、e)。上記のように、 -80°C では、pRと pR_K の差スペクトル、 -40°C ではpRと pR_M の差スペクトルが得られる。一方、 -60°C では、そのスペ

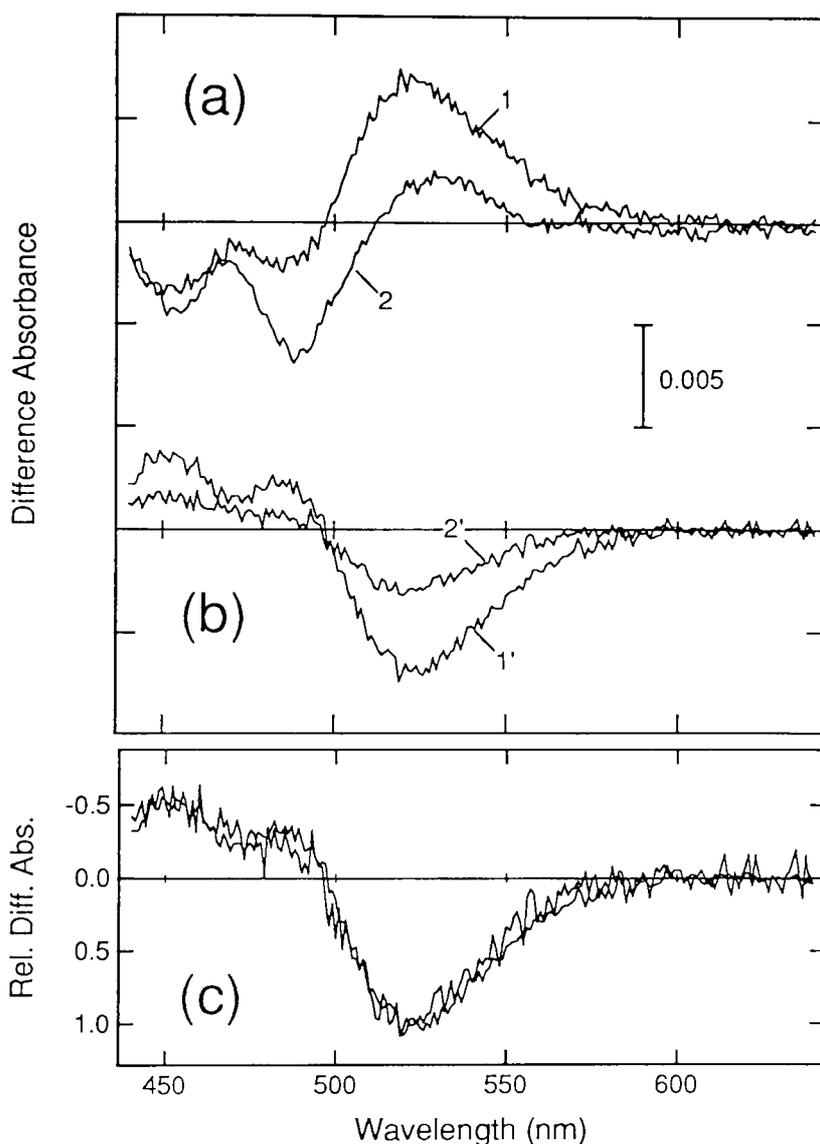


図2-9：長波長産物のスペクトル解析によるL中間体の検索。

まず、pRグリセリン試料を -80°C に冷却し、そのスペクトルをベースラインとして記録した。その後、試料を 436nm の光で 640 秒間照射した（パネルa、カーブ1）。続いて試料を $>540\text{nm}$ の光で 80 秒間照射し、その照射前後の差スペクトルを測定した（パネルb、カーブ1'）。次に別の試料を、パネルaのカーブ1と同様に -80°C で照射した後 pR_k を生成させた後、 -60°C で 30 分間暗保し、再び -80°C に冷却してスペクトルを測定した（パネルa、カーブ2）。続いてこの試料を $>540\text{nm}$ に光で 80 秒間照射し、その前後の差スペクトルを測定した（パネルb、カーブ2'）。カーブ1'と2'のそれぞれの極大でノーマライズして比較するとほぼ一致することから（パネルc）、 -80°C 、 -60°C の産物は、いずれも pR_k であると言える。

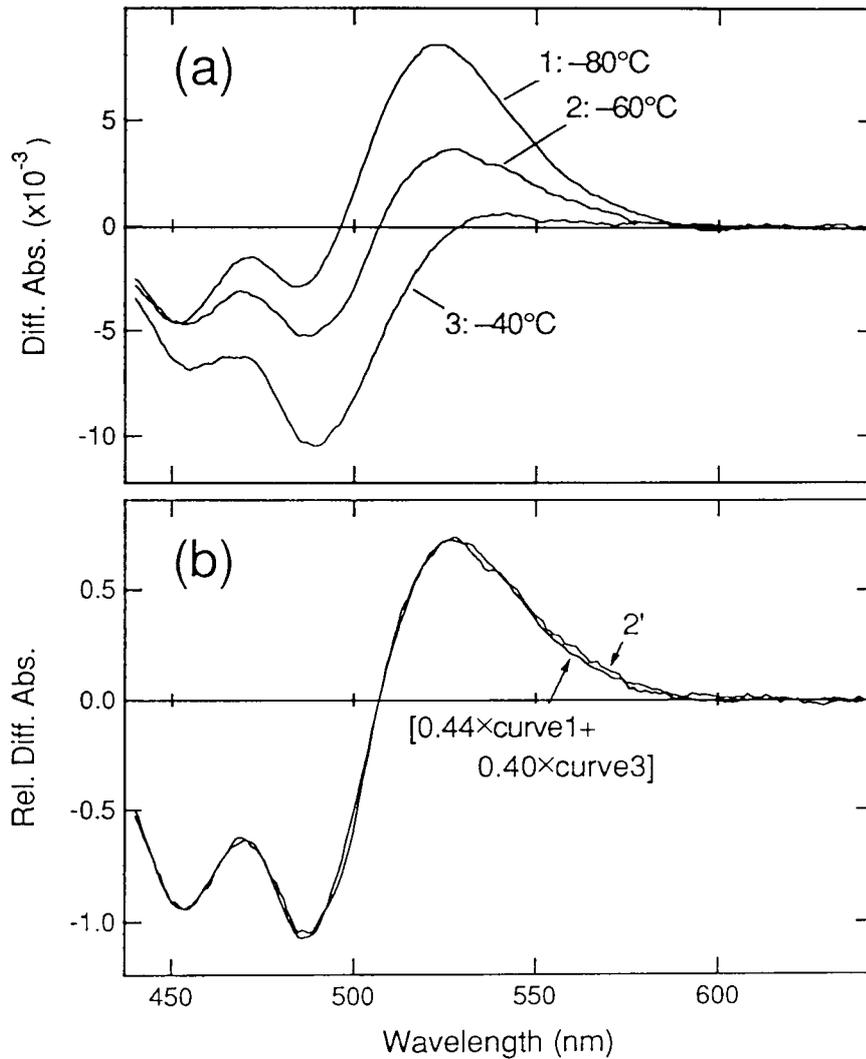


図2-10：コンピュータ シミュレーションによるL中間体の検索。

-60℃での照射前後の差スペクトルに、 pR_L の寄与があるかどうかを検討した。

(a) pRグリセリン試料を-80℃、-60℃、-40℃の各温度で、436nmの光を320秒間照射し、照射前後の差スペクトルを測定した（それぞれカーブ1、2、3）。これらは図2-7のパネルa、c、eのカーブ8と同一である。

(b) 44%のカーブ1と40%のカーブ3の和は、カーブ2と一致する。そのため、-60℃のスペクトルには、 pR_L の寄与はないと結論できた。

クトルの形状は、pR と pR_M の差スペクトルとは一致しないので、もし pR_L が存在するならば、その中に含まれるはずである。そこで、コンピュータ シミュレーションによって、-60℃ の差スペクトルを、-80℃ と -40℃ の差スペクトルの和で再現させることを試みた。-80℃ と -40℃ の差スペクトルの和には、pR、pR_K、pR_M の3成分しか含まれないため、その和で再現されれば、pR_L のスペクトルの寄与は含まれないと言える。実際に44%のカーブ1と40%のカーブ3を足し合わせたスペクトル^(註)は、-60℃の差スペクトルによく一致したので(図2-10b)、pR_Lの生成はみとめられないと結論した。

2-3-6 pR と中間体の絶対吸収スペクトル

本実験では、pR_H と pR_K という二つの光産物が新たに見いだされた。これらの産物の性質をより明らかにするためには、それらの絶対吸収スペクトルを求める必要がある。ところが、実験的にはもとの pR との差スペクトルのみが求められるので、それらの絶対吸収スペクトルは、実験で得られた差スペクトルと pR のスペクトルから計算で求めなければならない。2-3-2 では、pR の20℃あるいは0℃の吸収スペクトルを求めた。しかし、一般にレチナル蛋白質を低温に冷却すると、スペクトルの半値幅が狭くなるのと同時に、吸収極大がやや長波長側に移動する。言うまでもなく、本実験では光産物と pR との差スペクトルを低温で記録したので、常温での吸収スペクトルをそのまま計算に用いることはできない。そこでまず始めに、低温での pR の吸収スペクトルを求めた。

前述のように、-40℃で pR 試料を照射すると、pR と pR_M の差スペクトルが得られる。pR_M の吸収極大は350nmにあり、bR_M の例を考えると、pR_M は今回の測定領域である440nm以上の波長領域の光を吸収しないと考えると差し支えない。つまり、-80℃での pR のスペクトルを得ようとすれば、-80℃での pR と pR_M の差スペクトルを測定すればよい。しかし、-80℃で試料を照射すると、pR_K が安定に生成するので(図2-7a参照)、-80℃での pR_M と pR の差スペクトルを得るために、以下の操作を行った。

まず、-80℃で試料の吸収スペクトルを測定し、ベースラインとした。次に、試

^(註) 44%のカーブ1と40%のカーブ3を足し合わせたスペクトルで-60℃の差スペクトルが再現された。その和が100%にならないのは、pR から中間体(この場合は pR_K、あるいは pR_M) への変化量が温度によって異なるからである。すなわち pR_K は、pR との間に光平衡が成立するので、pR_K が存在する条件では pR が100%中間体に変化することはない。

料の温度を -40°C に上げ、 436 nm の光でスペクトルが変化しなくなるまで照射し、pRを pR_M に変化させた。次に試料の温度を再び -80°C に下げ、試料のスペクトルを測定した。このスペクトルでは、照射前の -80°C の試料がベースラインになっているので、 -80°C でのpRと pR_M の差スペクトルと見なすことができる。このスペクトルの 440 nm 以上の領域を、 -80°C でのpRの絶対吸収スペクトルとした(図2-11 b)。

-170°C でのpRの吸収スペクトルを求めるには、上記の方法は用いることができなかった。すなわち、 -170°C に冷却すると試料の凍結のためにクラックが入るが、この試料を一旦 -40°C に温めると試料が融解する。試料を再び -170°C に冷却しても、もとのクラックの状態を再現することはできないので、ベースラインを再現できないということである。そこで、以下の方法で求めた。まず、 -80°C で照射すると、pRと pR_K の差スペクトルが得られる(図2-7 a)。また、 -170°C で照射した時にもpRと pR_K の差スペクトルが得られるが(図2-4 a、挿入図)、 -170°C では pR_H も同時に生成している可能性がある。しかし、 pR_K を主に含む光平衡混合物の温度を上げててもスペクトル変化はほとんど見られなかった(図2-6 b)、ここでは pR_H の寄与は少ないと判断した。次に、 -170°C と -80°C でのpRと pR_K の差スペクトルを比較したところ、 pR_K に由来する、長波長側($>550\text{ nm}$)のスペクトルの形状はほとんど同じであり、 pR_K のスペクトルに対する温度効果は小さいことがわかった。そこで、 pR_K に由来する長波長側の吸収スペクトルを相殺するようにそれぞれを加え合わせると、pRを -80°C から -170°C に冷却したときのスペクトル変化を求めることができた。このスペクトル変化を -80°C のpRのスペクトルに加え、pRの -170°C でのスペクトルとした(図2-11 a)。

pR_H のスペクトルは、 -170°C で黄色光($>480\text{ nm}$)で照射した時の光平衡混合物のスペクトル(図2-5 a参照)を用いた(図2-11 a)。 pR_H はpRよりも短波長側に吸収をもつため、長波長側の光で照射したときには、ほぼ全てのpRが pR_H に変化していると考えてよい。

pR_K の吸収スペクトルは、以下の方法で求めた。まず、 -80°C でpR試料を照射することにより、pRと pR_K の差スペクトルが得られるが(図2-7)、 pR_K の吸収スペクトルを計算する上で、この時の試料中で、どれだけのpRが pR_K に変化しているのかを求める必要がある。そこで、pR試料を、 501 nm 、 469 nm の2種類の光で光平衡混合物が生成するまで照射し、それぞれの照射前後の差スペクトル

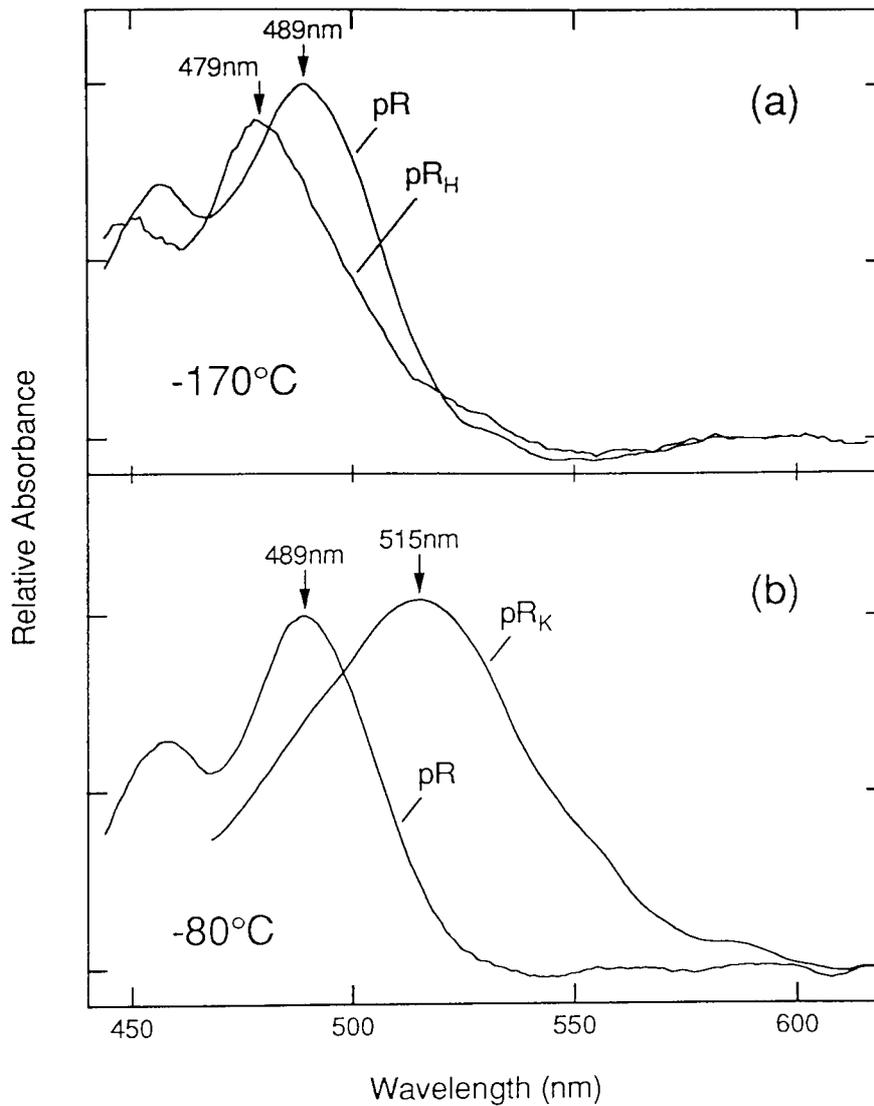
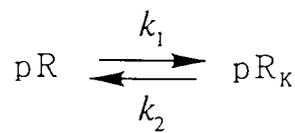


図2-11 pRとその中間体の吸収スペクトル。

pR、pR_Hの吸収極大波長は、 -170°C でそれぞれ489、479nmと求められた。また、pR、pR_Kの吸収極大波長は、 -80°C でそれぞれ489、515nmと求められた。計算法は本文中に詳記している。

を求めた。2つの差スペクトルは、差吸光度は異なるが、同じ形状をもつ。そのため、これら二つの光では、ともに pR_Kのみが生成するが、その量比が違っているだけであることがわかった。pRの吸収スペクトルの形状が、その光走性の作用スペクトルの形状と一致するので (Takahashi et al., 1988)、pRの量子収率に波長依存性はないと考えられる。したがって、以下の方法で pR から pR_K への変化量を計算した。

pR と pR_K の間に光平衡状態が生成するのは、以下のような反応において、pR から pR_K への変化速度と、pR_K から pR への変化速度が等しくなっている時である。



ここで、光反応における速度定数は、照射光の波長における各成分の吸光度と量子収率の積に比例する。例えば、469 nm の光で照射したときの光平衡状態では、

$$\begin{aligned} k_1 &\propto \phi A(\text{pR}, 469 \text{ nm}) \\ k_2 &\propto \phi' A(\text{pR}_K, 469 \text{ nm}) \end{aligned}$$

となる。ただし、 $A(\text{pR}, 469 \text{ nm})$ と $A(\text{pR}_K, 469 \text{ nm})$ は、それぞれ pR と pR_K の 469 nm での吸光度、 ϕ と ϕ' はそれぞれ pR と pR_K の量子収率である。そのため、pR_K に変化している pR の割合を x とすると、

$$(1-x) \phi A(\text{pR}, 469 \text{ nm}) = x \phi' A(\text{pR}_K, 469 \text{ nm})$$

とあらわすことができる。同様に、pR を 501 nm の光で照射した時に、pR_K に変化している割合を x' とすると、

$$(1-x') \phi A(\text{pR}, 501 \text{ nm}) = x' \phi' A(\text{pR}_K, 501 \text{ nm})$$

となる。ただし、 $A(\text{pR}, 501 \text{ nm})$ と $A(\text{pR}_K, 501 \text{ nm})$ は、それぞれ pR と pR_K の 501 nm での吸光度である。

一方、469 nm の光で照射したときの差スペクトルから、以下の式が導かれる。

$$\Delta A(469 \text{ nm}) = xA(pR_K, 469 \text{ nm}) - xA(pR, 469 \text{ nm})$$

$$\Delta A(501 \text{ nm}) = xA(pR_K, 501 \text{ nm}) - xA(pR, 501 \text{ nm})$$

ただし $\Delta A(469 \text{ nm})$ と $\Delta A(501 \text{ nm})$ は、それぞれ 469 nm の光で照射した時の 469 nm と 501 nm の差吸光度である。

これらの変数の中で、以下のものについては実験値を代入できる。まず、469 nm、および 501 nm の光で試料を照射したときに得られる差スペクトルから、それぞれの差吸収極大での差吸光度の比を求めると、 $x'/x = 0.79$ が得られる。また、pR の -80°C での吸収スペクトルから、 $A(pR, 469 \text{ nm}) = 0.0065$ 、 $A(pR, 501 \text{ nm}) = 0.0086$ が得られる。469 nm の光で試料を照射したときに得られる差スペクトルから、 $\Delta A(469 \text{ nm}) = -0.0017$ 、 $\Delta A(501 \text{ nm}) = 0.0011$ が得られる。これらの値を上式に代入し、4元1次方程式を解くことにより、 $x = 0.70$ 、 $\phi'/\phi = 0.68$ という値が得られた。この値を用いて、pR_K の $N \text{ nm}$ での吸光度は以下の式で表される。

$$A(pR_K, N \text{ nm}) = A(pR, N \text{ nm}) + \Delta A(N \text{ nm}) / 0.70$$

以上により求めた pR_K の吸収スペクトルの吸収極大波長は 515 nm であった (図 2-11 b)。また pR と違ってその吸収スペクトルに振動構造はみられなかった。

[2-4 まとめと考察]

-170°C で pR を、その吸収極大よりも短波長側の光 (436 nm) で照射すると、スペクトルが長波長側にシフトした中間体である pR_K に変化した。一方、pR をその吸収極大よりも長波長側の光 (> 480 nm) で照射すると、今度はスペクトルが短波長側にシフトした産物である pR_H に変化した。そして、pR、pR_K、pR_H の3成分の間には、-170°C で互いに光可逆性があった。pR_H は、-160°C 以上の温度でもとの pR に戻るが、pR_K の方は熱的に非常に安定で、-60°C まで変化しない。その後、pR_M、pR_O を経てもとの pR にもどり、光反応サイクルは完結する。pR_K や pR_H の安定温度は、ほかのレチナル蛋白質の初期中間体と比べて特徴的である。すなわち、ロドプシンや bR のバソ中間体、K 中間体 (液体窒素温度で生成する長

波長産物という点で pR_K に対応する) が、次のルミ中間体や L 中間体に変化する温度は $-140 \sim -120^\circ\text{C}$ である。それと比べると pR_K の安定温度 (-60°C) は高く、 pR_H の安定温度 (-160°C) は低い。

-170°C で観測された各成分の発色団の構造から考えると、まず、pR の発色団は全トランス型である。このことは pR が全トランス型レチナールと結合することから推測される (2-3-2, Takahashi et al., 1990)。また、好塩好アルカリ菌の pR 様蛋白質 (ppR) では、実際にその発色団構造が全トランス型であることを確認している (本論文 第3章)。一方、 $C_{13}=C_{14}$ をトランス型に固定した pR アナログでは、 pR_M が生成しないこと (Yan et al., 1990)、ppR の M 中間体 (ppR_M) の発色団が 13 シス型であること (本論文 第3章) から、 pR_M の発色団は 13 シス型であると考えられる。 pR_K は pR_M の前駆体であることから、その発色団構造も 13 シス型と考えられる。 pR_H は、 -160°C という低い温度でもとの pR に戻ることから、光反応サイクル中の本来の中間体ではないと考えられる。また、光反応によって pR_K に変化すること、その吸収スペクトルが pR と類似していることから、その発色団は pR と同じく全トランス型であると考えられ、pR と pR_H との違いは、わずかな発色団/蛋白質相互作用の違いに起因すると考えられる。そのために、 -160°C という低い温度でもとの pR に戻ってしまうのであろう。この観点からすると、pR から pR_H 、あるいはその逆の直接的な光反応は考えにくく、 pR_H は pR_K からのみ生成すると考えた方が自然であろう。以上の知見から、pR の光反応サイクルのスキームは、図 2-12 のようになると考えられる。

pR の吸収極大は 489 nm であり、bR の 568 nm、hR の 578 nm、あるいは sR の 587 nm と比べて非常に短波長側にある。しかし、このことは、pR の発色団構造に由来するのではない。つまり、pR の発色団は、bR、hR、sR と同じく全トランス型である。そのため、短波長側に吸収極大があることや、振動構造があらわれる事等の pR の特徴は、その発色団/蛋白質間の相互作用の違いに帰着できる。pR の一次構造はまだ決定されていないので、アミノ酸レベルでの議論は出来ないが、発色団まわりの構造はある程度推測できる。

レチナール蛋白質で振動構造があらわれるのは、発色団レチナールの β イオノン環部分とポリエン部分が平面に保たれているか、捻れているが強く固定されている場合であると言われている (Honig et al., 1971)。つまり、 C_6-C_7 の単結合の回転が制限されている場合に振動構造があらわれるのである。そのため、pR の場合にも、その β イオノン環部分が蛋白質によって固定されていると考えられる。pR が

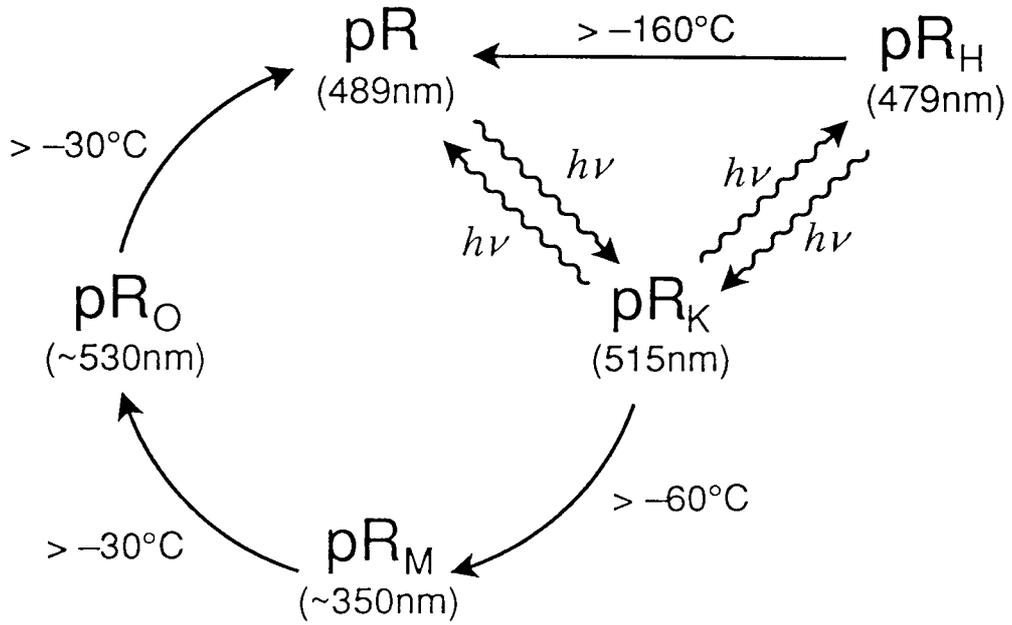


図2-12 pRの低温での光反応サイクル。

図の中では、光反応は波線で、熱反応は実線で表している。また、各成分の吸収極大波長を括弧内に示した。矢印の横に示した温度は、低温スペクトル法により求めた、各中間体の安定温度である。

pR_Kに変化するときには、その発色団は全トランス型から 13 シス型に光異性化する。その結果、吸収極大が長波長側に移動すると同時に、その振動構造が消失する（図 2-11 b）。他のレチナール蛋白質の場合には、K 中間体あるいはバソ中間体の発色団は強く捻れていると言われており、一般的な解釈をすれば、pR_Kで振動構造が消失するのは、発色団の捻れが原因ということになる。しかし、もし、pR_Kの発色団が強く捻れているとすれば、その構造は非常に不安定なはずである。すなわち、bR の K 中間体やロドプシンのバソ中間体のように、低い温度（-120 ~ -140 °C）で次の中間体に変化するか（Shichida, 1986; Iwasa et al., 1980）、あるいは、なんらかの要因で次の中間体への変化が阻害されているとすれば、アイオドプシンのバソ中間体のように、元の状態に戻ってしまうはずである（Yoshizawa & Wald, 1967; Imamoto et al., 1989）。ところが、pR_Kの安定温度は非常に高く、-60 °C であった。そこで、以下のように推測した。

構造式を比較すればわかるが、全トランス型レチナールよりも、13 シス型レチナールの方が、β イオノン環部分から末端の酸素原子までの距離が短い（Matsumoto et al., 1975）。液体窒素温度近くでは、蛋白質部分の変化があまり起こらないと考えられるので、リジン残基の位置を固定して考えると、異性化の時には、発色団のβ イオノン環部分がシッフ塩基結合の方向に動くという事になる。その時に、β イオノン環がその固定部位から少し移動して、C₆-C₇部位の自由度が高くなる可能性がある。もしそうであれば、pR_Kのスペクトルが振動構造を示さないことが説明できる。また、発色団の側鎖部分の無理な捻れも考える必要がなく、比較的安定に存在できるものと思われる。この点については、ppR の低温スペクトル法での解析結果（Hirayama et al., 1992）や、ナノ秒閃光分解の結果（4 章）もふまえて、5 章で再びふれることにする。

第 3 章

ppR と中間体の発色団の構造解析

[3-1 目的]

第2章では、低温スペクトル法によって、pRの吸収スペクトル変化から、その光反応のメカニズムを考察してきた。しかし、bRやhRでは、暗中で全トランス型レチナールを発色団とするものと、13シス型レチナールを発色団とするもの間で平衡が成り立っている (Maeda et al., 1977; Kamo et al., 1985) (図3-1)。そのため、pRのスペクトルに振動構造が現れる可能性として、pRが混合物であることも示唆されていた。2-3-2 に述べたように、光退色の実験からその可能性は否定したが、pRの発色団がbRやhRのように発色団の構造の違うものの混合物である可能性は残っている。また、pR_Kの安定温度が高いことや、L中間体が現れない事などの光反応過程における特徴も、それらの中間体の発色団構造が、他のレチナール蛋白質の中間体と違っていることに起因するという可能性を否定できない。そのため、pRの発色団構造の確認が不可欠であるが、*Halobacterium halobium* のpRは精製が困難なため、適用できる実験が限定されていた。

しかし、好塩好アルカリ菌 *Natronobacterium pharaonis* にも、pR様のレチナール蛋白質 (ppR) が存在することが見いだされており (Bivin & Stoeckenius, 1986)、その後、北海道大学のグループによってその精製法が確立された (平山、1991; Hirayama et al., 1992)。ppRの吸収極大は498 nmにあり、pRと比べて約10 nm長波長側にある。しかし、吸収スペクトルには振動構造が現れ、その形状はpRのものによく似ている (Tomioka et al., 1990; Hirayama et al., 1992)。また、低温スペクトル法による解析から、その反応過程にはpRと同じくL中間体が存在せず、K中間体の安定温度が高いことが示された (Hirayama et al., 1992)。さらに、その生理的役割として、pRと同じく青緑色光からの負の光走性に関与していることが示され (Tomioka et al., 1990; Sharf et al., 1992)、pRとppRは由来となる菌の種類が違っただけで、ほぼ類似の蛋白質であると考えられた。

そこで、ppRの精製試料を用いて、pRでは困難であった発色団の構造決定を試みた。そのための手法には、共鳴ラマン分光、フーリエ変換赤外分光のような振動分光法の応用も考えられるが、pRやppRのように、他の光受容蛋白質とは性質の異なったものでは、かえって得られたデータの解釈が難しいことが考えられる。そこで、最も明快な結果が得られるように、発色団を抽出することを試みた。抽出したレチナールの立体異性体は、HPLC (高速液体クロマトグラフィー) により、互いに分離可能である。本論文では、ppRと、その長寿命中間体であるppR_M、ppR_Oの発色団構造を決定した。この章に述べる成果は、主論文2として本論文に

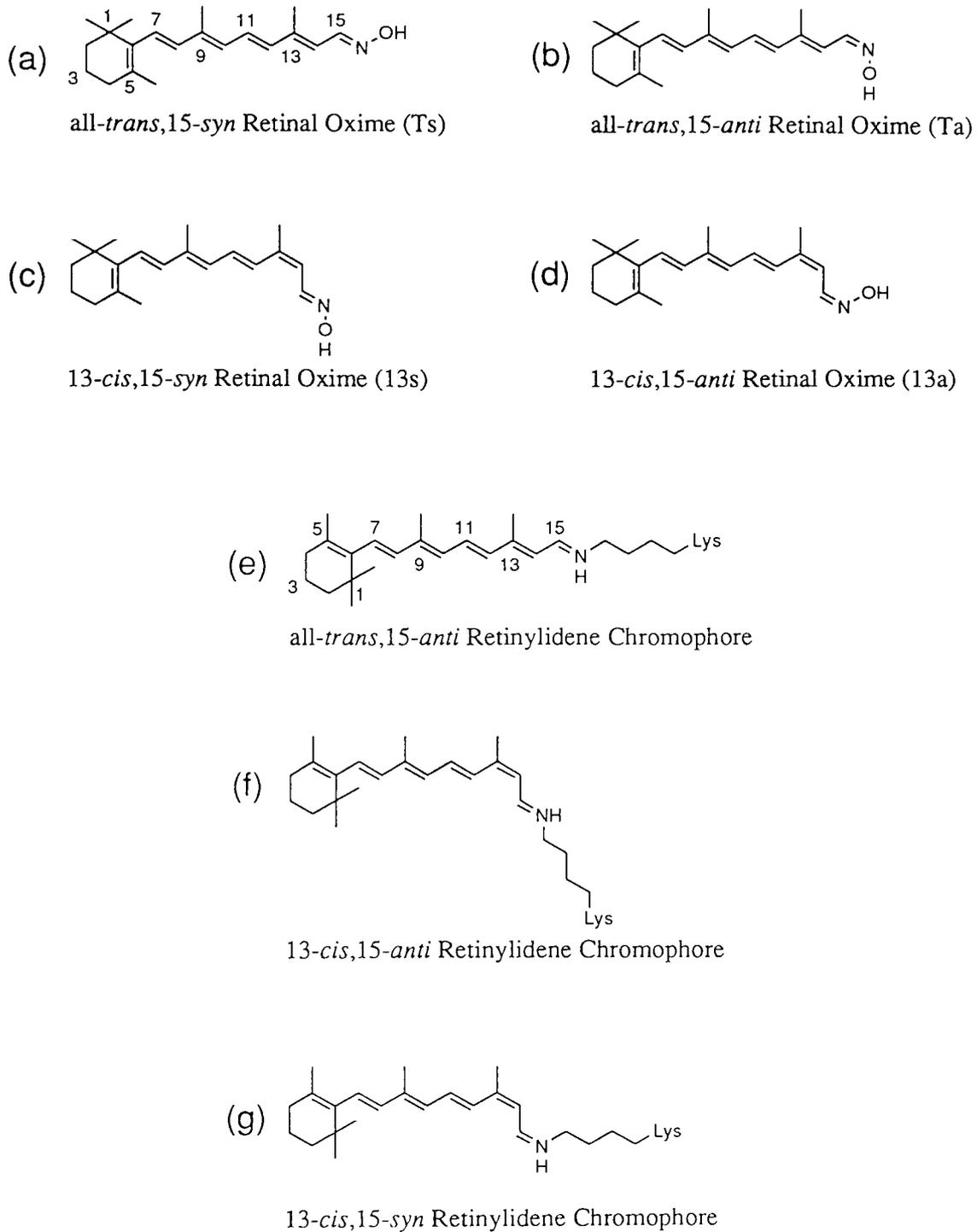


図3-1 レチナルオキシム及びレチナル発色団のC=N構造と命名。

- (a) 全トランス 15 シン型レチナルオキシム (Ts)。
- (b) 全トランス 15 アンチ型レチナルオキシム (Ta)。
- (c) 13 シス 15 シン型レチナルオキシム (13s)。
- (d) 13 シス 15 アンチ型レチナルオキシム (13a)。
- (e) 全トランス 15 アンチ型レチナル発色団。明順応型 bR の発色団はこの構造である。
- (f) 13 シス 15 アンチ型レチナル発色団。bR は光異性化後にこの構造をとる。
- (g) 13 シス 15 シン型レチナル発色団。今のところ、暗順応型 bR (13 シス型 bR) のみで報告されている。

添付している (Imamoto et al., 1992a)

[3-2. 試料の調製と実験法]

3-2-1 ppR試料の調製

ppRは、好塩好アルカリ菌 *Natronobacterium pharaonis* (NCMB 2191、National Collection of Industrial and Marine Bacteria, LTD, Scotland) から単離した (Hirayama et al., 1992)。45℃、pH 9.0のペプトン培地で3日間培養した菌を、遠心分離により回収した。液体窒素を用いた凍結/融解法を3回繰り返して菌体を破壊した後、細胞膜を遠心分離により回収した。4M NaCl溶液に懸濁した後、DNase Iを加えてDNAを消化し、透析により除去した。この試料に1/4量の20%コール酸を加えて、ppRを含めた膜蛋白質を可溶化した。遠心分離によって得られた上清から、フェニルセファロース、ヒドロキシアパタイト、オクチルセファロースの3種類のカラムクロマトグラフィーを用いてppRを分離・精製した。精製試料は、緩衝液 (0.5% オクチルグルコシド / 25mM Tris-HCl / 4M NaCl / pH 7.2) に対して一晩透析し、実験に用いた。

3-2-2 蛋白質部分の変性と発色団の抽出

ppRの発色団レチナール ($\text{Ret-NH}^+\text{-Ops}$) を、ヒドロキシルアミンと反応させてオキシム (Ret-N-OH) に変化させることにより蛋白質部分から分離し、ヘキサンで抽出した (Shichida et al., 1988b)。本研究では、ヒドロキシルアミンと発色団レチナールを反応させるタイミングを2通り考えた。一つは、レチナールが発色団として蛋白質部分に結合している状態で、ヒドロキシルアミンを加えて退色させるものである。この場合は、発色団レチナールは蛋白質部分に囲まれた状態でヒドロキシルアミンと反応することになり、発色団と蛋白質部分の相互作用に関する情報を得られる可能性がある。しかし、ppRが混合物である場合、その一方のみがヒドロキシルアミンによって退色する可能性がある。例えば、全トランス型と13シス型との平衡混合物があったとしても、もし、全トランス型のみがヒドロキシルアミンに不安定であるとすると、得られるのは全トランス型のみになってしまう。そのため、もう一つの方法を併用した。それは、ppR、あるいはその中間体を有機溶媒で変性させ、その後ヒドロキシルアミンを加える方法である。この場合、発色団の結合部位は速やかに破壊されるので、平衡を止めることができ、発色団構

造を最も直接的に調べられる。いずれもその後でヘキサンを用いてレチナールオキシムを抽出した。以下詳しい方法を述べる。

ppR試料（退色試料または未退色試料）の体積を、緩衝液で1 mLに合わせ、各1 mLのメタノールとジクロロメタンを加え、軽く攪拌した。その後試料に、終濃度33mMのヒドロキシルアミンを加え、ミキサーで30秒間、氷上で攪拌し、蛋白質部分を変性させた。次に、試料にヘキサンを5 mL加え、ミキサーでさらに30秒間攪拌し、レチナールオキシムをヘキサン層に抽出した。手回し遠心によって、水層とヘキサン層に分離し、ヘキサン層を回収した。以上のヘキサンによる抽出操作をもう一度繰り返した。脱水のため、得られたヘキサン層に約1 gの無水硫酸ナトリウムを加えて、ピペットで攪拌し、ヘキサン層のみを回収した。ヘキサン層に含まれるレチナールオキシムを窒素ガス中で乾固させ、50 μ Lのヘキサンに再度溶解し、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で分析した。

3-2-3 高速液体クロマトグラフィー

島津製LC-7A型HPLCシステムに、YMC製A0123型カラム（シリカゲル、6 \times 150mm）を接続してHPLC分析を行った。クロマトパックCR-5Aを制御コンピュータとして用いた。移動層は、98.8%ベンゼン、0.2%イソプロパノール、1.0%ジエチルエーテル（いずれも体積%）を用いた。HPLCの流速は1.5 mL/分、モニター波長はレチナールオキシムの吸収極大波長である360nmに設定した。得られたデータは一旦CR-5Aに格納した後、PC9801コンピュータに転送し、解析を行なった。

得られたHPLCパターンのピークの同定は、あらかじめ組成のわかっているレチナールオキシムのHPLCパターンと保持時間を比較することにより行った。また、各成分のピーク面積から、各異性体のモル比を計算した。本研究では4種類のレチナールオキシムが見いだされたが（図3-1）、それぞれのベンゼン中、360nmでのモル吸光係数（Absorbance/M/cm）は、52200（Ts）、51600（Ta）、47800（13s）、52100（13a）という報告値を用いた（Tsukida et al., 1985; Trehan et al., 1990）。

3-2-4 分光測定

以下全ての吸収スペクトルは、島津製MPS-2000型自記分光光度計で測定した。分光光度計に電磁式ミラー、シャッター等を組み込み、照射光源として1000

Wのスライドプロジェクターと光学フィルターの組合せを用いたが、これらは低温スペクトル法で用いたものと基本的に同一のセッティングである（図2-1 a参照）。ただし、クライオスタットの代わりに冷媒還流式の試料セルホルダーを設置し、水/エチレングリコールを還流させることによって、試料の温度を正確に0℃、あるいは20℃に保った。

[3-3 結果]

3-3-1 暗順応型 ppR の発色団構造

精製 ppR 試料の吸収スペクトルを図3-2 aに示した（カーブ1）。吸収極大は498nmで、460nmにショルダーがみられる。少量のヘム蛋白質がまだ試料中に含まれているが（420nm）、カロチノイドの吸収は無く、実験には支障が無かった。

bRやhRでは、暗順応状態ではその発色団が、全トランス型と13シス型の平衡状態になることが知られている（Maeda et al., 1977; Kamo et al., 1985）。そのため、ppRがbRやhRと同様の暗順応を示すとすれば、暗順応型 ppRでは、全トランス型の ppRと13シス型の ppRの混合物になると考えられた。そこでまず始めに、2日間4℃で暗保し、完全に暗順応させた ppRを、100mMヒドロキシルアミン存在下で20℃で暗保した（図3-2 a）。ppRはこの条件ではヒドロキシルアミンによって退色し、360nmに吸収極大をもつレチナールオキシムに変化した。このスペクトル変化の過程で、400nmに等吸収点が現れた。また、この過程での、ppRの吸収極大波長である500nmの吸光度と、ショルダーである460nmの吸光度を暗保時間に対して片対数プロットした。その結果、図3-2 bのように平行な直線となり、暗状態での ppRは1成分であることが強く示唆された。

続いて、暗順応状態の ppR の発色団構造を調べた。まず、ppR 試料を4℃、暗中で2日間保存し、完全に暗順応させた試料（図3-2 a、カーブ1）を、メタノール/ジクロロメタンで変性させた。この試料にヒドロキシルアミンを加えてレチナールオキシムを生成させ、ヘキサンで抽出した。次に、暗順応させた ppR 試料を20℃、ヒドロキシルアミン存在下で暗保し、ppRを完全に退色させた試料（図3-2 a、カーブ27）に含まれる ppR オプシンを、メタノール/ジクロロメタンで変性し、レチナールオキシムをヘキサンで抽出した。これらの抽出したレチナールオキシムをHPLCで分析した（図3-3）。さらに、HPLCパターンの各ピーク面積

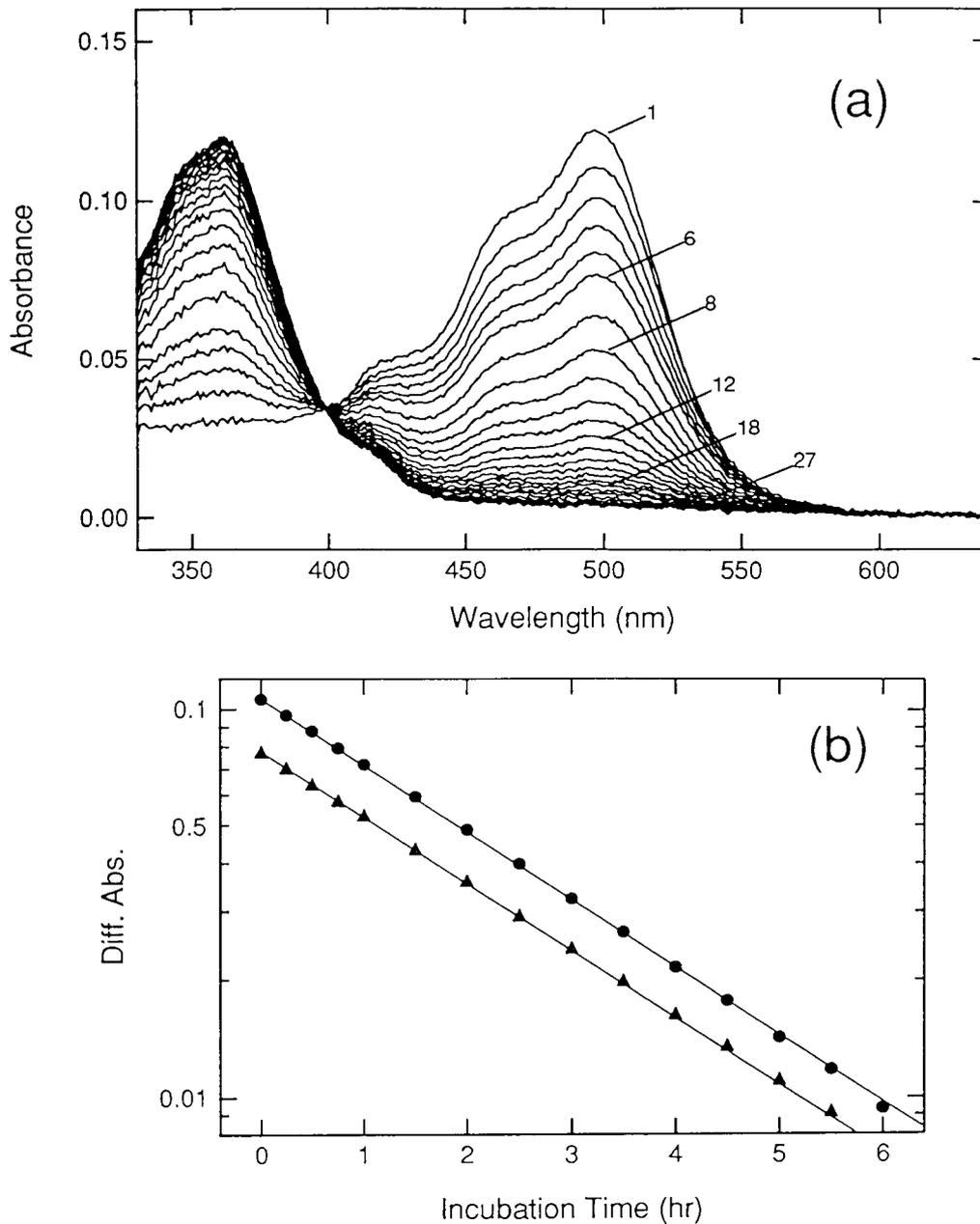


図3-2：ヒドロキシルアミンによる暗順応型 ppR の退色過程の解析。

(a) ppRのヒドロキシルアミン退色のスペクトル変化。ppR試料(カーブ1)に、1/10量の1 Mヒドロキシルアミンを加え(カーブ2：希釈効果で濃度が低下している)、その後20℃で暗保した。測定間隔は、カーブ2～6では、15分、カーブ6～24では30分、カーブ24～27では1時間である。

(b) ヒドロキシルアミン退色時の吸光度変化の片対数プロット。●は吸収極大である500nm、▲はショルダーである460nmでの吸光度変化である。二つは平行な直線にのり、ショルダーが混合物に由来するのではないことがわかる。

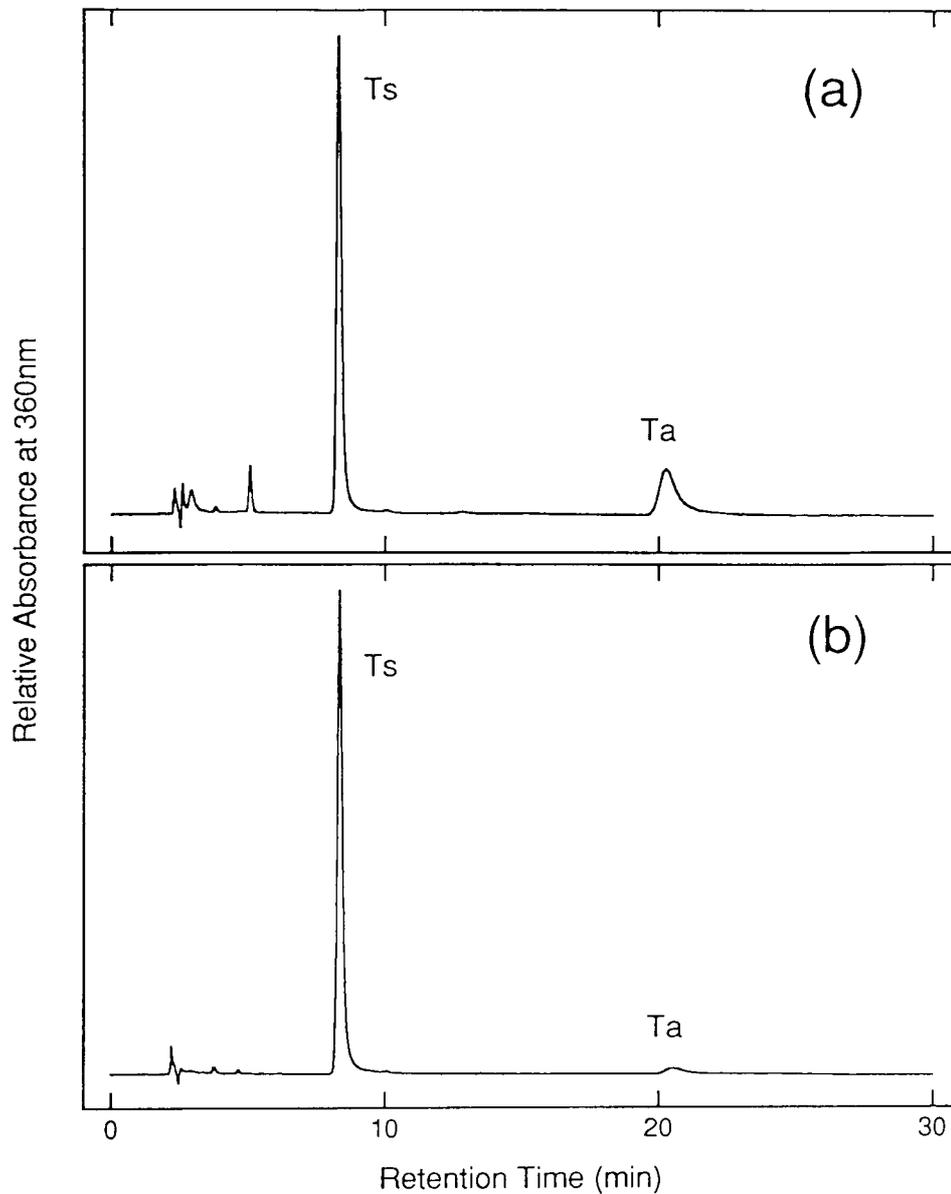


図3-3：暗順応型 ppR から抽出したレチナールオキシムのHPLCパターン。

(a) 暗順応 ppR (図3-2 aのカーブ1に対応) を、メタノール/ジクロロメタンで変性させた。次に、終濃度 33mM のヒドロキシルアミンを加えてオキシムを生成させた後、ヘキサンで抽出し、HPLCで分析した。検出光の波長は 360nm である。

(b) 暗順応 ppR に終濃度 100mM のヒドロキシルアミンを加え、暗中で完全に退色させた (図3-2 aのカーブ27に対応)。この試料の ppR オプシンをメタノール/ジクロロメタンで変性させてから、レチナールオキシムを抽出し、HPLCで分析した。検出光の波長は 360nm である。パネル a と比べて 15 アンチ型 (Ta) はほとんど見られない (表3-1)。

表3-1：試料から抽出されたレチナールオキシムのモル比

退色条件	モル比 (%)					
	全トランス型			13シス型		
	シン	アンチ	計	シン	アンチ	計
(a) MeOH/CH ₂ Cl ₂ , 暗中, 0℃	<u>72.4</u>	27.6	100.0	0.0	0.0	0.0
(b) 100mMNH ₂ OH, 暗中, 20℃	<u>95.5</u>	4.5	100.0	0.0	0.0	0.0
(c) 10mMNH ₂ OH, 501nm光, 20℃	9.6	1.2	10.8	14.7	<u>74.5</u>	89.2
(d) 10mMNH ₂ OH, 501nm光, 0℃	6.8	1.1	7.9	14.3	<u>77.8</u>	92.1
(e) 10mMNH ₂ OH, >480nm光, 20℃	7.9	1.0	8.9	11.7	<u>79.4</u>	91.1
(f) MeOH/CH ₂ Cl ₂ , 501nm光, 0℃	10.8	1.9	12.7	<u>66.1</u>	21.1	87.3

から、それぞれの異性体のモル比を計算した（表3-1）。

暗順応させたppR試料では、全トランス型レチナール（T_sとT_a）のみが観測された。このことは、bRやhRとは異なり、暗順応状態のppRには13シス型の発色団は含まれないことを示す。しかしながら、ヒドロキシルアミンと発色団とを反応させるタイミングを変えると、抽出されてくるT_sとT_aの量比が変化した。すなわち、メタノール/ジクロロメタンで変性させた試料からは、T_sとT_aの比が約3 : 1であったが（表3-1a）、暗中でヒドロキシルアミンで退色させた試料では、約20 : 1であった（表3-1b）。これについては3-4-2で詳しく考察する。

3-3-2 ppRの反応中間体の発色団構造

次にppRの光反応中間体の発色団構造を調べた。ppRは、他のレチナール蛋白質と同じく、光吸収後、いくつかの中間体をへてもとのppRに戻る（Tomioaka et al., 1990; Hirayama et al., 1992）。一般に光反応中間体は、もとの状態（この場合はppR）と比べてヒドロキシルアミンに対して不安定である。つまり、ppRが実験条件上安定な程度の低濃度のヒドロキシルアミン存在下でppRを照射すれば、中間体のみを選択的に退色させ、オキシムに変化させられる可能性がある。

そこで、ppRに20℃で、終濃度10mMのヒドロキシルアミンを加えた。別の実験から、この条件ではppRの半減時間は約10時間であった（データは示していない）。次にこの試料を、501nmの光で照射したところ、半減時間が約10分で試料中のppRに由来する吸収はなくなり、オキシムの生成に由来する吸収が観測された（図3-4a）。これは、期待した通り、ppRの中間体が、ヒドロキシルアミンに対して非常に不安定であることをあらわしている。また、ppRの半減時間は10時間であることから、照射中に退色したppRの量は無視できる。この試料をメタノール/ジクロロメタンで変性し、オキシムを抽出してHPLCでその発色団構造を分析した（図3-4b）。そのモル比を計算したところ、89.2%の13シス型レチナールオキシムと、10.8%の全トランス型レチナールオキシムがみられた（表3-1c）。この場合、暗順応型ppRから抽出したときと違い、C₁₅=Nの構造がアンチ型のレチナールオキシム（13a）が主にみられた。これについても暗順応型ppRの発色団とあわせて、3-4-2で詳しく議論する。

さて、ヒドロキシルアミン存在下での光退色は、反応中間体がヒドロキシルアミンに攻撃されて起こるものと考えられる。ヒドロキシルアミンと反応しうるのは、

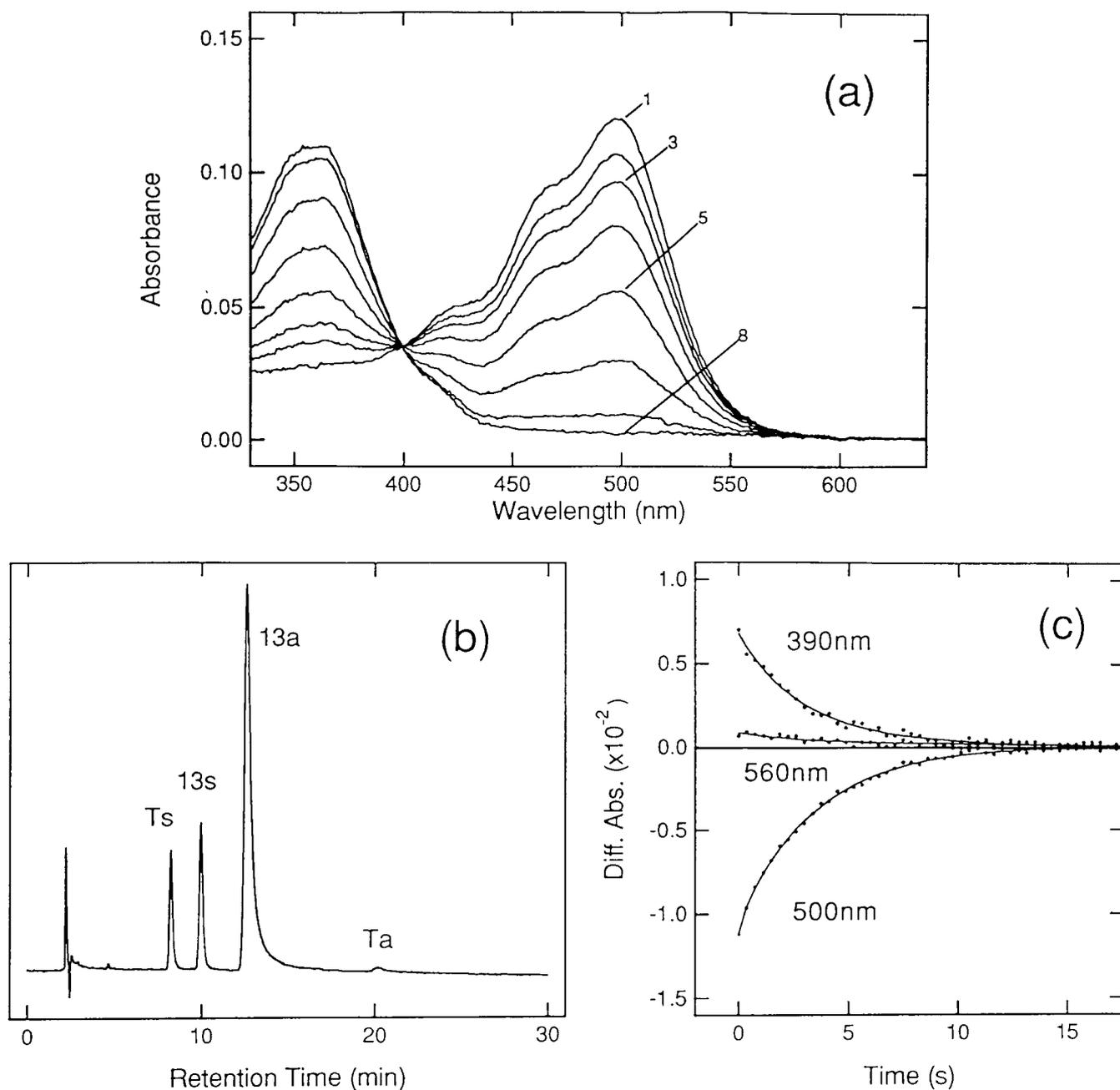


図3-4：ppRの光反応中間体の発色団構造の解析。

(a) ヒドロキシルアミン存在下での光照射。ppR試料に、20℃で終濃度10mMのヒドロキシルアミンを加え、501nmの光で順に合計1、2、4、8、16、32、64、128分照射し、試料中のppRを退色させた。

(b) その後、この試料のppRオプシンをメタノール/ジクロロメタンで変性させてから、生成したレチナルオキシムをヘキサンで抽出し、HPLCで分析した。主に13aが含まれていた。検出波長は360nmである。

(c) ppR試料を20℃で501nmの光で30秒間照射し、その後の吸光度変化を記録した。560nm、500nm、390nmでの測定で、それぞれppR₀の崩壊、ppRの回復、ppR_Mの崩壊を反映している。

比較的寿命の長い、 ppR_M と ppR_O であると考えられる。そこで、抽出された全トランス型レチナールオキシムと13シス型レチナールオキシムがどの中間体に由来するかを確認するため、照射中の試料にどのような中間体が含まれているかを調べた(図3-4c)。

照射中の試料では、 $ppR \xrightarrow{h\nu} ppR_M \rightarrow ppR_O \rightarrow ppR$ というサイクルをえがき、一種の光平衡混合物になっていると考えられる。そこで、ppR試料を20℃で501nmの光で30秒間照射し、その後の吸光度変化を500nm、390nm、560nmで記録した。390nmと560nmは、それぞれ ppR_M と ppR_O の、ppRとの差吸収極大波長にあたり、そこでは ppR_M と ppR_O の崩壊過程が観測できる。500nmはppRの吸収極大波長なので、ppRの回復が観測できる。これらのカーブのTime = 0での外挿点の差吸光度が、照射中の各中間体の含量を反映する。560nmと390nmの差吸光度はそれぞれ0.0068と0.00086であった。 ppR_M と ppR_O の分子吸光係数は、ppRを1.0とするとそれぞれ0.95(本論文第4章)と1.06であり(Miyazaki et al., 1993)、ppRとほぼ同じである。そのため、照射中の試料では、 ppR_M と ppR_O の量比を概算すると約10 : 1といえる。この値は、抽出された全トランス型、および13シス型レチナールオキシムの比にほぼ一致し、それぞれ ppR_O と ppR_M に由来することが示唆された。

この事をさらに確認するため、照射条件を変えることにより、照射中の試料に含まれる ppR_O の比率を少なくして、得られるオキシムの量比を比較検討した。まず、試料の温度を0℃にし、上記の実験と同様に10mMヒドロキシルアミン存在下で501nmの光で照射した後、発色団を抽出した。温度を下げると ppR_O の生成量は減少する(Miyazaki et al., 1993)。次に、照射光の波長を>480nmにし、10mMのヒドロキシルアミン存在下で20℃で照射した。この場合は、長波長側に吸収をもつ ppR_O が光を吸収するため、試料中の ppR_O は減少すると期待される。いずれの場合にも、全トランス型レチナールオキシムの抽出比が減少していた(表3-1d、e)。

この実験のように、定常光で照射した場合、中間体が光を吸収して副産物が生成することがあり、抽出されてきた全トランス型レチナールオキシムが、このような副産物に由来する可能性がある。例えば網膜の光受容蛋白質ロドプシンの場合、その発色団は11シス型であるが、光を吸収すると全トランス型に異性化する。ところが、ルミ中間体が安定な-80℃で強い赤色光で試料を照射すると、全トランス

型の発色団をもつルミ中間体が光を吸収して、7シス型に異性化する (Maeda et al., 1978, 1979)。錐体光受容蛋白質 アイオドプシンでも同様に、 $-40^{\circ}\text{C} \sim -80^{\circ}\text{C}$ で強い赤色光で照射すると、7シス体が生成する (Imamoto et al., 1991)。このような場合、7シス体は中間体の光反応によって生成したものであり、本来の生理的条件下の退色過程で現れる中間体ではない。そのため、ppRの場合にもこのような反応が起こっていないかに留意する必要がある。今回の実験では、全トランス型と13シス型のレチナルオキシムのみが抽出されたので、本来ppR₀が13シス型の発色団をもっているのに、ppR₀が光を吸収して全トランス型レチナルが生成した可能性がある。しかし、501nmの光よりも (表3-1c)、ppR₀が光を吸収しやすい $>480\text{nm}$ の光で全トランス型レチナルオキシムが減少したということは (表3-1e)、このような可能性を否定するものである。また、501nm、 $>480\text{nm}$ の光では、ppR_Mの光反応は考慮しなくてもよい (図4-3参照)。以上の事から、ppR₀の発色団は全トランス型であると結論した。

[3-4 考察]

3-4-1 光反応サイクルでの発色団の挙動

明順応型ppRでは、発色団の構造はすべて全トランス型であり、bRやhRに見られるような、暗中之での異性化 (全トランス型 \rightarrow 13シス型) は観測されなかった。この性質はもう一つの光センサーであるsRと共通している (Tsuda et al., 1985)。また、種類は違うが、ロドプシンを始めとする網膜の光受容蛋白質も暗中之での異性化はない。そのため、暗中之での異性化があるかどうかは、bRやhRのようにイオンポンプとして働くレチナル蛋白質と、光センサーとして働くレチナル蛋白質の本質的な違いであると考えられる^(注)。

ppRが光を吸収した時には、発色団は13シス型に異性化する。これは、明順応型 (全トランス型) bRやhRと同様の反応である (Briman & Mathies, 1982; Ogurusu et al., 1981)。また、*Halobacterium halobium*で、 $C_{13}=C_{14}$ の二重結合をトランス型に固定したレチナルアナログを発色団とすると光走性が見られなくなることと一

^(注) *Halobacterium halobium*のpRでは、暗中で約20%の13シス型発色団を含むと報告されている (Takahashi et al., 1988; Sharf et al., *in press*)。前者は膜断片を用いた実験、後者はジギトニンで可溶化した試料での実験結果である。この違いは種に由来するのか、実験条件に由来するのか現在のところわからない。

致する (Yan et al., 1990)。その後、 ppR_M から ppR_O への変化過程で、発色団は再び全トランス型に異性化する。 bR でも、 bR_O への変化過程で13シス型から、全トランス型への異性化が起こると報告されている (Smith et al., 1983)。以上のように、ppRの光反応サイクル中での発色団の挙動は、明順応型 bR のものとはほぼ同じであることが確かめられた。

3-4-2 立体選択的反応

上記のように、ppRと ppR_O からは全トランス型レチナールオキシムが、 ppR_M からは13シス型レチナールオキシムが抽出されたが、抽出されたレチナールオキシムの $C_{15}=N$ の構造に着目すると、ppRを暗所でヒドロキシルアミンと反応させたときには主に15シン型(Ts)、 ppR_M では15アンチ型のレチナールオキシム(13a)が主に抽出された(図3-1)。遊離のレチナールがヒドロキシルアミンと反応するときにも、ある程度の立体選択性は見られ、15シン型と15アンチ型の比は4 : 1~2 : 1程度である。これは、14位の水素原子とOH基との間の立体障害が、15シン型の方が小さいことが原因であろう(図3-1参照)。しかし、これらの反応が蛋白質内で起こるとき、その立体選択性はさらに強くなる。

メタノール/ジクロロメタンで変性させた試料と比べて、ppRの発色団が、暗所でヒドロキシルアミンと反応するときには、発色団周りの蛋白質部分はその構造が保たれている。そのため、主に15シン型レチナールが生成するのは、蛋白質によって、ヒドロキシルアミンの攻撃の方向性、あるいは生成するレチナールオキシムのN-OH部位の $C_{14}-H$ 部位に対する方向性が限定されていると考えられる。一方、 ppR_M では、立体選択的に15アンチ型が得られたが、これが蛋白質部分の影響を受けていることが原因であることを確認するため、以下の対照実験を行った。

ppR試料を氷上に置き、501nmの光で30秒間照射した。そのままさらに照射を続けながら、試料にメタノール、ジクロロメタン、ヒドロキシルアミンの混合液を加えて、ミキサーで攪拌した。メタノール/ジクロロメタンによる変性は、ヒドロキシルアミンが中間体の発色団を攻撃するよりも速いと考えられるので、この実験では、ppRはまず中間体の状態で変性され、その後、レチナールオキシムが生成したと考えられる。このようにして生成したレチナールオキシムをヘキサンで抽出したところ、主に15シン型が得られた(表3-1f)。そのため、 ppR_M の場合には、蛋白質によって立体選択的に15アンチ型が得られるといえる。

このような $C_{15}=N$ における立体選択的な反応、すなわち、もとの光受容蛋白質からは15シス型、光反応中間体からは15アンチ型が得られるという反応は、すべてのレチナル蛋白質に共通ではないかと思われる。それは、われわれの未公表の実験から、ニワトリの赤色感受性錐体光受容蛋白質 アイオドプシンやロドプシンアナログでもやはり立体選択的な反応が見られたからである（図3-5）。

アイオドプシンの発色団は、光異性化によって11シス型から全トランス型に異性化するので、ppRの場合の全トランス型から13シス型への異性化とは本質的に異なっている。しかし、アイオドプシンでも同様に、暗所でヒドロキシルアミンで退色させた試料からは11シス15シス型レチナルオキシムが得られ、ヒドロキシルアミン存在下で光退色した試料からは全トランス15アンチ型レチナルオキシムが得られる。逆に、ウシロドプシンにダイシス型レチナルを結合させた場合には、暗所でヒドロキシルアミンと反応させたとき、15アンチ型レチナルオキシムが得られる（Shichida et al., 1988b）。

ppRの発色団のシッフ塩基結合部位の構造は、全トランス型bRの発色団の構造から類推して、15アンチ型であると考えるのが妥当であろう（図3-5）（Harbison et al., 1985）。ヒドロキシルアミンと反応してTsが生成するとき、そのOH基の方向は、シッフ塩基部分に結合しているプロトンと反対方向になる。（図では上向き）。13aでも同様に、OH基の向きは図で上向きになる。アイオドプシンの場合では、発色団が11シス型であるが、15シス型ではOH基の向きはプロトンと反対方向になり（図では下向き）、反応中間体の場合の15アンチ型でもやはり下向きになる。ロドプシンにダイシス型レチナルを結合させた場合には、シス結合が一つ多いために、 $C_{15}=N$ の構造はアンチ型であるが、OH基の方向はアイオドプシンの場合と同じく下向きになる。

そのため、これらの反応は、レチナル蛋白質に共通した、あるアミノ酸残基がシッフ塩基結合部位のプロトン側に存在し、その方向にOH基がくるのを妨げていると考えられる。シッフ塩基部位にプロトンを安定に結合させるためには、カウンターイオンと呼ばれる解離性アミノ酸残基が存在している（図3-5）。カウンターイオンはこれまで調べられた全てのレチナル蛋白質に見いだされており、おそらくこの残基とOH基の相互作用により、立体的な選択が見られるのであろう。

以上の推測の要点は、発色団がヒドロキシルアミンと反応し、オキシムが生成したときに、OH基がプロトンと反対側にくるということである。ppR_Mではシッフ塩基結合部位は脱プロトン化していると考えられるが、bR_Mから類推すると、カウ

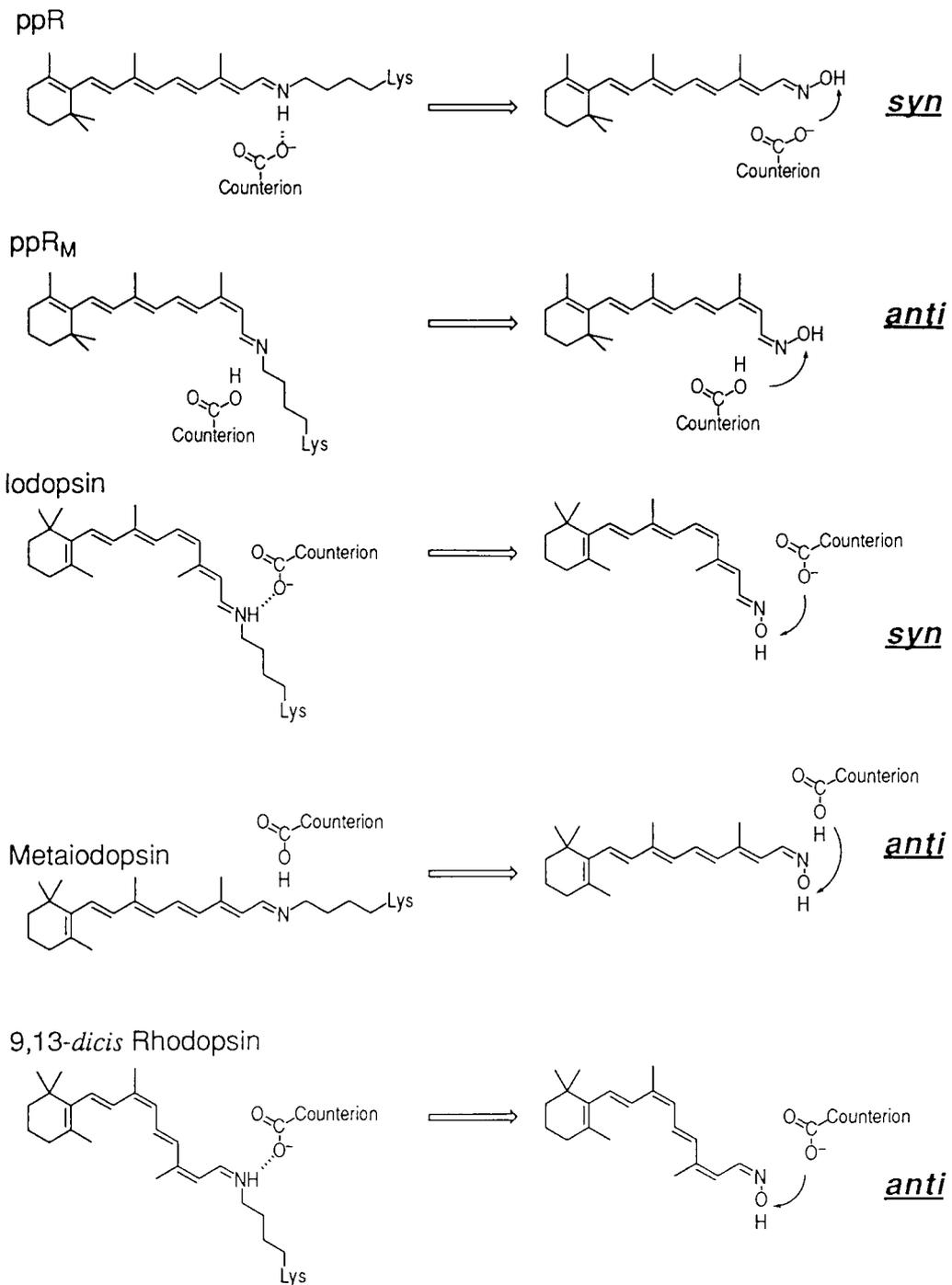


図3-5：立体選択的なオキシム生成のモデル。

レチナル蛋白質の発色団がヒドロキシルアミンの攻撃をうけ、レチナルオキシムが生成する時のカウンターイオンとの相互関係のモデル。レチナル蛋白質の発色団であるレチナルは、シッフ塩基結合を介して蛋白質部分のリジン残基と結合している。またこの付近にはカウンターイオンと呼ばれる負に帯電したアミノ酸残基が存在し、シッフ塩基部分を安定にプロトン化している。ppRの発色団は全トランス型レチナルであるが、ppR_Mでは異性化して13シス型になっている。いずれにヒドロキシルアミンが反応するときでも、OH基は図中で上を向く。アイオドプシンの発色団は11シス型レチナルで、メタ中間体では全トランス型である。この場合には、いずれもOH基は図中で下を向く。9,13ダイシス型レチナルを発色団とするロドプシンアナログでも、OH基は下向きになる。以上の反応はすべて、オキシムのOH基はカウンターイオンと反対方向に向くことから、カウンターイオンとヒドロキシルアミンのOH基の間に、立体的（あるいは静電的）な反発作用があると考えられる。

ンターイオンがプロトン化していて、その位置関係はもとの ppR とほぼ同じであると考えられる (Henderson et al., 1990)。シッフ塩基部位のプロトンの結合の方向は、シッフ塩基部位の $C_{15}=N$ がシン型かアンチ型かによって決ってくる。つまり、ヒドロキシルアミンとの反応から生成するオキシムの $C_{15}=N$ 構造から、もとの蛋白質中での $C_{15}=N$ 構造を決定できる可能性を示唆している。現在のところ、 $C_{15}=N$ の立体構造の決定は、振動スペクトル法 (共鳴ラマン分光法、フーリエ変換赤外分光法) を用いて、15 の位置の炭素原子を ^{13}C に置換したときの、振動バンドのシフトの度合から決定している。しかし、今回の実験を発展させれば、複雑な振動スペクトルの実験をしなくても、ヒドロキシルアミンと反応させるだけで決定できる可能性がある。bR では暗順応型 (13 シス型) が 15 シン型のシッフ塩基結合をもっているといわれている (図 3-1) (Harbison et al., 1985; Smith et al., 1987)。そのため、イオンポンプとして働くレチナル蛋白質の暗順応機構の解明に応用することも可能であろう。

第 4 章

ナノ秒レーザー閃光分解による ppR の光反応サイクル の解析

[4-1 目的]

第2章では、*Halobacterium halobium* のもつ pR の光反応過程を、低温スペクトル法で解析した結果を述べた。L 中間体が現れない事や、K 中間体の安定温度が、他のレチナル蛋白質のものよりも高い等の特徴が見いだされた。しかし、レチナル蛋白質では、室温と低温でその光反応過程に違いがあらわれる事がある。たとえば sR では、その K 中間体は室温では観測されるが (Ohtani et al., 1986)、低温スペクトル法では観測できない (Ariki et al., 1987)。また、ニワトリのアイオドブシンでは、室温で生成したバソ中間体は、熱反応により次の中間体に変化するが (Kandori et al., 1990)、液体窒素温度でトラップしたものは、熱反応でもとのアイオドブシンに戻ってしまう (Yoshizawa & Wald, 1967; Imamoto et al., 1989)。以上のような例もあるので、やはり室温での反応過程も調べなければ、低温スペクトル法で見いだされた特徴を、pR の特徴として断定することはできない。また、室温と低温で光反応に違いがあれば、その違いから逆に、光反応のメカニズムに関する情報が得られる可能性がある (Imamoto et al., 1989)。

ところが、精製方法が確立されていない pR 試料では、低温スペクトル法と比較して、S/N 比の劣る閃光分解法の試料としては困難な点が多く、これまでにはミリ秒領域の解析しか行われていなかった (Tomioaka et al., 1986)。本研究では、精製 ppR 試料を用いることにより、ナノ秒レーザーを用いた閃光分解法を行った。それによって、ナノ秒～マイクロ秒領域でのスペクトル変化を解析し、ppR の室温での初期の光反応過程を検討した。測定の主眼点は、ppR_K から ppR_M に至る反応過程において、ppR_L が存在するかどうかの検討である。ここで得られた結果は、主論文3として添付している (Imamoto et al., 1992b)。

[4-2 試料の調製と測定法]

4-2-1 ppR 試料の調製

ppR の精製方法は、第3章と同じである。精製試料を限外濾過膜 (Amicon、YM30、または Centricon30) で濃縮し、測定に用いた。ppR の吸収極大である 500nm の吸光度は、光路長 2mm で 0.5 ~ 0.6 であった。

4-2-2 レーザー分光

エキシマ/色素レーザーから得られる、パルス幅 17 ナノ秒、波長 460nm、強

度 100 マイクロジュール/mm² のパルス光を励起光として用いた (Okada et al., 1991)。測定光として、カメラ用ストロボランプから得られるフラッシュ光を用いた。まず、励起前の測定光強度を、試料側、対照側で記録した (それぞれ I_1^{sam} 、 I_1^{ref})。続いて励起光を試料に照射し、設定時間後 (50 ナノ秒~100 マイクロ秒) の測定光強度を、試料側、対照側で記録して (それぞれ I_2^{sam} 、 I_2^{ref})、励起前後の差スペクトルを以下の式により計算した。

$$\Delta A = \log (I_1^{\text{sam}} / I_1^{\text{ref}}) - (I_2^{\text{sam}} / I_2^{\text{ref}})$$

1 回の励起につきこの操作を繰り返した。また、励起の間隔は 30 秒以上とし、光反応サイクルが完結するようにした。以下に示した差スペクトルは、32 回の測定の平均値である。

[4-3 結果]

4-3-1 励起後の過渡吸収スペクトル

用いた試料の吸収スペクトルをマルチチャンネルアナライザーで記録したスペクトルを図 4-1 に示した。少量のチトクロムが含まれているが、460 nm を励起光とすればチトクロムを励起せず、実験には支障がないと考えられた。そこで、この試料を波長 460 nm、パルス幅 17 nm のフラッシュ光で励起した後の過渡吸収スペクトル測定した (図 4-2)。励起前の試料のスペクトルをベースラインとしているので、励起後 50 ナノ秒以内に長波長産物が生成していることがわかる。しかし、この産物は、ピコ秒レーザー閃光分解で見いだされた ppR_K (水上ら, 1991) よりも短波長側に吸収極大をもっており、その他の性質も bR の KL 中間体に類似しているため、ppR_K の次の ppR_{KL} であると考えられる (詳しくは 4-4 参照)。

ppR_{KL} は 2 段階の反応を経て変化する (図 4-2)。励起後 1.2 マイクロ秒までは 470 nm に等吸収点をもち (図 4-2 a)、1.2 マイクロ秒から 100 マイクロ秒では 430 nm に等吸収点をもつ (図 4-2 b)。100 マイクロ秒後の産物は 390 nm に差吸収極大をもつことから、ppR_M である。そのため、その前の中間体は ppR_L であると考えられる。実際この中間体の性質も、bR の L 中間体によく類似している (詳しくは 4-4 参照)。つまり低温では観測されなかった ppR_{KL}、

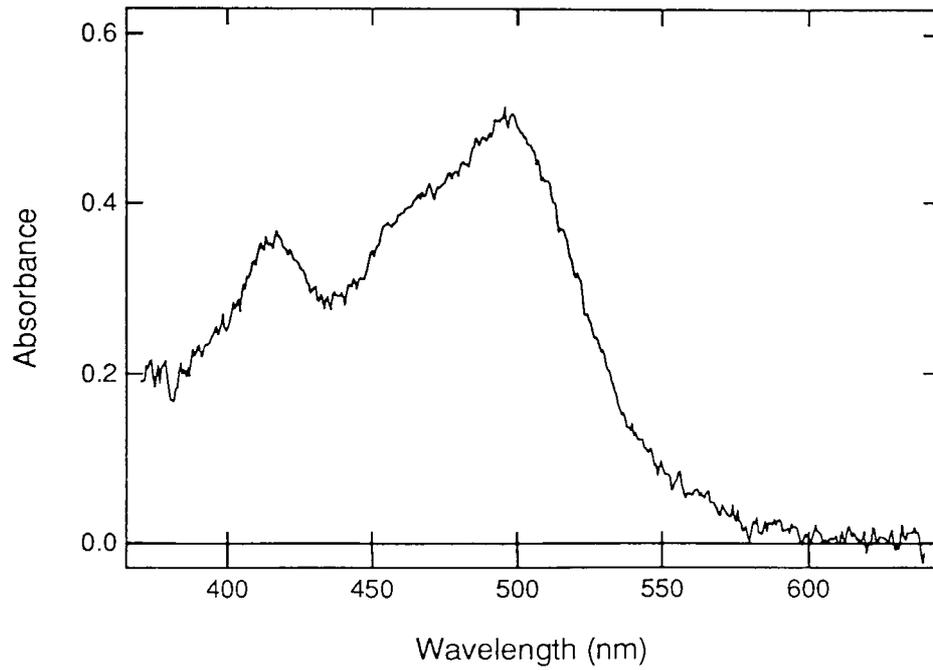


図4-1：閃光分解に用いた試料の吸収スペクトル。
このスペクトルは、対照に蒸留水を用いて、レーザー分光と同じシステムで記録した。

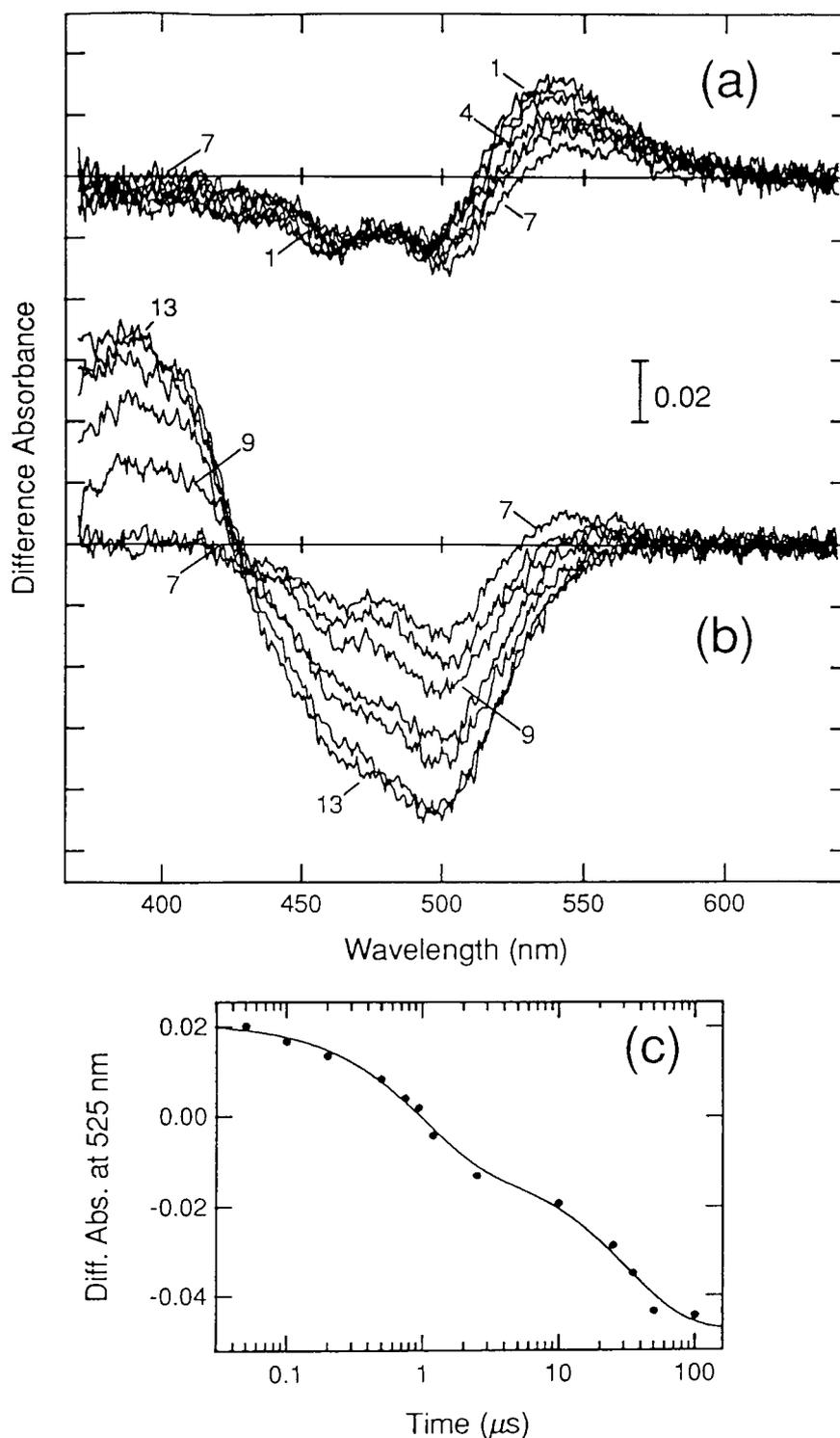


図4-2：ppRの光励起後の過渡吸収スペクトル。

ppR試料を波長460nm、パルス幅17ナノ秒のパルス光で励起し、その後のスペクトル変化を励起前との差スペクトルとして記録した。測定温度は20℃である。

(a) 励起後、50、100、200、500、750、950ナノ秒、1.2マイクロ秒後に測定した差スペクトル(カーブ1~7)。主に ppR_{KL} から ppR_L への反応が観測された。

(b) 励起後、1.2、2.5、10、25、35、50、100マイクロ秒後に測定した差スペクトル(カーブ7~13)。主に ppR_L から ppR_M への反応が観測された。

(c) 励起後の525nmでの吸光度変化を、時間に対してプロットし、二成分の指数関数曲線で近似した。時定数は990ナノ秒と32マイクロ秒であった。この値はそれぞれ ppR_{KL} 、 ppR_L の寿命に対応する。

ppR_Lが、室温では観測されたといえる。

次に、今回確認された ppR_{KL} と ppR_L の寿命を求めるため、図 4-2 a、b の 525 nm での吸光度変化を、励起後の時間に対してプロットした (図 4-2 c)。この吸光度変化の曲線は、二段階の減少を示し、二成分の指数関数曲線で近似できた。その結果、990 ナノ秒と 32 マイクロ秒という値 ($\tau_{1/e}$) が得られた。つまり、ppR_{KL}、ppR_L の寿命は、それぞれ 990 ナノ秒と 32 マイクロ秒と求められた。

4-3-2 ppR と反応中間体の絶対吸収スペクトル

次に、ppR_{KL}、ppR_L、ppR_M の絶対吸収スペクトルを計算した。計算のためには ppR の正確な (チトクロムの含まない) スペクトルが必要なため、それは以下の方法で求めた。ppR 試料には、少量のチトクロムが混入しているが、この試料を 100 mM のヒドロキシルアミン存在下で暗保すると、全トランス型レチナルオキシムと蛋白質部分に退色する (3-3-1)。退色後の試料の吸収スペクトルは、全トランス型レチナルオキシムと、含まれていたチトクロムの混合物のスペクトルになっている。今回の実験では、含まれていたチトクロムは少量であるので、その還元によるスペクトル変化の寄与は無視できた。他方、全トランス型レチナルオキシムの、今回用いた緩衝液中での吸収スペクトルを別に求めた。このレチナルオキシムのスペクトルを、ppR の退色後のスペクトルから適当量差し引けば、含まれていたチトクロムのスペクトルが定量的に求められる。ところが、どれだけのレチナルオキシムのスペクトルを差し引くかによって、得られるチトクロムの吸収スペクトルが違ってくるので、差し引きには何か目安が必要である。今回はチトクロムの吸収スペクトルの 420 nm と 380 nm の吸光度の比が 3.5 : 1 になるようにした。この比は、*Halobacterium halobium* チトクロムでの値である (Fujiwara et al., 1989)。得られたチトクロムの吸収スペクトルを、退色前の試料のスペクトルから差し引くことにより ppR の正確なスペクトルが得られた。簡便のため、ppR のスペクトルの吸収極大 (498 nm) での吸光度を 1.0 に補正した上で以下の計算に用いた (図 4-3)。

100 マイクロ秒後の差スペクトル (図 4-2 b、カーブ 13) には、390 nm を極大とする吸光度の増加と、500 nm を極小とする吸光度の減少とがあらわれている。450 nm 以上の長波長側の差スペクトルの形は、正負が逆転しているものの、ppR の吸収スペクトルの形とよく一致している。これは、ppR_M の吸収帯が短波長側にあるために、ppR との差スペクトルのこの領域には、ppR_M の寄与が現れない

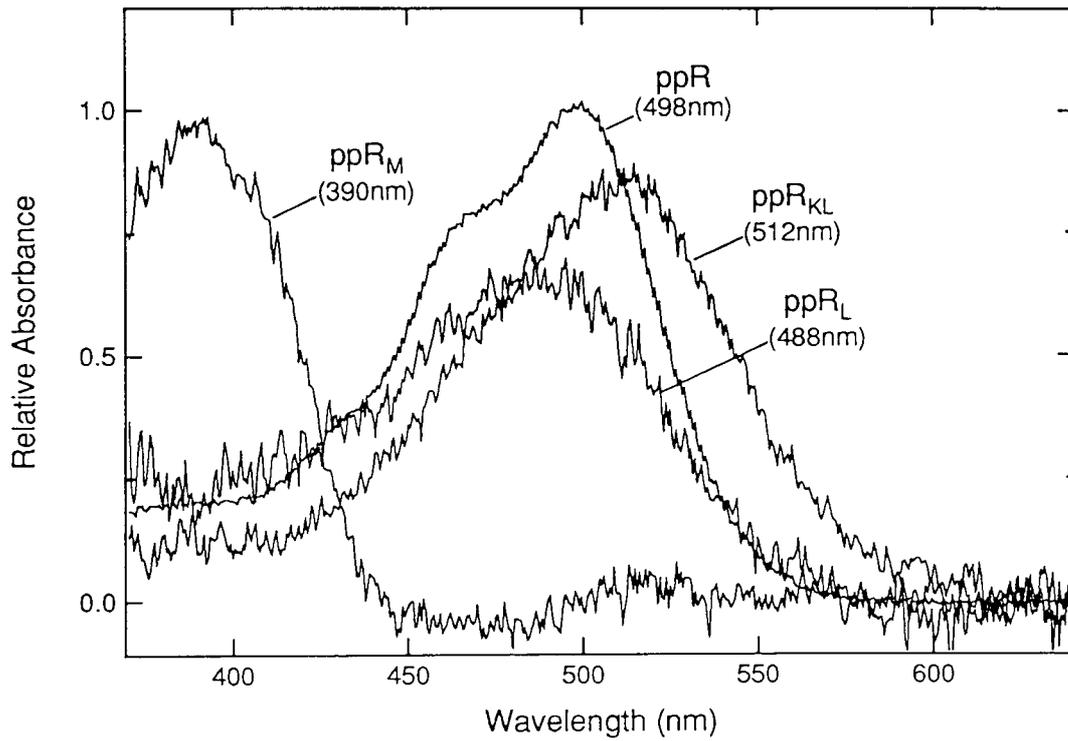


図4-3 ppR、ppR_{KL}、ppR_L、ppR_Mの吸収スペクトル。

ppR、ppR_{KL}、ppR_L、ppR_Mの吸収極大波長は、20℃でそれぞれ498、512、488、390 nmであった。また、それらのppRに対する相対的な分子吸光係数は、それぞれ0.85、0.68、0.95であった。

ためであると考えられる。また、 ppR_L の寿命が 32 マイクロ秒であることから、100 マイクロ秒後に測定した差スペクトルには ppR_L の寄与はほとんどなく、 ppR_M と ppR の差スペクトルになっていると考えてよい。そのため、 ppR_M の吸収スペクトルは、100 マイクロ秒後に測定した差スペクトルの、450 nm 以上の負の吸光度を相殺するように ppR の吸収スペクトルを加たものと考えることができる。100 マイクロ秒後に測定した差スペクトルの、500 nm の差吸光度は 0.087 なので、ここでは 0.087 にあたる ppR が ppR_M に変化していると考えられる。そのため、上記の ppR の吸収スペクトル、すなわち吸収極大 (498 nm) での吸光度を 1.0 に補正したスペクトル [ppR] を使えば、 ppR_M のスペクトル [ppR_M] は、

$$[ppR_M] = \text{Diff}_{100\mu s} / 0.087 + [ppR]$$

と計算される。ただし、 $\text{Diff}_{100\mu s}$ は励起後 100 マイクロ秒後に測定した差スペクトルを表す。なお、この計算により得られた ppR_M の吸収スペクトルでは、その吸収極大での吸光係数が ppR のものとの相対値に補正されている。

図 4-2 c では励起後の吸光度変化をプロットしたが、50 ナノ秒後の点は近似した二成分指数関数曲線からの偏差は小さく、 ppR_K の寄与は無視できると考えられる。そうすると、 ppR_{KL} の寿命は 990 ナノ秒なので、励起後 50 ナノ秒では、95% 以上が ppR_{KL} である。また、 $ppR_{KL} \rightarrow ppR_L \rightarrow ppR_M$ という分岐のない熱反応スキームを考えると、励起後 50 マイクロ秒では、100 マイクロ秒後に ppR_M に変化していたのと同量の ppR 、すなわち 0.087 の ppR が ppR_{KL} に変化しているため、 ppR_{KL} の吸収スペクトルは、以下の式で表される。

$$[ppR_{KL}] = \text{Diff}_{50ns} / 0.087 + [ppR]$$

ただし、 $[ppR_{KL}]$ は ppR_{KL} のスペクトル、 Diff_{50ns} は励起後 50 ナノ秒後に測定した差スペクトル (図 4-2 a、カーブ 1) である。一方、990 ナノ秒、32 マイクロ秒という二つの時定数から計算すると、1.2 マイクロ秒には 30% の ppR_{KL} と 69% の ppR_L が含まれている。そのため、 ppR_L のスペクトルは、

$$[ppR_L] = (\text{Diff}_{1.2\mu s} / 0.087 + [ppR] - 0.30 \times [ppR_{KL}]) / 0.69$$

と表される。ただし $[ppR_L]$ は ppR_L のスペクトル、 $Diff_{1.2\mu s}$ は励起後 1.2 マイクロ秒後に測定した差スペクトル (図 4-2 a、カーブ 7) である。以上の計算から、 ppR_{KL} 、 ppR_L 、 ppR_M の絶対吸収スペクトルを求めた (図 4-3)。

ppR_{KL} 、 ppR_L 、 ppR_M の吸収極大はそれぞれ 512、488、390 nm であった。また、 ppR のモル吸光係数を 1.0 とした時の ppR_{KL} 、 ppR_L 、 ppR_M の相対モル吸光係数は、それぞれ 0.85、0.68、0.95 であった。また、 ppR_{KL} 、 ppR_L では、 ppR に見られたような、スペクトルの振動構造は消失していた。これらの結果から、 ppR の光反応サイクルは図 4-4 のように示される。

[4-4 考察]

今回の室温での閃光分解では、低温スペクトル法で観測されなかった二つの中間体の生成を確認し、それぞれ ppR_{KL} 、 ppR_L と名付けた。これは、 bR の光反応サイクルで現われる KL 、 L 中間体に対応すると考えたからであるが、それは以下の理由による。

bR で観測されている中間体 (Shichida et al., 1983) 及び今回明らかになった ppR の中間体の性質を表 4-1 にまとめた。今回確認した ppR の 2 つの中間体の内、速い方の中間体 (ppR_{KL}) は、吸収極大が 512 nm、 ppR に対する相対吸光係数が 0.85、寿命が 1 マイクロ秒であり、 bR における KL 中間体に最も近い。また、 ppR_{KL} よりも長波長に吸収極大をもち、 K に対応すると思われる中間体 (ppR_K) は、室温でのピコ秒閃光分解で確認されており、少なくとも 5 ナノ秒までは安定である (水上ら、1991)。そのため、 ppR_K の寿命は 5 ナノ秒から、今回の測定限界であった 50 ナノ秒の間であると思われる。低温スペクトル法でみられた長波長中間体 (Hirayama et al., 1992) は、液体ヘリウム温度近く (-263°C) でも生成することから、第一光産物と考えられ、室温での ppR_K に対応すると思われる。

今回みられた ppR の遅い方の中間体 (ppR_L) は、吸収極大が 488 nm、 ppR に対する相対吸光係数が 0.68、寿命が 33 マイクロ秒であり、 bR における L 中間体に対応する。

ppR_{KL} 、 ppR_L は、低温では観測されなかったが、室温では観測された。 bR の場合にも、 KL は室温でのみ観測され、低温では観測されていない (Shichida et al., 1983; Iwasa et al., 1980)。しかし、 bR_L は低温でも観測され (Iwasa et al., 1980)、また、他のレチナール蛋白質でもそれに対応するルミ中間体が観測されているので

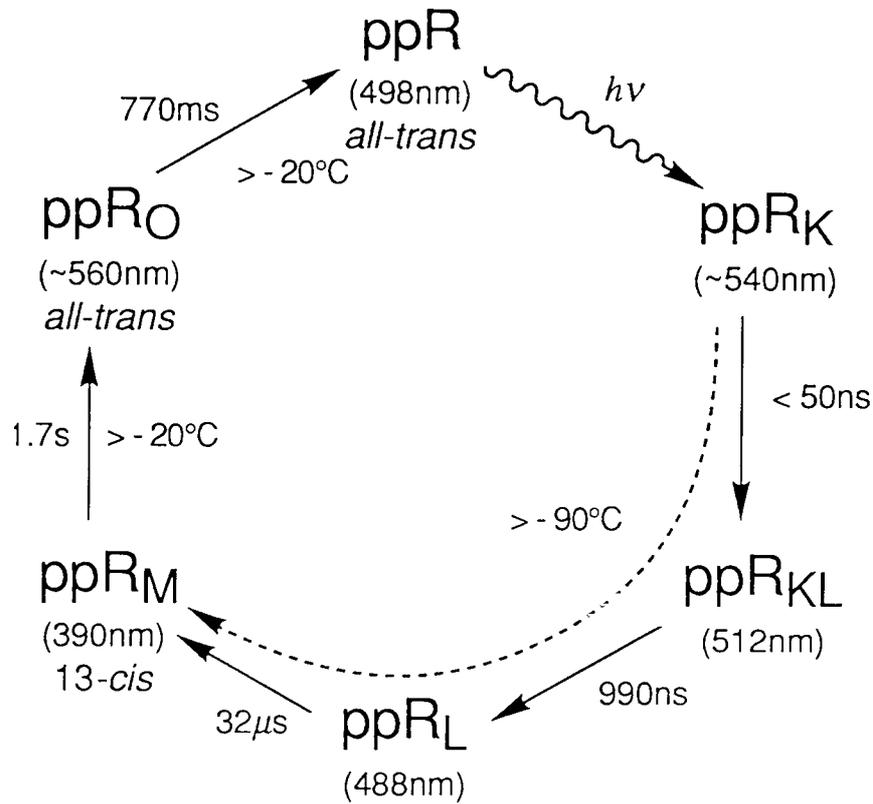


図4-4 : ppRの光反応サイクル。

光反応は波線で、熱反応は実線で表している。また、括弧内に ppR と中間体の吸収極大波長を示している。ppR_K は低温スペクトル法 (Hirayama et al., 1992)、あるいはピコ秒レーザー閃光分解法 (水上ら, 1991) により検出されている。ppR_{KL}、ppR_L の寿命は、本研究でそれぞれ 990 ナノ秒と 32 マイクロ秒と求められたが、低温スペクトル法では検出されなかった (破線)。ppR_M、ppR_O の寿命はそれぞれ 1.7 秒と 0.77 秒と報告されている (Miyazaki et al., 1993)。低温スペクトル法で求められた安定温度を矢印の横に併記した。

表4-1: bR と ppR、及びそれらの反応中間体の分光学的諸性質。

	吸収極大波長	相対吸光係数*	寿命
bR	568 nm	1.0	—
K	610 nm	0.92	~10 ns
KL	596 nm	0.80	2.2 μ s
L	543 nm	0.66	55 μ s

Shichida et al., 1983; Milder & Kliger, 1988

	吸収極大波長	相対吸光係数**	寿命
ppR	498 nm	1.0	—
ppR _K	~540 nm	?	5 ~ 50 ns
ppR _{KL}	512 nm	0.85	1.0 μ s
ppR _L	488 nm	0.68	32 μ s

* bR の吸光係数を 1.0 としたときの値。

** ppR の吸光係数を 1.0 としたときの値。

(Shichida et al., 1986; Yoshizawa et al., 1987)、 ppR_L が低温で観測されないことは、ppR の反応機構を探る上で注目すべき問題である。

bR と ppR の各中間体の室温での寿命と、低温スペクトル法で求められた安定温度を比較した (図 4-5 a)。これからわかるように、ppR の各中間体の室温での挙動は、bR のものに非常によく類似している。また、発色団が光によって全トランス型から 13 シス型に異性化することも同じである (第 3 章)。しかし低温では、 ppR_K の安定温度が、 bR_K に比べて非常に高い。これは pR でも見られた現象である (第 2 章)。 ppR_K の安定温度である -90°C という値は、 bR_L の安定温度にあたり、 ppR_K の崩壊と同時に ppR_L が崩壊して ppR_M が生成したと考えれば、 ppR_L が低温スペクトル法で観測されなかったことと符合する。つまり、 ppR_L が観測されないということは、一見 ppR_L の特徴のように見えるが、それは ppR_K の温度安定性に帰着できるということである。

一般に温度を下げると熱反応は遅くなるが、室温での寿命が、 ppR_K と bR_K でほぼ同じである事から、 ppR_K の寿命が bR_K よりも温度に依存することがわかる。 ppR_K と bR_K の室温と低温での寿命の対数を、その温度の逆数に対してプロットした (図 4-5 b)。この図では、低温スペクトル法で求められた安定温度での寿命が、10 ~ 100 分に相当すると仮定している。そうすると、室温での寿命が ppR_K と bR_K でほぼ同じなので、少なくとも定性的には、傾き、 y 切片ともに ppR_K の方が大きいといえる。遷移状態理論に従うと、以下のように、速度定数 (k) は、活性化自由エネルギー (ΔG^\ddagger) と比例し、 ΔG^\ddagger は活性化エントロピー (ΔS^\ddagger) と活性化エンタルピー (ΔH^\ddagger) の関数として表される。

$$k = kT / h \exp(-\Delta G^\ddagger / RT) = kT / h \exp(\Delta S^\ddagger / R) \exp(-\Delta H^\ddagger / RT)$$

ここで、 T は温度、 h はプランク定数、 k はボルツマン定数、 R は気体定数である。このことから、 ppR_K の活性化エンタルピー、活性化エントロピーともに、 bR_K のものよりも大きいという事が示される。 ppR_{KL} 以降の各中間体の熱的挙動やスペクトル的性質が bR の場合と類似している事から (表 4-1 参照)、 ppR_K の遷移状態が bR_K と同様であると仮定すると、 ppR_K の持つエントロピー自体が小さいと推測される。次章では、2、3、4 章で得られた知見をもとに、pR、ppR の光反応機構について考察する。

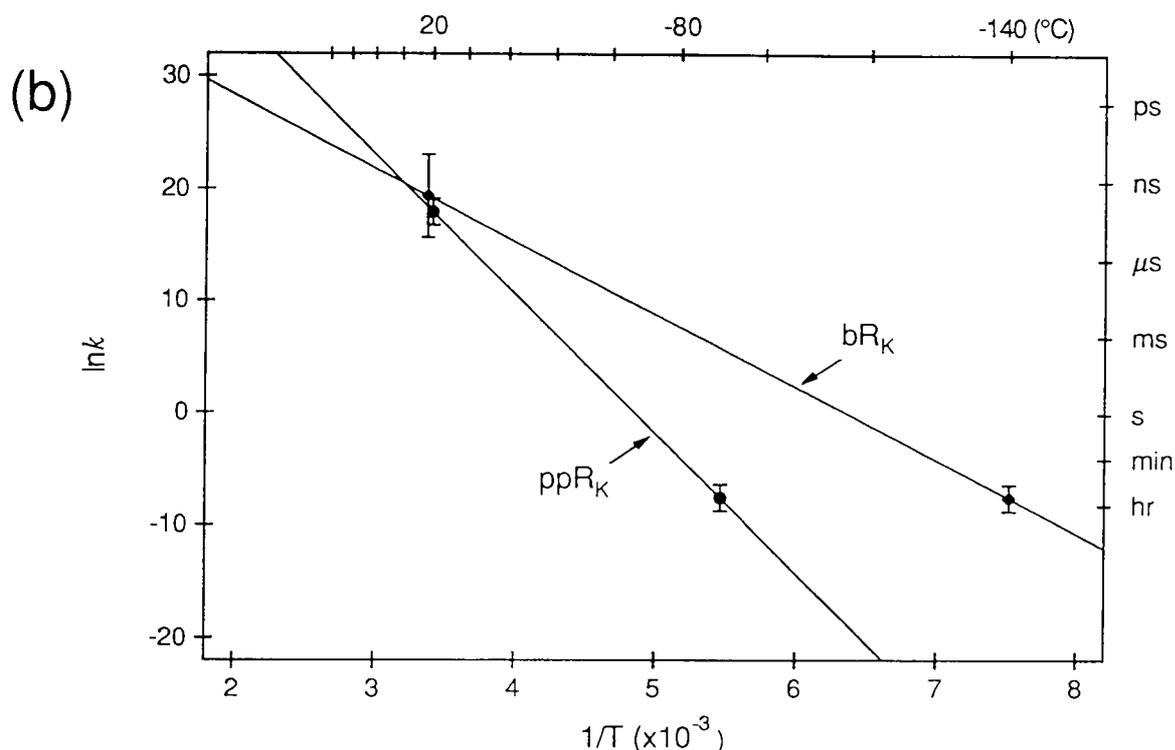
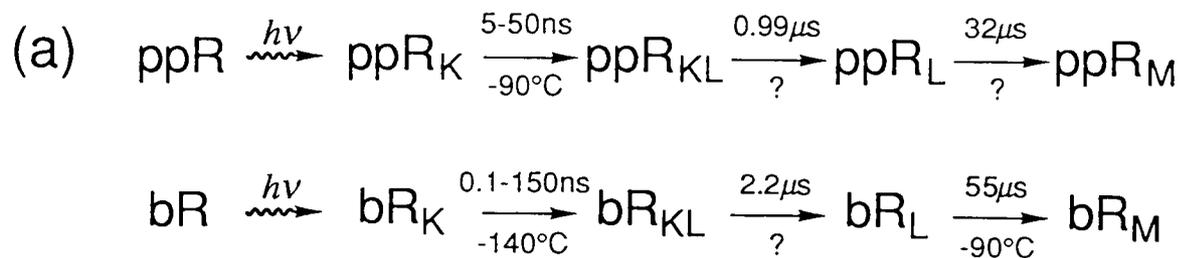


図4-5: ppR_Kの寿命の温度異存性。

(a) bRとppRにおける、低温と室温での時定数の比較。矢印上が20℃での寿命、下が低温での安定温度である。室温での各中間体の挙動はbRとppRではほぼ同じであるが、低温では、ppR_Kの安定温度が、bR_Kよりもかなり高くなっている。

(b) 低温と室温の、K中間体の寿命の対数を、絶対温度の逆数に対してプロットした(アレニウスプロット)。簡便のため、上軸に対応する温度、右軸に対応する時間を目盛った。低温での安定温度が、その温度で寿命が10~100分にあたと仮定している。少なくとも定性的には、傾き、y切片ともにppR_Kの方が大きい。これは、ppR_Kの活性化エンタルピー、活性化エントロピーともに、bR_Kよりも大きいことを意味する。

第5章

まとめ

[5-1 フォボロドプシンの光反応機構]

本論文でこれまで述べてきた実験結果の内、pRとppRの光反応機構に関する知見をまとめると、以下のようなになる。なお本章では、pRとppRの光反応機構は同一であるとして扱う。

- 1 暗順応型のpRの発色団は、全トランス型レチナールであるが、光を吸収すると13シス型に異性化する。(3章)
- 2 pRの吸収スペクトルには振動構造が現れるが、光を吸収してpR_Kが生成すると振動構造が消失する(1、4章)。
- 3 室温の光反応サイクルは、pR_{KL}、pR_Lが観測されるなど、bRのものとよく似ている(4章)。しかし、低温ではpR_Kの熱安定性が高く、pR_Lが観測されない。(2章)
- 4 pR_Kの寿命の温度依存性が高いことから、その活性化エンタルピー、活性化エントロピーともに大きい。(4章)

以上の結果から、ppRの発色団と蛋白質部分の相互作用を、モデルにあてはめて考えると、以下のような解釈が可能であろう(図5-1)。

まず、pRの発色団は全トランス型レチナールである。pRの吸収スペクトルに振動構造が現れることから、pRの発色団レチナールのβイオン環付近は蛋白質部分によって強く固定され、C₆-C₇単結合は、自由にねじれることが出来なくなっていると考えられる。pRが光を吸収すると発色団は13シス型に異性化し、pR_Kが生成する。pR_Kは、液体ヘリウム温度～液体窒素温度で生成する中間体である。このような極低温では、発色団の異性化反応は起こるが、蛋白質部分の大きな構造変化は起こらない。したがって、pR_Kの生成過程では、蛋白質部分に変化がほとんど無いと考えて、シッフ塩基部分を固定して異性化を考えると、発色団のβイオン環部分は、異性化によってシッフ塩基の方向に移動する。pR_Kでは、その吸収スペクトルから振動構造が消失するが、低温での高い温度安定性を考慮すると、bR_Kやロドプシンのバソ中間体のように発色団が強く捻れていることがその原因であるとは考えにくい。それよりも、発色団レチナールのβイオン環部分が、その固定部位から解放され、pRと比較して、C₆-C₇結合の回転の自由度が増すためと考えた方が妥当であろう。しかし、全トランス型と13シス型のレチナールの長さの違い(βイオン環部分の移動距離)は、約1.2オングストローム程度であるので

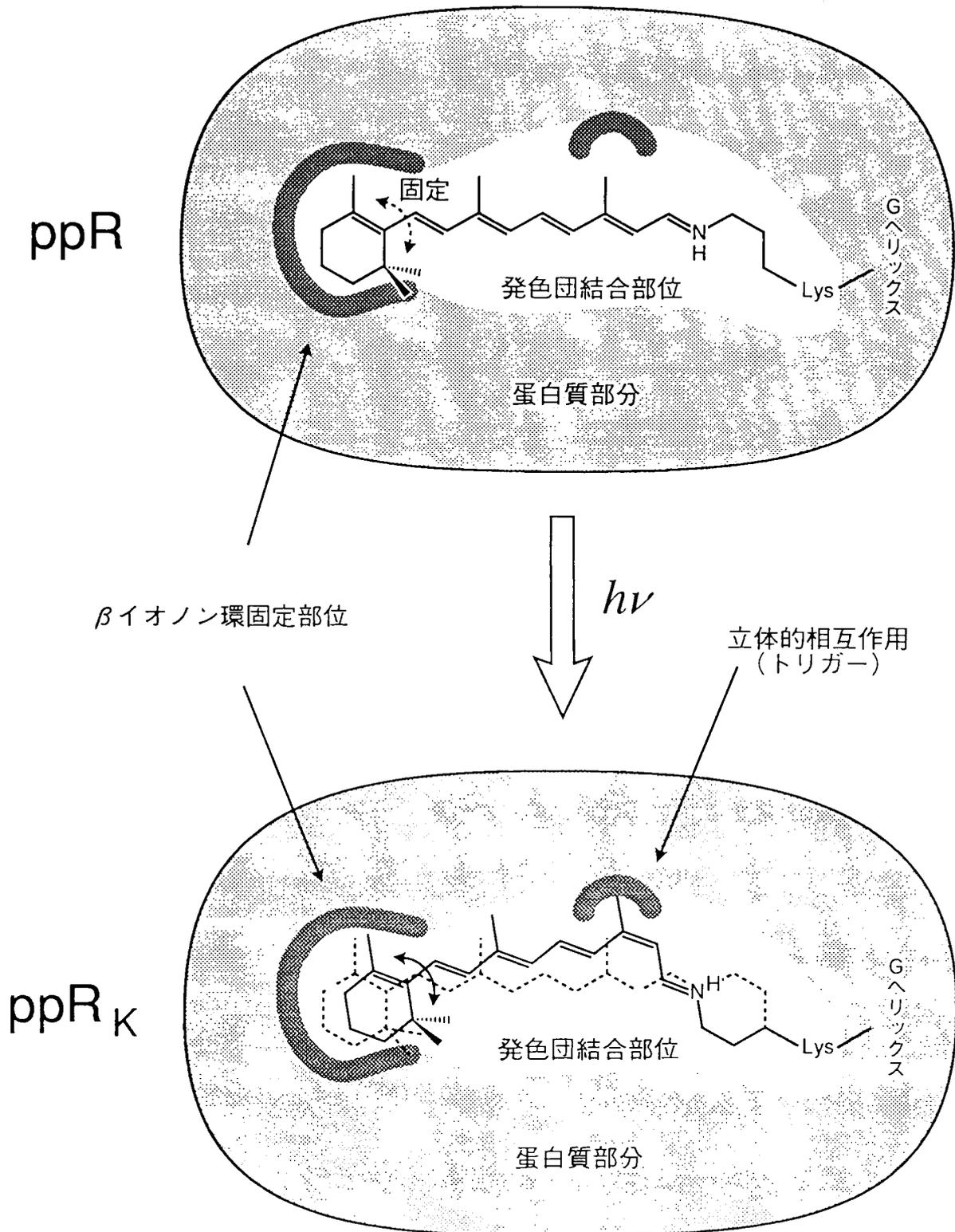


図5-1：ppRの発色団／蛋白質相互作用のモデル図。

(a) ppRの状態では発色団は全トランス型である。吸収スペクトルの微細構造から、蛋白質部分にβイオンン環固定部位があると考えられる。

(b) 光を吸収すると、発色団は13シス型に異性化する。そのため、発色団の両端の距離が短くなり、βイオンン環部位が蛋白質の固定部位から解放されることにより、吸収スペクトルの振動構造が消失する。また、βイオンン環周辺が狭いことから、発色団の自由度は低く、ppR_Kの活性化エンタルピーは大きい。そのため、低温にした時のppR_Kの安定性が非常に高まり、ppR_Lが観測されなくなる。

(Matsumoto et al., 1975)、完全に解放されるわけではなく、ある程度は固定されているため、 pR_K における C_6-C_7 結合の自由度は、 bR_K よりは小さいと考えられる。

低温スペクトル法では、 pR_K の後には pR_L は観測されず、見かけ上、 pR_K は直接 pR_M に変化した。ところが室温では pR_{KL} 、 pR_L が観測されたので、低温で pR_L が観測されなかったのは、 pR_K の温度安定性が pR_L と同じか、あるいは高くなったためであると考えられる。室温では pR_L よりも pR_K の方が不安定（寿命が短い）であるが、低温にしたときに pR_K の方が安定になるのは、その時定数に対する温度効果が大きいということである。このことを定性的に考えると、 pR_K の活性化エンタルピーが大きいということになる。また、室温での寿命が同じであることから、 pR_K の活性化エントロピーが大きいということも示唆される。 pR_L 以降の中間体の時定数等の性質は、 bR のものとよく類似しているので、 pR_L 以降では bR と同様の反応が起こっていると考えて、 pR_K の遷移状態が bR_K のものと同様であると仮定すると、 pR_K のもつエントロピーは小さいと考えることができる。このことをモデルにあてはめると、以下のような解釈ができる。

先に述べたように、 pR から pR_K に変化する時には、蛋白質部分の変化が少なく、 β イオン環固定部位は保たれているために、 pR_K の C_6-C_7 結合の自由度は、 bR_K のものよりも小さいと考えられる。また、 pR_K の高い安定性から考えて、 pR_K の発色団は bR_K ほど強く捻れてはいないと考えられる。以上の事から、 pR_K の発色団は、蛋白質部分の結合部位の中で、安定に、無理のない構造をとっていると推測される。これは、発色団の自由度が小さく状態数が少ないということである。そのため、 pR_K のもつエントロピーが小さいのであろう。 bR の場合にも、室温では ppR と同じく、 bR_K の後に bR_{KL} 、 bR_L が観測される。しかし低温では bR_{KL} は観測されない。 pR での解釈をあてはめて考えると、 bR_K の発色団の自由度は、 bR_{KL} のものよりも小さいと考えることができる。

pR の光反応機構において、以上の考えから導かれることは、 pR の光反応上の特徴は、蛋白質部分の β イオン環固定部位に帰着できるということである。また、振動構造をもった特徴的な吸収スペクトルの形状も、 β イオン環固定部位の存在が原因であると考えられる。このように、 pR はレチナールの β イオン環部分の固定という、独特の発色団/蛋白質相互作用で可視光を吸収できるようになった光受容蛋白質である。 bR 等、他のレチナール蛋白質のオブシンシフトは、発色団と蛋白質部分の立体的な相互作用の他にも、発色団近くのアミノ酸残基が、発色団レチナールの共役二重結合系に静電的な作用を及ぼすことが原因であるといわれている。

るので、pRの発色団／蛋白質間の相互作用は極めて特徴的といえる。このようなメカニズムで可視光の吸収能力を得ることに生理的な意味があるのかどうかは明らかにはされていないが、以下のように考えることも出来るだろう。

bRやロドプシンが幅広い吸収スペクトルをもつのは、光を吸収したときの基底状態と励起状態間のエネルギー準位が多数あるため、さまざまなエネルギーの光、つまり広い波長領域の光を吸収できるためであると考えられている。つまり、広くなだらかな吸収帯は、さまざまなエネルギー準位の足し合わせということである。ところが、pRのように発色団の β イオン環部分とポリエーテル部分が固定されている場合には、発色団の状態数が限られてしまうため、基底状態と励起状態のエネルギー準位の種類があまり多くなってしまふ。結果的にはエネルギー準位の平均化が不十分なので吸収スペクトルに振動構造が現れ、また、エネルギー準位の種類が少ないために、吸収スペクトルの半値幅が狭くなる。ppRの吸収スペクトルをウシロドプシンのものと比較してみると(図5-2)、短波長側では大差はないが、長波長側では吸収波長領域が狭くなっている。例えば、吸収極大の10%の吸光度をもつ波長は、ウシロドプシンでは575nmなのに対して、ppRでは549nmである。つまり、もしppRの吸収スペクトルがウシロドプシンと同じであれば、bRやhRの吸収極大にあたる570~580nmの光を吸収してしまうということである。もしそうであれば、ppRは負の光走性をトリガーする光受容蛋白質なので、菌体はbRやhRが最も効率よく光を吸収できる光環境から逃げてしまうことになる。ところが実際には、ppRの吸収スペクトルの幅は狭いために、bR、hRの吸収極大にはほとんど吸収をもたず、負の光走性を抑えられていると考えられる。つまり、スペクトルの半値幅を狭めて色識別能を高めていることが、pRやppRの特長ではないだろうか。

[5-2 今後の展望]

本研究では、pR、ppRの光反応過程の解析を、各種分光学的手法により行った。しかしながら、可視分光にとどまっているため、発色団についての知見が主であった。pRやppRの場合には、吸収スペクトルに振動構造が現れ、これを指標として発色団構造の議論を進めてきた。そのため、分光測定だけで、多くの推測が出来た。今後、さらに詳しい解析を行うには、振動分光が必須である。ppRの場合には、精

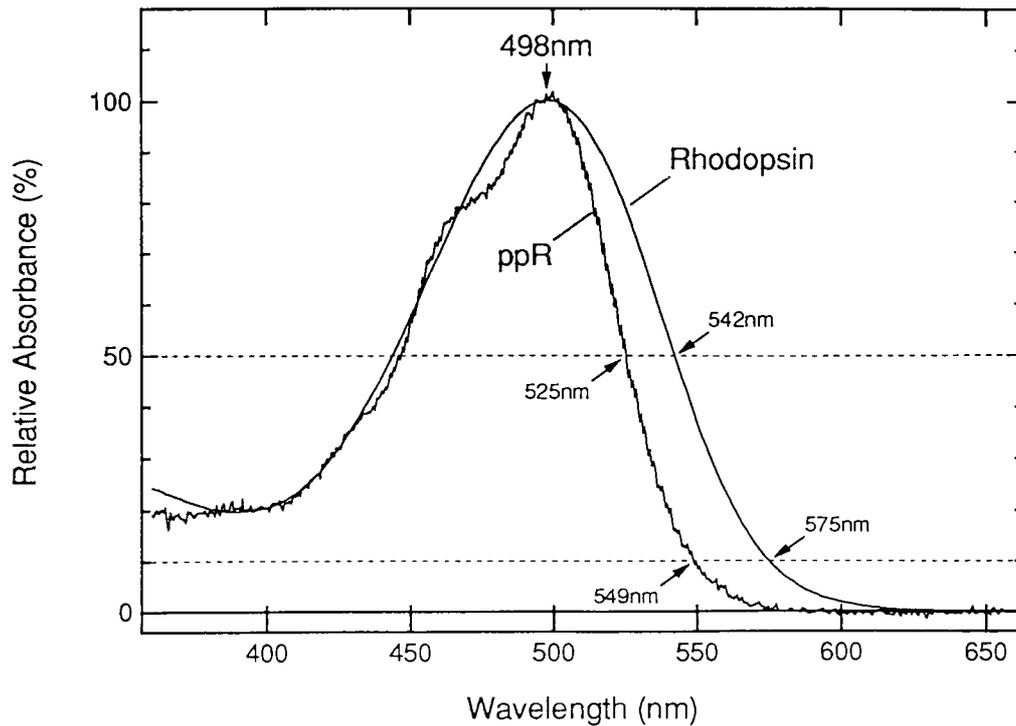


図5-2：ウシロドプシンとppRの吸収スペクトルの比較。

両者とも吸収極大波長は498nmであるが、半値幅が異なる。そのため、ppRではロドプシンと比較して、吸収極大よりも長波長側では吸収波長域はあまり広くない。吸収極大の50%の吸光度をもつ波長は、ppRでは525nmに対してロドプシンでは542nmである ($\Delta = 597 \text{ cm}^{-1}$)。また、吸収極大の10%の吸光度をもつ波長は、ppRでは549nmに対して、ロドプシンでは575nmである ($\Delta = 824 \text{ cm}^{-1}$)。

製方法が確立されてるので、FTIRのような透過型の赤外分光測定も十分に可能である。また、発色団の β イオン環部分とポリエン部分の平面度に関する知見を得るには、円偏光二色性の測定が適用できるだろう。また、 β イオン環部分を修飾したレチナルアナログを用いた実験も進行中であり、 β イオン環部分を立体的に大きくしたレチナルアナログは結合しにくいことから、 β イオン環部分の固定部位の存在が具体的に示されている (Hirayama et al., in preparation)。

その次の段階としては、発色団/蛋白質相互作用の解明を目指した研究が必要であろう。蛋白質部分の議論のためには、pR、ppRのアミノ酸配列の決定が不可欠である。いくつかのグループで試みられてはいるが、まだ成功には至っていないようである。おそらくは、pRは他のレチナル蛋白質とのホモロジーが低く、クローンを得るのが難しいのであろう。pRのオプシシフトのメカニズムは、ほとんど β イオン環部分の固定のみで行われており、その簡単なメカニズムから、他のレチナル蛋白質の先祖型ではないかという意見がある (Hirayama et al., 1992)。確かに、クラミドモナスのレチナル蛋白質も、pRのように振動構造をもつ吸収スペクトルである (Beckman & Hegemann, 1991)。そのため、pRの一次構造は分子進化の観点からも興味深い。

さらに、pR、ppRから鞭毛に至る情報伝達システムにも興味がある。視細胞では、情報伝達系の機能性蛋白質は、ほぼ役者がそろった感があるが、好塩菌ではまだまだこれからである。しかし、遠からず視細胞の伝達システムとの相違を議論出来るようになるだろう。

6 引用文献

- Alam, M., & Oesterhelt, D. (1984) Morphology, function and isolation of halobacterial flagella. *J. Mol. Biol.* 176, 459-475.
- Ariki, M., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1987) Low temperature spectrophotometry on the photoreaction cycle of sensory rhodopsin. *FEBS Lett.* 225, 255-258.
- Beckman, M. & Hegemann, P (1991) In vitro identification of rhodopsin in the green alga *Chlamydomonas*. *Biochemistry* 30, 3692-3697.
- Bivin, D. B., & Stoeckenius, W. (1986) Photoactive retinal pigments in haloalkaliphilic bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 132, 2167-2177.
- Bogomolni, R. A. & Spudich, J. L. (1982) Identification of a third rhodopsin-like pigment in phototactic *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 79, 6250-6254.
- Braiman, M., & Mathies, R. A. (1982) Resonance Raman spectra of bacteriorhodopsin's primary photoproduct: Evidence for a distorted 13-*cis* retinal chromophore. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 79, 403-407.
- Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Skulachev, V. P., & Zorina, V. V (1987) The mechanism of H⁺ transfer by bacteriorhodopsin: The properties and the function of intermediate P. *FEBS Lett.* 226, 139-144.
- Fujiwara, T., Fukumori, Y., & Yamanaka, T. (1989) Purification and properties of *Halobacterium halobium* "Cytochrome aa₃" which lacks Cu_A, & Cu_B. *J. Biochem.* 105, 287-292.
- Harbison, G. S., Smith, S. O., Pardo, J. M., Courtin, L., Lugtenburg, J., Herzfeld, J., Mathies, R. A., & Griffin, R. G. (1985) Dark-adapted bacteriorhodopsin contains 13-*cis*,15-*syn* and *all-trans*,15-*anti* retinal Schiff bases. *Biochemistry* 24, 6955-6962.
- Henderson, R., Baldwin, J. M., Ceska, T. A., Zemlin, F., Beckmann, E., & Downing, K., H. (1990) Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* 213, 899-929.
- 平山順一 (1991) Purification and characterization of *pharaonis* phoborhodopsin. 北海道大学薬学博士学位申請論文。
- Hirayama, J., Imamoto, Y., Shichida, Y., Tomioka, H., Kamo, N., & Yoshizawa, T. (1992) A photocycle of phoborhodopsin from haloalkaliphilic bacterium (*Natronobacterium pharaonis*) studied by low-temperature spectrophotometry. *Biochemistry* 31, 2093-2098.
- Honig, B., Hudson, B., Sykes, B. D., & Karplus, M. (1971) Ring orientation in β -ionone and retinals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 68, 1289-1293.
- Imamoto, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T., Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N. & Kobatake, Y. (1988) Low temperature spectrophotometric study on the photoreaction cycle of phoborhodopsin. in *Molecular Physiology of the Retinal Proteins*. (Hara, T., Ed.) pp361-362, Yamada Science Foundation, Osaka, Japan.

- Imamoto, Y., Kandori, H., Okano, T., Fukada, Y., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1989) Effect of chloride ion on the thermal decay process of the batho intermediate of iodopsin at low temperature. *Biochemistry* 28, 9412-9416.
- Imamoto, Y., Shichida, Y., Yoshizawa, T., Tomioka, H., Takahashi, T., Fujikawa, K., Kamo, N., & Kobatake, Y. (1991) Photoreaction cycle of phoborhodopsin studied by low-temperature spectrophotometry. *Biochemistry* 30, 7416-7424.
- Imamoto, Y., Shichida, Y., Fukada, Y., & Yoshizawa, T. (1991) Photochemical reactions of iodopsin, a mediator of chicken color vision. *Comp. Phys. Biochem* 8, 161.
- Imamoto, Y., Shichida, Y., Hirayama, J., Tomioka, H., Kamo, N., & Yoshizawa, T. (1992a) Chromophore configuration of *pharaonis* phoborhodopsin and its isomerization on photon absorption. *Biochemistry* 31, 2523-2528.
- Imamoto, Y., Shichida, Y., Hirayama, J., Tomioka, H., Kamo, N., & Yoshizawa, T. (1992b) Nanosecond laser photolysis of phoborhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*: appearance of KL and L intermediates in its photocycle at room temperature. *Photochem Photobiol* 56, 1129-1134.
- Imamoto, Y., Shichida, Y., Hirayama, J., Tomioka, H., Kamo, N., & Yoshizawa, T. (1992c) Chromophore configuration and photoreaction cycle of phoborhodopsin from *Natronobacterium pharaonis*. in *Structures and Functions of Retinal Proteins* (Rigaud, J. L., Ed.), *in press*.
- Iwasa, T., F Tokunaga, & T. Yoshizawa (1980) A new pathway in the photocycle of *trans*-bacteriorhodopsin, and the absorption spectra of its intermediates. *Biophys. Struct. Mech.* 6, 253-270.
- Kamo, N., Hazemoto, N., Kobatake, Y., & Mukohata, Y. (1985) Light and dark adaptation of halorhodopsin. *Archiv. Biochem. Biophys.* 238, 90-96.
- Kandori, H., Mizukami, T., Okada, T., Imamoto, Y., Shichida, Y., Fukada, Y., & Yoshizawa, T. (1990) Bathiodopsin, a primary intermediate of iodopsin at physiological temperature. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87, 8908-8912.
- Kehry, M. R., Doak, T. G., & Dahlquist, F W (1984) Stimulus-induced changes in methyl-esterase activity during chemotaxis in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 259, 11828-11835.
- Lanyi, J. K. (1986) Halorhodopsin: a light-driven chloride ion pump. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 15, 11-28.
- Lozier, R. H., Bogomolni, R. A., & Stoeckenius, W. (1975) Bacteriorhodopsin: a light-driven proton pump in *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 15, 955-962.
- Maeda, A., Iwasa, T., & Yoshizawa, T. (1977) Isomeric composition of retinal chromophore in dark-adapted bacteriorhodopsin. *J Biochem.* 82, 1599-1604.
- Maeda, A., Ogurusu, T., Shichida, Y., Tokunaga, F., & Yoshizawa, T. (1978) Formation of a 7-*cis* retinal pigment by irradiating cattle rhodopsin at low temperatures. *FEBS lett.* 92, 77-80.

- Maeda, A., Shichida, Y., & Yoshizawa, T. (1979) Formation of 7-*cis*- and 13-*cis*- retinal pigments by irradiating squid rhodopsin. *Biochemistry* 18, 1449-1453.
- Matsumoto, H., & Yoshizawa, T. (1978) Recognition of opsin to the longitudinal length of retinal isomers in the formation of rhodopsin. *Vision Res.* 18, 607-609.
- Marwan, W., & Oesterhelt, D. (1987) Signal formation in the halobacterial photophobic response mediated by a fourth retinal protein (P₄₈₀). *J. Mol. Biol.* 195, 333-342.
- Marwan, W., Schäfer, W., & Oesterhelt, D. (1990) Signal transduction in *Halobacterium* depends on fumarate. *EMBO J.* 9, 355-362.
- McCain, D., A., Amici, L., A., & Spudich, J. L. (1987) Kinetically resolved states of *Halobacterium halobium* flagellar motor switch and modulation of the switch by sensory rhodopsin I. *J. Bacteriol.* 169, 4750-4758.
- Milder, S. J., & Kliger, D. S. (1988) A time-resolved spectral study of the K, and KL intermediates of bacteriorhodopsin. *Biophys. J.* 53, 465-468.
- Miyazaki, M., Hirayama, J., Hayakawa, M., Kamo, N. (1993) Flash photolysis study on *pharaonis* phoborhodopsin from a haloalkaliphilic bacterium (*Natronobacterium pharaonis*). *Biochim. Biophys. Acta*, in press.
- 水上 卓、今元 泰、七田芳則、平山順一、富岡寛顕、加茂直樹、吉澤 透 (1991) ピコ秒レーザー分光法によるファラオニスフォボロドプシンの光化学初期反応過程の研究。日本生物物理学会第29回年会講演予稿集、pp258.
- Oesterhelt, D., & Stoeckenius, W. (1974) Isolation of the cell membrane of *Halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane. *Methods Enzymol.* 31, 667-678.
- Ogurusu, T., Maeda, A., Sasaki, N., & Yoshizawa, T. (1981) Light-induced reaction of halorhodopsin prepared under low salt conditions. *J. Biochem.* 90, 1267-1273.
- Ohtani, H., Kobayashi, T., & Tsuda, M. (1986) Photocycle of sensory rhodopsin: a new precursor of sR₃₇₀. *Photobiochem. Photobiophys.* 13, 203-208.
- Okada, T., Kandori, H., Shichida, Y., Yoshizawa, T., Denny, M., Zang, B. -W., Asato, A., & Liu, R. S. H. (1991) A spectroscopic study of the batho to lumi transition during the photobleaching of rhodopsin using ring modified retinal analogs. *Biochemistry* 30, 4796-4802.
- Sharf, B., Pevec, B., Hess, B., Engelhard, M. (1992) Biochemical and photochemical properties of photophobic receptors from *Halobacterium halobium* and *Natronobacterium pharaonis*. *Eur. J. Biochem.* 206, 359-366.
- Shichida, Y., Matuoka, S., Hidaka, Y., & Yoshizawa, T. (1983) Absorption spectra of intermediates of bacteriorhodopsin measured by laser photolysis at room temperatures. *Biochim. Biophys. Acta* 723, 240-246.
- Shichida, Y. (1986) Primary intermediates of photobleaching of rhodopsin. *Photobiochem.*

- Photobiophys.* 13, 287-307.
- Shichida, Y., Imamoto, Y., Yoshizawa, T., Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N., & Kobatake, Y. (1988a) Low-temperature spectrophotometry of phoborhodopsin. *FEBS Lett.* 236, 333-336.
- Shichida, Y., Nakamura, K., Yoshizawa, T., Trehan, A., Denny M., & Liu, R. S. H. (1988b) 9,13-*dicis*-Rhodopsin and its one-photon-one-double-bond isomerization. *Biochemistry* 27, 6495-6499.
- Smith, S. O., Pardoen, J. A., Mulder, P P J., Curry, B., Lugtenburg, J., & Mathies, R. A. (1983) Chromophore structure in bacteriorhodopsin's O₆₄₀ photointermediate. *Biochemistry* 22, 6141-6148.
- Smith, S. O., Pardoen, J. A., Lugtenburg, J., & Mathies, R. A. (1987) Vibrational analysis of the 13-*cis*-retinal chromophore in dark-adapted bacteriorhodopsin. *J Phys. Chem.* 91, 804-819.
- Spudich, E. N., Takahashi, T., & Spudich, J. L. (1989) Sensory rhodopsins I and II modulate a methylation/demethylation system in *Halobacterium halobium*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86, 7746-7750.
- Spudich, J., L. & Bogomolni, R. A. (1988) Sensory rhodopsins of halobacteria. *Annu. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 17, 193-215.
- Stoeckenius, W., & Bogomolni, R. A. (1982) Bacteriorhodopsin and related pigments of halobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 52, 587-615.
- Sundberg, S. A., Alam, M., & Spudich, J. L. (1986) Excitation signal processing times in *Halobacterium halobium* phototaxis. *Biophys. J.* 50, 895-900.
- Takahashi, T., Mochizuki, Y., Kamo, N., & Kobatake, Y. (1985a) Evidence that the long-lifetime photointermediate of S-rhodopsin is a receptor for negative phototaxis in *Halobacterium halobium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 127, 99-105.
- Takahashi, T., Watanabe, M., Kamo, N., & Kobatake, Y. (1985b) Negative phototaxis from blue light and the role of third rhodopsinlike pigment in *Halobacterium cutirubrum*. *Biophys. J.* 48, 235-240.
- Takahashi, T., Tomioka, H., Kamo, N., & Kobatake, Y. (1985c) A photosystem other than PS370 also mediates the negative phototaxis of *Halobacterium halobium*. *FEMS (Fed Eur. Microbiol. Soc.) Microbiol. Lett.* 28, 161-164.
- Takahashi, T., Tomioka, H., Nakamori, Y., Tsujimoto, K., Kamo, N., & Kobatake, Y. (1988) Phototaxis and second sensory pigment phoborhodopsin in *Halobacterium halobium*. in *Molecular Physiology of Retinal Proteins* (Hara, T., Ed.) pp149-154, Yamada Science Foundation, Osaka, Japan.
- Takahashi, T., Yan, B., Mazur, P., Derguini, F., Nakanishi, K. & Spudich, J. L. (1990) Color regulation in the archaebacterial phototaxis receptor phoborhodopsin (sensory rhodopsin II). *Biochemistry* 29, 8467-8474.

- 高橋哲郎、津田基之 (1989) 「高度好塩菌の走光性の光受容体—センサーロドプシンとフォボロドプシン」蛋白質 核酸 酵素増刊「視覚の分子メカニズム」、共立出版pp452-451.
- Tomioka, H., Takahashi, T., Kamo, N., & Kobatake, Y. (1986) Flash spectrophotometric identification of a fourth rhodopsin-like pigment in *Halobacterium halobium*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 139, 389-395.
- Tomioka, H., J. Otomo, J. Hirayama, N. Kamo, & H. Sasabe (1990) Isolation and characterization of a phoborhodopsin in phototactic haloalkalophile, *Natronobacterium pharaonis*. *IVth International Conference on Retinal Proteins* (Santa Cruz, Ca).
- Trehan, A., Liu, R. S. H., Shichida, Y., Imamoto, Y., Nakamura, K., & Yoshizawa, T. (1990) On retention on chromophore configuration of rhodopsin isomers derived from three *dicis* retinal isomers. *Bioorg. Chem.* 18, 30-40.
- Tsuda, M., Nelson, B., Chang, C. -H., Govindjee, R., & Ebrey, T. G. (1985) Characterization of the chromophore of the third rhodopsin-like pigment of *Halobacterium halobium* and its photoproduct. *Biophys. J.* 47, 721-724.
- Tsukida, K., Ito, M., Tanaka T., & Yagi, I. (1985) High-performance liquid chromatographic and spectroscopic characterization of stereoisomeric retinaloximes. *J Chromatography* 331, 265-272.
- Wolff, E. K., Bogomolni, R. A., Scheerer, P., Hess, B. & Stoeckenius, W. (1986) Color discrimination in halobacteria: spectroscopic characterization of a second sensory receptor covering the blue-green region of the spectrum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 83, 7272-7276.
- Yan., B., Takahashi, T., Johnson, R., Derguini, F., Nakanishi, K., & Spudich, J. L. (1990) All-*trans*/13-*cis* isomerization of retinal is required for phototaxis signaling by sensory rhodopsins in *Halobacterium halobium*. *Biophys. J.* 57, 807-814.
- Yan., B., Takahashi, T., Johnson, R., & Spudich, J. L. (1991) Identification of signaling states of a sensory receptor by modulation of lifetimes of stimulus-induced conformations: The case of sensory rhodopsin II. *Biochemistry* 30, 10686-10692.
- Yoshizawa, T., & Wald, G. (1967) Photochemistry of iodopsin. *Nature, London* 214, 566-571.
- Yoshizawa, T., & Shichida, Y (1982) Low-temperature spectrophotometry of intermediates of rhodopsin. *Methods Enzymol.* 81, 333-356.
- Yoshizawa, T., Shinozawa, T., Shichida, Y., Matuoka, S., Ioshida, S., Kandori, H., Sokabe, M., (1987) The transduction mechanism of light information in rod outer segment. in *Retinal Proteins* (Ovchinnikov, Yu. A. Ed.), VNU Science Press, pp75-84.

7 謝辞

本研究を進めるにあたりご協力頂いた方々に深く感謝致します。

私が5年半の間所属した、京都大学理学部生物物理学教室の七田芳則博士には、指導教官として数々の助言を頂きました。京大名誉教授で現 電気通信大学電子物性工学科の吉澤 透教授には、私が博士課程1年まで、所属研究室担当の教授として、ご指導頂きました。

北海道大学の故 小島陽之助教授、加茂直樹教授、高橋哲郎博士（現サントリー生物有機化学研究所）、富岡寛顕博士（現理化学研究所）、平山順一博士（現米国シラキュース大学）、藤川和久氏（現(株)中埜酢店 中央研究所）には、pR、ppRの調製に関してご協力頂きました。調製の難しい試料を快く調製して頂いた事を深く感謝致します。平山順一博士は、共同研究で京大に来られた事もあり、研究の面以外にも得るところが多かったと思います。

京都大学理学部生物物理学教室の前田章夫教授、深田吉孝助手には、研究室セミナー等を通じて色々な意見を頂きました。また、大学院生、学部学生として一緒に研究した皆様からも、公私全般にわたっていろいろと力になって頂いたことを感謝致します。