視物質と視興奮

大阪大学理学部
生物学教室

吉 沢

透^{*}

感覚生理学の一分野である視覚の解析は、生物の光に対する反応を目安に行なう反応生理的な方法と、その反応を電気的な現象とみなして研究する電気生理的な方法によって発展してきた。前者は動物の色覚の有無、明暗順応、視覚を生じるための最小光量子数の決定、その他数々の視覚の基本的な現象の発見と解析の、後者はこれらの反応のより精密な解析の有力な手段となっている。特に最近微少電極法の進歩により、光照射にともなって観察される電位変化を直接視細胞から誘導できるようになってきた。この実験により視細胞の中には光のエネルギーを電気的なエネルギーに転換する機構が存在することは確かである。このエネルギー転換機構はいうまでもなく視細胞を構成している分子のレベルで、さらに分子下のレベルで説明されねばならない。この意味において第三の研究方法であるいわゆる分子生理学的な研究方法が視興奮の初期過程の解明に重要な手段と考えられる。眼に投入して来る光は視細胞の中に存在する視物質によって吸収され、エネルギー転換機構をへて視細胞を興奮させるから、ここでは主として視物質の分子生理学的な研究を紹介し、その意義について考察してみたい。

I. 光受容器の構造

脊椎動物の眼の構造はよくカメラにたとえられる。光は眼の水晶体（レンズ）を通して、写真のフィルムに相当する網膜上に像を結ぶ（図1）。網膜はいくつかの細胞層からなる複雑な構造で、一番外側に視細胞層がある。光は神経繊維や神経細胞をとおり視細胞層に達する。視細胞層にはすい体とかん体の二種類の視細胞があり、すい体は昼間視（色覚）を、かん体は薄明視（明暗感覚）を司っている（図2）。視細胞の外節の構造が長軸方向に蛋白質層とリポイド層とが交互につみ重なっていることは、偏光顕微鏡を用いた実験から明らかにされていたが、その後電子顕微鏡やX線に

よりさらに詳しく研究された（図3）。かん体外節の中には厚さ100~150Åの二重膜円板が100~150Åの距離をおいて、1000個位含まれている。円板の膜の

図1. ヒトの眼の水平断面 (Wall, 1942改変)

図2. 霊長類の網膜の構造 ((Polyak, 1941)

1: 色素上皮層 (この層の上に脈絡膜がある), 2~10: 網膜 2a~5b: 視細胞層 (太いのがすい体, 細いのがかん体) 2a: 視細胞外節, 2b: 視細胞内節, 4a: すい体の核, 4b: かん体の核, 5b: シナプス, 5c~10: 神経細胞層

Visual Pigment and Visual Excitation;

* Tōru YOSHIZAWA: Department of Biology, Faculty of Science, Osaka University

図3. モルモットのかん体
(Sjöstrand, 1956改変)

厚さは約 $50 \text{ \AA}$ で、その間に $0-50 \text{ \AA}$ の内腔がある。外節の中のどこに視物質が存在しているかは未だ明らかにされていないけれども、蛋白質層とリポイド層の間に単分子層をなして配列していると考えられる。外節の中には繊維毛が通っているので、視物質の光吸収によって生じた興奮はこの繊維毛を通して内節へ伝わるとも考えられるが、この繊維毛が外節の長軸方向にせいぜい半分位しか延びていないので、恐らく興奮は視細胞を包む原形質膜を通して内節からシナプスに伝わるのではないと思われる⁴⁾。内節には巨大なミトコンドリアが多数存在しているから、この部分は外節の栄養を司っているものと思われる。

II. 視物質

1. 抽出

視物質は水に不溶性のリポ蛋白質であるから、表面活性剤を用いて水溶液にすることができる。Kühne (1877) が始めて胆汁酸を用いて暗順応した網膜から視物質を抽出した。その後色々な抽出剤が使用されてきたが、純度に関して現在のところジギトニンが最も

すぐれた抽出剤である。視物質は視細胞外節に局在しているから、出来るだけ純度のよい視物質を抽出するには、先ず外節だけを網膜の他の組織から分離して集める必要がある。斎藤 (1938) が高濃度蔗糖溶液を用いる遠心分離法を発見して以来、色々な変法⁹⁾ が行なわれている。

ウシのロドプシン (rhodopsin) 抽出法について簡単に述べる。暗順応した網膜を碎いてから、36%蔗糖液中で遠心分離すると、殆んど外節だけが液面に浮んでくる。外節を取りだし、明ばん液を加え、外節に含まれているロドプシン以外の蛋白質を不溶性にする。冷凍乾燥後石油エーテルで外節に含まれているリポイドを除去してから、2%ジギトニンを加えロドプシンを抽出する。

以上の操作はロドプシンの感じない暗赤色光の下で行なわれなければならない。このようにして抽出されたロドプシンは1分子当り180~200分子のジギトニンと複合体を作っている。明網膜について同じ操作を明所で行なうと、ロドプシンのリポ蛋白部分であるオプシン (opsin) を抽出することが出来るし、淡水魚の暗網膜を用いるとポルフィロプシン (porphyropsin)⁷⁾ を抽出することが出来る。すい体に含まれている視物質アイオドプシン (iodopsin) はニワトリ、ハト⁸⁾ などから抽出されている。アイオドプシンは明ばんで分解するから、上記の方法のうち明ばん処理を省略しなければならない。

2. 吸収曲線

ロドプシン (分子量: 約40,000) の吸収曲線は図4に示すように3つの吸収帯からなっている。 α 吸収帯 (吸収極大 $\lambda_{\max}$: 約500 $m\mu$, 分子吸光係数 $\epsilon_{\max}$: 約40,000)¹⁰⁾ は薄明視感度曲線とよく一致し、他に近紫外部に小さな β 吸収帯 ($\lambda_{\max}$: 約350 $m\mu$)、紫

図4. ヒトのロドプシンの吸収曲線
(Wald, Brown, 1958,¹⁸⁾改変)

外部に芳香族アミノ酸を含む蛋白質が示す γ 吸収帯 ($\lambda_{\max}$: 278m μ) がある。 α , β 吸収帯は主としてロドプシンの発色団レチナール (retinal, 以前はレチニン retinene と呼ばれていた) に, γ 吸収帯はリポ蛋白質部分オプシンに関係している。

視物質の純度は普通 400m μ 近辺の吸収極小に対する可視部の吸収極大の吸光度の比 (ロドプシンの場合は E_{400}/E_{500}) であらわされる。この値が小さい程, 純度がよいことになる。前述の方法で抽出したロドプシンの純度 (光学的純度) は 0.2 にかなり近いが, この値以下になることはない。¹¹⁾ なお業外部における純度の標準として E_{278}/E_{500} を用いることがある。

抽出されたロドプシンの可視部の光学的純度が 0.3 以上の値を示す時, α 吸収帯の $\lambda_{\max}$ は溶液に含まれている不純物のため, しばしば短波長側にずれる。正確な吸収極大を決定するために, いわゆる差吸収曲線を求めるのが普通である。そのため試料に中性ヒドロキシルアミンを加え, 照射前の吸収曲線から照射後の吸収曲線をさしひく。ヒドロキシルアミンの存在下ではロドプシンの光退色によって生じた黄色のレチナールは直ちにヒドロキシルアミンと結合して無色のレチナールオキシムになる。したがって照射後測定され

た可視部の吸収曲線は試料中の不純物によるものである。このような条件で求めた照射前後の差吸収曲線は 430m μ 以上の領域では不純物を含まないロドプシンの吸収曲線とよく一致する。差吸収曲線を求めるもう 1 つの方法はロドプシン溶液の水素イオン濃度をアルカリ性 (pH9.0以上) にすることである。照射後生じたオプシンは直ちに変性してからレチナールとシフ塩基 (Schiff base) 結合し, インジケターイエロー (indicator yellow) を生じる。インジケターイエローは酸性で黄色, アルカリ性で無色であるが, この場合照

射前後の差吸収曲線の吸収極大は真の吸収曲線に較べ, 吸収極大は約 2 m μ 長波長側に存在する。¹³⁾

3. 種類

現在各種動物主として脊椎動物から抽出されている

視物質は 100 種以上に及んでいる。¹⁴⁾ 抽出された視物質の $\lambda_{\max}$ は動物の種類によってかなりちがっている。一般に脊椎動物のロドプシンは 500m μ 近辺に $\lambda_{\max}$ をもつが, 淡水魚のかん体から抽出された視物質 (ポルフィロプシン) は 522m μ 近辺に $\lambda_{\max}$ がある¹⁵⁾。この $\lambda_{\max}$ のちがいは主として視物質の発色団レチナールのちがいによるものである。すなわちレチナールの前駆体であるビタミン A に 2 種類 A₁ と A₂ があり, それに対応してレチナール₁ とレチナール₂ とがある。ロドプシンはレチナール₁ とオプシンとが結合したもの

図5. ビタミン A₁ と A₂ およびそのレチナール

であり, ポルフィロプシンはレチナール₂ と結合したものである。鳥類のすい体に存在するアイオドプシン ($\lambda_{\max}$: 562m μ) の発色団はレチナール₁ である⁸⁾ から, ロドプシンとアイオドプシンのちがいはかん体オプシンとすい体オプシンの構造のちがいに帰せられる。脊椎動物のロドプシンでもくわしく調べると $\lambda_{\max}$ が 478 m μ (深海魚の一種)¹⁵⁾ から 524m μ (ヤモリ)¹⁶⁾ にも及んでいるから, 動物の種によってオプシンの構造がちがっていることがわかる。

Ⅲ. 視物質と視感度曲線

視物質とは化学的にはレチナールとオプシンとが結合したもので、光によって速やかに反応するものであると一応定義することは出来るが、視物質が視物質であるゆえんはそれが光を吸収することによって視覚が生じるという点にある。したがって視物質の吸収曲線は反応生理学的に求めた視感度曲線と比較されなければならない。視感度曲線は実験動物が一定の反応を示すに必要な最小の光エネルギーの逆数、すなわち感度を各波長に対して目盛った曲線である。視物質の吸収曲線と比較する場合には、光のエネルギーの代りに光子の数の逆数を用いなければならない。

視物質の吸収曲線と視感度曲線の比較の例として、ヒトの場合について述べるのが最も興味深いと思われる。ヒトのロドプシンを最初に抽出したのは König と Kottgen (1894) であるが、その後 Crescitelli 等 (1953)¹⁷⁾ は光学的純度0.77, $\lambda_{\max}$ 490m μ をもつヒトのロドプシンを抽出し、そのアルカリ差吸収曲線から真の $\lambda_{\max}$ は 497m μ に存在すると報告した。この差吸収曲線はヒトの薄明視感度曲線 ($\lambda_{\max}$: 約500m μ) とかなりよく一致している。その後 Wald 等 (1958)¹⁸⁾ はかん体から光学的純度約0.25というきれいなロドプシンを抽出した (図4) が、その吸収曲線 ($\lambda_{\max}$: 493m μ) は薄明視感度曲線より短波長側に位置している。このような差はロドプシンがかん体外節の中で、溶液として存在しているのではなくて、凝結晶状態として存在しているためであると考えられる。

図6. ヒトのロドプシンの吸収曲線と薄明視感度曲線との比較 (Wald, Brown, 1958)¹⁸⁾

実際かん体外節粒子のヒドロキシルアミン差吸収曲線の $\lambda_{\max}$ は 500m μ に存在し、網膜表面で測定された薄明視感度曲線と完全に一致することが示された (第6図)。その後顕微分光光度計*を用いて、網膜の周辺部 (殆んどかん体だけ存在) の吸収を測定し、ヒドロキシルアミン差吸収曲線の $\lambda_{\max}$ が 500m μ に存在していることを明らかにした。さらに単一かん体の差吸収曲線の $\lambda_{\max}$ が 505m μ に存在することが観察された²¹⁾。この 5m μ の長波長側への波長のずれは、差吸収曲線を求める時に、ヒドロキシルアミン等を添加しなかったためと思われる。

以上述べてきたようにロドプシンの吸収曲線は溶液から遊離網膜へと生理的に近い条件で測定されてきている。この意味において次に述べる Rushton²²⁾ の方法は生きているヒトの眼を用いて視物質の吸収曲線を測定することが出来るから、非常に興味深い。彼は眼科医の用いる検眼鏡からヒントをえた。すなわち眼に入射してきた光は網膜を通り、それから色素上皮層または脈絡膜 (図1, 2) で反射され、再び網膜を通過して出て来るから、この光を測定することにより、生きた人の眼の視物質の吸収を測定することが出来る。この原理を応用した反射分光光度計 (reflection densitometer) を用いて網膜周辺部を測定し、ヒトのロドプシンの吸収曲線 ($\lambda_{\max}$: 500m μ) と薄明視感度曲線とが一致することを観察した。

この方法を利用してすい体視物質の吸収曲線を測定することも出来る。網膜の黄斑部 (図1) は殆んどすい体ばかりである。また赤色盲の人は赤色感光性の視物質がないと考えられる。そこで実験は初め赤色盲の人の黄斑で行なわれ、約 540m μ に $\lambda_{\max}$ のある差吸収曲線が得られた。この曲線は赤色盲の人の昼間視感度曲線とほぼ一致する。また正常な人の黄斑の吸収を測定してから、赤色光で黄斑を照射し、赤色光照射前後の差吸収を測定すると、590m μ に $\lambda_{\max}$ をもつ赤色感光性の視物質がえられた。赤色光照射後ひきつづき白色光で照射し、白色光照射前後の差吸収スペクトルから 540m μ に $\lambda_{\max}$ をもつ緑色感光性の視物質がえられた。これは前述の赤色盲の人の緑色感光性の視物質と一致する。このようにしてヒトのすい体視物質に二種類存在することがわかった。その後顕微分光光度計による黄斑部、さらに単一すい体の差吸収曲線から、赤色、緑色、青色にそれぞれ感じる三種のすい体視物質が確認された (表1)。これらの視物質は

* 顕微分光光度計による視物質の研究は、花岡・藤本¹⁹⁾ (1957)によって始めて行なわれた。

表1. 円すい体視物質の吸収極大と視感度曲線の極大

	研 究 者	研 究 方 法	円すい体視物質の λ_{max}		
			青 色	緑 色	赤 色
視物質の吸収曲線	Rushton (1958) ²³⁾	反射分光法・黄斑	—	540	590
	Brown & Wald (1963) ²⁰⁾	顕微分光法・黄斑	440	535	565
	Brown & Wald (1964) ²¹⁾	顕微分光法・単一円すい体	450	525	555
	Marks, Dobelle & Mac Nichol (1964) ²⁴⁾	顕微分光法・単一円すい体	457	535	570
視感度曲線	Stiles (1959) ²⁵⁾	二色閾値法 ^{a)}	440	540	575
	Wald (1964) ²⁶⁾	差別順応法 ^{b)}	430	540	575

a) two-colour threshold technique, b) differential adaptation method

特定の波長の光で順応してから求めた視感度曲線とかなりよく一致していることが表1からわかる。このようにしてヤング・ヘルムホルツ (Young Helmholtz) の色覚の三色説に対して、物質的な裏付けがなされた。なお顕微分光光度計で測定された黄斑の差吸収曲線は屋間視感度曲線 (λ_{max} : 約 550m μ) と非常によく一致している。

IV. 視物質の反応回路

1. ロドプシンの退色過程

脊椎動物のロドプシンに光をあてると、赤い色から橙黄色をへて、最後に黄色になる。この退色過程は光反応とそれにつづく熱反応からなりたっている。低温下では退色の速度が非常におそくなるから、容易にロドプシンの中間産物を観察することができる。現在この退色過程には少なくとも4つの中間産物が存在すると考えられている。ロドプシンの第一光産物は吉沢・鬼頭 (1958)^{27,28)} により液体窒素 (-195°C) 中でウシのロドプシンを照射することにより発見の糸口がつかまれた。現在我々はこれをプレルミロドプシン (pre-lumirhodopsin)²⁹⁾ と呼んでいる。ロドプシンが -195°C で光を吸収するとプレルミロドプシンになるが、これが再び光を吸収するとロドプシンにもどる。かような可逆的な光反応はロドプシンの発色団レチナールのシス・トランス光異性化によるものである。^{29),31)} プレルミロドプシンを -140°C 以上に温めると、第2の中間産物ルミロドプシン (lumirhodopsin) へ変化する^{29),31),32)}。ルミロドプシンは -40°C まで安定であるが、この温度以上になるとメタロドプシン I (metarhodopsin I)^{29),34)} に変化する。以上の変化は主としてオプシンの高次構造変化によるものである。メタロドプシン I は

^{31)~33)}
-15°C まで安定で、この温度以上でメタロドプシン II と互変平衡 (tautomeric equilibrium) を形成する。この段階までオールトランス・レチナールはオプシンのリジン残基 (lysine residue) とシフ塩基結合をしている。³⁵⁾ 酸性度を高めると、シフ結合から H⁺ が失われ、メタロドプシン I は II の方へ移行する。³⁴⁾ それとともに試料の色は橙黄色から薄黄色になる。0°C 以上ではメタロドプシン II は加水分解して、オールトランスレチナールとオプシンにわかれる。

常温で照射しても以上のような中間産物を通してロドプシンが退色して行くと考えられる。閃光法 (flash photolysis) の実験により、プレルミロドプシンは -25°C ~ -75°C で溶液ならびにかん体の粒子で観察されているし、メタロドプシン I も室温で観察されている。^{36),37)} またこれらの中間産物はいずれも光可逆的である。この性質を考慮して理解できる実験がたくさん報告されている。^{37),38)} とくに生きているウサギの眼をいかに強く照射しても、照射時間が短かい限り網膜内の視物質が半分以上退色しないという実験事実は、生体内においても中間産物が形成され、それが再び光を吸収してロドプシンが生じたと考えて始めて理解される現象である。^{27)~32),34)}

2. レチナールとビタミンAとの相互転換

ロドプシン溶液を照射するとその赤い色がなくなり、最後に黄色のレチナールになるが、網膜を照射した時には生じたレチナールは外節に存在するレチナール還元酵素 (retinene reductase) とその補酵素によって無色のビタミンAへ還元される。レチナールの還元反応はウマの肝臓から抽出した結晶アルコール脱水素酵素 (alcohol dehydrogenase) ⁴⁴⁾ でもよいし、またその

図7. ロドプシンの反応回路 (ウシ)

補酵素も NADH (DPNH) でも NADPH (TPNH) でもよい。しかしかん体外節浮遊液を用いた実験⁴⁵⁾では NADPH を用いた時の方が反応速度は大きい。外節の中にはエムデン マイヤーホッフ (Emden Meyerhof) 経路にある酵素の活性は低いが、ブドウ糖を磷酸化するヘキソキナーゼ (hexokinase) やシャントメカニズム (shunt mechanism) の脱水素酵素の活性は高いから、NADP を還元する全酵素系が外節の中に存在しているようである。Futtermann (1963)⁴⁶⁾の実験によると、外節の中ではシャントメカニズムによるブドウ糖の酸化によって還元された NADPH がレチナールの還元反応につかわれているようである。このようにロドプシンの反応回路は網膜のブドウ糖代謝と関係している。レチナールから生じたビタミン A は、明順応の間に網膜または色素上皮層でエステル化され、そこに貯蔵される。^{48) 49)}

暗順応の過程では、ビタミン A エステルは視細胞にもどり、エステラーゼ (esterase) により加水分解され、遊離型になる。⁴⁹⁾多くの組織ではふつう NAD は酸化型で、NADP は還元型で存在しているから、ビタ

ミン A は恐らく NAD を補酵素とするレチナール還元酵素によって、再びレチナールになるにちがいない。NAD-レチナール還元酵素系によるビタミン A とレチナールの平衡は、はるかにビタミン A 側にかたむいている。しかし視細胞内では生じたレチナールは直ちにオプシンと反応するから、ロドプシンがたえず再生して来る。^{50) 51)}

3. レチナールの異性化と再生

生体から抽出したオプシンにビタミン A, NAD, アルコール脱水酵素を加えて暗保すると、ロドプシンが合成されてくる。この場合に用いられたビタミン A は魚の肝油から取り出されたもので、もし合成ビタミン A を用いた場合にはロドプシンが出来てこない。^{52) 53)}この事はロドプシンの合成には特殊な立体構造をもったビタミン A が必要であることを意味している。現在知られているビタミン A の立体異性体は 5 種類ある (図 8)。通常の合成または結晶のビタミン A はオールトランス型である。オールトランス型のビタミン A ならびにレチナールの 9—10, 13—14 の位置にある二重結合は容易に回転し、9 シス型, 13 シス型, 9, 13 ダイシス型

ビタミンA

図8. ビタミンAの立体異性体

等3つのシス型に転換する。これらのシス型の場合それぞれ8と11または12と15の炭素の位置にある水素原子の間にごくわずかではあるが立体障害が生じる。このようなシス型は一般に非立体障害シスと呼ばれている。これに対して11-12の位置にある二重結合がシス型になる時、10の炭素原子の水素と13の炭素にあるメチル基との間に大きな立体障害が生じ、分子の平面性は失われ、よじれまがった立体構造をとる。11シス型はこのような状態のシス異性体で、立体障害シスと呼ばれている。これはオールトランス型、非立体障害シス型に較べかなり不安定である。7-8の位置にある二重結合はβ-イオン環(β-ionone)と側鎖の間に立³⁵⁾体障害が生じるためにシス構造をとることが出来ない。

以上述べた5種のビタミンAの異性体はその立体構造に関係なく、アルコール脱水素酵素系や二酸化マン

ガンで酸化され、それぞれのレチナールに変化する。今11シスレチナール⁸⁾にかん体またはすい体のオプシンを加えると、網膜から抽出したロドプシンまたはアイオドプシンとまったく同一のものが出来てくる。9シスレチナール⁵²⁾もオプシンと結合して、ロドプシンまたはアイソロドプシンと類似の感光色素が形成される。これらはそれぞれアイソロドプシン (isorhodopsin) またはアイソアイオドプシン (isoiiodopsin) と呼ばれ、11シス型の視物質よりかなり短波長側に吸収極大をもっている。他の異性体はオプシンと反応しない。ビタミンA₂に関しても以上述べたことは同じである。11シスレチナール⁸⁾とかん体またはすい体オプ

表2. 脊椎動物の視物質とそのアイソ系色素の吸収極大

視物質	吸収極大 (λ _{max})		
	11シス型 (mμ)	アイソ系色素 9シス型 (mμ)	両者の差 Δλ _{max} (mμ)
ロドプシン	500	485	15
ボルフィロプシン	522	507	15
アイオドプシン	562	510	52
サイアノプシン	620	575	45

(Wald, 1961)⁵⁴⁾

シンとから、それぞれボルフィロプシンまたはサイアノプシンを作ることが出来るし、9シスレチナール⁵⁵⁾からはアイソボルフィロプシン、アイソサイアノプシンを合成することも出来る。アイソ系色素は正常な網膜の中には見出しされていないので人工産物であると考えられている。

視物質の退色によって生じたオールトランスレチナールが視物質へと再生するにはそれがシス型に異性化されねばならない。まず考えられることはレチナールの光異性化である。モノシス型のレチナールに光をあてると、それは先ずトランス型へ異性化する。生じたトランス型に再び光があたると再びシス型になる。したがって最終的には3つのモノシス型とオールトランス型を含む光平衡混合物になる。この場合ダイシス型は殆んど出来ない。かようなレチナールの光異性化は視物質の退色の機構を考える上に重要なものであるけれども、生体内ではあまりこのような反応をする機会はないようである。何故ならレチナールの光異性化に有効な紫外線(オールトランスレチナールのλ_{max}は387mμ)は水晶体や硝子体等(図1)によりかなり吸収されるし、また視物質の退色により生じたオー

ルトランスレチナールは速やかにビタミンAに還元されるからである。

次に考えられることは酵素による異性化である。牛の網膜、カエルの色素上皮(図2)の中にはオールトランスレチナールをシス型にするレチナール異性化酵素(retinene isomerase)が存在している⁵⁸⁾。この酵素によって作られる平衡混合物は11シス型がわずか5%でオールトランス型が95%であるけれども、生体内ではオプシンが直ちに11シス型と結合するから視物質は絶えず再生してくる。

以上述べてきた視物質の反応回路の中で、視覚興奮過程に関係しているのはどの段階までであろうか。視覚は視物質の光吸収後非常に速やかに生じるものであるから、視物質がオールトランスレチナールとオプシンに分解する前に、何んらかのエネルギー伝達が行なわれなければならない。かような意味で視物質の退色の機構について次にややくわしく考察してみたい。

V. 視物質の退色の機構

1. ロドプシンの発色団の光異性化

視覚興奮過程を理解する上において光が視物質にどのような変化を与えるかを理解することは非常に大切である。HubbardとKropf(1958)^{59) 60)}は視覚における光の役割は視物質の発色団11シスレチナールをオー

ルトランス型にすることであると考えた。この仮説はプレルミロドプシンの発見により、一層確かなものとなった。視覚興奮過程において、ロドプシンからプレルミロドプシンへの光反応以外のすべての反応はこの光異性化反応によって導かれる暗反応である。

この光異性化反応をよりよく理解するため、まずプレルミロドプシンの吸収曲線がいかにして決定されたかについて述べよう。図9のカーブ1はウシロドプシンのグリセリン混合液の室温での吸収曲線である。これを液体窒素(-195°C)で冷却してから(カーブ2)440m μ の光で充分長く照射すると、ロドプシンとプレルミロドプシンとからなる光平衡混合物になる(カーブ3)。これを室温に温めると、ロドプシンは変化しないけれども、プレルミロドプシンはオールトランスレチナールとオプシンに分解する(カーブ4)。この吸収曲線はカーブ1と $\lambda_{\max}$ がほぼ等しいが、高さはカーブ1の45%である。このことは光平衡混合物(カーブ3)の中に45%のロドプシンと55%のプレルミロドプシンが混在していたことを示している。カーブ3から45%のロドプシンの吸収曲線(カーブ2 $\times$ 45%)をさしひくならばプレルミロドプシンの吸収曲線(カーブ6)を求めることが出来る。カーブ5はカーブ6と等量のロドプシンの吸収曲線である。このようにしてプレルミロドプシンの $\lambda_{\max}$ が543m μ に存在す

図9. プレルミロドプシン(ウシ)の吸収曲線 (Yoshizawa, Wald 1963)²⁷⁾

ることがわかった。この実験で $440\text{m}\mu$ の光を用いたのは、この波長の光が、光平衡混合物中のプレルミロドプシンを最も多く作るからである。

ロドプシンに光があたるとプレルミロドプシンを生じるが、逆にプレルミロドプシンに光があたるとロドプシンにもどることが、図10に示されている。 -195°C でウシのロドプシン溶液（上図：カーブ1）を短波長の光（ $440\text{m}\mu$ ）で照射すると、照射時間と共に吸収曲線は $512.5\text{m}\mu$ にあるアイソスベスチックポイント（isosbestic point）を通りながら長波長側へ移行し、最後にロドプシンとプレルミロドプシンからなる光平衡混合物（上図：カーブ5, 6）に落ちつく。この混合物（下図：カーブ1）を長波長の光（ $600\text{m}\mu$ ）で再び照射すると、プレルミロドプシンはロドプシンへと転

図10. ロドプシンとプレルミロドプシンの相互転換

上図 1: 55%グリセリンロドプシン混合液（ウシ）， -195°C ， $\text{pH } 7.4$ ，2～6: $440\text{m}\mu$ の光でそれぞれ5, 5, 10, 20, 40分と繰り返し照射したもの
下図 1: $440\text{m}\mu$ ， -195°C で80分照射した光平衡混合物（ロドプシンとプレルミロドプシン）。2～5: $600\text{m}\mu$ の光で5, 10, 25分繰り返し照射したもの。a: もとのロドプシン混合液（Yoshizawa, Wald 1963）²⁹⁾

換し、最後にカーブ5になる。このカーブはもとのロドプシンの吸収曲線（カーブa）と一致している。この実験からロドプシンとプレルミロドプシンとは光によって完全に相互転換することがわかる。より詳細な実験により、 -195°C 照射でえられる光平衡混合物はロドプシン（11シス型）、アイソロドプシン（9シス型）、プレルミロドプシン（オールトランス型）からなり、それら成分の割合は照射光の波長に依存することが明らかにされた。すなわちロドプシン（ -195°C ）は最終的には照射光をできるだけ少なく吸収するような光平衡混合物になる。もしロドプシンとプレルミロドプシンとが吸収し、アイソロドプシンが吸収しないような長波長の光（例えば $578\text{m}\mu$ ）でロドプシンを長時間照射するならば、ほとんどアイソロドプシンだけからなる光平衡混合物になる。^{30), 31), 61)}

このようにロドプシンの発色団の立体異性化は典型的な光化学反応である。この光化学反応は -195°C と云う極めて低い温度の剛性溶媒中で観察されるから、ロドプシンのリポ蛋白部分オプシンが変化したとは考えにくい。

このような光異性化反応によってロドプシン（11シス型）は最初にプレルミロドプシン（オールトランス型）に変化するのであろうか、それともアイソロドプシン（9シス型）に変化するのであろうか。そこでまずレチナールのエネルギー準位について考えてみよう。シス異性体はオールトランス型より不安定であるから、シス型の基底状態のエネルギー準位はオールトランス型より高い。しかもシス型の吸収曲線はオールトランス型より短波長側に位置しているから、シス異性体の励起エネルギーはオールトランス異性体より大きい。すなわちシス異性体の励起準位はオールトランスよりかなり高い所にある。したがって11シス異性体が1ケの光量子を吸収すると、まずオールトランス型になり、これが再び光量子を吸収するとシス型へ異性化され、最終的には3つのモノシス型とオールトランス型の混合物になる。この場合ダイシス型は非常に出来にくい。かようなレチナールのシス・トランス光異性化は -195°C でも観察されている。⁶²⁾したがってロドプシンは光吸収によりまずプレルミロドプシンへ変化し、それからシス異性体（ロドプシンまたはアイソロドプシン）へ変化する。我々の実験においては13シス型の発色団をもった色素を見出すことは出来なかったけれども、13シス型の出来る可能性はある。そこで反応は次のようにまとめることが出来る。³⁵⁾

発色団の光異性化はプレルミロドプシンの段階だけでなく、ルミまたはメタロドプシンの段階でも生じる。^{34), 59), 60)}メタロドプシンIでは光異性化の量子収率は次のように示されている。^{59), 63)}

この反応系において、発色団の光異性化が本質的な役割を演じていると考えるならば、メタロドプシンIの代りにプレルミロドプシンを入れて考えても同じような関係になるだろう。

以上のことを考慮すると、 -195°C におけるロドプシンの光平衡混合物への反応の経過をうまく説明することが出来る。いま1例としてイカのロドプシンを -195°C で緑色光 ($546\text{m}\mu$) 照射した実験について述べよう (図11)。カーブ1はイカのロドプシン (-195°C) で照射により一旦長波長側に吸収曲線は移動する (カ

図11. ロドプシンから プレルミロドプシンをへてアイソロドプシンへの転換

1: イカロドプシン pH 9.5, グリセリン66%, -195°C , 2~8: $546\text{m}\mu$, -195°C で2, 3, 5, 10, 40, 220秒繰り返し照射したもの。

ーブ2) が、照射時間の増大と共に吸収曲線は徐々に短波長側へ移行し、カーブ1を通り越して最後にカーブ8に落ちつく。この変化は明らかに、ロドプシンが最初すみやかにプレルミロドプシンに、それから徐々にアイソロドプシンへと転換して行くことを示している。

さてここでプレルミロドプシンの吸収極大がもとの

ロドプシンより何故 $40\text{m}\mu$ も長波長側に位置するか考えてみよう。遊離のオールトランスレチナールの λ_{max} ($387\text{m}\mu$) は11シス型 ($380\text{m}\mu$) より $7\text{m}\mu$ しか長波長側に位置していないから、ロドプシン (11シス型) からプレルミロドプシン (オールトランス型) への変化をただ単に発色団のシス・トランス異性化だけで説明出来そうにない。Kropf と Hubbard^{(1958)⁶³⁾}はロドプシンの構造を図12の左端のように考えている。すなわちその発色団である11シスレチナールはオプシンの表面構造の窪みの中にうまくはまり込んでいる。その理由を簡単に説明すると、ロドプシン分子の中では11シスレチナールはそのアルデヒド基でオプシンのアミノ基とシッフ塩基結合 ($\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{CH}=\text{N}-\text{opsin}$) をしている。ロドプシンが単なるシッフ塩基であるならば、その λ_{max} は $367\text{m}\mu$ に存在することになるし、たとえシッフ塩基がプロトン化してもその λ_{max} は $440\text{m}\mu$ である。それ以上に λ_{max} を長波長側に移行させるためには、ロドプシンの励起状態のエネルギー準位を下げることを考えねばならない。そのためには11シスレチナールがオプシンと相互作用をもつような配置、すなわち両者が密着して存在しているようなロドプシンの構造を考えねばならないことになる (図12)。11シスレチナールはオプシンとうまく適合するから $500\text{m}\mu$ に λ_{max} があり、9シスレチナールは11シス型と較べて、やや適合が悪いから、アイソロドプシンの λ_{max} はロドプシンより $15\text{m}\mu$ 程短波長側に存在する (表2)。

もしロドプシンがこのような構造をもっているとするならば、 -195°C でロドプシンが光吸収した時、それはどのように変化するだろうか。発色団は11シスレチナールからオールトランス型に転換しようとするが、オプシンの立体構造はこの温度では殆んど変化しないと考えられるから、レチナールはオプシンの表面構造の中で歪んだ形をとらざるをえないだろう。プレルミロドプシンはこのような状態のものである (図12)。重要なことはプレルミロドプシンの発色団がロドプシンよりよくオプシンの表面構造の中に適合しているのではなくて、その発色団が不自然に歪んだオールトランス型であるという点である。このような構造はプレルミロドプシンが非常に不安定であること、すなわちその基底状態のエネルギー準位が高いことを示唆している。それ故に基底状態から励起状態への遷移が短くなり、吸収曲線は長波長側に位置する。

プレルミロドプシンを温めると、オプシンとレチナ

図12. ロドプシンの光退色にともなう構造の変化の模式図

ールとの間の緊張がゆるみ、オプシンは遊離のオプシンの構造へ、レチナールは正常なオールトランスレチナールの構造へと近づいて行く。それと共にオプシンとオールトランスレチナールとの間の密着具合は次第に悪くなる。すなわち両者の相互作用が弱くなるから、基底状態のエネルギーレベルが低くなり、吸収曲線は短波長側へと移行して行く。

このような相互作用は決して連続的に減少するのではなく、段階的に進行することが図13の実験から明らかである。まづプレミロドプシンを作るために、ウシのロドプシン溶液 (λ_{max} : 505m μ , -195°C) は青色光 (436m μ) で照射された。えられた光平衡混合物の λ_{max} は 517m μ に存在する。この混合物の主成分はプレミロドプシンでそれにロドプシンとアイソロドプシンが含まれている。この混合物を或温度に温める

図13. ロドプシン (ウシ) の退色の段階 (Yoshizawa, Wald, 1963)²⁹⁾

毎に、 -195°C に再冷却して λ_{max} を測定した。したがって図13は -195°C における λ_{max} を示している。プレミロドプシンは -140°C まで安定であるが、これ以上の温度になると混合物の λ_{max} は 500m μ に移動する。これはプレミロドプシンがルミロドプシン (λ_{max} : 497m μ) に変化したことを示している。ル

ミロドプシンは -40°C まで安定であるが、それ以上の温度で再び混合物の λ_{max} は移動し、487m μ にくる。これはルミロドプシンがメタロドプシン I (λ_{max} : 478m μ) に変わったことを示している。 -15°C 以上ではメタロドプシン I はメタロドプシン II をへて最後にオールトランスレチナールとオプシンに加水分解するが、ロドプシンとアイソロドプシンが混合物中に存在するために λ_{max} が 499m μ に観察された。

2. ロドプシンの中間産物の高次構造変化

前節においてプレミロドプシンからレチナールとオプシンへの暗反応過程を発色団とオプシンとの相互関係の弛緩として説明してきた。この過程についてより一層理解を深めるために、中間産物の反応機構を熱力学的に考察してみよう。

閃光法の実験によりウシのプレミロドプシンからルミロドプシンへの変化は溶液中で約 10kcal/mol, かん体の粒子で 12.5kcal/mol の活性化エネルギー (activation energy, E_a 或は ΔH^*) を必要とする。表3に示すように、活性化の自由エネルギー (free energy ΔF^*), 熱 (heat, ΔH^*) は少く 10kcal/mol 程度のものであり、活性化のエントロピー (entropy, ΔS^*)

表3. ウシのロドプシンの光退色の後続熱反応

	E_a (kcal)	ΔF^* (kcal)	ΔH^* (kcal)	ΔS^* (e. u.)
プレミ $\rightarrow$ ルミ ^{36,37)}	10	10	10	0
ルミ $\rightarrow$ メタ I	60	19	60	160
メタ I $\rightarrow$ メタ II ³⁴⁾	60	19	60	150
メタ II $\rightarrow$ レチナール + オプシン ³⁴⁾	20	21	19	-7

(Hubbard, Bownds, Yoshizawa 1965)³⁵⁾

は 0 またはそれに近い。一般に蛋白の大きな高次構造変化は正の大きな活性化熱およびエントロピーを伴うから、プレミロドプシンからルミロドプシンへの変

化は非常に小さい高次構造変化に由来していると思われる。ロドプシンの退色過程においてみられる大きな活性化熱、エントロピーの変化は次のルミロドプシンからメタロドプシンへの過程である。それらの値はオプシンの熱変性の実験で得られた値とほぼ等しい。⁶⁴⁾

これら2つの反応について得られた値を考慮する時、次のような観察に対していくらか説明が出来るようになった。すなわちメタロドプシン I を -20°C で照射すると、容易にロドプシンに変化するが、 -65°C あるいは -195°C で照射しても変化しない。それに反してルミロドプシンを -65°C あるいは -195°C で照射すると、ロドプシンへ転換することが出来る。これらの観察は中間産物のオプシンの高次構造変化の度合 (E_a , $\Delta S^{\ddagger}$) を考慮すると理解出来る。すなわちプレルミロドプシンからルミロドプシンへの変化は、 -140°C より高い温度で照射しても低い温度で照射しても可逆的に変化することの出来るような小さい変化である。それに対してルミロドプシンがメタロドプシン I になる時には、オプシンの高次構造は大きく変化し、そのためメタロドプシン I を -65°C またはそれ以下の温度で照射しても、もはや逆反応が進まないと考えられる。

メタロドプシン I から II への変化は大きな色変化すなわち橙色 (λ_{max} : $478\text{m}\mu$) から薄黄色 (λ_{max} : $380\text{m}\mu$) への変化をとまう。この反応は $\text{pk}6.4$ を示す基 (恐らくオプシンのヒスチジンのイミダゾール基) によって1ケのプロトンが取り込まれた結果生じるものである。³⁴⁾ 活性化の熱、エントロピーの値はそれぞれ約 60kcal/mol , $+150\text{e.u.}$ で、ルミロドプシンからメタロドプシンへの変化の場合とほぼ等しい値を示している。それゆえにこの反応の場合にもオプシンの高次構造がかなり変化していると思われる。メタロドプシン I 以前の変化は光をあてることによって始めて可逆的に変化するが、メタロドプシン I から II への変化は暗状態でも可逆的である点が異なっている。しかしながら多くの蛋白の変性の場合と同様に、適当な条件さえ見付ければ、メタロドプシン I 以前の反応を暗で可逆的に進行させることができるだろう。³¹⁾

メタロドプシン II からオールトランスレチナール、とオプシンへの分解反応は明らかに加水分解反応である。³³⁾ この場合オプシンの高次構造はあまり変化しない (表3)。しかし遊離オプシンはレチナールと結合しているオプシン (ロドプシン) よりかなり変性を受けやすい⁶⁴⁾ から、レチナールをはなした後、オプシンの高次構造が変化する可能性は充分にある。

可視部の吸収を基礎にしてなされた考察から、中間

産物のオプシン部分の高次構造は退色過程の段階が進むにつれて変化してゆくことを推察した。このことを裏付ける実験は現在どの程度まで行なわれているであろうか。

高木、世古口 (1961)⁶⁵⁾ はウシのロドプシン溶液の紫外外部吸収を測定し、照射によりオプシン部分の構造が変化することを示した (図14)。照射前後のウシのロド

図14. ロドプシン (ウシ) の紫外部と可視部における照射前後の差吸収曲線 (Takagi, 1963)⁶⁶⁾

プシンの差吸収曲線はロドプシンの退色を示す $500\text{m}\mu$ の減少、退色の結果生じたアルカリインディケーターイエローを示す $370\text{m}\mu$ の増大と共に、紫外部領域では $291\text{m}\mu$ の増大、 $287\text{m}\mu$ と $279\text{m}\mu$ の小さな減少、 $234\text{m}\mu$ の顕著な減少を示している。合成ペプチドや蛋白の変性について行なわれた研究から判断すると、 $291\text{m}\mu$ の差吸収の増大はトリプトファン残基の、 $287\text{m}\mu$ と $279\text{m}\mu$ の差吸収の減少はチロジン残基の周りの電場の変化に、 $234\text{m}\mu$ の顕著な差吸収の減少はヘリックスからランダムコイルへの変化にともなうペプチド結合の吸収変化に由来するものと考えられる。いずれにしてもこれらの変化はオプシンの高次構造の変化を示している。

オプシンの高次構造変化が視物質の退色過程のどの段階で生じるかという疑問に対して、紫外外部吸収の測定は有力な手段である。³⁵⁾ 牛のロドプシン溶液ならびに音波処理でえられたかん体粒子で行なった実験から、ロドプシンがメタロドプシン I に変化する時、また溶液の実験からメタロプシン I から II へ変化する時にオプシンの高次構造が変化することがわかった。^{35), 66)} イカのロドプシンはウシのロドプシンと類似の退色過程を示すが、メタロドプシンは 20°C 以下で安定である。ロドプシンが酸性またはアルカリ性メタロドプシンへ変化する時もウシ同様の高次構造の変化を観察することが出来る。⁶⁸⁾ これらのメタロドプシンが光を吸収することに

よりロドプシンに回復する時、高次構造も回復する。⁶⁸⁾レチナールの添加によりウシのオプシンがロドプシンへ再生する時にも、オプシンの高次構造が回復する。したがって紫外外部吸収で測定されたオプシンの高次構造の変化はメタロドプシンの段階ですでに生じるだけでなく可逆的なものであり、生物学的に意義のある変化であると考えられる。

牛のロドプシンについて施光分散が測定された。235m μ にコトン効果 (Cotton effect) を示すから、ロドプシン分子の中にヘリックスを構成している部分が存在することは確かである。³⁵⁾注意すべきことはロドプシンの退色に伴い施光度が減少することである。^{35), 69)}鬼頭、竹崎 (1965)⁶⁹⁾はかような施光度の変化はオプシンの α -

とプレルミアイオドプシン ($\lambda_{\max}$: 640m μ) からなる光平衡混合物になる。アイソアイオドプシン ($\lambda_{\max}$: 550m μ) から同じプレルミアイオドプシンを生じる。⁷¹⁾これらの反応は完全に光によって可逆的である。

ここまではアイオドプシンとロドプシンとはまったく類似の反応を示すが、次にプレルミアイオドプシンを温めると、それはロドプシンとまったく違った反応を示す。すなわちプレルミアイオドプシンはルミ、メタ I、メタ II という経路を通らずに、直接にアイオドプシンへ転換する (図15右)。カーブ 2 は左図のカーブ 10 を再記録したもので、アイオドプシンとプレルミアイオドプシンからなる光平衡混合物である。これをある温度に温めてから、 -195°C で吸収曲線を求めた。

表4. ロドプシン系とアイオドプシン系の吸収極大の比較

発色団の型	吸 収 極 大 (mμ)							
	視物質		アイソ		プレルミ	ルミ	メタI	メタII
	11 シス		9 シス		オールトランス			
測定温度	室温	−195℃	室温	−195℃	−195℃	約−70℃	約−20℃	約0℃
ウシ・ロドプシン系	498	505	485	491	543	497	478	380
イカ・ロドプシン系	437	498	473	431	543	530	500 ^{a)}	380 ^{b)}
ニワトリ・アイオドプシン系	562	575	510	550	640	518	500	380

a) 酸性メタロドプシン, b) アルカリメタロドプシン

ヘリックスからランダムコイルへの転換に帰因するものであり、メタロドプシン I または II の段階で現われると考えている。

3. アイオドプシンの退色過程

色覚に関係した視物質の中で、退色過程がくわしくしらべられている唯一のものはニワトリのすい体中存在するアイオドプシンである。その吸収曲線 ($\lambda_{\max}$: 562m μ) はロドプシンより長波長側に位置し、ニワトリの視感度曲線とかなりよく一致している。⁸⁾アイオドプシンの発色団はロドプシンと同様レチナール、⁸⁾で、その退色過程にみられる中間段階もロドプシン系と類似している。^{35), 70), 71)}したがってアイオドプシンの退色過程もロドプシンと同様に、発色団の光異性化とオプシンの高次構造変化で説明できる。

図15左にアイオドプシンのプレルミアイオドプシンへの光転換の経過が示されている。 -195°C のアイオドプシン (カーブ 1) は緑色光 (546m μ) により順次吸収曲線が長波長側に移行し、最後にアイオドプシン

温度の上昇と共に吸収曲線は短波長側に移行する (カーブ 3, 4) が、 -140°C 以上に温めてもそれ以上変化せず (カーブ 5~8)、ほとんどもとのアイオドプシンの吸収曲線 (カーブ 1) と一致している。このようにプレルミアイオドプシンは暗反応でアイオドプシンに変化する。 -195°C ではアイオドプシンの発色団は光により11シスレチナール型からオールトランス型のシン構造化されるとはいうものの、この温度ではオプ方へ異性が変化しないために、発色団は高度に歪められた構造、むしろ11シス型に近い構造をもっているのではないだろうか。それ故により高い温度に温められた時、それは正常な11シス型にもどるのである。

Hubbard と Kropf (1959)^{35), 70)}はアイオドプシンの感光度すなわち量子収率は温度の低下と共に著しく減少することを報告した。この不可解な現象は今やプレルミアイオドプシンのアイオドプシンへの暗反応の発見により理解することが出来る。アイオドプシンは -78°C で緑色光 (546m μ) で照射されても見かけ上何ら変化しな

図15. アイオドプシンとプレルミアイオドプシンとの相互転換

- (左図) 1: 50%グリセリン-アイオドプシン混合液 (ニワトリ), pH6.5, -195°C ,
 2~10: 546 mμの光でそれぞれ1, 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128秒と繰り返し照射したもの, 10: アイオドプシンとプレルミアイオドプシンからなる光平衡混合物
 (右図) 1: アイオドプシン (左図カーブ1と同じ), 3~8: 光平衡混合物を夫々暗黒中で -180°C , -160°C , -140°C , -120°C , -100°C , -80°C に温めたもの。測定は -195°C で行われた。(Yoshizawa, Wald, 未発表)⁷¹⁾

図16. アイオドプシンの退色、再生の過程 (ニワトリ)

いが、アイソアイオドプシンは同じ条件で(恐らくプレルミアイオドプシンをへて)アイオドプシンに転換する。⁷¹⁾このことはアイオドプシンは -78°C で光によりプレルミアイオドプシンに変化し、それから暗反応でアイオドプシンに回復したことを意味する。これが -78°C でのアイオドプシンの主な変化であるが、ごくわずかではあるが同じ温度でルミアイオドプシン ($\lambda_{\text{max}}: 518\text{m}\mu$) が生成される。すなわちアイオドプシンを -78°C で長波長の光 ($578\text{m}\mu$) (ルミアイオドプシンはこの光をほとんど吸収しない。)を長時間照射することによりルミアイオドプシンが徐々に形成されてくる。また生じたルミアイオドプシンは緑色光で完全にアイオドプシンに回復する。^{35), 71)}これらの結果の考察を容易にするため、図16にアイオドプシンの退色再生の過程を示した。この図はロドプシンの場合とほぼ類似しているがプレルミアイオドプシンからアイオドプシンへの暗反応が添加されている点異なる。アイオドプシン、アイソアイオドプシンは光異性化によりプレルミアイオドプシンを生じるが、これは2つの暗反応のいずれかの方向へ、すなわち一方はアイオドプシンへ、他方はルミアイオドプシンへと変化する。暗反応がいずれに進行するかは温度に依存している。 $-180^{\circ}\text{C} \sim -78^{\circ}\text{C}$ ではプレルミアイオドプシンはアイオドプシンへ回復するが、 -78°C では非常に僅かではあるが、ルミアイオドプシンへと変化する。より高い温度ではオプシンの高次構造はより変化しやすくなるから、反応はルミアイオドプシンの方へ進行する。したがって温度の上昇と共にアイオドプシンの退色の量子収率は増加するのである。生理的な温度ではプレルミアイオドプシンは暗反応でアイオドプシンへ殆んどもどることなく、ルミアイオドプシンをへてオールトランスレチナルとオプシンへと分解する。³⁵⁾

VI 視物質の退色過程と電気的な変化

網膜に光をあてた時に観察される動作流 (エレクトロレチノグラム)のうち、最初に現われるa波は視興奮と密接に関係していると考えられてきた。最近このa波よりもっと速く現われる電位変化 (early receptor potencial, ERP と略す) (潜伏期 $25\mu\text{sec}$) が微少電極法を用いてサルの網膜から記録された。^{72), 73)}同じようなERPは他のいろいろな動物のエレクトロレチノグラムの測定の場合にも検出されている。^{74), 75)}かようなERPをもとにして測定された作用スペクトルはロドプシンの吸収曲線とよく一致するから、それはロドプシンの光吸収に端を発していることは確かである。⁷⁶⁾しかもERPの初期の変化は -35°C で記録されている。この

温度ではロドプシンはメタロドプシンIまでしか変化しないから、ERPの起源はメタロドプシンIまたはそれ以前の段階であろうと考えられる。現在ERPが視覚興奮過程の本道の上に乗っているという見解に対して疑問があるかもしれないけれども、もしERPがその過程と密接に関係しているとすれば、一体視物質の中間産物のどのような物理化学的な変化をERPの直接の要因とみなすことが出来るだろうか。

一つの可能性として、色変化にともなう視物質の高次構造変化に由来する電荷をもった基の露出が考えられよう。以前視物質の退色にともない2~3ヶの-SH基の露出や $\text{pk}6.6$ を示すプロトン結合基の露出等が観察された。⁷⁸⁾最近の研究によるとSH基の露出はメタロドプシンIIの加水分解の際にみられる変化であり、³⁵⁾一方プロトン結合基はメタロドプシンIからIIへの変化と考えられている。³⁴⁾したがってこれらの基の露出によって、ERPが生じると説明することは出来ない。ERPの源を適確に説明出来るような物理化学的な実験は将来に待たねばならないけれども、原(1957)によって始められたロドプシン溶液の光照射に伴う電導度変化の研究は、この機構の解明に一つの手がかりを与えるかもしれない。

ウシのロドプシン溶液を常温で照射すると、速度の異なった3つの暗過程からなる電気電導度の変化が観察される。⁴¹⁾第一過程は照射直後に現われる所の速やかな電導度の減少過程で、その半減期は約1.5ミリ秒である。第二過程は電導度の増加を示し、その半減期は約2.3秒であり、第三過程は数分も続く遅い減少の過程である。速やかな電導度の減少(第一過程)は -12°C においても観察されるから、⁸⁰⁾恐らくメタロドプシンIまたはそれ以前の中間産物に起源をもつ変化であると考えられる。イカのロドプシンについての実験はこの考えをより確かにしたようである。ロドプシン(5°C)を酸性またはアルカリメタロドプシンに転換させる際、いずれの場合にも第一過程と見做される初期の電導度の減少と、⁸¹⁾第2過程と見做される電導度の増加が測定された。このような速やかな電気電導度変化はオプシンの微細な高次構造変化に由来するものである。⁷⁹⁾

最近の分子生化学の論議によれば、酵素の場合、活性部位以外の所(アロステリックサイト, allosteric site)に結合する低分子物質(アロステリックエフェクター, allosteric effector)によって可逆的な高次構造変化(アロステリックトランジション, allosteric transition)が誘導され、その結果酵素活性に質的、

疊的な変化がもたらされるといわれている。このような考えは必ずしも酵素蛋白に限ったものではなく、他の蛋白例えばヘモグロビンの生理機能の調節の説明にも適用されている。厳密な意味においてはアロステリックトランジションは現在測定出来るような大きな高次構造の変化によってのみ誘導されるものではなく、例えば分子内の電荷の分布の変動によって誘導されるようなものであるかもしれないし、さらにこのような電荷の分布が高次構造の変化を促進させる可能性もある⁸³⁾。もしこの言葉を用いるならば視物質の発色団レチナールはアロステリックエフェクターであり、それが光異性化することによりオプシンにアロステックトランジションを導き、最初は電荷の再配列を、それから高次構造の変化をもたらすのかもしれない⁽³⁵⁾。したがって電気的な変化が視物質の電荷の再配列に起因していると考えらるならば、それは退色過程の極めて初期の段階であられる可能性があり、一方それが特殊な反応基の露出によるとするならば、高次構造変化に由来するものであるかもしれない。

VII. 視細胞の興奮への経路

光を吸収した視物質の変化が神経興奮をひきおこすには、光を吸収した場所から他の場所へ何らかの方法でエネルギーが移動しなければならない。可能な方法として励起子 (exciton) と光電導 (photoconduction) の2つを考えることができる。

Hagins と Jennings (1959)⁸⁴⁾ はカエルのかん体を用いて励起子移動の可能性をしらべた。カエルのかん体にはロドプシンが他の動物に較べて異常な程高濃度に存在し、しかも一定方向に規則正しく配列しているから、この機構を考える上に最も都合のよい材料である。それにも拘らず、実験結果は否定的であった⁸⁵⁾。Rosenberg 等 (1961)⁸⁵⁾ はヒツジのかん体外節が光電導性を示すことを報告しているが、その変化は視興奮を考えるにはあまりにもおそい (時間定数: 10~15秒) ように思われる。その上動物の種によっては外節中の視物質の量が少なく、二重膜円板上に視物質が50分子ほど集団を作って存在していると言う報告もあるから、エネルギー移動の機構としてこれらを考えるには一層の検討を要するだろう。

視覚興奮過程においてより重要なことは、視物質によって吸収した光のエネルギーがただ単に分子から分子へ移動するというのではなく、その移動によってエネルギーが増巾されて行かねばならないと言うことである。何故ならかん体が1ケの光量子を吸収するこ

とによって視興奮 (数ミリボルトの電圧) が生じるからである。今励起エネルギーが光を吸収した視物質からあまり遠くへは移動しないと考えるならば、増巾機構は外節の二重膜円板上に存在し、興奮はそこで発生しなければならない。

一般に興奮の発生は膜を通過するイオンの流れによって説明されている。視細胞の興奮膜は二重膜円板であると仮定するならば、イオンは円板を構成している視物質や他のリポ蛋白質などと密接な関係を保って存在していなければならない。事実ロドプシンはアルカリ金属イオンを保持し、ロドプシンの光退色に伴って、それらのイオンは遊離する⁸⁶⁾、またかん体粒子の照射による電導度の増大はかようなイオンの遊離に起因していると考えられている。さらに興味深いことは³²Pで標識された外節の粒子が光により³²P (恐らく燐酸イオン) を遊離する現象である。この³²Pは恐らく外節のリポ蛋白質にとりこまれたものと思われる。光による³²Pの逸出はいろいろな代謝阻害剤によって影響を受けず、エレクトロレチノグラムの負の成分 (主としてa波d波に関係、視細胞層に関係⁸⁹⁾) に有効な麻酔剤によって影響を受けるから、二重膜円板の興奮はイオンの流れとして理解されなければならない。従って二重膜円板上に存在する1ケの視物質の光変化が何んらかの機作でそこから同時にイオンを放出するような機構が解明されるならば、視興奮発生の機構が説明できることになる。原等 (1961)⁸⁶⁾ は二重膜円板を静電容量約0.01 PF オーダーの平行平板コンデンサーと見做し、リポ蛋白質膜 (ロドプシン) から約5,000ケのイオンが遊離すれば10数 mV の電位が発生すると計算している。このような二重膜円板の興奮は外節を包む原形質膜を刺戟し、その興奮は神経と同じような機構で内節の方に伝って行くものと考えられる。最近の放射化分析の結果によれば、ウシかん体外節のNa, Kイオンは照射により夫々30%の増加と25%の減少が報告されている。またウシやイカ (視細胞層が全網膜の90%をしめている) の網膜でも、光によるNaイオンの増加とKイオンの減少が観察されている。Hagins (1962) は微量電極法を用いて、イカの視細胞外節から光照射によって生じる電位を測定し、それがNaイオンのインフラックス (influx), Kイオンのエフラックス (efflux) によって生じると報告している⁹²⁾。

視細胞が一度興奮するならば何らかの機構で回復しなければならない。世古口 (1953)⁹⁴⁾ はATP分解酵素 (ATPase) が網膜およびかん体外節に存在し、その活

性は K-イオン濃度に依存していることを報告した。その後この酵素は Na-K-活性 ATP 分解酵素 (Na-K-activated ATPase) であることが確認されている^{95)~97)}。網膜を照射するところの酵素の活性は増加するが、これは視細胞の興奮によって網膜内の Na イオンや K イオンの濃度が変化したためである。注目すべきことは遊離かん体の外節を照射しても活性の増加はみとめられないが、網膜を照射した後外節を分離し、その活性を測定すると、照射による活性の増大が観察できることである⁹⁵⁾。遊離かん体外節ではそれを包む原形質膜はほとんど破壊され、その透過性は失なわれていると考えられるから、このような酵素の活性化は光によって何らかのアロステリックエフェクターが酵素の高次構造を変化させたためであろうと推察出来る。ATP 分解酵素⁶⁷⁾の活性はこのように 2 つの異なった方法で調節され、視細胞興奮後のイオンの能動輸送に貢献していると考えられる。

以上視物質の吸収から視細胞の興奮までを記述してきたが、個々の実験結果の間に未だかなりのひらきがあり、それをつなぐのにかなりの空論を重ねてきた。これらの考えは必ずしも一般に認されているものではないが、万一今後の研究に役立てばと思い敢て記述した次第です。

文 献

- 1) W. J. Schmidt: Kolloid. Zeitschr., 85, 137 (1938)
- 2) F. S. Sjöstrand: J. Cell. Comp. Physiol., 42, 15, 45 (1953)
- 3) J. B. Finean, F. S. Sjöstrand, E. Steinmann: Exptl. Cell Research, 5, 557 (1953)
- 4) G. Wald, P. K. Brown, I. R. Gibbons: J. Opt. Soc. Am., 53, 20 (1963)
- 5) 細谷雄二, 木村英一: 蛋白質, 核酸, 酵素, 5, 458 (1960)
- 6) R. Hubbard: J. Gen. Physiol., 37, 381 (1954)
- 7) G. Wald: J. Gen. Physiol., 22, 775 (1939)
- 8) G. Wald, P. K. Brown, P. H. Smith: J. Gen. Physiol., 38, 623 (1955)
- 9) C. D. B. Bridges: Nature, 195, 40 (1962)
- 10) G. Wald, P. K. Brown: J. Gen. Physiol., 37, 189 (1953-54)
- 11) F. D. Collins, R. A. Morton: Biochem. J., 51, 292 (1952)
- 12) P. K. Brown, P. S. Brown: Nature, 182, 1288 (1958)
- 13) F. Crescitelli, H. J. A. Dartnall: J. Physiol., 125, (1954)
- 14) H. J. A. Dartnall: The Eye (ed. H. Davson) 2, 323, Academic Press Inc., New York (1962)
- 15) F. W. Munz: J. Physiol., 140, 220 (1958)
- 16) F. Crescitelli: Ann. N. Y. Acad. Sci., 74, 230 (1958)
- 17) F. Crescitelli, H. J. A. Dartnall: Nature, 172, 195 (1953)
- 18) G. Wald, P. K. Brown: Science, 127, 222 (1958)
- 19) T. Hanaoka, K. Fujimoto: Japan J. Physiol., 7, 276 (1957)
- 20) P. K. Brown, G. Wald: Nature, 200, 37 (1963)
- 21) P. K. Brown, G. Wald: Science, 144, 45 (1964)
- 22) W. A. H. Rushton: J. Physiol., 134, 11 (1956)
- 23) W. A. H. Rushton: Ann. N. Y. Acad. Sci., 74, 291 (1958)
- 24) W. B. Marks, W. H. Dobelle, E. F. MacNichol: Science, 143, 1181 (1964)
- 25) W. S. Stiles: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 45, 100 (1959)
- 26) G. Wald: Science, 145, 1007 (1964)
- 27) T. Yoshizawa, Y. Kitô: Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci. Osaka Univ., 6, 27 (1958)
- 28) T. Yoshizawa, Y. Kitô: Nature, 182, 1604 (1958)
- 29) T. Yoshizawa, G. Wald: Nature, 197, 1279 (1963)
- 30) Y. Kitô, M. Ishigami, T. Yoshizawa: Biochim. Biophys. Acta., 48, 287 (1961)
- 31) T. Yoshizawa: Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci., Osaka Univ., 10, 1 (1962)
- 32) T. Yoshizawa, Y. Kitô, M. Ishigami: Biochim. Biophys. Acta., 43, 329 (1960)
- 33) G. Wald, J. Durell, R. C. C. St. George: Science, 111, 179 (1950)
- 34) R. G. Matthews, R. Hubbard, P. K. Brown, G. Wald: J. Gen. Physiol., 47, 215 (1963)
- 35) R. Hubbard, D. Bownds, T. Yoshizawa: Cold Spring Harbor Symp. (1965)
- 36) K-H. Grellmann, R. Livingston, D. C. Pratt: Nature 193, 1258 (1962)
- 37) D. C. Pratt, R. Livingston, K-H. Grellmann: Photochem. Photobiol., 3, 121 (1964)
- 38) V. J. Wulff, R. G. Adams, H. Linschitz, E. W. Abrahamson: Ann. N. Y. Acad. Sci., 74, 281 (1958)
- 39) F. W. Abrahamson, J. Marquisee, P. Gavuzzi, J. Roubie: Z. Elektrochem. 64, 177 (1960)
- 40) T. P. Williams: J. Gen. Physiol., 47, 679 (1964)
- 41) R. Hara: J. Gen. Physiol., 47, 241 (1963)
- 42) W. A. Hagins: J. Physiol., 129, 229 (1955)
- 43) G. Wald, R. Hubbard: J. Gen. Physiol., 32, 367 (1949)
- 44) A. F. Bliss: Biol. Bull., 97, 221 (1949)
- 45) M. M. Kini, J. R. Cooper: Biochim. Pharmacol., 8, 207 (1961)
- 46) S. Futterman: J. Biol. Chem., 238, 1140 (1963)
- 47) O. H. Lowry, N. R. Roberts, D. W. Schulz, J. E. Clow, J. R. Clark: J. Biol. Chem. 236, 2813 (1961)
- 48) N. I. Krinsky: J. Biol. Chem., 232, 881 (1958)
- 49) J. E. Dowling: Nature, 188, 114 (1960)
- 50) A. F. Bliss: Arch. Biochem. Biophys., 31, 197 (1951)
- 51) R. Hubbard, G. Wald: Proc. Natl. Acad. Sci. U. S., 37, 69 (1951)

- 52) R. Hubbard, G. Wald: *J. Gen. Physiol.*, **36**, 269 (1952-53)
- 53) R. Hubbard, G. Wald: *J. Gen. Physiol.*, **36**, 415 (1953)
- 54) G. Wald: *Light and Life* (ed. W. D. McElroy, B. Glass) 724, (1961)
- 55) G. Wald: *Fed. Proc.*, **12**, 606 (1953)
- 56) G. Wald, P. K. Brown, P. H. Smith: *Science*, **118**, 505 (1953)
- 57) R. Hubbard: *J. Am. Chem. Soc.*, **78**, 4662 (1956)
- 58) R. Hubbard: *J. Gen. Physiol.*, **39**, 936 (1955-56)
- 59) R. Hubbard, A. Kropf: *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, **44**, 130 (1958)
- 60) R. Hubbard, A. Kropf: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **81**, 388 (1959)
- 61) T. Yoshizawa, G. Wald: *Nature*, **201**, 340 (1964)
- 62) L. Jurkowitz, J. N. Loeb, P. K. Brown, G. Wald: *Nature*, **184**, 614 (1959)
- 63) A. Kropf, R. Hubbard: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **74**, 266 (1958)
- 64) R. Hubbard: *J. Gen. Physiol.*, **42**, 259 (1958-59)
- 65) M. Takagi, Y. Sekoguti: *Biochem. Biophys. Acta.*, **49**, 589 (1961)
- 66) M. Takagi: *Biochem. Biophys. Acta.*, **66**, 328 (1963)
- 67) Y. Sekoguti, T. Yoshizawa: *Int. Soc. Clin. ERG, IVth. Intern. Symp.*, (1965)
- 68) Y. Sekoguti, M. Takagi, Y. Kitô: *Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci. Osaka Univ.*, **12**, 67 (1964)
- 69) 鬼頭勇次, 竹崎真美: *日本動物学会* (1965)
- 70) R. Hubbard, A. Kropf: *Nature*, **183**, 448 (1959)
- 71) T. Yoshizawa, G. Wald: *in preparation*
- 72) K. T. Brown, K. Watanabe: *Nature*, **193**, 958 (1962)
- 73) K. T. Brown, M. Murakami: *Nature*, **204**, 739 (1964)
- 74) R. A. Cone: *Nature*, **204**, 736 (1964)
- 75) W. L. Pak, R. A. Cone: *Nature*, **204**, 836 (1964)
- 76) W. L. Pak, T. G. Ebrey: *Nature*, **205**, 484 (1965)
- 77) G. Wald, P. K. Brown: *J. Gen. Physiol.*, **35**, 797 (1951-52)
- 78) C. M. Radding, G. Wald: *J. Gen. Physiol.*, **39**, 909 (1955-56)
- 79) T. Hara: *J. Gen. Physiol.*, **41**, 857 (1957-58)
- 80) 原黎子, 高木雅行: *動物学雑誌*, **69**, 255 (1960)
- 81) T. Hara, R. Hara: *Int. Soc. Clin. ERG, IVth. Intern. Symp.*, (1965)
- 82) 早石修: *生物物理*, **3**, 70 (1963)
- 83) J. Monod, J-P. Changeux, F. Jacob: *J. Mol. Biol.*, **6**, 306 (1963)
- 84) W. A. Hagins, W. H. Jennings: *Discussion Farady Soc.* **27**, 180 (1960)
- 85) B. Rosenberg, R. A. Orlando, J. M. Orlando: *Arch. Biochem. Biophys.*, **93**, 935 (1961)
- 86) T. Hara, R. Hara: *Annot. Zool. Japon.*, **34**, 1 (1961)
- 87) M. Kato, I. Oki: *Jap. J. Zool.*, **12**, 377 (1959)
- 88) M. Kato, I. Oki: *Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci., Osaka Univ.* **7**, 183 (1959)
- 89) I. Oki, I. Honjo: *Jap. J. Zool.*, **13**, 239 (1961)
- 90) Y. Sekoguti: *Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci. Osaka Univ.*, **8**, 75 (1960)
- 91) Y. Sekoguti: *Ann. Rep. Sci. Works, Fac. Sci. Osaka Univ.*, **8**, 83 (1960)
- 92) W. A. Hagins, R. G. Adams: *XXII Int. Cong. Physiol. Sci.* (1962)
- 93) W. A. Hagins, H. V. Zonana, R. G. Adams: *Nature*, **194**, 844 (1962)
- 94) 世古口雄三: *動物学雑誌*, **63**, 139 (1953)
- 95) Y. Sekoguti: *J. Cell. Comp. Physiol.*, **56**, 129 (1960)
- 96) S. L. Bonting, L. L. Caravaggio, M. R. Canady: *Exptl. Eye Res.*, **3**, 47 (1964)
- 97) R. N. Frank, T. H. Goldsmith: *Arch. Biochem. Biophys.*, **110**, 517 (1965)