高度好塩菌に見出された 新しいレチナールタンパク

高橋 哲郎・加茂 直樹・小畠陽之助

北海道大学薬学部 〒060 札幌市北区北12条西6丁目

Sensory Rhodopsinlike Proteins in *Halobacterium halobium*

Tetsuo TAKAHASHI, Naoki KAMO and Yonosuke KOBATAKE

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University, Sapporo 060

Recently, a third retinal binding chromoprotein was found in cell membrane of *Halobacterium halobium*. Like bacteriorhodopsin and halorhodopsin, the third pigment shows photoreaction cycling upon illumination, but the decay of its photointermediate is two orders of magnitude slower than that of the two. Behavioral studies have shown that the pigment acts as photoreceptors for both positive and negative phototactic systems in this bacteria. Also, another photorepellent system has been found in the course of the study, which is mediated by a different (the fourth) photoreactive retinal-protein pigment.

Key words: *Halobacterium halobium*, Phototaxis, Sensory rhodopsin, Retinal, Sensory transduction

はじめに

1. 高度好塩菌と2つのレチナールタンパク
2. 第三のレチナールタンパクの発見
3. ハロバクテリアの走光性
4. ハロロドプシンと走光性
5. 新しい受容体 P 565 ?
6. 負の走光性と第三のレチナールタンパク
7. 走光性変異株
8. 正の走光性と S-ロドプシン
9. 光情報の増幅, 伝達
おわりに

はじめに

高度好塩菌 *Halobacteria* は, ユニークな光エネルギー変換素子であるバクテリオロドプシンやハロロドプシンを持つことでよく知られた細菌である。この菌は塩田の跡地や, 砂漠の中の塩湖のような相当に強い日光に曝される環境下に生活している。菌の密度が高くなり, 溶存している酸素濃度が低下してくると, バクテリオロドプシン, ハロロドプシンを盛んに合成し, 太陽光のエネ

ルギーを利用して生育するようになる。バクテリオロドプシンが始めて発見され, それが視物質ロドプシンと同じくレチナールを発色団としていることがわかった当時, 動物の視覚の研究者たちはこの細菌に興味を持った。視物質の起源, 視覚の情報変換などの基本的問題を, この小さな細菌が解き明かしてくれそうに思えたからである。

時代は流れ, バクテリアのロドプシンに対する興味が, 光エネルギーの効率的利用という, より実用的な観点からも捉えられるようになった時, このバクテリアの持つ“視覚”は, 単にエネルギーを求めて集まる習性としてのみ評価されそうになった。この生物が光に集まる性質<走光性>はバクテリオロドプシンの働きによって生じた“高エネルギー状態”に対する菌の行動的応答であると考えられたのである。

ところが, この菌の生理が更に明らかにされてみると, それ以上のものがあることがわかった。バクテリアのロドプシン様タンパクは更に複雑に分化していて, その中には純粹に情報としての光を受け取り, 増幅し, 伝達するものがあった。

Fig.1 *Halobacterium halobium* バクテリオロドプシンを含まない株 (JW-1) の膜小胞の閃光々分解による吸光度の時間変化 (A, B), および時刻 0 (閃光前) に対する時刻 t での差スペクトル (C)^{1,2)}.
 A: フルスケール 5 秒間での測定, 観測波長は図中に記入
 B: フルスケール 50 ミリ秒での測定
 C: $t = 2$ ミリ秒 ($\circ$) と, $t = 50$ ミリ秒 ($\bullet$) での吸収差スペクトルの比較. 2 ミリ秒後の 490nm 付近の極大は 50 ミリ秒後には消失し, 380nm 付近の吸収極大のみとなる.

ここではエネルギー転換タンパクとしてのバクテリオロドプシン、ハロロドプシンの話は割愛して、最近発見された2種類の“光情報受容タンパク”についてのみ記すことにする。その詳しい性質、機能などに関しては以後の研究に待つ点も多いので、主に現象面からの記述に片寄るのは避けられない。御容赦頂きたい。

1. 高度好塩菌と2つのレチナールタンパク

飽和に近い25% (w/v) という食塩濃度の培地中で良く生育する高度好塩菌には、球状の *Halococcus* 属と、桿状の *Halobacterium* 属が知られている。*Halobacterium* 属の一種 *H. halobium* の形質膜中の、紫膜と呼ばれる特異な部分が、視物質ロドプシンとよく似たレチナールタンパク、バクテリオロドプシンから成ることが発見されたのは1971年のことであった¹⁾。バクテリオロドプシンは光を吸収してそのエネルギーを用い、プロトン細胞内から細胞外へ汲み出す。その独特なエネルギー変換の機構を探ることは魅力的である。また分離、精製が容易なことからも、紫膜は研究対象としての人気を集めた。1975年にはバクテリオロドプシン分子の7 Å分解能での三次元モデルが提出され²⁾、その後、全一次構造も明らかにされた^{3,4)}。バクテリオロドプシンに関しては内外に詳しい総説がある^{5~7)}。

1977年になって、バクテリオロドプシンを持たない *H. halobium* の変異株にも、光に依存したイオンの輸送現象が見られることを、向畑らは報告した⁸⁾。このイオンポンプもやはり、レチナールを発色団とすることがわかり、ハロロドプシンと命名された。始めのころハロロドプシンの機能はNaイオンを菌体内から菌体外に運ぶことであると考えられたが、現在では内向きの光駆動Cl⁻ポンプであることがわかっている⁹⁾。ハロロドプシンに関してはもう一つの誤った報告が、次に記すように、光化学反応サイクルに関してなされた。

WeberとBogomolniは、バクテリオロドプシンを含まない変異株から膜小胞を調製して、閃光々分解実験を行った¹⁰⁾。彼らによれば、閃光照射後の吸光度変化から推定すると光励起後、立ち上がり時間30μsで500nmに吸収極大を持つ中間体P500が生成され、その後半減期0.4msで380nmに極大を持つ中間体P380へと転換し、最後には半減期10msでもとの588nmに吸収極大を持つハロロドプシンへと回帰すると言う。

2. 第三のレチナールタンパクの発見

これに対して樋本らは、他の測定から中間体の寿命がもう少し長くなければ説明できない結果を得ていた¹¹⁾。そこで、同じように膜小胞を閃光々分解法で調べると、もとの色素の持つ590nmの吸光度が回復する過程には、10ms程の速いものと、1秒近くを要する遅いものがあることがわかった¹²⁾。このような極めて遅い回復過程は、短い繰返しパルスで励起するWeberらの方法では見えなかったであろう。速い過程は中間体P500の崩壊に対応し、遅い過程はP380の崩壊の過程であることも同時に示された。すなわち、両中間体は平行して進行する2つの光化学サイクル(フォトサイクル)上に、それぞれ位置すると考えられる(Fig. 2)。

次の問題はこれら2つの過程が、同一の物質(ハロロドプシン)に基づくのか、それとも他に反応サイクルを持つ光受容色素が存在するのかどうかである。樋本らが見いだした証拠はいずれも、新たな色素タンパクの存在を示すものであった^{13,14)}。すなわち、

- (1) 膜小胞を低濃度のコール酸で処理すると、遅い過程はすみやかに消失するが、速いサイクルは長時間おいても安定である。
- (2) 酸、アルカリ処理などで光反応性は消失するが、中性に戻すと速い過程だけが回復してくる。
- (3) P380とP500両中間体の生成量の比を、いろいろなbR⁻変異株について調べてみると、株によって大きな差があることがわかる。
- (4) 温度やpHに対する依存性は、速い過程と遅い過程で一致も相反もせず、全く独立したふるまいを示す。生理的環境下でのNaCl濃度の減少に応じて、P500の生成量が減ることから、イオンポンプであるハロロドプシンは、速い過程に対応するものと考えられた。

同じ頃Spudichらは、ハロロドプシンが菌体内を酸性化させることを巧みに利用し、いくつかのハロバクテリアの変異株を得ていた¹⁵⁾。なかでもFlx3と名付けられた株は、ハロロドプシンもバクテリオロドプシンも持たないが、膜断片の閃光々分解実験では上述の遅い光化学サイクルを示したのである¹⁶⁾。さらに興味深いことに、

Fig. 2 ハロロドプシンと思われた色素の2つのフォトサイクル

この菌は走光性も見せた。

3. ハロバクテリアの走光性

ハロバクテリアに走光性があることは、バクテリオロドプシンの機能の発見と同じ頃に知られていた¹⁷⁾。その後 1975年に Hildebrand らは、作用スペクトルなどを含む詳しい解析を発表している¹⁸⁾。ハロバクテリアは直径 1 μm 、長さ 3~7 μm 程度の極毛性の菌であり長軸方向に前進、後退が自由である。Dencher¹⁹⁾によるとハロバクテリアの走光性は光喫驚応答 (Photophobic reaction)²²⁾ によっている。すなわち、バクテリアは光強度の急激な変化に対して一旦停止、方向逆転などの応答をする。誘引光のスポットの中を泳いでいたバクテリアは、スポットから外れると急に立ち止まり、1 秒もしないうちにそれまでとは逆の方向に泳ぎ出す。こうして誘引光のスポットにはトラップされ、忌避光のスポットには近づかない。

このような走性発現のしくみは、大腸菌、サルモネラなどの走化性の場合と、本質的には同じである²⁰⁾。光の強度が一定ならば、ハロバクテリアは 5~10 秒に 1 回程度の割合で自発的に方向を逆転する。Spudich らによればオレンジの誘引光を急に照らしたり、青色の忌避光を急に切ると、次の方向逆転までの時間は、10~20 秒程度と長くなった²¹⁾。これはハロバクテリアの光に対する反応が、サルモネラなどの化学物質に対する場合と同じように、方向変換頻度をバイアスすることで発現することを意味する。このような反応は厳密には Clinokinesis と呼ばれるべきだが²²⁾、バクテリアの化学物質に対する走性は広く一般に走化性 (Chemotaxis) と呼ばれている。それでハロバクテリアの場合も、光に誘引される性質を正の走光性、光を忌避する性質を負の走光性と呼ぶことにする。

さて、Dencher らは刺激から泳ぎの一旦停止までの時間が、刺激光の強度に依存することを利用して作用スペクトルを測定した。誘引光を切った後 1.9~2 秒で菌体を停止させるのに必要十分な光量の逆数を、波長に対してプロットすると、500nm 以上ではバクテリオロドプシンの吸収スペクトルとほぼ重なり (作用極大 565nm)、それ以下の波長では応答は見られなかった。そのことから彼らはバクテリオロドプシンが誘引光の受容体であると考え、誘引光に応答する系を Photosystem 565 (PS 565) と名付けた。一方、忌避光を急に照らす刺激では、370nm に極大のある作用スペクトルが得られたので、

これを PS 370 とした¹⁸⁾。両システム共レチナルを必要とするが、PS 370 の方がより培養初期に発現するので、彼らは PS 370 の受容体はバクテリオロドプシンとは異なると考えた²³⁾。

これに対して、現在の Spudich²⁴⁾ や我々の考えは次のようである。バクテリオロドプシンもハロロドプシンももたない変異株が野生株と同程度の走光性を示すのだから、2つのイオンポンプは一応、走光性とは無関係であろう。その変異株がもっているレチナルタンパクこそが、光感受受容体であるに違いない。中間体の寿命が長いということは、通常照明下で中間体が存在できることを示すので、370~380nm に吸収極大をもつ中間体が PS 370 の光受容体であり、もとの 590nm 付近に極大のあるのが PS 565 の受容体なのであろう。すなわち第三のレチナルタンパクは、正負両方の走光性の受容体を兼ねている。第三のレチナルタンパクは、Spudich らの提案によって S-ロドプシン (slow-cycling rhodopsin¹⁶⁾、または sensory rhodopsin²⁴⁾) と呼ばれることになった。

4. ハロロドプシンと走光性

走光性の受容体がバクテリオロドプシンであるとの考えは、光によるバクテリアのプロトン駆動力の増減が行動発現の引き金となっているとの解釈^{25, 26)}を暗黙のうちに含む。それならば起電性のポンプであるハロロドプシンも当然、走光性に関与してよいはずである。また、バクテリオロドプシンに比較して少量しか存在しないハロロドプシンの生理的意味もよくわからない。それゆえハロロドプシンの発見はハロバクテリアの走光性に対する興味を増大させることになった。

Narurkar と Spudich は、バクテリオロドプシンを欠損した ET-15 株と野生株 ET 1001 について作用スペクトルを比較した。バクテリオロドプシン、ハロロドプシンを共に含む ET 1001 株では 570nm と 590nm の 2 つの作用極大が見られるのに対し、ET-15 株では単一の極大が 590nm に見られたという²⁷⁾。ところが Hildebrand と Schimz は同じ ET-15 株の作用スペクトルについて、565nm の単一ピークであると報告している²⁸⁾。その一方で同じグループの Traulich らは、バクテリオロドプシン欠損株 L-33 では 565nm と 590nm の 2 つの極大が見られるとしている²⁹⁾。

590nm にピークを観測した両グループ共、これは走光性に対するハロロドプシンの寄与を示すものであると考

えた。現在ではハロロドプシンの吸収極大は580nm付近であり^{30, 31)}、590nmに極大を持つものはS-ロドプシンであることがわかっているの、上の解釈は妥当でない。

5. 新しい受容体 P 565 ?

それより前、Sperling と Schimz はレチナールの生合成をニコチンで阻害させたハロバクテリアに外部からレチナール誘導体を加え、走光性の作用スペクトルを測定した³²⁾。3,4-dehydroretinal (retinal 2) の場合、走光性の作用極大は15-20nm レッドシフトするのに対し、紫膜の吸収極大のシフトは30nmであった。この時点では、彼らは慎重を期していたのか何も解釈を加えていない。ところがその2年後、1982年にSchimzらはほとんど同様の実験を報告し、走光性の受容体はバクテリオロドプシンではなく、565nmに吸収極大を持つ新たなレチナールタンパクが存在することを主張した³³⁾。

Hildebrand のグループはDencherら以来、一貫して565nmの作用極大を主張しているの、1983年の総説ではハロバクテリアのレチナールタンパクは、5種類あることになっている⁷⁾。バクテリオロドプシン、ハロロドプシン、第三のレチナールタンパク、の他に分光学的に未同定の光受容体P 565、同じく負の走光性の光受容体P 370というわけである。そしてP 370とP 565が異なることの証拠として、Dencherが初期に指摘したように、バクテリアが定常増殖期に入るにしたがって現われる走光性の出現のしかたが、PS 370とPS 565とは異なる点をあげている。例えば、培養の途中でタンパク合成を阻害した場合、バクテリアは負の走光性だけを示すようになるという。さらに、どの培養時期でも負の走光性だけを示す変異株がET-15株から得られたという³⁴⁾。

たしかに、S-ロドプシンがPS 370とPS 565正負両方の走光性の受容体を兼ねているとすると、これらのことは説明が難しい。また、作用スペクトルの極大とS-ロドプシンの吸収極大のずれも気になる。そこで我々は、次のように問題を個別化して、解答を試みることにした。

(1) S-ロドプシンの光化学中間体は負の走光性の受容体であるのか？ (2) もしそうであるなら、それ以外に負の走光性の受容体は無いのか？ (3) S-ロドプシンは正の走光性の受容体であるのか？ (4) もしそうならば、それ以外に正の走光性の受容体は無いのか？

6. 負の走光性と第三のレチナールタンパク

植本らは、第三のレチナールタンパク (S-ロドプシン)

Table 1 各種塩溶液中で観測できるS-ロドプシン (sR) とハロロドプシン (hR) の相対量と光誘起膜電位¹⁴⁾。

Salt ^{a)}	hR	sR	membrane potential ^{b)}
NaCl	100 ^{c)}	100 ^{c)}	+
NaBr	117	114	+
NaI	77	66 [*])	+
NaAcetate	trace	119	-
KH ₂ PO ₄	trace	105	-
NaH ₂ PO ₃	trace	103	-
Na ₂ SO ₄	trace	103	-
NaNO ₃	trace	116	-
NaSCN	trace	66 [*])	-
NaClO ₄	trace	76 [*])	-
LiCl	103	91	+
KCl	102	108	+
NH ₄ Cl	68	79	+
CsCl	55	108	+
MgCl ₂	70	71	+
CaCl ₂	67	70	+

a) 塩濃度は3M。ただしNa₂SO₄は1.5M

b) +: 光誘起膜電位の発生が観測できたイオン
-: 光誘起膜電位の発生が観測できなかったイオン

c) 3M NaCl 中における A_{590} の値を100とした

*) 不安定

のフォトサイクルに対する添加塩の効果を詳しく調べ、ハロロドプシンに対するそれと比較した¹⁴⁾。ハロロドプシンを低塩濃度にさらすと吸収極大がブルーシフトし、Cl⁻の添加によってもとに戻ることが知られている。Table 1に示すように、フォトサイクルや光誘起膜電位もやはり各種のイオンの中ではハロゲンイオン、特にCl⁻の影響を受ける。一方、三番目のレチナールタンパクのフォトサイクルは、塩の種類、濃度に依存しない。また、Spudichらの得た変異株Flx 3は、光照射を受けても膜電位の変化を示さない。これらから、S-ロドプシンはバクテリオロドプシン、ハロロドプシンのようなイオンポンプではないことがわかる。S-ロドプシンの分子量はハロロドプシンとほとんど同じく約25000である³⁶⁾。

これまでの研究で知られたS-ロドプシン (sR) のフォトサイクルをFig. 3に示す。長寿命の中間体S 373の発色団レチナールはバクテリオロドプシンのM中間体と同じように13-cis型をしている。閃光分解によるS 373

Fig. 3 S-ロドプシンのフォトサイクル^{37, 38)}.

光励起によって生じる最初の中間体 S 680 にも、もとの sR に戻る熱的過程が存在する³⁸⁾が省略した。波線は光誘起過程、実線は熱的過程を表す。

の収量は低温になるに従って小さくなる¹³⁾が、この原因は最初の中間体 S 680 から S 373 に至る過程の温度依存性が大きく、低温では S 680 が直接もとの sR に戻ることにある³⁸⁾。S 373 が元の状態に戻る過程には 2 通りあって、半減期 0.8sec の熱的過程の他、青色光を吸収した S 373 が新たな中間体 S 520 を経由して元の sR 590 へと戻る過程がある^{24, 37)}。青色光を忌避光と感ずる負の走光性は、後者の過程と関係があると考えられる。ここで受容体と仮定した S 373 が定常的に存在するためには、図中に矢印で示した背景光の存在が必要である。そのための背景光が、どの程度必要かを見積もってみよう。

Fig. 3 の外側のサイクルについて定常状態を仮定すれば、

$$[S_{373}] = \frac{\phi \sigma I}{\phi \sigma I + k}$$

の関係が成立する。ここで I は背景光量、k は S 373 → sR の速度定数、すなわち $\ln 2 / 0.8$ 、 ϕ は sR 590 から S 373 への過程の量子収率、 σ は吸収断面積で、 $0.38 \times 10^{-18} \text{ cm}^2$ (ϵ はモル吸光係数) の関係が成り立つ。sR 590 の ϵ を約 50000 とし、 ϕ を 1 と仮定すれば、これらから S 373 の半飽和光強度は、だいたい $5 \times 10^{13} \text{ photons/mm}^2 \text{ s}$ と見積られる。1W は 600nm で約 $3 \times 10^{12} \text{ photons/s}$ であるから、 $1.7 \times 10^{-5} \text{ W/mm}^2 = 17 \text{ W/m}^2$ の光強度で約 50% の sR が中間体 S 373 として存在できることになる。すなわち、背景光として与えられる光が、これよりも暗くなると、もし中間体 S 373 が受容体であるなら、負の走光性は抑えられてよいはずである。

このことを調べるために我々の用いた走光性測定装置⁴⁰⁾の概念図を Fig. 4 に示した。観測光、背景光は、顕微鏡の通常の照明装置 (位相差用) を経て定常的に、落射照明装置を経た作用光は電気シャッターにより断続的にスライドガラス上のバクテリア懸濁液に当てられる。

Fig. 4 走光性測定装置⁴⁰⁾の概念図

A: 観測光 (背景光) 光源. B: 作用光光源.
C: 電気シャッター. D: 高感度ビデオカメラ
E: 画像入力装置 (ビデオデジタイザー).
F: マイクロコンピュータ. G: ビデオモニター
H: 追跡モニター.

刺激を受けた菌体の遊泳方向の変化は、ビデオカメラに接続されたマイクロコンピュータにより自動的に記録されるので、これまでのように実験者の主観の入り込む余地はない。作用光点灯直後に遊泳方向を逆転させた菌の割合で負の走光性を評価すると、Fig. 5 に示すように背景光に依存することが確かめられた⁴¹⁾。ここで用いた背景光は 550nm よりも長波長のものである。

次に S 373 が吸収するような短波長の光を背景光として定常的に当てる場合を考えてみよう^{42, 24)}。S 373 が光を吸収して sR 590 に戻る過程が負の走光性発現と結びつくならば、S 373 を生成するような光、即ち sR 590 が吸収する光もまた、短波長の定常光存在下では、負の走光性を引き起こすことになる。もっとも、そのような長波長の光は正の走光性の作用光でもあるから、上に述べた条件下では両方の走光性は互いに干渉し、正の走光性は弱められると思われる。そこで、背景光の波長を変えて、正の走光性に対する背景光の効果を調べたのが Fig. 6 である。予想どおり 373nm 付近の背景光は大きく正の走光性を阻害する。

さらに短波長の背景光を強めると、人工的に引き起こされた負の走光性は正の走光性に打ち勝ち、点灯時の方向逆転頻度は、消灯時の頻度を上回るようになる (Fig. 7)。このことは明らかに S 373 が負の走光性の受容体であることを示す証拠であると考えられる。

では S 373 が負の走光性受容体として唯一のものだろうか。もしそうであるなら、S 373 を生成する背景光が完全に暗ければ走光性は現われない。ところが Fig. 5 は、作用光量がある程度以上ならば、背景光がなくとも負の走光性が現われることを示している。さらに調べると背景光が暗い場合には、負の走光性の極大は 370nm

Fig. 5 負の走光性の強さ（縦軸）と背景光量，作用光量との関係⁽⁴¹⁾。

A：作用光量をそれぞれ， 6.4×10^{13} photons/mm²s (■)， 1.6×10^{13} photons/mm²s (○)， 4×10^{12} photons/mm²s (●) に固定したときの負の走光性の背景光量依存性。作用光の波長は 380nm。

B：背景光量を 230 W/m² (○, ●)，0.8 W/m² (□, ■) に固定した場合の作用光量依存性。

負の走光性の強さは作用光を点灯後 4 秒間に遊泳方向を逆転した菌の割合で示した。矢印は作用光のないときに現われる自発的方向逆転の割合。

Fig. 6 正の走光性を阻害する背景光の波長依存性⁽⁴²⁾

縦軸は作用光点灯後 3 秒間で方向逆転した菌の割合を示す。背景光の強度は 16 W/m² にそろえた。

作用光の波長 580nm, 強度 44 W/m²。

付近ではなく，むしろ 470nm 付近に現われることが判った。通常は S373 の作用の影にかくれている，感度の比較的低い他の受容体の存在を考えると説明しやすい結果である。

7. 走光性変異株

最近我々は正の走光性を全く示さない変異株を分離した。この株は他に次の特徴を持っている。1. 自発的な方向逆転をあまり行わず，直進遊泳を続ける時間が長い。2. 感度は低い負の走光性を示し，この極大は 480nm 付近にある。3. sR 含量は野生株に比べて 1/4 以

背景光の強度 (10^{13} photons/mm²s)

Fig. 7 強い青色背景光の照射によって生じる，長波長的作用光に対する正の走光性の負の走光性への転換⁽⁴²⁾。

縦軸は作用光 (583nm) の点灯後 (●)，あるいは消灯後 (○) 3 秒間に遊泳方向を逆転した菌の割合。背景光の波長は 400nm。作用光の強度は 6×10^{13} photons/mm²s。

下である。

この株では背景光量の大小にかかわらず，つねに負の走光性の極大は 480nm 付近であり，370nm 付近には肩も見られない。即ち，この変異株は，正の走光性と同時に PS370 と呼ばれる負の走光性システムも欠いている。したがって，480nm に極大を示すこの菌の負の走光性はこれまでに見つかっていない新しい走光性システムであると考えられる。我々はこのシステムを受容体を同定するため極大波長付近のフラッシュ光を用いて閃光々分解実験を試みた。その結果，Fig. 8 に示すように 490nm 付近で励起した場合，明らかに sR とは異なる緩和過程

Fig. 8 A: PS 370 を持たない変異株の負の走光部の波長依存性⁴³⁾. 作用光の強度は 62 W/m^2 にそろえた. B: 変異株の膜断片試料の閃光々分解による吸光度の時間変化. 閃光の波長は干渉フィルターで 486 nm (半値幅 10 nm) を選択. 上のトレース (観測波長 590 nm) は一部励起される S-ロドプシンの存在を示している.

が 450 nm での観測で認められた. その後の精密な測定では, 閃光々分解による差スペクトルは走光性の作用スペクトルとよく一致し, またレチナール非存在下では走光性も閃光々分解によるシグナルも共に見られないことから, この sR よりもやや速い緩和過程を示す物質は, 新しい負の走光性システムの受容体であると結論した⁴³⁾. この変異株では, 負の走光性の感度は対数増殖期に最大で, 静止期に入ると約 $1/2$ に低下する. また, 閃光々分解による吸光度の変化も同様に対数増殖期に集菌した場合が最大である.

ここで改めて過去の報告を振り返ってみよう. Dencher は PS 370 には, カロテノイドもアンテナ色素として関与し, 500 nm 付近の作用スペクトルに肩を作っているという. その後 PS 370 の作用スペクトルを精密に測定した者はいないが, 今回発見されたシステムもまた, PS 370 と重なれば, その肩として観測されと考えられる. Dencher の結論は果たして妥当なのだろうか. また, われわれの発見した変異株の負の走光性システムの作用スペクトルも閃光々分解差スペクトルも, カロテノイドの吸収スペクトルによく似ている. ここでカロテノイドの関与かどうかを確かめておくことは重要だとと思われる. 現在可能な方法の一つはカロテノイドを持っていない菌株の走光性を背景光の暗い条件で測定して, 480 nm に負の走光性の極大が現われるか否かを見ることである. 我々の実験ではカロテノイドを含まないとされる W1 株にも 480 nm に極大を持つ走光性システムは存在した.

我々は Hildebrand らの, いわゆる PS 370 と正の走

光性の分離にも疑問を抱いている. 彼らの言う培養時期による分離は, 我々の負のシステムとの分離ではないのか? 彼らの得た PS 370 だけを持つ変異株は, 実は我々の得た 480 nm に極大を示す変異株と同種のものではないのか? こんな疑問を持つのも実は, 我々の得た変異株で, PS 370 と正の走光性が同時に消失しているからである. PS 370 と正の走光性は切り離せないのではないか? 共に sR を受容体としているのではないだろうか?

8. 正の走光性と S-ロドプシン

S-ロドプシンのオブシン部分は, 培養の早い時期から存在する. 定常増殖期を過ぎないと負の走光性が現われないのは, レチナールの合成が開始されないからである. では, sR のオブシンを持っている対数増殖期の菌体に外からレチナールを加えた場合, 正の走光性は発現するだろうか. 確かに, 正の走光性は現われる. だが, これだけでは sR が正の走光性の受容体を兼ねている証拠にはならない. そこで我々は次に, そのようにして発現した正の走光性の作用スペクトルを測定した⁴⁴⁾.

一定の作用の現われる光強度を求め, その逆数を波長に対してプロットすれば, 受容体が 1 種類である限り, 吸収スペクトルと相同な作用スペクトルが描かれることになる. 刺激された菌体のうち 50% が反応する光強度を各波長で求めた (Fig. 9A). 対数増殖期では上述の負の走光性システムの寄与が大きいため, スペクトルの短波長側では両走光性システムの混合を観測していることになるが, 580 nm よりも長波長側では負のシステムの影

Fig. 9A 対数増殖期の *Halobacterium halobium* Flx 3 株に外からレチナルを加えて現われる正の走光性⁴⁴⁾.

作用光点灯後 3 秒間に方向を逆転する菌の割合 (縦軸) が 50% 付近になるような光量 (横軸) を各波長で求めた。単一の受容体の働きであるならば光量-作用曲線の傾きは各波長で一定となる。

Fig. 9B A 図から求めた作用スペクトル (実線) と S-ロドプシンの吸収スペクトル (点線)

響はほとんどない。そこで、長波長側で sR の吸収スペクトルと対応させたのが Fig. 9B である。作用スペクトルは sR の吸収スペクトルと良く一致していると言える。

sR が正の走光性の受容体としても働いていることを示す根拠は他にもあるので、我々は今ではそのように考えている。残された問題は sR 以外に正の走光性の受容体が存在するか否かということになるが、我々の実験では未だその存在を示すような結果を得ていない。

これまで分光学的に同定された 4 種類のレチナルタンパクの主な性質を表 2 にまとめておく。

9. 光情報の増幅, 伝達

これまで得られた現象論的な測定結果だけをもとにし

Fig. 10 PS 370 による負の走光性発現の一つのモデル⁴¹⁾.

でも、光情報の伝達、増幅の機構を論じることには意味があろう。Spudich らは一定強度の背景光の下での S 373 中間体の存在確率から逆算して、菌体当り一分子の S 373 が青色光によって励起されることで負の走光性が誘起されると見積っている²⁴⁾。我々の計算はこれとは少し異なる⁴¹⁾。

S 373 が青色光を吸収して sR に戻る過程と共役した過程 (Fig. 10) を考え、それによって蓄積される量 j が走光性応答の確率と比例すると仮定してみよう。ここでは共役の際の比例定数 j が増幅程度を表わすことになる。話を第 6 節に戻すが、粗く見積った S 373 の半飽和光量よりも、実測された走光性の半飽和光量が小さかった (Fig. 5)。sR 590 → S 373 の量子収率は最近の測定結果³⁸⁾では約 0.1 であり、これをもとにすると差は更に大きくなる。ところが、ここで導入したモデルによれば、走光性の半飽和光量は増幅の程度が増すに従って減少する。すなわち、走光性の飽和は S 373 の存在比の飽和で

Table 2 高度好塩菌のレチナールタンパクの主な性質

名称 (略号)	吸収極大	分子量	最も寿命の長い中間体の吸収極大, 半減期	一菌体を含む分子数	機 能
バクテリオロドプシン (bR)	568nm	26,800	412nm, 2-5ms	$< 10^5$	プロトンポンプ
ハロロドプシン (hR)	578nm ⁵¹⁾	約 25,000 ⁵⁰⁾	520nm, 15ms ⁵²⁾	1.7×10^4 ¹⁶⁾	Cl ポンプ
S-ロドプシン (sR)	587nm	約 25,000 ³⁶⁾	373nm, 0.8s ²⁸⁾	6.5×10^3 ¹⁶⁾	正および負の走光性受容体
第4番目のロドプシン様タンパク (仮称)	480nm ⁴⁹⁾	不 明	360nm, 0.3s ⁴⁹⁾	約 10^3 ⁴⁴⁾	負の走光性受容体

はなく、菌体の応答、さらに言えば量 j の飽和という状況がこのモデルにより実現することになる。走光性の実測結果を良く説明するような増幅度 b は、sR → S373 および S373 → sR の量子収率をそれぞれ 0.1, 0.5 としたときに約 100 であった。 j が菌体内で一様に存在し、一菌体のどの sR 分子も j の生成と共役できると仮定すれば、このことはその中の 1 / 100 の sR 分子が sR → S373 → sR という 2 光子吸収過程を経ることで一菌体の走光性応答が発現することを意味する。5000 分子程度の sR を一菌体に持つハロバクテリアでは約 50 分子の励起が必要なこととなる。

上述のモデルに表われた量 j の実体は不明である。これから探るべき大きな課題である。

一方、これまでに蓄積の多い細菌の走化性研究の成果をふまえて、走光性発現の機構を解明しようとする方向もある。Schimz らは誘引光を照射したとき、ハロバクテリアの膜に存在する分子量 60000 程度のタンパクがメチル化されることを観察した⁴⁵⁾。メチル基の供与体である L-メチオニンを枯渇させたり、メチル基転移の阻害剤であるエチオニンを培地に添加すると、ハロバクテリアは走光性の応答を示さなくなる。大腸菌、サルモネラなどではメチル化、脱メチル化はそれぞれ誘引、忌避物質に対する応答が順応 (adaptation) する過程に対応している²⁰⁾。おそらくハロバクテリアでも同様であろう。メチル化は *in vitro* の系でも起こり、そのメチル基転移酵素は他の菌の場合と異って膜画分に存在する⁴⁶⁾。また、メチル化反応には Ca イオンが必須であるという⁴⁶⁾。Ca²⁺、Mg²⁺ が走光性発現に重要な役割を演じていることを指摘するグループもある^{47, 48)}。

おわりに

新しいレチナールタンパクと題しながら、ハロバクテリアの走光性研究の現状を紹介することにとどまった。しかも歴史の浅い分野であるので、動物の視覚の研究に比べても、また他のバクテリアの走化性に比較しても、機構の分子レベルでの解明という点では立ち遅れている。しかしながら筆者らは、上記 2 つの研究対象の長所を合わせ持つことの利点は、予想される以上に大きいのではないかと考える。

少し先に発見されたハロロドプシンは精製が成功し、新たな研究成果が次々と報告される状況にある^{50~53)}。2 種類の走光性の受容タンパクも近い将来に精製が実現する。そのうえで前記の長所を生かした新しいアイデアを少しばかり足すことができれば、この走光性研究が、先行する分野を追い越すことも不可能ではないと思っている。

文中に引用した研究成果の一部は文部省科学研究費 58420053, 59780237, 60571012 の補助、および樋本紀夫、渡辺正彦、富岡寛顕氏らの協力のもとでなされました。

参考文献

- 1) D. Oesterhelt, W. Stoekenius: *Nature New Biol.*, **233**, 149-152 (1971)
- 2) R. Henderson, P. N. T. Unwin: *Nature*, **257**, 28-32 (1975)
- 3) Y. A. Ovchinnikov, N. G. Abdulaev, M. Yu. Feigana, S. B. Kiselev, N. A. Lomanov: *FEBS Lett.*, **100**, 219-224 (1979)
- 4) H. G. Khorana, G. E. Gerber, W. C. Herlihy, C. P. Gray, R. J. Anderegg, K. Nihei, K.

- Biemann: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5046-5050 (1979)
- 5) 徳永史生, 岩佐達郎: 膜, **9** (2), 73-91 (1984)
- 6) W. Stoeckenius, R. A. Bogomolni: *Ann. Rev. Biochem.*, **52**, 587-616 (1982)
- 7) N. A. Dencher: *Photochem. Photobiol.*, **38**, 753-767 (1983)
- 8) A. Matsuno-Yagi, Y. Mukohata: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 237-248 (1977)
- 9) B. Schobert, J. K. Lanyi: *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306-10313 (1982)
- 10) H. J. Weber, R. A. Bogomolni: *Photochem. Photobiol.*, **33**, 601-608 (1981)
- 11) N. Hazemoto, N. Kamo, M. Kondo, Y. Kobatake: *Biochim. Biophys. Acta.*, **682**, 67-74 (1982)
- 12) M. Tsuda, N. Hazemoto, M. Kondo, N. Kamo, Y. Kobatake, Y. Terayama: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 970-976 (1982)
- 13) N. Hazemoto, N. Kamo, Y. Terayama, Y. Kobatake, M. Tsuda: *Biophys. J.*, **44**, 59-63 (1983)
- 14) N. Hazemoto, N. Kamo, Y. Kobatake: *Biophys. J.*, **45**, 1073-1077 (1984)
- 15) E. N. Spudich, J. L. Spudich: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4308-4312 (1982)
- 16) J. L. Spudich, R. L. Bogomolni: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6250-6254 (1982)
- 17) D. Oesterhelt, W. Stoeckenius: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **70**, 2853-2857 (1973)
- 18) E. Hildebrand, N. Dencher: *Nature*, **257**, 46-48 (1975)
- 19) N. A. Dencher: in *Energetics and Structure of Halophilic Microorganisms* (eds. S. R. Caplan, M. Ginzburg), pp 67-85, Elsevier / North-Holland Biomedical Press (1978)
- 20) 例えば, 今栄康雄, 水野敬文: 生物物理, **25** (6), 235-244 (1985)
- 21) J. L. Spudich, W. Stoeckenius: *Photobiochem. Photobiophys.*, **1**, 43-53 (1979)
- 22) B. Diehn, M. Feinleib, W. Haupt, E. Hildebrand, F. Lenci, W. Nultsch: *Photochem. Photobiol.*, **26**, 559-560 (1977)
- 23) N. A. Dencher, E. Hildebrand: *Z. Naturforsch.*, **34c**, 841-847 (1979)
- 24) J. L. Spudich, R. A. Bogomolni: *Nature*, **312**, 509-513 (1984)
- 25) V. A. Baryshev, A. N. Glagolev, V. P. Skulachev: *Nature*, **292**, 338-340 (1981)
- 26) V. A. Baryshev, A. N. Glagolev, V. P. Sklachev: *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 367-373 (1983)
- 27) V. Narurkar, J. L. Spudich: *Biophys. J.*, **33**, Supple., 218a (1981)
- 28) E. Hildebrand, A. Schimz: *Photochem. Photobiol.*, **37**, 581-584 (1983)
- 29) B. Traulich, E. Hildebrand, A. Schimz, G. Wagner, J. K. Lanyi: *Photochem. Photobiol.*, **37**, 577-579 (1983)
- 30) J. L. Spudich, R. A. Bogomolni: *Biophys. J.*, **43**, 243-246 (1983)
- 31) M. Steiner, D. Oesterhelt, M. Ariki, J. K. Lanyi: *J. Biol. Chem.*, **259**, 2179-2184 (1984)
- 32) W. Sperling, A. Schimz: *Biophys. Struct. Mech.*, **6**, 165-169 (1980)
- 33) A. Schimz, W. Sperling, E. Hildebrand, D. Koehler-Hahn: *Photochem. Photobiol.*, **36**, 193-196 (1982)
- 34) E. Hildebrand, A. Schimz: *Photochem. Photobiol.*, **38**, 593-597 (1983)
- 35) T. Ogurusu, A. Maeda, N. Sasaki, T. Yoshizawa: *Biochem. Biophys. Acta*, **682**, 446-451 (1981)
- 36) E. N. Spudich, J. L. Spudich: *J. Biol. Chem.*, **260**, 1208-1212 (1985)
- 37) H. Tomioka, N. Kamo, T. Takahashi, Y. Kobatake: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **123**, 989-994 (1984)
- 38) 大谷弘之, 小林孝嘉, 津田基之: 生物物理, **25**, Suppl., 208 (1985)
- 39) M. Tsuda, B. Nelson, C.-H. Chang, R. Govindjee, T. G. Ebrey: *Biophys. J.*, **47**, 721-724 (1985)
- 40) T. Takahashi, Y. Kobatake: *Cell Struct. Funct.*, **7**, 183-193 (1982)
- 41) T. Takahashi, M. Watanabe, N. Kamo, Y. Kobatake: *Biophys. J.*, **48**, 235-240 (1985)
- 42) T. Takahashi, Y. Mochizuki, N. Kamo, Y. Kobatake: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 99-105 (1985)
- 43) T. Takahashi, H. Tomioka, N. Kamo, Y. Kobatake: *FEMS Microbiol. Lett.*, **28**, 161-164 (1985)
- 44) H. Tomioka, T. Takahashi, N. Kamo, Y. Kobatake: submitted
- 45) A. Schimz: *FEBS Lett.*, **125**, 205-207 (1981)
- 46) A. Schimz: *FEBS Lett.*, **139**, 283-286 (1982)
- 47) V. A. Baryshev, A. N. Glagolev, V. P. Skulachev: *FEMS Microbiol. Lett.*, **13**, 47-50 (1981)
- 48) V. A. Baryshev: *FEMS Microbiol. Lett.*, **14**, 139-143 (1982)
- 49) 富岡寛顕: 未発表
- 50) M. Steiner, D. Oesterhelt: *EMBO J.*, **2**, 1379-1385 (1983)
- 51) E. Bamberg, P. Hegemann, D. Oesterhelt: *Biochemistry*, **23**, 6216-6221 (1984)
- 52) P. Hegemann, D. Oesterhelt, M. Steiner: *EMBO J.*, **4**, 2347-2350 (1985)
- 53) P. Hegemann, D. Oesterhelt, E. Bamberg: *Biochim. Biophys. Acta*, **819**, 195-205 (1985)