ハロロドプシン——光により 駆動される塩素イオンポンプ

吉 澤 透・小栗栖 太郎

京都大学理学部生物物理学教室 〒606 京都市左京区北白川追分町

Halorhodopsin—Light-driven Cl⁻-pump

Toru Yoshizawa and Tarou Ogurusu

Department of Biophysics, Faculty of Science, Kyoto University, Kyoto 606

Spectroscopic, photochemical and biochemical properties of halorhodopsin are summarized. Halorhodopsin is present in the plasma membrane of *Halobacterium halobium* and acts as a light-driven Cl⁻-pump. Halorhodopsin has an all-*trans* retinal as its chromophore which binds to apoprotein, halo-opsin through a protonated Schiff base. The absorption spectrum of halorhodopsin and its photoreaction depend on the chloride concentration in the medium. The λ_{max} of halorhodopsin in the presence and absence of NaCl are 576 and 567 nm, respectively. The Cl⁻-dependency of the absorption spectrum suggests the existence of two sites for binding Cl⁻; one is a "Cl⁻-binding site" specific for Cl⁻ and the other is an "anion-binding site" non-specific for Cl⁻. The Cl⁻-binding site is responsible for the wavelength regulation of the absorption spectrum, while the anion-binding site is not. On the basis of these two binding sites, a light-driven Cl⁻-pump mechanism has been suggested as follows: During the photoreaction of halorhodopsin, a Cl⁻ is released from the Cl⁻-binding site to the inside of the cell, then another Cl⁻ in the anion-binding site shifts to the Cl⁻-binding site and finally a Cl⁻ in the medium outside of the cell is bound in the anion-binding site. Thus one Cl⁻ in the medium can be transported into the inside of the cell by the aid of the photoreaction of one halorhodopsin molecule.

Key words: Halorhodopsin, Membrane Protein, *Halobacterium halobium*, Cl⁻-pump, Photo-transducer

1 はじめに

好塩菌 *Halobacterium halobium* は、飽和に近い塩濃度でのみ生育できるバクテリアである。この菌の細胞膜には光駆動の H⁺ ポンプ機能を持つ bacteriorhodopsin (bR)が多量に含まれている。bRはその発見 (1971年)¹⁾以来、興味ある膜タンパク質として非常に活発に研究されてきたが(最近の総説としては文献 2)~5)がある)、ここ数年の間に、この菌の細胞膜から、bRと異なる2種類のロドプシンが発見された (Fig. 1)。その一つは halorhodopsin (hR)⁷⁾で、光駆動の Cl⁻ ポンプ機能を持ち⁸⁾、他の一つは slow-rhodopsin (sR)と呼ばれ、走光性の光センサーであるといわれている⁹⁾。

本総説では hR の Cl⁻ ポンプ機能が発見された経過を簡単に紹介した後、現在までに得られている知見をまとめ、最後に hR による Cl⁻ 輸送のしくみについての我々のモデルを提出したい。hR は初めて発見された光駆動の Cl⁻ ポンプであり、この例のないタンパク質に関心を持っていただければ幸いである。

2 光駆動の Cl⁻ ポンプの発見

H. halobium の菌体浮遊液に中性付近で光を照射すると、外液の pH は一時的に上昇し、次に下降する。この pH 変化は従来 bR によるとされていた¹⁰⁾が、矢木と向畑¹¹⁾が bR をほとんど含まない変異株 R₁mR を分離し、この菌体浮遊液に光を照射すると、pH の上昇

Fig. 1 *Halobacterium halobium* の三つのロドプシンとそれらに関連している膜輸送系はロドプシンを示す。アミノ酸と Na^+ の symporter 等については引用文献 6) の総説が詳しい。

だけしか観察されなかった。このことから光による外液の pH の上昇は、通常の bR によるのではないと示唆された¹¹⁾。その後外国の研究者¹²⁻¹⁴⁾ により、 H^+ のキャリアである CCCP (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone) や FCCP (carbonyl cyanide *p*-trifluoromethoxyphenyl hydrazone) 等により、外液の pH の下降が阻害されるのに対し、pH の上昇は阻害されないことがわかった。このことから、pH の上昇は H^+ ポンプによる H^+ の流入に起因するのではないことがわかった。さらに菌体には他のイオン種の光駆動ポンプが存在し、これにより形成される膜電位によって、受動的に H^+ の流入が起こるのではないと考えられ、いくつかのイオン種の輸送が検討された。菌体を破碎して cell envelope vesicles (細胞膜小胞) を調製し、それに光をあてると Na^+ が流出してくることがフローダイアリス法等により観察されたために¹²⁻¹⁴⁾、光駆動の Na^+ ポンプの存在が提案された。この考えによると、 Na^+ のくみ出しにより菌体の内側に負の膜電位が生じるので、 H^+ が菌体内に流入し (Fig. 2a 参照)、その結果、外液の pH が上昇すると説明された。一方、この光駆動の Na^+ ポンプは、レチナールを発色団とする光受容タンパク質であることも確認された¹⁵⁾ (詳しくは 3-1 を参照)。これらの結果に基づいて、1981 年に向畑によりこの Na^+ ポンプは halorhodopsin (hR) と命名された⁷⁾。命名に至るまでの経過は文献¹⁶⁾ に詳しく紹介されている。

ところがその後、Schobert と Lanyi⁸⁾ により、hR は Na^+ ポンプではなくて Cl^- ポンプであることが、次に述べる実験により示された。bR を欠落し、hR を含む変異株 L-33 から菌体膜小胞を調製し、それをリン酸カリの溶液中に懸濁し、光を照射したところ、膜電位は形成されなかった。ところが KCl を加えて光を照射すると、膜電位が生じた。このことから、膜電位の形成には Na^+ は必要ではないが、 Cl^- が必要であることがわかった。さらに光の照射により細胞膜小胞内の Cl^- 量が増加することもわかった。また光の照射により細胞膜小胞の体積が増加した。これらの結果は hR が Na^+ ポンプだとすると説明できず (Fig. 2a)、 Cl^- ポンプだと考えられた (Fig. 2b)。すなわち光の照射による体積の増加は、hR による Cl^- のとりこみと、生じた膜電位による受動的な Na^+ のとりこみにより細胞膜小胞内の塩濃度が増加し、浸透圧差により水が流入するためと説明された (Fig. 2b)。一価カチオンのチャンネルであるグラミジジンを加えると、光による体積の増加がさらに著しくなった。これはグラミジジンが Na^+ の流入を促進するためである。もし hR が Na^+ を菌体外にくみ出しているとする (Fig. 2a)、体積は光の照射により減少し、グラミジジンは体積の変化を阻害するはずであり、また Cl^- は Na^+ のくみ出しにより生じた膜電位により流出すると考えられ、実験結果に反する。

彼らは、以前の実験で光により細胞膜小胞内の Na^+

Fig. 2 細胞膜小胞における膜輸送のモデル

~~~~~ は光の吸収を示し, g はグラミシジンを示す. 詳細は本文参照

- (a) 光駆動の外向きの Na^+ ポンプ (hR ?) を持つと考えた場合
- (b) 光駆動の内向きの Cl^- ポンプ (hR) を持つと考えた場合
- (c) 微量の bR を含んでいると考えた場合

が外にくみ出されるという結果を得たのは¹²⁻¹⁴⁾, 用いた細胞膜小胞に微量の bR が含まれていたためであると考えて以下のように説明している (Fig. 2c). すなわち Fig. 1 に示したように, *H. halobium* の細胞膜には Na^+/H^+ antiporter が存在すると考えられるので^{17,18)}, 光を吸収した bR により小胞外にくみ出された H^+ は Na^+/H^+ antiporter を通って小胞内へ流入し, それと共役して Na^+ がくみ出される. このとき一つの H^+ の流入に対し複数の Na^+ が小胞外へくみ出されると仮定すると, 生じた膜電位によりさらに H^+ が流入する可能性がある. 実際に hR を含まず微量の bR だけを含む細胞膜小胞を調製し, それに光を照射すると, 外液の pH の上昇が観察されている⁹⁾. この結果は hR ではなく bR によっても光により外液の pH が上昇し得ることを示している⁹⁾.

以上のように hR は, 現在では Cl^- ポンプと見なされている. 実際 3 および 4 章で述べるように, hR の吸収スペクトルや光反応は, Na^+ ではなくて Cl^- により影響を受けるので, hR が Cl^- ポンプであると考えるとよく理解できる. しかし Fig. 1 に示したように, 細胞膜には様々な膜輸送の仕組みがあるので, hR が Cl^- ポンプであることを確認するには, 精製した hR と脂質からのみなる再構成膜小胞等を用いた実験が必要である.

hR により菌体内にくみこまれた Cl^- が, どのよう

な仕組みで菌体外に放出されるのかは今後研究されねばならない重要な課題である. それは炭酸や水の輸送等と共役している可能性もある. また hR の生理的な役割としては, Cl^- のくみこみにより生じた膜電位を利用して H^+ -ATPase を働かせ, その結果として ATP を合成するという機能のあることが報告されている^{11,19,20)}. また受動的な H^+ の流入には, H^+ -ATPase 以外にも Na^+/H^+ antiporter や flagellar motor が考えられている⁷⁾.

3 hR の吸収スペクトル

3-1 halo-opsin とレチナールによる hR の再構成

hR の作用スペクトルの極大 (580-600nm¹¹⁾ または 580-585nm¹⁴⁾ は, bR の作用スペクトルの極大より約 20nm 長波長側にある. そのため hR の吸収極大は bR よりも長波長側に位置していると予想された. このことを実証するために, hR のタンパク質部分 (halo-opsin) にオールトランスレチナールを加え, hR を再構成する実験が試みられた^{15,20)}. まず halo-opsin を得るために, hR だけを含んでいると考えられる変異株 ET-15 を用い, それより得た細胞膜小胞に NH_2OH を加え, その存在下で長時間光を照射し hR を退色させた¹⁵⁾. またレチナールの合成能を失ってはいるが halo-opsin を含んでいる変異株 (L-07) より得られる細胞膜小胞²⁰⁾ も用いられた. これらの標品にオールトランスレチナールを加え

ると、588nm 付近の吸収が増大し^{15,20)}、hR の活性も一部回復した¹⁵⁾。これらの再構成実験から、hR はオルトランスレチナールを発色団とし、吸収極大は 588nm にあると報告された^{15,20)}。この値は作用スペクトルの極大とはほぼ一致している。

ところがその後、bR も hR も含まないにもかかわらず走光性を示す変異株が分離され²¹⁾、その変異株中に sR が発見された⁹⁾。しかも sR の再構成実験から、その吸収極大は 589nm と測定され、前述の hR の吸収極大とほとんど同じ値が報告された⁹⁾。その後 hR の再構成実験に用いられた標品の中には、halo-opsin の他に slow-opsin も含まれていることが示されたので^{21,22)}、吸収極大の値を再検討する必要が生じた。

3-2 光反応による hR の吸収極大の検討

hR の吸収極大を検討するために、われわれが分離した、bR を含まず hR を含む変異株 Y₁ を用いた。Y₁ 株の細胞膜片をやや精製してから、それを低イオン強度の溶液で処理することによりばらばらにし、シヨ糖密度勾配遠心法により分画した²³⁾。得られた標品に NH₂OH を加え、その存在下で強い赤色光を照射すると、580nm 近付の吸収が減少し、410nm の近辺の吸収が増大した。ほぼ同一の吸収スペクトル変化は、NH₂OH を加えない場合にも観察された。赤色光による吸収の減少が最大になる波長は、吸収の増加が最大になる波長と 170nm も離れているので、前者を hR の吸収極大とみなした²³⁾。

次にこの方法を用いて hR の吸収極大の NaCl 依存性を調べた。NaCl が存在しない場合は 566nm に吸収極大があるが、NaCl を加えると 576nm まで移動した²³⁾。後者の値は、その後報告された sR のみを含んでいる変異株 (Flx 37) の膜片の吸収スペクトルと、hR と sR を共に含んでいる変異株 (L-33) の膜片の吸収スペクトルとの間の差より求められた hR の吸収極大の値、578nm (24) とほぼ一致している。光反応による吸収極大の見積りが正確だったのは、低イオン強度下では sR が不可逆的に変性し²⁵⁾、sR はこのような光反応を示さない²⁶⁾ ためと考えられる。

3-3 hR の吸収スペクトルの陰イオン、特に Cl⁻ と NO₃⁻ による変化

NaCl により hR の吸収極大が移動したので²³⁾、この移動が Na⁺ によるのか Cl⁻ によるのかを明らかにするため、各種の塩を加えて調べた。Table 1 に示すように、hR の吸収極大は Na⁺ によっては移動しないが、Cl⁻、Br⁻、I⁻ により移動を示した²⁷⁾。すでに 2 章で述べたように、hR は Cl⁻ ポンプであり、Cl⁻ も Br⁻ も菌体内

Table 1 種々の塩存在下での hR の吸収極大 ($\lambda_{\max}$) (文献 27) より改変)

Salt (1M)	$\lambda_{\max}$ (nm)
none	566 ± 2
LiCl	587 ± 2
NaCl	576 ± 1
KCl	578 ± 1
RbCl	578 ± 2
CsCl	575 ± 3
Tris-Cl	575 ± 2
NaF	566 ± 1
NaCl	576 ± 1
NaBr	582 ± 1
NaI	572 ± 0
NaNO ₃	570 ± 0
NaClO ₄	568 ± 1
CH ₃ COONa	564 ± 1
KCl	578 ± 1
KBr	583 ± 1
KI	576 ± 1
MgSO ₄	568 ± 2
*NaCl	570 ± 1
*NaBr	572 ± 1
*NaI	568 ± 2

* 0.2M

各試料の中には 10mM HEPES (pH 6.8)、2.8 mg/ml タンパク質が含まれている。

にくみこまれるといわれている⁸⁾。I⁻ は輸送されないといわれていたが⁸⁾、最近では輸送されると報告されている²⁸⁾。

最近我々の方法を含めて、いくつかの hR の精製法が開発され²⁹⁻³¹⁾、詳細な分光学的研究が行われるようになってきた。Steiner と Oesterhelt²⁹⁾ は、L-33 株の細胞膜をルブロールで溶解し、フェニルセファロースカラムとハイドロキシルアパタイトカラムを併用して、hR を精製した。Taylor ら³⁰⁾ は L-33 株の細胞膜をオクチルグルコシドで溶解し、オクチルセファロースカラムとハイドロキシルアパタイトカラムを併用して、hR を精製した。我々³¹⁾ は Y₁ 株の細胞膜を Triton X-100 により溶解し、硫酸分画とオクチルセファロースカラムにより hR を精製した。我々の方法は hR の含有量の低い変異株 (Y₁ 中の hR は L-33 の約 25%) にも適用可能である。この方法を改善し、さらに hR 含量の高い変異株 OD2⁹⁾ (L-33 の約 3 倍) を用いてよい結果を得ている (未発表の結果)。

Fig. 3 hR の吸収スペクトルに対する Cl^- の効果³¹⁾

カーブ 1 は精製された hR の吸収スペクトル。試料は 1M NaNO_3 , 10mM リン酸カリ緩衝液 (pH 6.8), 0.06mg/ml のタンパク質を含む。カーブ 2～9 はカーブ 1 で示した試料に 5M NaCl , 10mM リン酸カリ緩衝液 (pH 6.8) を順次加えた場合の吸収スペクトルで、体積変化を補正して記録されている。カーブ 2～9 の NaCl 濃度はそれぞれ 50, 100, 190, 410, 610, 790, 1120, 1390mM である。吸収スペクトルは 0°C で測定された。挿入図はカーブ 9 とカーブ 2 の差吸収スペクトルを示す。

Fig. 3 には精製した hR の吸収スペクトルの Cl^- 依存性が示されている。イオン強度を下げると hR が退色するので、試料には 1M の NaNO_3 が加えられている。試料に NaCl を加えると、膜片の場合と同様に吸収極大は 567nm から 576nm へ移動した。この際 557nm に等吸収点が存在しているので、 Cl^- の結合により hR が一つの状態 (吸収極大が 567nm) から他の状態 (吸収極大が 576nm) へ変化していることがわかる。hR の吸収スペクトルに影響を与える Cl^- の結合部位が一つ存在すると仮定して、600nm の吸収変化を調べると、 Cl^- の結合定数として 3.2M^{-1} が得られた³¹⁾。

一方 Na_2SO_4 存在下では、細胞膜小胞に NaCl を加えても、Fig. 3 のような吸収スペクトル変化は観察されないが、その代わりに 410nm 近辺の吸収の減少と 590nm 近辺の吸収の増加が観察された²⁶⁾。この結果から Schobert と Lanyi は hR の吸収極大は Cl^- によって移動しないと考えていた^{26,28)}。また、Taylor らは他の精製標品を用いて、 Cl^- により吸収極大が 564nm から 573nm まで移動することを報告しているが³⁰⁾、その差吸収スペクトルは Fig. 3 のそう入図とは一致していない。これらの不一致を考察するために、精製した hR についてさらに研究を行った。

精製した hR を NaNO_3 の代わりに Na_2SO_4 に対して透析すると、410nm 付近の吸収が増加した。細胞膜小胞で観察されたように²⁶⁾、pH を上げるとこの吸収はさらに増加し、567nm 近辺の吸収は減少した。中性付近で NaCl を加えると、Fig. 4 に示したように 410nm 付近の吸収が減少し、590nm 近辺の吸収が増大した ($-\bigcirc-\bigcirc-$)。この吸収スペクトル変化は、細胞膜小胞で得られた結果²⁶⁾と類似しているが、等吸収点が存在せず、吸収極大は Fig. 3 と同様に 567nm から 576nm まで移動した。 Na_2SO_4 中の hR について Cl^- による吸収極大の移動が観察されたのであるから、吸収極大は移動しないという Schobert と Lanyi^{26,28)} の考えは否定されたことになる。 NaCl の代わりに NaNO_3 を加えると、410nm 付近の吸収の減少とともに 567nm 付近の吸収が増加した ($-\blacktriangle-\blacktriangle-$)。この吸収スペクトル変化には 466nm に等吸収点が存在し、吸収極大は 567nm 以上には変化しなかった。さらにこの試料に NaCl を加えると、510nm 付近の吸収が減少し 600nm 付近の吸収が増加した ($-\triangle-\triangle-$)。そして NaNO_3 を加えた場合の吸収スペクトル変化と、さらに NaCl を加えた場合の吸収スペクトル変化の和 ($-\bullet-\bullet-$) は直接 NaCl を加えた場合の吸収スペクトル変化と一致した。また NaCl に

Fig. 4 一価アニオンによる hR の吸収スペクトル変化³²⁾

精製した hR を 0.3M Na_2SO_4 , 10mM リン酸カリ緩衝液 (pH 6.8) に対して透析し, NaCl または NaNO_3 を加えて吸収スペクトル変化を調べた。試料は 0.12mg/ml のタンパク質を含み, そのスペクトル変化は 0°C で測定された。

(—○—○—): 1.1M の NaCl を加えた。

(—▲—▲—): 1.1M の NaNO_3 を加えた。

(—△—△—): 1.1M の NaNO_3 を加えたものに, さらに 2.2M の NaCl を加えた。

(—●—●—): (—▲—▲—) と (—△—△—) とを加算した。

よる吸収極大の移動は NaNO_3 により阻害されることが判った³²⁾。これらの結果を 7-1 で考察する。

4 hR の光反応

4-1 hR の光反応

hR の光反応は, bR を欠落した変異株より得られた細胞膜小胞について, 閃光分解法や低温吸収スペクトル法を用いて研究された。その結果, いくつかの光反応中間体が報告された³³⁾。その後, 細胞膜小胞中に sR が含まれていることが判明し, 再検討が必要となった。sR の存在を考慮した最近の実験²⁸⁾によると, 存在の確認されている中間体は P500 (hR の光反応に伴う吸収スペクトル変化の極大が 500nm なので P-500 と名付けられた³³⁾。Schobert と Lanyi は P-500 の吸収極大を 520nm にあると計算して P-520²⁸⁾ と呼んでいる)のみであり, 他の光反応中間体は sR に由来する可能性があ

る。P-500 は閃光分解法により観察されたものであるが, 低温吸収スペクトル法によっても類似の吸収スペクトル変化を観察することができる (Fig. 5)²⁷⁾。また精製標品においても類似の吸収スペクトル変化が観察されている^{30,31)}。現在のところ P-500 の前後に光反応中間体の存在を確認した報告はない^{25,28)}が, phase-lifetime spectrophotometry により 500nm 近辺に吸収を持つ 2 種類の光反応中間体 (寿命は約 1msec と 11msec) の存在が報告されている。

3-2 で述べたように, 赤色光で光反応を起こさせるためには強い光を必要とする。また生じた光反応生成物の寿命も長いので (数時間) 通常の光反応中間体とは考えられない。この光反応は細胞膜小胞²⁶⁾や精製標品でも観察される^{30,31)}。ただし Steiner と Oesterhelt の精製標品の場合の寿命は, -6°C で約 76 秒と短く²⁹⁾、別の光反応中間体であると考えられる。Taylor らの精製標品の場合にも, 試料はオクチルグルコンドを含んでいるので³⁰⁾、寿命の違いは用いられた界面活性剤の違いではない。これらの光反応中間体の違いは今後検討する必要がある。

4-2 hR の光反応に対する Cl^- の効果

hR の光反応は, その吸収スペクトルと同様に, Cl^- の影響を受ける^{26,27)}。Fig. 5 に示したような -75°C での光反応を観察するには, Cl^- か Br^- か I^- が必要である²⁷⁾。これらのイオン種が存在しない場合には, 上記のものと異った光反応中間体 P-660 が生じ, その寿命は約 1.5msec であると報告されている²⁸⁾。

hR は Cl^- ポンプなので, その光反応の速さは Cl^- 濃度で大きく変化することが予想されるが, P-500 の寿命は Cl^- 濃度が増加してもやや長くなるのみで約 10msec である²⁸⁾。同様の結果は精製標品でも観察されている (未発表の結果)。これについては 7-2 で考察する。

5 hR の分子量

hR の分子量は, ^3H でラベルしたオールトランスレチナールを halo-opsin に結合させ, それを SDS-PAGE で展開させてそのゲル上での ^3H の位置から求められた。その結果 bR よりやや軽く, 25,000 と報告された³⁵⁾。しかしその後 sR が混在することが明らかになったので, その再検討が必要になった。そこで hR と sR の両方を含んでいる変異株 (OD2R) と sR のみを含んでいる変異株 (Flx 3R) を用いて同様の実験が行われ, 両者の比較から, hR の分子量は 25,000, また sR の分子量もおそらく 25,000 と報告された³⁶⁾。hR の精製

Fig. 5 低イオン強度下で部分的に精製した膜片中の hR の -75°C での光反応

(文献 27) より改変)

カーブ 1 は hR で、試料の中には 67% (v/v) グリセリン, 3.3mM HEPES (pH 6.8), 6.9mg/ml タンパク質を含む。カーブ 2~5 は 650nm の光をカーブ 1 の試料にそれぞれ 15, 65, 164, 465 秒照射して測定したときの吸収スペクトルの変化を示す。

標品について SDS-PAGE を行った場合、その分子量は bR よりやや軽いと報告されている²⁹⁻³¹⁾。Steiner と Oesterhelt の標品では、hR は SDS-PAGE 上で二つの近接したバンドとして観察されているが²⁹⁾、なぜ二つのバンドになるのか不明である。

6 hR の発色団としてのレチナール

halo-opsin を含んだ細胞膜小胞にオールトランスレチナールを加えると、hR の活性、すなわち光による受動的な H^+ の流入が部分的に回復した¹⁵⁾。しかしこの場合観測された吸収スペクトル変化の極大が 588nm なので、レチナールは主に slow-opsin に結合していると考えられる (3-1を参照)。またこの実験は常温で行われているので、実験操作中に熱異性化したレチナールのみが halo-opsin に結合している可能性もあるので、この実験からだけでは hR に結合しているレチナールがオールトランス型をしているとは結論できない。そこで低イオン強度下で部分的に精製した膜片からレチナールを抽出し、高速液体クロマトグラフィーで異性体組成を分析した。その結果、抽出されたレチナールは主にオールトランス型であった²³⁾。赤色光照射 (3-2 参照) により光反応生成物が生じるが、この光反応につれて、オールトランス型から 13-シス型へ変換することが観察さ

れた。これらの結果から、赤色光により安定な光反応生成物を生じる色素、すなわち hR は、主にオールトランス型を発色団とし、一方 410nm 付近に吸収を持つ光反応生成物は、13-シス型を発色団としていることがわかった²³⁾。また NaCl の有無で吸収極大は異なるが、異性体組成は変化しないこともわかった²⁷⁾。これらの結果は精製標品でも確かめられている (未発表の結果)。

精製標品の共鳴ラマン散乱の実験から、hR の発色団レチナールはプロトン化したシッフ塩基であり、 Cl^- がプロトン化シッフ塩基に影響を与えることが示された³⁷⁾。

7 hR による Cl^- 輸送のしくみ

7-1 hR の Cl^- の結合部位

hR が Cl^- ポンプであることから、hR にはいくつかの Cl^- の結合部位が存在すると予想される。 Cl^- による吸収極大の移動^{27,30,31)} や吸収スペクトル変化 (Fig. 3)³¹⁾ (これらを Cl^- 効果と呼ぶ) から、hR の吸収スペクトルに影響を及ぼす Cl^- の結合部位は一つであると考えられているが³¹⁾、それだけでは NaNO_3 による吸収スペクトル変化 (Fig. 4) を説明することはできない。そこで Fig. 6 に示すように、hR にはその吸収スペクトルに影響を与える Cl^- の結合部位 (○で表示) と与えない結合部位 (□で表示) が存在すると考えた。

図の○は Cl^- に特異的な結合部位 (Cl^- 結合部位) で、 NO_3^- や SO_4^{2-} は結合できない。この部位に Cl^- が結合すると (●で表示)、吸収極大が 567nm 付近から 576nm 付近まで移動する (II→III) ので、 Cl^- 結合部位 (○と●) はプロトン化シッフ塩基 (NH^+ で表示) の近くに位置していると考えられる。○の部位への Cl^- の結合は、□を経由する。□の部位には Cl^- の他に NO_3^- も結合できる (それぞれ ■と/// で表示) のでアニオン結合部位と呼ぶ。□の部位に Cl^- や NO_3^- が結合している (e) (f) と、それらのいずれもが結合していない (d) とは、同一の吸収スペクトルを持つと考える (III で表示)。この関係は Cl^- 結合部位に Cl^- が結合していない場合 (○の場合、II で表示) にもあてはまる。アニオン結合部位への Cl^- の結合が吸収スペクトルに影響を与えないため、この部位はプロトン化シッフ塩基から離れたところに位置していなければならない。(a) の 410nm 付近に吸収を持つ分子種 (吸収スペクトルを I で表示) では、シッフ塩基が脱プロトン化していると考えている (N で表示)。pH の上昇により 410nm の吸収が増加することから妥当であると考えられる。

Fig. 6 のモデルに基づいて、我々は Na_2SO_4 存在下

Fig. 6 hR の Cl^- の結合部位と吸収スペクトルの関係を示すモデル

○は Cl^- 結合部位を示し、□はアニオン結合部位を示す。NH⁺ と N はレチナールがタンパク質部分に結合しているシッフ塩基のプロトン化型と非プロトン化型をそれぞれ示している。破線で囲んだ分子種はほとんど同じ吸収スペクトルを持つと考える。詳細は本文参照。

での hR の Cl^- や NO_3^- による吸収スペクトル変化 (Fig. 4) を以下のように説明する。中性付近で NO_3^- と Cl^- の両方が共に存在していない場合には、hR は (a) と (b) との平衡状態にある。この状態に Cl^- を加えると、順次 (c) (d) (e) の分子種を生じ、それらの平衡状態になる。吸収スペクトルの変化としては、I → II の変化と II → III の変化が同時に進行するため等吸収点は観察されない。 Cl^- の代わりに NO_3^- を加えた場合には、(g) の分子種が生じ、(a) の分子種はほとんどなくなる。吸収スペクトルの変化としては I → II の変化のみが観察されるため等吸収点が存在し、吸収極大の吸光度は増大するが吸収極大波長はほとんど移動しない。そこへ Cl^- を加えると、(c) (d) (e) (f) の分子種が生じる。吸収スペクトル変化としては II → III の変化のみが観察されるため等吸収点が存在し、吸収極大が移動する。また NO_3^- がアニオン結合部位 (□) に結合している場合には、 Cl^- の Cl^- 結合部位 (○) への結合が阻害され、結果として吸収極大の移動が阻害される。

7-2 hR の光反応と Cl^- 輸送のモデル

我々は吸収スペクトルに影響を与える部位 (Cl^- 結合部位) に結合している Cl^- が、光反応に伴い輸送されると考えている。その理由の一つは、hR の吸収極大の 576nm への移動をひきおこすイオン種 (Cl^- , Br^- , I^-) だけが輸送される^{8,28)} (3-3 参照) からである。さらに

Fig. 7 hR の Cl^- による吸収スペクトル変化と光反応による吸収スペクトル変化の比較

- (●-●-●): 精製した hR の Cl^- による吸収スペクトル変化 (Fig 3 より改変)。
- (○-○-○): 精製した hR の -75°C での光反応に伴う吸収スペクトル変化の逆をとったもの (31 より改変)。
- (△-△-△): 細胞膜小胞の中の hR の光反応に伴う吸収スペクトル変化の逆をとったもの (9 より改変)。

hR の P 520²⁶⁾ への光反応に伴う吸収スペクトル変化 (P-500³³⁾), あるいは -75°C での赤色光による吸収スペクトル変化 (Fig. 5)^{27,31)} が、Fig. 3 の挿入図の Cl^- による吸収スペクトル変化とかなりよく類似している³¹⁾ (Fig. 7) こともあげられる。因みに -75°C での吸収スペクトル変化は、 Cl^- , Br^- , I^- のいずれかが存在する場合のみ観察された (4-2 参照)。

hR が光を吸収することにより、結合している Cl^- が菌体内に放出されると仮定し、Fig. 6 の Cl^- の二つの結合部位 (Cl^- 結合部位○とアニオン結合部位□) を考慮して、hR の光反応と Cl^- 輸送の関係を Fig. 8 のモデルで表した。このモデルでは光反応サイクルは $\text{hR} \xrightarrow{h\nu} \text{State 1} \rightarrow \text{State 2} \rightarrow \text{hR}$ と進む。hR が光を吸収すると、 Cl^- 結合部位に結合している Cl^- が菌体内に放出され State 1 を生じる。次にアニオン結合部位に結合していた Cl^- が Cl^- を結合していない Cl^- 結合部位に転移し、吸収スペクトルが回復し、State 2 になる。空になったアニオン結合部位に菌体外の Cl^- がとりこまれ、hR に戻る。hR と State 2 の吸収スペクトルが同

他の Cl^- の輸送体との比較も行われている。

文 献

- 1) D. Oesterheld, W. Stoerkenius: *Nature New Biol.*, **233**, 149 (1971)
- 2) W. Stoerkenius, R. A. Bogomolni: *Annu. Rev. Biochem.*, **52**, 587 (1982)
- 3) *Methods in Enzymology*, Vol. **88** (1982)
- 4) 前田章夫: *科学* **52**, 793 (1982)
- 5) 徳永史生, 岩佐達郎: *膜* **9**, 73 (1984)
- 6) J. K. Lanyi: *Biochim. Biophys. Acta*, **559**, 377 (1979)
- 7) Y. Mukohata, Y. Kaji: *Arch. Biochem. Biophys.*, **206**, 72 (1981)
- 8) B. Schobert, J. K. Lanyi: *J. Biol. Chem.*, **257**, 10306 (1982)
- 9) R. A. Bogomolni, J. L. Spudich: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 6250 (1982)
- 10) W. Stoerkenius, R. H. Lozier, R. A. Bogomolni: *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 215 (1979)
- 11) A. Matsuno-Yagi, Y. Mukohata: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **78**, 237 (1977)
- 12) E. V. Lindley, R. E. MacDonald: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **88**, 491 (1979)
- 13) R. E. MacDonald, R. V. Green, R. D. Clark, E. V. Lindley: *J. Biol. Chem.*, **254**, 11831 (1979)
- 14) R. V. Greene, J. K. Lanyi: *J. Biol. Chem.*, **254**, 10986 (1979)
- 15) J. K. Lanyi, H. J. Weber: *J. Biol. Chem.*, **255**, 243 (1980)
- 16) 向畑恭男: *蛋白質・核酸・酵素* **27**, 1144 (1982)
- 17) J. K. Lanyi, R. E. MacDonald: *Biochemistry*, **15**, 4608 (1976)
- 18) J. K. Lanyi, M. P. Silverman: *J. Biol. Chem.*, **254**, 4750 (1979)
- 19) A. Matsuno-Yagi, Y. Mukohata: *Arch. Biochem. Biophys.*, **199**, 297 (1980)
- 20) G. Wagner, D. Oesterheld, G. Krippahl, J. K. Lanyi: *FEBS lett.*, **131**, 341 (1981)
- 21) E. N. Spudich, J. L. Spudich: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **79**, 4308 (1982)
- 22) M. Tsuda, N. Hazemoto, M. Koddo, N. Kamo, Y. Kobatake, Y. Terayama: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **108**, 970 (1982)
- 23) T. Ogurusu, A. Maeda, N. Sasaki, T. Yoshizawa: *J. Biochem.*, **90**, 1267 (1981)
- 24) J. L. Spudich, R. A. Bogomolni: *Biophys. J.*, **43**, 243 (1983)
- 25) N. Hazemoto, N. Kamo, Y. Terayama, Y. Kobatake, M. Tsuda: *Biophys. J.*, **44**, 59 (1983)
- 26) J. K. Lanyi, B. Schobert: *Biochemistry*, **22**, 2763 (1983)
- 27) T. Ogurusu, A. Maeda, N. Sasaki, T. Yoshizawa: *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 446 (1982)

Fig. 8 hR の光反応と Cl^- 輸送のモデル

○や□は Fig. 6 と同じであり。~~~~~は光の吸収を表す。詳細は本文参照

じであると考え、吸収スペクトル変化は State 2 までで完結し、光反応に要する時間が、 Cl^- 濃度によりあまり変化しないことも説明できる (4-2 参照)。

State 1 は Cl^- の非結合型の hR の吸収スペクトル (Fig. 3) に類似していると予想されるが、これが光反応中間体である P-500 と同じものであるか、それとも P-500 とは別の光反応中間体であるのか、また Cl^- の放出には、レチナールの異性化やシッフ塩基の脱プロトン化等がどのように関与しているか等は、今後調べなければならない研究課題である。

なお細胞膜小胞を用いた実験結果から他のモデルも考えられているが²⁸⁾、 Cl^- による吸収スペクトル変化が考えられていないので、このモデルで光反応と Cl^- ポンプ機構との関連が説明されているとは思えない。しかしこのモデルでは Cl^- が結合していない hR が光を吸収して Cl^- を吸着すると考えられているので、この可能性を検討する必要があると考えている。

8 おわりに

hR 研究の歴史は浅く、現状では光反応等の基礎的な研究さえもまだ十分行われていない。しかし hR には可視部に吸収があるので、この利点をいかし、精製が行われ、 Cl^- の結合部位の研究が開始された。今後このような研究が進めば、その結果は他の生物の Cl^- の輸送機構の解明に役立つと期待される。すでにアニオン輸送の阻害剤の hR に対する効果が研究されはじめており²⁸⁾、

- 28) B. Schobert, J. K. Lanyi, E. J. Jr. Gragoe: *J. Biol. Chem.*, **258**, 15158 (1983)
  - 29) M. Steiner, D. Oesterhelt: *EMBO J.*, **2**, 1379 (1983)
  - 30) M. E. Taylor, R. A. Bogomolni, H. J. Weber: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **80**, 6172 (1983)
  - 31) T. Ogurusu, A. Maeda, T. Yoshizawa: *J. Biochem.*, **95**, 1073 (1984)
  - 32) T. Ogurusu, A. Maeda, K. Tao, T. Yoshizawa: in preparation
  - 33) H. J. Weber, R. A. Bogomolni: *Photochem. Photobiol.*, **33**, 601 (1981)
  - 34) J. Krupinski, J. L. Spudich, G. G. Hammes: *J. Biol. Chem.*, **258**, 7964 (1983)
  - 35) J. K. Lanyi, D. Oesterhelt: *J. Biol. Chem.*, **257**, 2674 (1982)
  - 36) E. N. Spudich, R. A. Bogomolni, J. L. Spudich: *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **112**, 332 (1983)
  - 37) 前田章夫, 小栗栖太郎, 吉澤 透, 北川禎三: 日本生物物理学会第21回年会講演予稿集 (IF 1330) (1983)
-

最新の膜処理技術とその応用

西村正人（大工研） 清水 博（東大・薬） 監修

1984年，A 4 版，1100ページ，定価68,000円，フジテクノシステム，東京

近年の膜処理技術の発展はめざましく，急速にその応用範囲が拡大している．機能性高分子材料の研究開発とあいまって新展開が期待される．

本書の特長は，技術資料集ということで，主に企業の第一線の研究者約 100 名が，膜物性，装置仕様，実用用途，運転成績を中心に膜処理技術を詳述していることである．本書でとりあげている膜は，精密ろ過膜，限外ろ過膜，逆浸透膜，拡散透析膜，イオン交換膜，ガス分離膜などである．

本書は次の五編からなっている．第一編 総論，第二編 膜処理装置，第三編 膜処理の応用，第四編 未来技術，第五編 資料編である．第一編は，全ての膜処理技術の要約といえる．第一章の膜処理技術発展の歴史年表は興味深い．第二編は，図表および写真をふんだんにもり込んで，使用する膜や膜処理装置の製品の現状を網羅してあり，非常に明解である．また，膜処理ポンプと

その選定についての章もおかれている．第三編は膜処理応用を12の応用分野に分け解説している．解説は設計法，実績についても言及している．超純度への挑戦（2章），排水の再利用による節水（5章），薬品の製造，精製，濃縮の効率化（7章），微量物質測定の迅速化，精密化（10章），かくれた用途（12章）など貴重な情報も豊富である．第四編では，第二編でとりあげた膜や装置の進歩の方向と未来展望を具体的に述べている．生体膜機能の人工化，光合成への応用，エネルギー変換への応用など魅力的な内容となっている．第五編では，膜および膜装置関連メーカーの製品一覧表などが紹介され，ユーザーの便宜をはかっている．

以上のように，本書はいわば“膜便覧の最新版”であり，機能性高分子膜の開発状況と応用面の現状をわかりやすく解説している．また，膜技術の進歩の方向をも見渡すにも有益な書である．（東京大学工学部 古崎新太郎）