総説

J. Jpn. Soc. Colour Mater., 78 [9], 431-434 (2005)

光機能性色素タンパク質, バクテリオロドプシン

小山行一*

1. はじめに

生物が生命を維持するための機能は、大部分タンパク質とその集合体が担っている。20種類のアミノ酸を基本分子として構成されるタンパク質は、その配列によって多様な化学構造を作ることができ、その多様性がさまざまな機能を創出する。タンパク質の優れた点は、それぞれの分子が独立した機能を有し、きわめて効率的な分子機械であることである。このような分子機械としてのタンパク質の集積度は、現代の半導体微細加工技術の集積度に比べて 10^3 倍以上とされている。

このようなタンパク質の優れた機能を利用する研究は1980年代より始まった。いくつかの生体分子が分子素子の材料として検討されているが、中でも高度好塩菌が産生する感光性のタンパク質、バクテリオロドプシン (BR) が採取の容易さ、光や熱に対する安定性といった観点でとりわけ大きな関心を集めている。ここでは生命科学与工学の接点という観点から、生物材料であるBRの機能をデバイスの側面からアプローチする。

2. バクテリオロドプシン (BR) の構造と機能

1970年頃、Oesterholt と Stoeckenius は高度好塩菌という古細菌からバクテリオロドプシン (BR) という感光性のタンパク質を発見した¹⁾。高度好塩菌は4 M という高濃度の食塩水の中で好んで生息し、細胞膜にパッチ状の紫膜 (purple membrane) を産生する。紫膜は、平均直径0.5~1 μm 厚さ50 Å程度の膜断片として、破碎された菌からショ糖密度勾配遠心などの容易な手段で、ほぼ純品の形で手に入れることができる。

高度好塩菌のユニークな点は、図-1に示すように、エネルギー変換システムを2種類もっていることである。通常は酸素呼吸によってATPを産生するのであるが、環境の変化によって酸素濃度が低くなると、細胞膜上に紫膜が生成して光合成を始める。この光合成も通常の植物に見られるような複雑なシステムではなく、BRが単独で行っている。したがって、BRはこの細菌にとって、非常電源のような位置づけと考えられる。

Henderson らのX線解析結果によると、BRは紫膜中で図-2のように、BR 1分子が3個集合した3量体を作り、それが六方

格子状に二次元結晶構造をとっている^{2,3)}。この六方格子の格子間隔が6.2 nmであることを考慮すると、BR 1分子は長径約3 nm、短径約2 nm、厚さ約4 nm程度の楕円形と考えてよい。さらに遺伝子解析と電子線回折の結果から、BRは分子量約26,000の248個アミノ酸残基からなり、視物質ロドプシン同様レチナールという光をとらえる分子がシッフ塩基結合して、7本の膜貫通 α -ヘリックス構造 (ヘリックス1本の長さ、約4 nmで1 nm間隔で7本) を有することがわかった。

図-1 高度好塩菌の模式図

図-2 BRの二次元配列の模式図

〔氏名〕 こやま こういち
〔現職〕 桐蔭横浜大学医工学部
生命・環境システム工学科 教授
〔趣味〕 スポーツ観戦、音楽鑑賞
〔経歴〕 北海道大学大学院薬学研究科修了、
富士写真フイルム(株)足柄研究所主
任研究員、北海道大学客員教授、
2003年より現職。

平成17.6.28受理

Light-Sensitive Colored Protein, Bacteriorhodopsin
Koichi KOYAMA

*桐蔭横浜大学 医工学部 生命・環境システム工学科
神奈川県横浜市青葉区鉄町1614 (〒225-8502)

BR は通常 568 nm に極大吸収をもち、基底状態でレチナールは全トランス型の構造をとっていて、光照射により、全トランスから 13-シスへと異性化する。その後、BR は構造変化をとまないうちに、いくつかの過渡的に安定な中間体を形成するが、この中間体は、レチナールとタンパク質との相互作用により、その色相は大きく変化する。最終段階で 13-シス体は全トランス体に再異性化し、全行程 10 ms 程度の時間で最初の状態に戻る。この行程を BR の光反応サイクルと呼ぶ(図-3)。このサイクル中に、細胞内のプロトンが能動的に細胞外に汲み出され、細胞の内外でプロトンの濃度勾配を生じる。高度好塩菌は、この濃度勾配を利用して ATP を合成しエネルギーを獲得している。このように BR は単独でプロトンの濃度勾配を作ることができることから、一種の“分子機械”と位置づけられている。

BR のプロトン輸送の機構は、分光学的研究⁴⁾と電気化学的研究⁵⁾から、現在では以下のように結論づけられている(図-4)。光照射によってタンパク質に結合しているレチナールが異性化(光反応サイクル(図-3)の BR → K に対応)する。ついで、①シッフ塩基の pKa が下がり、シッフ塩基上のプロトンが Asp-85 (N-末端から数えて 85 番目、以下同じ)に移動する(K → L)。それと同時に②細胞外側に位置する Glu-204 の pKa が変化し、Glu-204 のプロトンが細胞外側に放出される(L → M)。ついで③細胞内側に存在する Asp-96 の pKa が下がり、そのプロトンがシッフ塩基に移動し(M → N)、④細胞内側からプロトン

が Asp-96 へ供給される(N → O)。最終段階で⑤ Asp-85 のプロトンが Glu-204 へ移動し、同時にレチナールの再異性化が起こって出発段階に戻る(O → BR)。このように BR は約 10 ms の間に、約 4 nm 離れたタンパク質の中を 5 回のプロトン移動を経て細胞内側のプロトンを外側に輸送する。このようなダイナミックなプロトン輸送の原動力は、タンパク質の構造変化がタンパク質内部の疎水環境に影響を与え、これがシッフ塩基や側鎖カルボキシル基の pKa 変化の引き金となるためと考えられている。

この反応プロセスは動物の視物質ロドプシンとよく似ているが、視物質の場合は、1 回の光吸収で最終的にレチナールとタンパク質部分が分離して退色してしまう。ところが BR の場合、すでに述べたように反応が循環するため、何度でも光反応を行うことができる。この安定性(紫膜の状態では 140°C まで熱に対して安定というデータがある⁶⁾)が BR を工学的な材料として魅力あるものになっている大きな理由である。

3. BR の工学的応用研究

BR の機能を工学的に利用しようとする研究は、タンパク質発見後すぐ始まった。当初はリポソームに組み込んだり、溶液セルの隔膜に吸着させて黒膜(BLM)として用い、光電応答測定に供された⁷⁾。また Racker らは、BR とウシの心筋から得た ATP 合成酵素をリポソームに組み込み、これに光照射することで、ATP が産生することを実験的に明らかにし、当時まだ仮説にすぎなかった“化学浸透圧説”を実証する研究も生まれた⁸⁾。

その後 BR のデバイス開発を目的とする研究は、光電応答と光反応サイクルに基づくフォトクロミックな効果を利用したものや BR におけるプロトン移動に基づく光電応答を取り出すものの 2 種類に大別されていく。

3.1 フォトクロミズムの利用

図-3 に示すように、BR は光励起後、色相の異なるいくつかの中間体を経て元の状態に戻る。BR の基底状態と各中間体との吸収スペクトル差を利用するいくつかの試みがある。

この現象を工学的に利用できると考えたのは旧ソ連の Ovchinnikov で、彼は潤沢な軍事予算を背景に「ロドプシン」プロジェクトを組織し、バイオエレクトロニクス研究を極秘裏に推進したが、彼自身の死とソ連崩壊によりプロジェクトは途中で頓挫した。プロジェクトの中身は、その後、アメリカへ移った研究者などから部分的に明らかにされつつある。そのプロジェクトの一つが BR の薄膜を使った「バイオクロム」と呼ばれるフィルムで、彼らはこのフィルムが優れたホログラム特性を有することを最初に見いだした。このあたりの顛末については、当時プロジェクトの一員だった Vsevolodov による成書⁹⁾が興味深い。

Birge は BR 状態と K 中間体の間のスイッチングによるランダムアクセスメモリーを試作した¹⁰⁾。基板に BR の LB 膜を累積した素子に、液体窒素温度で緑色レーザーを照射すると、照射された部分のみが K 中間体(590 nm)で止まる。これを赤色レーザー光で読みとると、K 中間体部分のみ透過率が異なるので、書き込み情報が読みとられる。書き込まれた情報は読みとりと同時に消去される。この方法はピコ秒レベルのアクセスタイムが原理

図-3 BR の光反応サイクル(化学構造式は上が全トランス、下が 13-シスレチナールをあらわす。添字は各中間体の極大吸収波長をあらわす)

図-4 BR 内部のプロトン輸送経路

的に可能であるが、実際はレーザービームのスキャン速度に依存し、ナノ秒程度となっている。また、K 中間体で止める必要があるため、液体窒素温度での駆動という制限もある。同様に M 中間体とのフォトクロミズムの利用も可能である。図-5 に BR と M 中間体のスペクトルを示す。

ドイツの Hampp らは BR の 96 番目のアスパラギン酸をアスパラギンに置き換えた変異体が天然の BR に比べて M 状態の寿命が数千倍延びることを見だし、この変異タンパクを用いて、実時間ホログラフィーを開発した。M 中間体の寿命が長くなると、光照射された部分の濃度変化が大きくなり、干渉縞のコントラストが増加し、回折効率が向上する。このシステムは、図-6 に示すように、BR 状態と M 状態を 2 本のレーザーを用いて記録と消去を繰り返すことでホログラムを記録できる^{11,12)}。応用例としては、スピーカーの振動測定や屈折率変化の様子など、実時間で変化する現象の記録に有用であると同時に、マッチトフィルトリングによるパターン認識が可能で、指紋照合などの利用が考えられる。

これらの発展技術として Birge は将来のコンピュータに利用可能な三次元メモリを提案している¹³⁾。BR の光サイクルにおいて、O 中間体に赤色光を照射すると P 状態を経てきわめて安定な Q 中間体へ緩和し、Q 状態に青色光を照射すると元の BR に戻るバイパスが知られている (図-7)。彼らは BR を含むポリアクリルアミドゲルで立方体の素子を作った。この素子は図-8 に示すように動作する。素子の一つの面に緑色のレーザーで書き込む (ページング) とその面内の BR が励起する。約 2 ms 後、O 中間体の量が最大になる頃、この面と直交する方向から赤色のレーザーを照射 (緑色光で励起された面のみ) すると、緑色光で書き込まれた部分のみ安定な Q 中間体を生成する。BR 状態をバイ

図-5 BR (実線) と M 中間体 (破線) のスペクトル比較

図-6 BR 薄膜とフーリエ変換レンズを用いた実時間パターン認識のための光学系 (文献 12) より一部改変)

ナリー値の「0」、Q 状態を「1」とすれば半導体メモリに代わるバイナリスイッチとなりうる。読み出しは緑色光を読み出すべき面に照射し、やはり 2 ms 後に、非常に強度を弱くした赤色光を照射する。Q 状態にある部分は赤色光を透過するので、赤色光に対向して置かれた検出器 (CCD) で「0」と「1」を検出できる。また、書き込まれたデータは青色光照射で全消去が可能である。一般に二次元のメモリでは蓄積容量は約 1 億 bit/cm² が限界とされるが、三次元メモリでは理屈の上では約 1 兆 bit/cm³ も可能となる。ただこのシステムにしても、そのまま実用に供される段階ではなく、いくつかの解決すべき課題を抱えている。その中でも最大の課題は、O 中間体の比率をいかに増大させるかで、種々の添加物や変異体の検討がなされている。

3.2 プロトン移動に基づく光電効果の利用

われわれは透明の電極基板 (SnO₂) 上に BR の薄膜を作製し、この薄膜と金属の対極との間に電解質溶液を挿入した、いわゆる湿式の電気化学セルを構築した (図-9)。

このセルに光を照射すると、その電流応答は入射光量に対してそのまま追従せず、ON/OFF の光信号に対して一過性の応答が得られた (図-9 右)¹⁴⁾。また光量に対する応答強度は 3 桁以上にわたって良好な直線性を保っており、光センサーとしても優れた特性をもっている。われわれはこの応答特性が、網膜内の神経節

図-7 バイパスをもつ BR の光反応サイクル

図-8 三次元メモリデバイス¹³⁾

図-9 左はBRを固定化した電気化学セル 1: SnO₂透明電極 2: BR 薄膜(紫膜) 3: 電解質水溶液 4: 電流電圧変換回路 5: オシロスコープ, 右は電気化学セルからの光電応答パターン

図-10 動画検出の実験例: ビデオカメラから液晶プロジェクターを通して光センサーに入射した、動く掌の様子をLEDパネルに表示させたもの(右)で、手の動きを止めるとパネル上の像は消滅する(左)。

Y細胞と類似の特性をもつことに気がついた。そこで、256画素の視覚センサーを作製し、視覚情報処理の基本ともいえる輪郭強調や動画抽出のシミュレーションを行った^{15,16)}。

まず、ガラス基板上に256画素(1.3mm 正方ピクセル)のITO(酸化インジウム・スズ)電極をパターンニングし、この基板にBR 薄膜を被覆し高分子電解質層と対極でサンドイッチしてエアセンサーを作製した。個々のピクセルは電氣的に独立に配線された並列回路となっていて、ピクセルで生じた微小な光電流は電圧に変換された後、増幅され、表示用の発光ダイオード(LED)に出力されるように設計した。

次にこのセンサーを用いた視覚機能のシミュレーションを一例だけ示す。図-10にCCDカメラでとった掌の映像を液晶プロジェクターを通して256画素のセンサーに入射した様子を示した。

図-10左の写真はカメラの前で手を静止した状態を示し、映像はセンサーには入射しているが、ディスプレイ上には表示されていない。一方、図-10右の写真は手を動かしている状態で、動画と輪郭像を同時に検出している様子がはっきりとわかる。このように本BR光センサーは、網膜内の神経節Y細胞の動画抽出機能および輪郭強調機能をほぼ模倣したと結論づけられる。

今日ではCCDのような固体素子で二次元画像を扱うイメージセンサーが広く普及している。しかしながらこのような画像処理(輪郭強調、特徴抽出など)を実時間で実施しようとすると必ずしも容易ではない。ところが、高等動物の視覚系は連続画像の実時間処理を確実にやっている。この違いは、固体素子が二次元の画像を一次元の時系列信号として処理するのに対し、生物の視覚系は二次元画像の並列同時処理を行っているためである。これまで述べてきたような微分信号は、CCDからの画像を微分演算回路を通すことによって基本的には取り出すことが可能である。しかしながら、このような素子を人工網膜として眼の中に移植する場合、大がかりな微分回路を必要とせずに材料自体で実時間応

答がとれることは素子のコンパクト化という観点でも重要である。

視物質ロドプシンとバクテリオロドプシンとは同じレチナールを発色団にもつタンパク質で、その化学構造や光反応挙動に類似点が多いにもかかわらず、その本来の機能はまったく異なる。大雑把に言えば前者は高度の視覚情報処理機能を備えた高感度光センサーとするなら後者はミニ太陽電池にたとえることができる。にもかかわらずバクテリオロドプシン薄膜の光電応答が部分的にしろ視覚機能に特徴的なパターンを示したことは大変興味深い。

4. おわりに

太陽光は生命体のエネルギーの根元であるばかりでなく、動物にとっては外界から情報を得るための媒体でもある(視覚)。このように光を介して、生物におけるエネルギー獲得システムと視覚の両方に接点をもつBRは、単にエネルギー変換装置としての色素タンパク質だけではなく、工学的にも大いに魅力のある材料として位置づけられている。先端技術の世界では、固体材料の微細加工から発展したエレクトロニクスが限界に近づきつつあることから、生物分子に学ぶとする分子素子、バイオ素子がとりざたされ、最近では、バイオナノテクという言葉までが一般化してきた。

このような状況の中で、BRを含む素子の立方体が1テラ(兆)バイトものメモリーを有するとなると、近年のタンパク質工学、およびその他の学問分野の発展で、生物材料を部品として使われる素子が登場することも夢ではないかもしれない。

文 献

- 1) D. Oesterhelt and W. Stoeckenius: *Nature New Biol.*, **233**, 149-152(1971).
- 2) R. Henderson and P. N. T. Unwin: *Nature*, **257**, 28-32(1975).
- 3) R. Henderson J. M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckman and K. H. Downing: *J. Mol. Biol.*, **213**, 899-929(1990).
- 4) J. K. Lanyi: *J. Biol. Chem.*, **272**, 31209-31212(1997).
- 5) K. Koyama, T. Miyasaka, R. Needleman and J. K. Lanyi: *Photochem. Photobiol.*, **68**, 400-406(1998).
- 6) Y. Shen, C. R. Safinya, K. S. Liang, A. F. Ruppert and K. J. Rothschild: *Nature*, **366**, 48-50(1993).
- 7) H. -W. Trissl: *Photochem. Photobiol.*, **51**, 793-818(1990).
- 8) K. Racker and W. Stoeckenius: *J. Biol. Chem.*, **249**, 662-663(1974).
- 9) N. Vsevolodov: "Biomolecular electronics," Birkhäuser(1998).
- 10) R. R. Birge: *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **41**, 683-733(1990).
- 11) N. Hampp, D. Bräuchle and D. Oesterhelt: *Biophys. J.*, **58**, 83-93(1990).
- 12) C. Bräuchle, N. Hampp and D. Oesterhelt: *Adv. Mater.*, **3**, 420-428(1991).
- 13) R. R. Birge, N. B. Gillespie, E. W. Izaguirre, A. Kusnetzow, A. F. Lawrence, D. Singh, W. Song, E. Schmidt, J. A. Stuart, S. Seetharaman and K. J. Wise: *J. Phys. Chem B*, **103**, 10746-10766(1999).
- 14) T. Miyasaka, K. Koyama and I. Itoh: *Science*, **255**, 342-344(1992).
- 15) T. Miyasaka and K. Koyama: *Appl. Opt.*, **32**, 6371-6379(1993).
- 16) 小山行一: 現代化学, 7月号, 24-31(1995).