

ロドプシンの光反応ダイナミクス

神取秀樹

(京都大学大学院理学研究科、生物物理学教室)

蛋白質の示す物性は、
物性物理としてもきわめて興味ある対象である。
それは、適度にかたく、適度にやわらかいこの高分子が、
「機能」という高度な仕事を演じるからであろう。

あまりにも複雑な対象である「蛋白質の物性」は、
これまで十分な解析の対象とはならなかったが、
最近の研究によって新たな展開が見られようとしている。

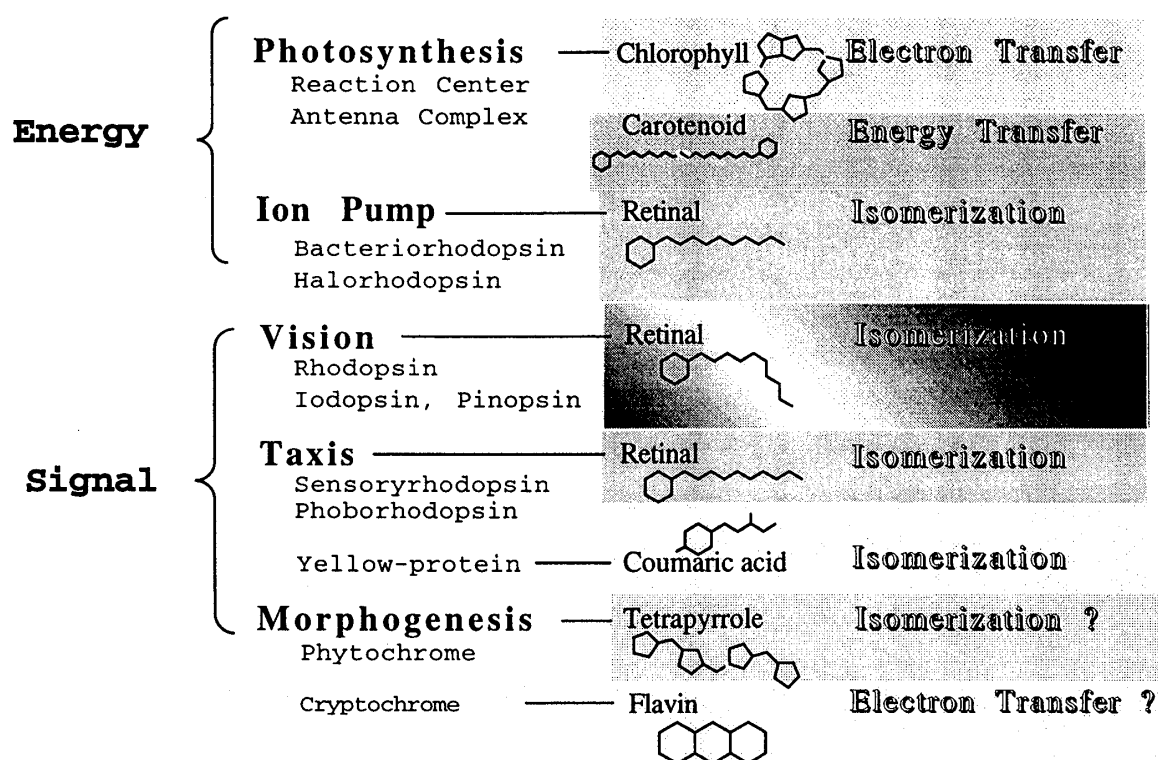
本ゼミでは、
光を使って仕事を行うロドプシンを対象として、
そのような研究の最前線を紹介する。

【要旨】

我々は目の中の光センサー蛋白質（ロドプシン類）を使ってものを見る。それでは、光の情報
報はどのようにして、視覚情報へと変換されるのであろうか？

光はロドプシンに含まれる発色団分子（レチナール）によって捉えられ、この分子に構造変
化をもたらす。それが蛋白質全体の変化へとつながり、細胞内増幅過程を経て、神経細胞の電
気信号に変換された情報は、脳に至って視覚となる。 10^{-15} 秒で光の吸収が起こってから 10^{-1} 秒
程度で視覚が発生するまでの過程において、約12桁の時間のあいだ、光の情報はロドプシン
内部に保たれることになる。フェムト秒、ピコ秒、ナノ秒、マイクロ秒、ミリ秒というそれぞ
れの時間で起こる出来事が、これまでの詳細な研究によって明らかになりつつある。

本講義においては、光の情報が時間的な階層構造の中で、どのように蛋白質の中を伝達され
るのか、最新のデータを含めて紹介する。特に、フェムト秒のオーダーで起こる初期異性化反
応を中心に捉え、ダイナミクスはどのように研究されてきたのか、なぜそんなに速いのか、蛋
白質という反応の場はどんな役割を担っているのか、といった点について解説する。蛋白質と
いう反応場は 10^{15} （ペタ）秒のオーダーで起こる進化によって最適化されたものであり、ペタ
秒の時間をかけて起こったことが、フェムト秒のダイナミクスを決定した可能性がある。



光受容蛋白質は光をエネルギーまたは情報へと変換する。光を受容するために、発色団と呼ばれる小分子が蛋白質内部に存在し、光エネルギーを効率よく利用することが知られている。ロドプシン類はビタミンAの誘導体であるレチナールを発色団とする光受容蛋白質であり、代表的なものとして視物質であるロドプシン（光情報変換）、光駆動プロトンポンプであるバクテリオロドプシン（光エネルギー変換）が挙げられる。光のもつ情報やエネルギーが、具体的にどのような形で変換されるのか、それを明らかにすることが研究者の夢である。

ロドプシンとバクテリオロドプシンについての理解を助けるための参考として、超高速分光に関する総説を以下に掲載する。さらにバクテリオロドプシンにおけるプロトンの「能動輸送」というエントロピーを減少させる（不思議な）過程についての参考文献を示す。ゼミはこれらの内容を踏まえて進行するが、参加者の事前の準備は特に必要としない。

それよりも、分光光学を駆使して研究を行う生物物理学者である私に対して、「物性物理を志す若手」という立場からの積極的な質問や討論を期待します。

【1】季刊化学総説「超高速化学ダイナミクス」(2000年)より

3. ロドプシンの超高速ダイナミクス

神取 秀樹, 七田 芳則

暗いところでウシの眼球からていねいに網膜を剥がし、定法に従って単離・精製すると光受容蛋白質であるロドプシンを取り出すことができる。ロドプシンは太陽輻射がいちばん強い 500 nm 付近(緑色光)に吸収の極大をもち、明るいところに出すと美しい赤色に見える(ウシは、ヒトのもつ三原色の色覚はなく、闘牛士のもつ赤い布が、ウシではなくヒトを興奮させるために使われるのはよく知られている)。ただし注意をしないと、赤色はあつという間に失われてしまう。ロドプシンの効率よい光反応によって、視興奮をもたらす蛋白質部分の構造変化が起こるためである。試験管の中で再度、赤色に戻すためには、目の中と同様、新しい発色団を供給しなければならない。後述するように、これが分光実験にとってもいちばん問題になる部分である。

視覚の初期過程におけるメカニズム解明は、超高速分光におけるチャレンジングな課題として常に多くの研究者の興味を集めてきた。1979年に刊行された『ナノ、ピコ秒の化学』においても、「ロドプシンの光励起とナノ、ピコ秒現象」という表題で、詳細な解説が与えられている¹⁾。ただし、当時の最高時間分解能はロドプシンの電子励起状態を捉えることができないピコ秒程度であり、視覚の初期過程の研究にとっては黎明期というべき時期であった。視覚における光反応を明らかにするためには、より短パルス、すなわちフェムト秒の光が必須であった。

フェムト秒パルスの実現は視覚の初期過程の研究に劇的な転機を与え、この20年の間に反応過程の理解は大きく進んだ。それと同時に、生体中での振動のコヒーレンスや多成分の起源など新たな問題が提起されている。本総説においては、視物質ロドプシンを中心に、超高速分光によって何がわかり、何が問題となっているのかを紹介したい。

1. フェムト秒前夜——視覚の初期過程は異性化か？

ロドプシンなど視物質の発色団は11-シス型レチナールである(図1)。一方、高度好塩菌にはバクテリオロドプシンなどのレチナールを発色団とする蛋白質が存在し、全トランス型のレチナールを発色団とする。いずれも蛋白質のリシン残基とシッフ塩基結合を形成し、シッフ塩基はプロトン化している(図1)。レチナール蛋白質の光反応が超高速の時間領域でその特異なポテンシャル面に沿って進行することは、光反応の温度依存性や励起波長依存性が乏しい²⁾ことや蛍光の量子収率が小さい³⁾ことなどから示唆されていた。このような結果をもとにして、レチナール蛋白質における初期過程のポ

3. Ultrafast Processes in Rhodopsins

Hideki KANDORI and Yoshinori SHICHIDA(京都大学大学院理学研究科)

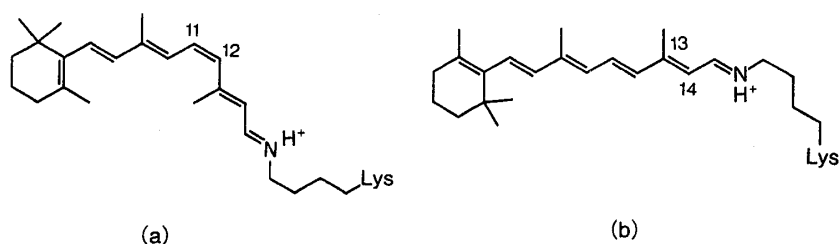


図 1 ロドプシンの発色団(レチナールのプロトン化 Schiff 塩基). (a) 視覚のロドプシン, (b) バクテリアのロドプシン.

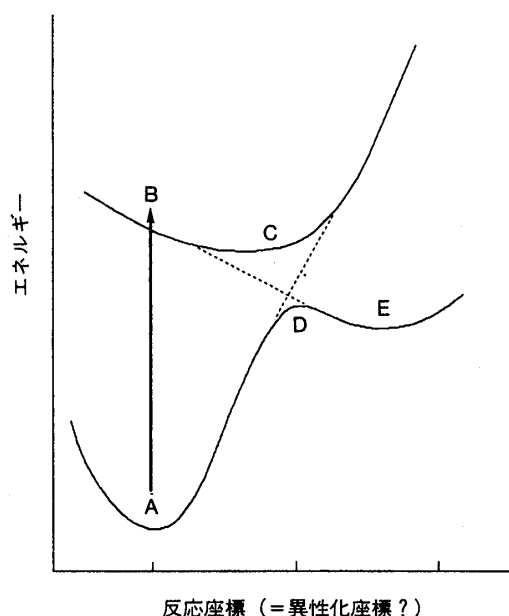


図 2 ロドプシンの初期過程に一般的に用いられるポテンシャル. A がロドプシンの基底状態, B がフランク-コンドン状態, E が反応産物の基底状態を表す.

テンシャル面は図 2(実線)のように考えられてきた.

その特徴として, ① 熱反応のポテンシャルバリアーが高い, ② 電子励起状態で反発的なポテンシャルをもつ, ③ 反応産物のエネルギー状態が高い, といった点があげられる. これらはそれぞれ, ロドプシンの特徴である低い熱雑音(室温では約 3,000 年に一度の活性化率), 高い反応効率(産物生成の量子収率はロドプシンで 0.67, バクテリオロドプシンで 0.6), 光情報変換のための蛋白質の構造変化(化学ポテンシャルエネルギーの獲得), をもたらすと考えられる. 問題はこの反応座標が何であるか, という点である. ポリエン鎖の場合, 特定の二重結合における異性化が考えられ, 実際に低温スペクトル法を用いた光反応産物の詳細な解析によって異性化説が定説となっていた¹⁾. しかし, たとえば 20 年前の総説をみると, ピコ秒分光による最新の報告としてプロトン移動説が紹介されている²⁾. このような異性化説に対する疑問には, 「11-位でシスがトランスになるような(大きな)構造変化がそんなに速く起こっていいのか?」という考えが背景にあった. 実際に, 低温においては初期中間体の 1 つであるバソロドプシンが構造解析の対象となったが, 室温ではその前にフォトロドプシンが生成する³⁾. したがって, 生理的な温度における視覚の引き金が何かという問題は, 1980 年代

講義ノート

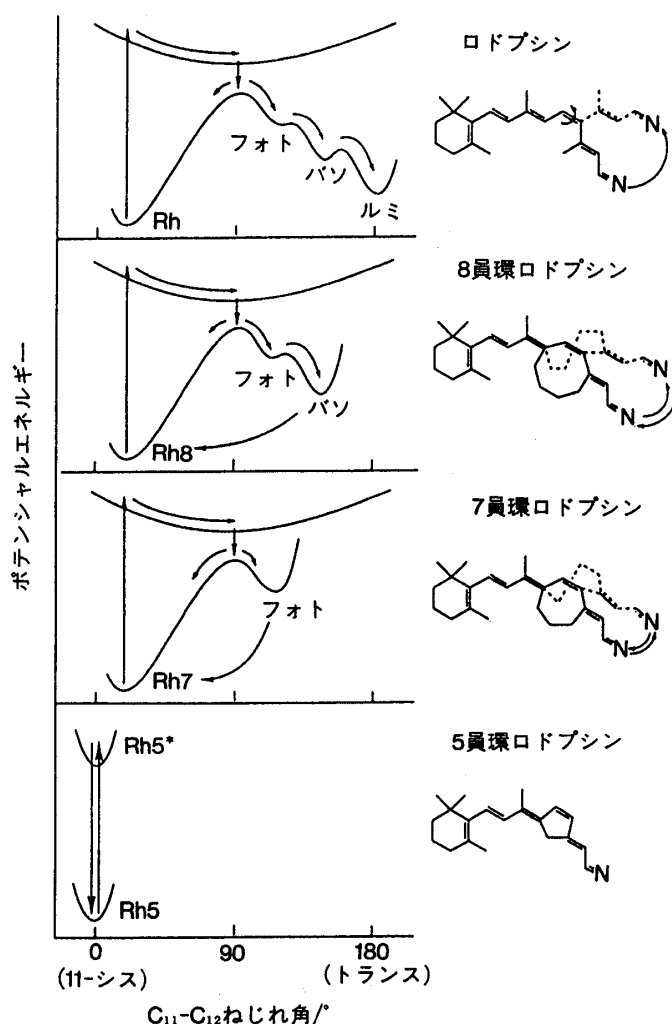


図3 ロドプシンおよび11-シス固定ロドプシンの初期過程。固定の堅さにより生成物が異なり、異性化反応が初期反応過程の中心であることがわかる。(文献6を改変)

の後半を迎えても依然として解決していなかった。

筆者らは、ロドプシンの初期過程が異性化であるか否かを検証するため、コロンビア大学の中西グループ、神戸薬科大学の伊藤グループと共同で、異性化をブロックしたレチナールを発色団とするロドプシンアナログの超高速分光を行なった⁵⁻⁷⁾。具体的には、11-シス型を5員環や7員環、8員環で固定したレチナールアナログを発色団とするロドプシン試料を作製し、ピコ秒の吸収および蛍光分光を行なった。それまでに行なわれた低温分光やナノ秒フォトリシスの結果から、これらのアナログはいずれも退色しないことが知られていたが、超高速分光は、リングの大きさに依存して光反応が相異なることを示した(図3)。たとえば、5員環固定のロドプシンでは反応中間体が生成せず、長寿命化(85 ps)した励起状態だけが観測された⁵⁾。これは、視覚の初期過程がシス-トランス異性化であることを示す実験事実と考えられる。ところが、7員環ロドプシンではロドプシンの最初の間mediateであるフォトリドプシンが⁵⁾、8員環ロドプシンでは次の中間体であるバソロドプシンまで⁶⁾が観測された。この一見、矛盾する実験事実は、環状構造のねじれの自由度との高い相関によって説明された。すな

わち、フェムト秒で起こるロドプシンの初期反応は異性化であり、ピコ秒からナノ秒にかけて進行する緩和過程は、蛋白質部分との相互作用による $C_{11}=C_{12}$ のねじれの緩和を伴うというものである。このような研究の積み重ねの結果、現在では、視覚のロドプシン、バクテリアのロドプシンのいずれにおいても、初期反応は光異性化であることが定説となっている。そして、レチナールのさまざまな部位がねじれることによって、異性化が起こりながら発色団全体は大きく動かず、高速反応が可能になるものと考えられている。

2. バクテリアのロドプシンのフェムト秒分光——励起状態を捉えた！

フェムト秒パルスの実現に伴い、1980年代の後半からロドプシンの測定が報告されるようになった。特に、光によって退色しないために実験のしやすいバクテリオロドプシンが最初のターゲットとなり、超高速分光をリードしていた各国の研究室で競って実験が行なわれた⁸⁻¹²⁾。特に大きな関心となったのは、「初期反応である異性化がいつ起こるのか？」という問題であった。

ロドプシン類においては、最初の反応中間体(基底状態産物、図2のEとして定義される)は必ずもとの吸収よりも長波長側へシフトした吸収をもつ。これらはピコ秒吸収分光によって観測することができるが、バクテリオロドプシンのフェムト秒吸収分光によると、励起直後に短波長側に過渡吸収が観測された⁸⁾。プローブ光による誘導放出が同時に観測されたことから¹⁰⁾、この過渡種はバクテリオロドプシンの電子励起状態と同定された。さまざまなグループの測定によって、励起状態の吸収、誘導放出の寿命として500 fsの値が報告され、バクテリオロドプシンは500 fsの励起状態の寿命をもつことが明らかになった。

ここで注意が必要である。「バクテリオロドプシンの励起状態の寿命は500 fsである」という実験事実はかなり有名であるが、この事実から異性化が500 fsで起こると理解しておられる方が多いことである。ポテンシャルが図2のように記述されるのであれば、励起状態の減衰時間は産物の生成時間と一致しなければならない。つまり500 fsでよい。しかしこのことは、産物生成の時定数が正確に測定され、励起状態の寿命と一致してはじめて確定することである。初期の一連の報告においては、このことがあまり考慮されず、常に図2のポテンシャルを用いて議論が展開されていた。

ポテンシャルの多次元性の問題は、バクテリオロドプシンの類縁蛋白質であるハロロドプシンの測定において提起された。ハロロドプシンのフェムト秒過渡吸収の結果、励起状態の吸収と誘導放出の減衰の時定数として2.3 psという、バクテリオロドプシンよりも長い励起状態の寿命が得られた¹³⁾。ところが、初期中間体の生成時定数を詳細な解析のもとに求めたところ、意外なことに1 ps以下という結果(0.6~0.9 ps)が得られたのである。励起状態(状態B~C)の寿命が中間体(状態E)の生成時間よりも長いという実験結果を図2のポテンシャル面をもとに説明することは不可能である。レチナール蛋白質の異性化ダイナミクスを表現するためには、それまで一般的に用いられてきた異性化に対する一次元座標では不十分であり、より複雑なポテンシャル面を考慮する必要があることがわかった。ハロロドプシンについてのこのような結果は、より高い時間分解能の実験によっても確認されている^{14,15)}。

以上の結果は、より短い励起状態の寿命をもつバクテリオロドプシンに対してはどうであろうか？ 残念ながら、筆者らの時間分解能では、バクテリオロドプシンの初期中間体であるJ中間体の生成時

講義ノート

定数を十分な精度で決定することはできなかった。そこで、ハロロドプシンと同様の解析をより高い時間分解能の測定¹⁰⁾ に対して行なってみると、生成時定数として 150~200 fs という値が得られる。励起状態の寿命が 500 fs であることを考え合わせると、バクテリオロドプシンも共通の性質をもつことが考えられた。その後、さらに広範な波長領域をカバーする精度の高い測定が行なわれるとともに^{16~19)}、図 2 のようなシンプルなポテンシャル面では十分な説明がつかないことが明らかになってきた。提案されたモデルは、基本的にハロロドプシンの場合と同様、励起状態に別のポテンシャル面を考慮するというものである¹⁸⁾。このような多成分の問題は、バクテリオロドプシンのフェムト秒時間分解蛍光測定によって確定的なものとなった²⁰⁾。すなわち、アップコンバージョン法を用いた蛍光測定により、励起状態の減衰として 90~240 fs と 0.6~0.9 ps の成分を含む 3 成分が検出された。時間分解蛍光分光は励起状態の情報しか与えないが、過渡吸収に加えてもとの吸収の減衰や発光など情報量の多い(多すぎる)時間分解吸収分光のデータを補完して、総合的な解釈をするために重要である。現在のところ、励起状態の緩和が多成分であり、速い成分が産物生成に深く関わっているという点に関しては共通の認識が与えられているといっていよいであろう。その一方で、どのようなポテンシャルを描くべきかについては、さまざまな可能性が考えられ結論は下されていない。

3. 視物質ロドプシンのフェムト秒分光——コヒーレントな異性化？

バクテリオロドプシンからやや遅れて、1991 年に最初の(ウシ)ロドプシンのフェムト秒分光が米国の 2 グループによって報告された^{21,22)}。ところが興味深いことに、カリフォルニアのグループは最初の中間体生成が 200 fs 以内に完了するとい²¹⁾、ニューヨークのグループは 3 ps で起こる²²⁾ と結論した。一方 Taiji らは、タコロドプシンの測定を行い、0.4 ps, 2 ps という 2 つの速度成分を報告した²³⁾。一体、異性化はいつ起こるのだろうか？

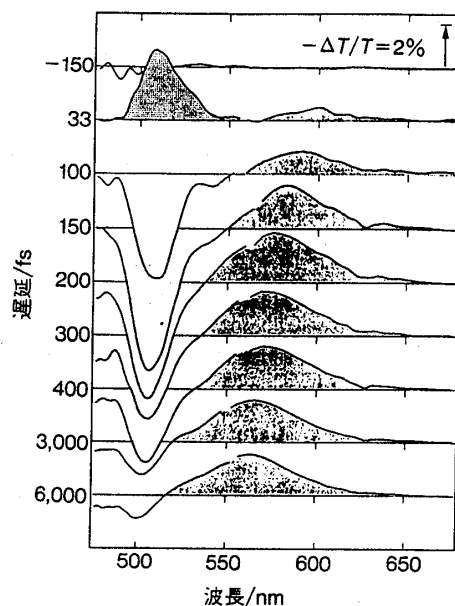


図 4 ウシロドプシンの過渡吸収変化²⁴⁾。500 nm, 35 fs の励起光でロドプシンを励起し、10 fs のプローブ光により過渡吸収変化を透過光量の変化として測定した。もとの吸収(図 2 の A)の減少や励起状態の吸収、フォトロドプシンの吸収(図 2 の E)が見られる。

カリフォルニアのグループの実験は 35 fs の励起光, 10 fs のプローブ光という当時, 最高の時間分解能の装置を用いて行なわれた。そして, 彼らはこの装置を用いて, その後も次々と論文を出版した²⁴⁻²⁷⁾。その結果, バクテリオロドプシンの場合とは異なり, 彼らグループの実験結果や解釈がロドプシンにおける定説として受け入れられることとなった。その典型的なデータを図 4 に示す。縦軸に記された時間は, 励起光に対するプローブ光の遅延時間を表わし, 縦軸はもとの吸収に対する過渡吸収の変化(実際には透過光量の変化)を表わす。したがって, 正の信号が過渡吸収, 負の信号がもとの吸収の減少を示す。ロドプシンは 500 nm 付近に吸収をもつので, 100 fs 以降に観測される 500 nm 付近の負の信号はロドプシンの減少に対応し, 530~630 nm に観測される正の信号が最初の間mediateであるフォトロドプシンの過渡吸収である。一方, 33 fs で 500 nm 付近に現われる正の信号は, ロドプシンの電子励起状態の吸収と解釈された²⁴⁾。本特集号で紹介される他の系におけるスペクトル変化と比較されると, ロドプシンにおけるこのような過渡吸収がかなり特異であることがわかるだろう。その特徴として, 励起状態の吸収が現われる時間に(励起状態ならば当然, 期待される)誘導放出が観測されないこと, さらに異性化産物であるフォトロドプシンの吸収の生成が 200 fs においてすでに完了していることである。図 4 をもとに, 生成の時定数を推定すると 100 fs 程度となる。これはレチナール分子を構成する炭素原子間の伸縮振動のわずかな数周期分程度の時間である。20 年前に, シスがトランスになるのにピコ秒で起こっているのか, ということが問題になっていたことを考えると, 驚くべき速さである。彼らは, 図 1 のような状態 C から状態 D への無輻射遷移を考慮した従来からのモデル(断熱的なポテンシャル交差に基づく)では, このような超高速異性化を説明するのが困難であると考え, 状態 B が非断熱的なポテンシャル交差により状態 E と強く相互作用するモデル(図 1, 破線)を提唱した²⁴⁾。そして, 非断熱的なポテンシャル面での励起波束の振る舞いを, Landau-Zener の式によって表現し, このような高速反応がロドプシンにおける高い効率の産物生成をもたらしていると結論した。

彼らのモデルによれば, 目の中では, 励起→緩和→反応と続く通常の光化学反応のスキームには従

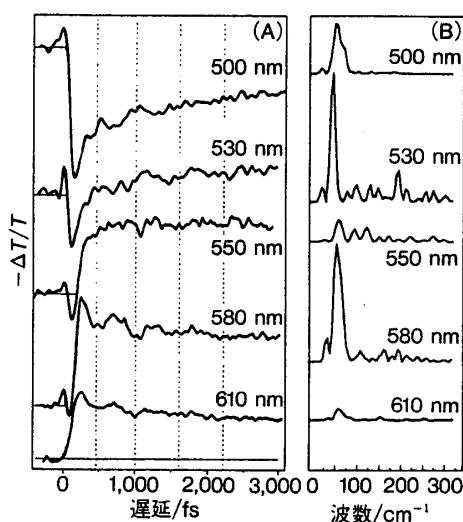


図 5 ロドプシンの初期反応に見出された振動のコヒーレンス²⁶⁾。(A) それぞれの波長における吸収変化のキネティクス。振動が見られる。(B) 振動成分のフーリエ変換により得られた振動バンド。60 cm^{-1} にピークをもつバンドが, プローブ波長に依存して現われる。

講義ノート

わず、励起→反応→緩和という過程が進行することになる。緩和より速い反応の結果として、カリフォルニアのグループはさらに興味深いデータを報告した。すなわち、図5(A)のように200 fsで完了する異性化産物の生成のキネティクスには振動がのっている。この振動をフーリエ解析したところ、 60 cm^{-1} の振動が得られたのであるが、この振動モードの位相を調べたところ、プローブ波長依存性が見出された²⁶⁾。550 nm よりも短波長側と長波長側で位相が逆転した結果を、彼らは異性化後のポテンシャル上で起こるレチナール分子のねじれ運動によるものと解釈した。励起状態での反応が完了した後、基底状態のポテンシャル上(図2のE)で位相が緩和していく様子が観測されたのである。このような振動のコヒーレンスは、レチナールのような大きな分子が、蛋白質という複雑な環境のもとに行なう異性化反応において見出されたため、大きな反響を呼んだ。筆者も、1994年にカリフォルニアで開催された「超高速現象の国際会議」ではじめて聞いたときの印象が強く残っている。

カリフォルニアグループの実験は、200 fsでの産物生成といい、基底状態産物に見られる振動のコヒーレンスといい、視覚の初期過程の解明に大きなブレークスルーをもたらした。彼らは、ほかにも11-シス型でなく9-シス型のロドプシンのダイナミクス測定²⁵⁾、13-位のメチル基をもたないロドプシンのダイナミクス測定²⁷⁾から、10-位の水素原子と13-位のメチル基との立体障害(図1(a))がロドプシンにおける超高速反応の駆動力となっていることを報告している。しかし、異性化が非断熱的な遷移によって記述されるのであれば、今度は逆になぜ、量子収率が1にならないのか、ということが疑問となる。さらに、ウシロドプシンを試料とした図4のような高い時間分解能、S/N比での実験においても、誘導放出は観測されていない。このような結果は、タコのロドプシン^{15,23)}やバクテリオロドプシン^{10,12,17)}とは大きく異なっている。ウシやヒトのロドプシンだけが特別な反応ダイナミクスをもつのであろうか？ 1つの問題は、前述の通り時間分解能がどれだけ高まろうと、スペクトル成分に重なりがある以上、解析が複雑になってしまうという過渡吸収分光の計測自身に由来する問題がある。そこで筆者らは、ウシロドプシンからの蛍光を実時間で測定することを試みた。測定中の試料の退色は困難な問題であったが、これを克服し、図6に示すようにロドプシンの蛍光を実時間で測定

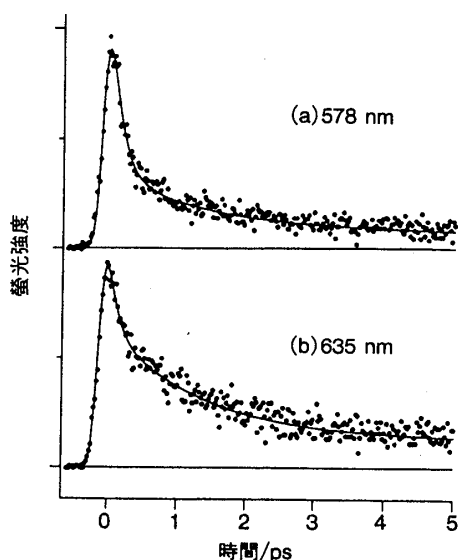


図6 ロドプシンの蛍光²⁸⁾。実線は装置の時間分解能を考慮したフィッティングカーブ。

することに成功した²⁸⁾。その結果、ウシロドプシンの励起状態の緩和にも、フェムト秒の成分とともに数ピコ秒の成分が存在することがわかった。さらに 2 つの波長のキネティクスには明らかに有意な違いがあり、ウシのロドプシンの励起状態ダイナミクスは、200 fs 以内にすべてが完結してしまうシンプルなものではないことが明らかになった。理解を深めるためにも、さらなる研究の進展が期待される。

4. 異性化の機構に関して——何が反応速度を決める？

これまでの研究から、ロドプシンの初期過程は励起状態における異性化であり、その緩和にはフェムト秒とピコ秒の(少なくとも 2 つ以上の)成分が存在することが明らかになった。過渡吸収における産物生成のダイナミクスとあわせると、フェムト秒の緩和成分がコヒーレントな異性化に関与している可能性がある。ではこのような多成分性の起源は何だろうか？ 興味ある仮説は、これらのダイナミクスが異性化の方向性と相関しているというものである。蛋白質という反応場は、シスとトランスの間で異性化するのにも右回りと左回りでは環境が異なり、ダイナミクスが変わってくる可能性がある。一方向の異性化が蛋白質内での反応の特徴、すなわち高い効率や選択性を説明できる可能性がある。

この仮説を検証するためには、発色団のダイナミクスをより対称な系で調べてやればよい。このような観点から、筆者らは溶液中でのレチナール発色団の励起状態ダイナミクスを調べたところ、バクテリアのロドプシン²⁹⁾、視覚のロドプシン³⁰⁾のいずれの発色団においても、メタノール中でフェムト秒とピコ秒の 2 つの成分が観測された。これらの実験で注意すべきことは、視覚のロドプシンの発色団(11-シスレチナール)では 13 の位置のメチル基と 10 の位置の水素の間に立体障害が生じるために、溶液中でも 2 種類(つまり、右回りと左回り)の構造をとるということである。一方、バクテリアのロドプシンの発色団は全トランス型のため立体障害は生じず、基本的には 1 種類の構造をとると考えることができる。しかし、実験結果は、両者とも 2 つの成分の緩和過程が観測された。したがって、2 成分の緩和過程は発色団の異性化の方向性を示しているのではなく、励起状態での異性化のチャネルに入る前の発色団構造の不均一性に由来しているように思える。その一方で、溶液中と蛋白質中でのダイナミクスを比較すると、フェムト秒の成分が蛋白質中でより大きくなっていた。11-シス型の場合、溶液中の異性化効率(約 0.15)は蛋白質中(0.67)よりも小さく、これがフェムト秒の緩和成分と相関がある可能性がある。

蛋白質という反応場の性質を調べるためには、溶液のようなまったく異なる環境のもとで調べる方法のほかに、アミノ酸置換によって蛋白質環境をわずかに改変する方法がある。しかし、視覚のロドプシンの場合、光を吸収すると退色するため実験には多量の試料が必要であるが、作製可能な試料の量が限られていることから、変異蛋白質のフェムト秒分光はあまり現実的ではない。一方、バクテリアのロドプシンは変異蛋白質を大量に調製することが可能であり、光反応がサイクルになっている事実とあわせると有力である。現に、バクテリオロドプシンにおいては、シッフ塩基周辺のアミノ酸残基を置換した試料の過渡吸収分光が行なわれ、高速異性化に対して、シッフ塩基の対イオンが重要な寄与をしていることが報告された³¹⁻³³⁾。変異蛋白質を利用した初期過程の系統的なダイナミクス測定は、今後のより深い理解のために重要であろう。

講義ノート

ロドプシンの超高速分光によれば、異性化のポテンシャル面が図2のような単一なものではそのダイナミクスを説明することができない。現時点ではさまざまな解釈が可能であるが、筆者は以下のように考えている。

「異性化における断熱的なポテンシャル交差と非断熱的なポテンシャル交差は、レチナール蛋白質の発色団がもち合わせる本質的な性質である。異性化に対するより古典的な描像である断熱的な過程と、より高い異性化効率を与える非断熱的な過程により全体の異性化過程は記述される。両者の分布はまわりの inhomogeneous (不均一) な環境に依存し、蛋白質環境では後者が優勢である。」

ポテンシャル交差が断熱的な非断熱的なかを決定する要素は、レチナール分子の基底状態における構造の相違を反映するものかもしれない。あるいは均一な分子構造から励起されても、異なった異性化過程が決定されるのかもしれない。これは今後の課題である。

5. ポテンシャルの向こうに

フェムト秒パルスの実現により、ロドプシンの異性化過程の研究は劇的な進展を見せた。しかし、これまで見てきたようにフェムト秒分光は、ロドプシンの超高速ダイナミクスに対して多くの知見を与えたのと同時に解決すべき疑問も提示した。視覚のダイナミクスに関して正しい描像を与えるためにも、さらに詳細な解析が期待される。特に蛋白質という反応場がどのような役割を演じているのかについては、さらなる理解が求められるところである。この観点からすると、最近の構造生物学の進展は新たな可能性をもたらしたといえることができる。

20年前、ピコ秒の光がロドプシンの実験に利用されたとき、蛋白質という反応場はまったくのブラックボックスであった。しかし、最近、バクテリオロドプシンの立体構造(図7³⁴⁾)が決定され、ロドプシンについても10年以内には原子レベルでの立体構造の決定が予想される。異性化に関して、なぜ決まったところで回るのか(選択性の問題)、右回りか左回りかどちら向きに回るのか(方向性の問題)、なぜ蛋白質内ではよく回るのか(効率の問題)、といった蛋白質反応場の不思議さは立体構造

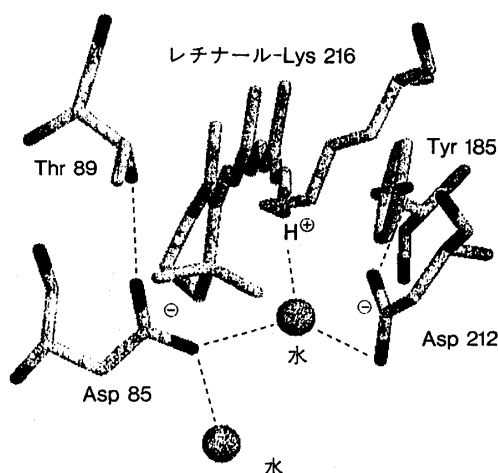


図7 バクテリオロドプシンの構造。発色団レチナールと異性化によって構造変化が誘起されと思われる蛋白質部分を示した。(文献34の構造より)

と密接に関わっている。しかし、立体構造があるだけでは、反応ダイナミクスは理解できない。立体構造をもとに、蛋白質を改変する分子生物学も含めて、包括的なダイナミクス解析により正しい描像を構築することができるものであろう。これまでわれわれ研究者は、超高速ダイナミクスを実時間で捉え、いかに正確にポテンシャル面を表現するかを求めてきた。凝縮系ではこのポテンシャル面を実空間における構造変化と対応させることは容易なことではないが、蛋白質という反応場は原子が決まった位置に固定されているという点で、溶液など他の系よりも精緻な解析が可能であるかもしれない。

さらに、フェムト秒(10^{-15} 秒)のオーダーで起こる蛋白質中での異性化反応の研究には、ペタ秒(10^{15} 秒)のオーダーで起こる生物進化という一見かけ離れた研究からも示唆が得られる。ロドプシンを含めた視物質は、生物の40億年にわたる進化過程で、さまざまな種類に多様化してきた。最近の研究によると、本総説で取り上げたウシとタコのロドプシンは、脊椎動物と無脊椎動物が分岐するはるか以前、すなわち単細胞生物から多細胞生物が生じる頃(約9億年前)に多様化したことが示されている。つまり、分岐の時期から現在まで非常に長い時間が経過しているのである。生物は進化の過程で視物質の遺伝子を重複させ、また、蛋白質部分のアミノ酸をさまざまに変異させ、色(吸収極大)の違う多くの視物質をつくってきた。最近では、光吸収後の蛋白質構造の変化のしやすさの違う視物質も発見されている^{35,36)}。それにもかかわらず、ウシやタコのロドプシンはおろか、これまで調べられた視物質の量子収率はほとんど変わらない^{35,36)}。つまり、発色団の異性化に関与する分子構築は進化の初期にすでに獲得され、その後の変化によってもほとんど改善されなかったと考えられる。裏を返せば、レチナールを発色団として使う限り、生物ができること(つまり発色団のまわりのアミノ酸を置換して環境を変えること)はそれほど大きくはなかったのかもしれない。そのため、量子収率の高さは意外と単純な仕組み、たとえば発色団の両端を固定して発色団構造の不均一性を減少させることにあるのかもしれない。また、両端を固定することにより、光エネルギーを中心付近の構造変化に利用しやすくなったのかもしれない。すでに述べたように、最近の分子生物学の進展により発色団のまわりのアミノ酸を自由に変化させることが可能になった。今後の研究の進展が期待される。

本総説においては、ロドプシンの超高速ダイナミクスについて、特にフェムト秒パルスを用いた実験結果を中心に解説した。紙面の制約で十分に包括的な紹介はできなかった面もあり、また理論的な研究に触れることができなかった。そういった部分に関しては、他の総説など³⁷⁻³⁹⁾を参考にして補完していただけたら幸いである。

文 献

- 1) 吉澤 透, 七田芳則, 化学総説, **24**, 211 (1979).
- 2) T. Rosenfeld, B. Honig, M. Ottolenghi, J. Hurley, and T.G. Ebrey, *Pure Appl. Chem.*, **49**, 341 (1977).
- 3) A.G. Doukas, M.R. Junnarkar, R.R. Alfano, R.H. Callender, T. Kakitani, and B. Honig, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 4790 (1984).
- 4) Y. Shichida, S. Matuoka, and T. Yoshizawa, *Photobiophys. Photobiochem.*, **7**, 221 (1984).
- 5) H. Kandori, S. Matuoka, Y. Shichida, T. Yoshizawa, M. Ito, K. Tsukida, V. Balogh-Nair, and K. Nakanishi, *Biochemistry*, **28**, 6460 (1989).
- 6) T. Mizukami, H. Kandori, Y. Shichida, A.-H. Chen, F. Derguini, C.G. Caldwell, C.F. Bigge, K. Nakanishi, and T. Yoshizawa, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 4072 (1993).
- 7) H. Kandori, H. Sasabe, K. Nakanishi, T. Yoshizawa, T. Mizukami, and Y. Shichida, *J. Am. Chem. Soc.*, **118**, 1002 (1996).
- 8) A.V. Sharkov, A.V. Pakulev, S.V. Chekalin, and Y.A. Matveetz, *Biochim. Biophys. Acta*, **808**, 94 (1985).

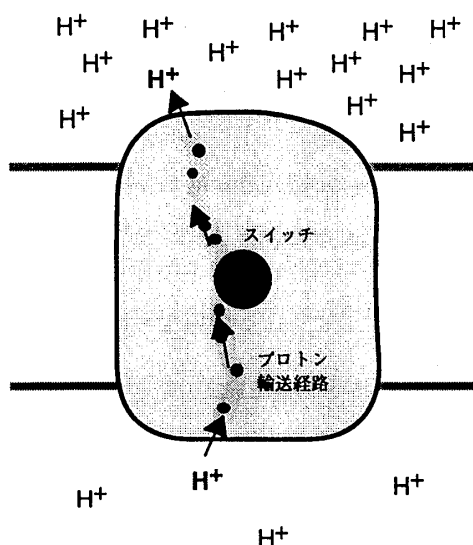
講義ノート

- 9) J.W. Petrich, J. Breton, J.L. Martin, and A. Antonetti, *Chem. Phys. Lett.*, **137**, 369 (1987).
- 10) J. Dobler, W. Zinth, W. Kaiser, and D. Oesterhelt, *Chem. Phys. Lett.*, **144**, 215 (1988).
- 11) R.A. Mathies, C.H. Brito Cruz, W.T. Pollard, and C.V. Shank, *Science*, **240**, 777 (1988).
- 12) T. Kobayashi, M. Terauchi, T. Kouyama, M. Yoshizawa, and M. Taiji, *SPIE Proceedings*, **1403**, 407 (1990).
- 13) H. Kandori, K. Yoshihara, H. Tomioka, and H. Sasabe, *J. Phys. Chem.*, **96**, 6066 (1992).
- 14) T. Arlt, S. Schmidt, W. Zinth, U. Haupts, and D. Oesterhelt, *Chem. Phys. Lett.*, **241**, 559 (1995).
- 15) T. Kobayashi, M. Kim, M. Taiji, T. Iwasa, M. Nakagawa, and M. Tsuda, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 272 (1998).
- 16) S.L. Dexheimer, Q. Wang, L.A. Peteanu, W.T. Pollard, R.A. Mathies, and C.V. Shank, *Chem. Phys. Lett.*, **188**, 61 (1992).
- 17) G. Haran, K. Wynne, A. Xie, Q. He, M. Chance, and R.M. Hochstrasser, *Chem. Phys. Lett.*, **261**, 389 (1996).
- 18) K.C. Hasson, F. Gai, and P.A. Anfinrud, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 15124 (1996).
- 19) F. Gai, J.C. McDonald, and P.A. Anfinrud, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 6201 (1997).
- 20) M. Du and G.R. Fleming, *Biophys. Chem.*, **48**, 101 (1993).
- 21) R.W. Schoenlein, L.A. Peteanu, R.A. Mathies, and C.V. Shank, *Science*, **254**, 412 (1991).
- 22) M. Yan, D. Manor, G. Weng, H. Chao, L. Rothberg, T.M. Jedju, and R.R. Alfano, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 9809 (1991).
- 23) M. Taiji, K. Bryl, M. Nakagawa, M. Tsuda, and T. Kobayashi, *Photochem. Photobiol.*, **56**, 1003 (1992).
- 24) L.A. Peteanu, R.W. Schoenlein, Q. Wang, R.A. Mathies, and C.V. Shank, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 11762 (1993).
- 25) R.W. Schoenlein, L.A. Peteanu, Q. Wang, R.A. Mathies, and C.V. Shank, *J. Phys. Chem.*, **97**, 12087 (1993).
- 26) Q. Wang, R.W. Schoenlein, L.A. Peteanu, R.A. Mathies, and C.V. Shank, *Science*, **266**, 422 (1994).
- 27) Q. Wang, G.G. Kochendoerfer, R.W. Schoenlein, P.J.E. Verdegem, J. Lugtenburg, R.A. Mathies, and C.V. Shank, *J. Phys. Chem.*, **100**, 17388 (1996).
- 28) H. Chosrowjan, N. Mataga, Y. Shibata, S. Tachibanaki, H. Kandori, Y. Shichida, T. Okada, and T. Kouyama, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 9706 (1998).
- 29) H. Kandori and H. Sasabe, *Chem. Phys. Lett.*, **216**, 126 (1993).
- 30) H. Kandori, Y. Katsuta, M. Ito, and H. Sasabe, *J. Am. Chem. Soc.*, **117**, 2669 (1995).
- 31) L. Song, M.A. El-Sayed, and J.K. Lanyi, *Science*, **261**, 891 (1993).
- 32) L. Song, M.A. El-Sayed, and J.K. Lanyi, *J. Phys. Chem.*, **100**, 10479 (1996).
- 33) S.L. Logunov, M.A. El-Sayed, and J.K. Lanyi, *Biophys. J.*, **70**, 2875 (1996).
- 34) H. Luecke, H.-T. Richter, and J.K. Lanyi, *Science*, **280**, 1934 (1998).
- 35) 寺北明久, 七田芳則, 蛋白質核酸酵素, **44**, 217 (1999).
- 36) Y. Shichida and H. Imai, *Cell. Mol. Life Sci.*, **54**, 1299 (1998).
- 37) 神取秀樹, 生物物理, **34**, 149 (1994).
- 38) G.G. Kochendoerfer and R.A. Mathies, *Isr. J. Chem.*, **35**, 211 (1995).
- 39) F. Gai, K.C. Hasson, J.C. McDonald, and P.A. Anfinrud, *Science*, **279**, 1886 (1998).

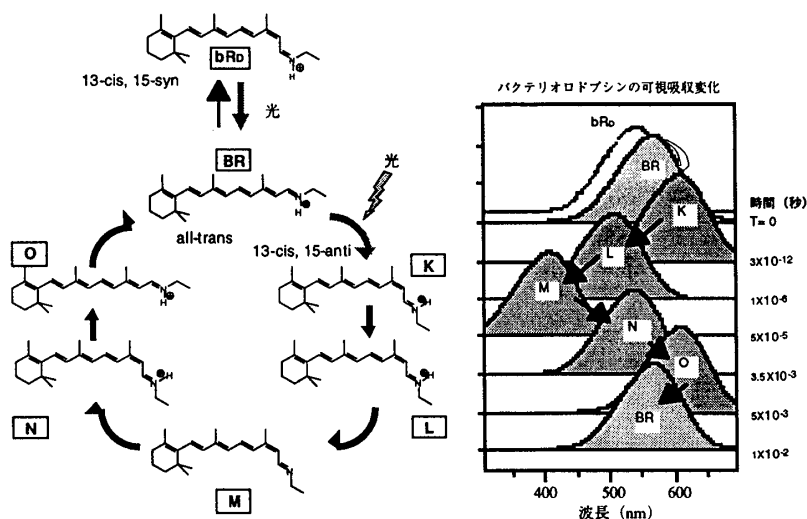
【2】バクテリオロドプシンのプロトンポンプについて

高度好塩菌という細菌には、バクテリオロドプシンと呼ばれるイオンポンプが存在する。バクテリオロドプシンは光のエネルギーを使ってプロトンを輸送する膜タンパク質であり、プロトン結合基のプロトン化状態を時間的、空間的に制御することによって、エネルギー勾配に逆らってプロトンを「能動輸送」することができる。系のエントロピーを減少させる「能動輸送」という不思議な出来事はなぜ生体分子において実現できるのであろうか？

分子ポンプは濃度勾配に逆らって輸送できる



バクテリオロドプシン：分子ポンプタンパク質のトップランナー



最近、高分解能の結晶構造やプロトンの輸送経路が明らかにされ、タンパク質の構造変化と共役した能動輸送のメカニズムを原子レベルで理解することが可能になった。ここでは、バクテリオロドプシンの光駆動プロトン輸送機構解明の現状を紹介したい。

講義ノート

参考文献（すべて総説）

神取秀樹、佐々木純、前田章夫

「バクテリオロドプシンとハロロドプシン」

化学、51, 368-373 (1996).

神取秀樹、前田章夫

「バクテリオロドプシンはどのようにして光をエネルギーに変換するか？」

蛋白質核酸酵素 42, 101-109 (1997).

茂木立志、神取秀樹

「バクテリオロドプシンの結晶構造とプロトン輸送機構」

蛋白質核酸酵素 44, 51-57 (1999).

山崎洋一、神取秀樹

「バクテリオロドプシン：光エネルギーを利用するプロトンポンプ」

Series ニューバイオフィジックス II 第3巻ポンプとトランスポーター（共立出版）109-123 (2000).

H. Kandori

"Role of internal water molecules in bacteriorhodopsin"

Biochim. Biophys. Acta, 1460, 177-196 (2000).

神取秀樹

「バクテリオロドプシン：地上最小のイオンポンプ」

バイオサイエンスの新世紀 第7巻生体膜のエネルギー装置（共立出版）、194-206 (2000).

神取秀樹

「バクテリオロドプシンの光エネルギー変換」

生体とエネルギーの物理：生命力のみなもと（裳華房）、印刷中 (2000).

神取秀樹

「プロトンをポンプするための蛋白質の「動き」」

現代化学、印刷中（2001年1月号予定）.

神取秀樹

「タンパク質分子ポンプのダイナミズム」

日本物理学会誌、印刷中（2001年3月号予定）.