

## ホタルイカの生きた視細胞の X線回折

浜中 俊明\*, 清道 正嗣\*\*,†, 鬼頭 勇次\*\*

\*大阪大学基礎工学部, \*\*大阪大学理学部

### X-ray Diffraction of the Live Firefly Squid Retina

Toshiaki HAMANAKA\*, Masatsugu SEIDOU\*\*,† and Yuji KITO\*\*

\*Faculty of Engineering Science, Osaka University, \*\*Faculty of Science, Osaka University

†Aichi Prefectural University of Fine Arts and Music

The initial step of the visual process is the absorption of light by a visual pigment in the photoreceptor cell. Unlike the vertebrate retina, the squid visual pigment is located in microvilli which are cylindrical extensions of the cell membrane, arranged hexagonally within the rhabdomere structures of the retinula cells. In previous studies of invertebrate rhabdomes by x-ray diffraction, the retina, fixed by glutaraldehyde, was used because this tissue disintegrated within an hour of dissection and more than ten hours exposure time was needed to record a diffraction pattern with conventional x-ray apparatus. In this study, x-ray diffraction patterns from live firefly squid retina could be successfully obtained by use of x-ray synchrotron radiation and the image plate.

The diffraction spots were indexed on a two-dimensional hexagonal lattice of 60 nm. X-ray data was analysed based on model building, in which the Patterson function gave us very useful informations. The best-fitting model showed a large gap between adjacent microvilli (~12nm), which had been expected for ionic current flow through the inter-microvillus space to generate the membrane potential, whereas such a large gap has not been observed with the chemically fixed retina. Also, the existence of massive inter-microvillus material, scarcely observed by conventional electron microscopy, has been confirmed. The change of diffraction pattern was observed under light illumination.

#### 1. はじめに

視覚は目に入って来た光が視細胞で吸収される事を引き金として始まる。ヒトを含む脊椎動物と頭足類であるイカ・タコでは、網膜やそれを構成する視細胞において、その起源と成り立ちがまったく異なるにもかかわらず、両者には類似点も多い。図1に脊椎動物の桿体視細胞とイカの視細胞

の模式図を示した。視細胞は内節と外節に分かれている。内節には細胞核やミトコンドリアなどの細胞を維持して行くのに必要な組織が存在する。他方、外節は光受容とそれを電気信号に変換する役割を担っている。桿体細胞の外節は円盤と呼ばれる閉じた袋状の細胞膜が1000枚程度規則正しく積み重なった、いわゆるラメラ構造をしており、

\*大阪大学 基礎工学部 〒560 大阪府豊中市待兼山町1-3

TEL 06-850-6516 FAX 06-843-9354 e-mail hamanaka@bpe.es.osaka-u.ac.jp

†現在 愛知県立芸術大学一般教育

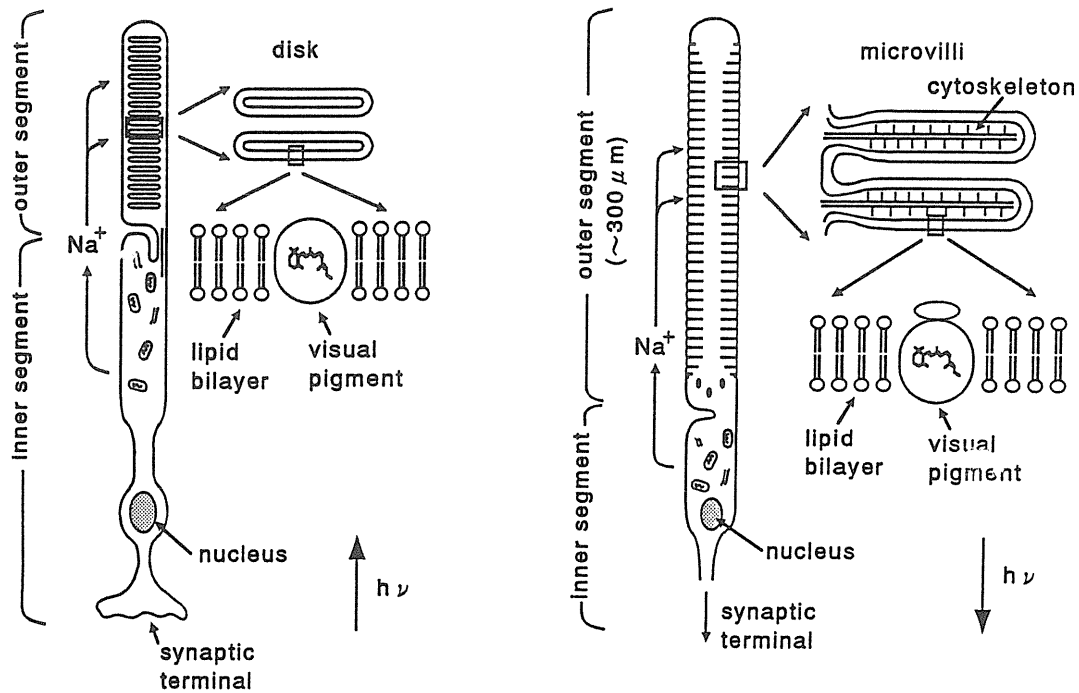


Figure.1 Schematic diagram of photoreceptor cells; a vertebrate rod cell (left) and a squid retinula cell (right).

その円盤間の距離は約 30nm となっている。また、イカの視細胞では細胞体から出ている微絨毛 (microvilli) と呼ばれる細長い突起が規則正しく配列した構造をとっており、その横断面は格子定数が約 60nm の 2次元 6方格子を作っている。この円盤および微絨毛を形成している細胞膜中に光受容蛋白質である視物質が存在する。

上で述べたように、視細胞外節は規則性のある構造をしているので X線回折法で構造を調べるのに適していると言える。しかし、規則構造が保たれているのは解剖によって網膜を取り出した後 1時間程度である。桿体細胞の場合は、実験室で用いられている従来の X線装置によっても 1時間以内の測定時間で回折像を記録できるので、これまで色々と研究がなされて来た<sup>1-3)</sup>。しかし、イカ視細胞では 10時間以上の露出を必要とするので回折像の記録は生のままでは不可能であった。そのため、これまでイカ網膜の X線による構造研究に関して出された 3つの論文では、いずれも、グルタルアルデヒドなどで化学的に固定された試料を用

いている<sup>4-6)</sup>。ところが、X線源としてシンクロトロン放射光が使える、2次元検出器としてイメージプレートが使えるようになった事で、数分以内の露出時間で X線回折像が記録できるようになった。この事は生きた状態の構造を生理的条件下で調べられるようになった事を意味するほかに、さらに光受容に伴う構造変化の研究を行う道が拓かれたことを意味する。

我々はホタルイカの網膜を用いて生きた状態の細胞から X線回折像を記録し、視細胞外節の構造に関するいくつかの知見を得ることができた<sup>7,8)</sup>。また、光照射によって X線回折像が変化する事も認めている<sup>9)</sup>。しかし、光による変化の仕方が実験ごとに異なっている事とデータの解析が終わっていない事から、ここでは主に暗下で得たデータ解析の結果について述べる事にする。

## 2. ホタルイカ網膜の構造について

ホタルイカの網膜はほとんど視細胞だけでできている。視細胞は図 1で示したように、細胞体か

ら逆向きの2方向に微絨毛が多数突き出した構造をしている。また、図2(a)に示されるように、隣り合った視細胞から出ている微絨毛は互いに垂直な向きを持ち、かつ、先端が接するように配置している。その様子を光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察した結果を図2(b)に示した。多くの無脊椎動物はこの様な構造の視細胞で出来ているが、イカやタコでは網膜中で微絨毛の占める体積が非常に大きいのでX線回折実験に最適な材料となっている。次に、微絨毛は図1に示してあるように、細胞体から突き出した細胞骨格(cytoskeleton)と呼ばれる繊維を細胞膜が包み込んだ構造をしている。この細胞骨格は筋肉などの構成蛋白質であるアクチンからできている。微絨毛膜と呼ばれる細胞膜は脂質の作る2重層膜に蛋白質が埋まってできてい

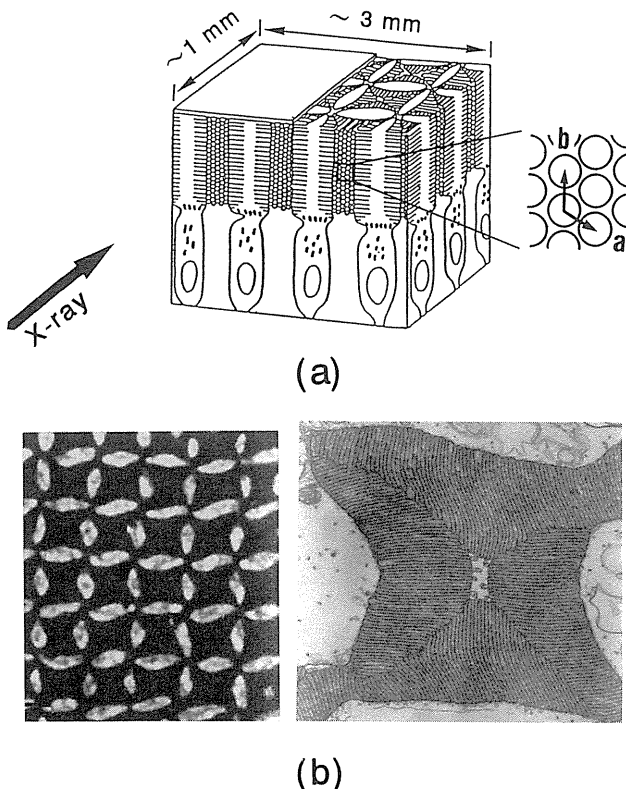


Figure.2 (a) Schematic diagram of a slice of squid retina is represented. (b) Light micrograph of a horizontal section through the outer segments, showing the rectilinear cell mosaic (left). Pale areas are cytoplasm and dark areas are microvilli. Electron micrograph of a horizontal section showing the orthogonal packing of the microvilli (right). (Courtesy of M. Michinomae).

る。この蛋白質の約9割は光受容蛋白である視物質である。

視物質は図3に示すような共役2重結合鎖を持つ低分子を発色団として結合している蛋白質である。視物質による光吸収は共役2重結合鎖の $\pi$ 電子の励起と言う形でおこなわれる。この発色団は光を吸収する前は $C_{11} = C_{12}$ で曲がった11-シス型をとっている。光を吸収すると異性化してトランス型に変わる。この変化が蛋白質部分の構造変化を引き起こし、それによって視物質は他の酵素を活性化できる状態に変わる。

### 3. 視細胞の興奮について

一般に細胞内のカリウムイオン濃度は細胞外より高い。逆に、ナトリウムイオン濃度は細胞外の方が高い。細胞膜を作っている脂質膜の水やイオンに対する透過性は低い。しかし、細胞膜にはイオンを透過させるチャンネル蛋白質が存在してい

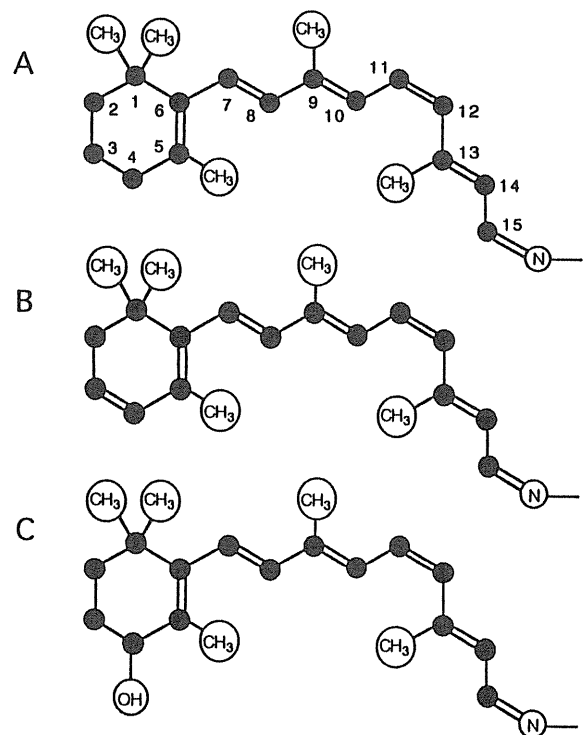


Figure.3 Three kinds of chromophores found in the visual pigments of the firefly squid (*Watasenia scintillans*) photoreceptor cells. A: Retinal (Vitamin A aldehyde), B: 3-dehydroretinal and C: 4-hydroxyretinal.

て、イオンの透過性が調節されている。したがって、細胞膜を介して細胞の内と外との間に膜電位と呼ばれる電位差が生じる。その値は、主なるイオンである  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cl^-$  のみを考慮すると次の式で与えられる。

$$E = \frac{RT}{F} \ln \frac{P_K [K^+]_o + P_{Na} [Na^+]_o + P_{Cl} [Cl^-]_i}{P_K [K^+]_i + P_{Na} [Na^+]_i + P_{Cl} [Cl^-]_o}$$

ここで、添え字の  $o$  や  $i$  は各イオンの細胞外および内部での濃度である事を示している。 $P_K$ ,  $P_{Na}$  および  $P_{Cl}$  は各イオンに対する透過係数を表わす。 $R$ ,  $F$ ,  $T$  はそれぞれ気体定数, Faraday 定数および絶対温度である。また、膜電位は細胞外部に対する内部の電位として表わされる。

光の当たっていない状態では、カリウムイオンの透過性が高いので膜電位はほぼカリウムイオンで決まり、かつ、 $[K^+]_i > [K^+]_o$  であるから、 $E \sim -50mV$  となる。光が当たると、イカの視細胞の場合は、ナトリウムイオンの透過性が上がる。その結果として、 $[Na^+]_i < [Na^+]_o$  であるので、膜電位は正の方に变化する（膜電位が小さくなるので脱分極と言う）。この膜電位の変化が電気生理学的に見た細胞の興奮と言う現象である。ちなみに、脊椎動物の多くの視細胞では、暗中所けるナトリウムイオンに対する透過性はイカの場合より高く、光が当たると透過性が下がる。したがって、膜電位は負の方に变化する（膜電位がさらに大きくなるので過分極と言う）。この膜電位が変化したと言う信号はシナプスと呼ばれる接合部を通して神経細胞に伝えられる。

視細胞は1光量子を吸収してもナトリウムイオンに対するチャンネル蛋白質の約1000個に開閉が起こって興奮する<sup>10)</sup>。また、視物質とチャンネル蛋白質とは空間的に離れて存在する。これらの事から、当然、視物質が光を吸収したと言う信号を伝達し、かつ、増幅する機構が存在すると考えられる。脊椎動物の桿体細胞の場合は、かなり良くこの機構が分かっていたが、イカの場合はあまり分

かっていない。桿体細胞では光を吸収する事によってナトリウムイオンに対するチャンネルが閉じるのに、イカの場合は開くのであるから、桿体細胞とは違った機構が存在するものと考えられている<sup>11)</sup>。

ところで、ナトリウムイオンは細胞膜を通して細胞外から細胞内に流れ込んでいるが、細胞内外の濃度は一定に保たれている。それは細胞の内節にナトリウムイオンに対してポンプとして働く蛋白質が存在して、常に細胞外にくみ出しているからである。実際、図1に示されているように、内節側から外節側に向かってナトリウムイオンが流れている事が確かめられている<sup>12, 13)</sup>。ナトリウムイオンに対するチャンネルは微絨毛の根元付近の細胞体の表面に存在すると考えられているので、ナトリウムイオンは微絨毛間を流れていると思われる。

#### 4. なぜホタルイカか？

ホタルイカを実験材料として用いている理由は、現在、我々が生きた状態で扱えるイカとして唯一のものだからである。イカは海水中のアンモニア濃度の上昇を抑えたり、吐き出したスミを速やかに除去したり温度を一定に保つ事などをしていないとすぐに死んでしまう飼育の難しい生き物である。ホタルイカは中深海性のイカであるが、春になると産卵のために富山湾近辺に押し寄せる。我々は漁船に乗せてもらって、引き寄せられた網の中を泳いでいるホタルイカをかすめ取るようにすくって、釣りなどで使うクーラーに入れて筑波の高エネルギー物理学研究所まで運ぶ。ホタルイカは0°Cの付近で生きているので、温度の制御は氷を使うことで容易に行える。また、体長が7cm位であるので、1つのクーラーに10~20匹入れておくことができる。他に、暗い所で生息するイカなので色素顆粒を持たない点でも視細胞外節の構造を調べるX線回折実験には都合が良い。

ホタルイカはその名前から分かるように発光性

のイカである。第4腕の先端に3個の大きな発光器を持ち、強い光を発する。これは補食や威嚇に使われているのではないかと考えられている。また、身体の腹側表面には多数の小さな発光器がある。この発光器は、上から来る光によってできる影を消して下にいる補食者に見つからないように、上からくると同じ光を出すために有ると考えられている。他に、眼球の腹側表面に一列に並んで5個の発光器が有る。何の為に有るのかは明かではないが、もしかしたら、ホタルイカ間の光通信手段として使われているのかも知れない。ところで、もし背景光の波長分布を認識しようとする色識別の能力が必要となる。また、上からの光による影を消した時にホタルイカどうしが認識しあうためには、環境光以外の他の動物には見えない光を使う必要がある。この為には、異なる吸収スペクトルを持つ視物質が存在しなければならない。実際、我々は図3に示すような発色団を持つ3種類の視物質が存在する事を見出した<sup>14)</sup>。他のイカにはレチナールを発色団とする視物質しか見られない。特に、4-ヒドロキシレチナールを持つ視物質はホタルイカで見いだされ、長い間ホタルイカにしか存在しないと思われてきた。しか

し、最近、大西洋の深海で捕獲されたやはり発光性のイカやタコにも存在することが確認された。このように、ホタルイカはX線による構造研究の対象と言う事を離れても魅力のある生き物である。

## 5. X線回折実験

X線回折実験はフォトン・ファクトリーのビームラインBL15Aで行った<sup>15)</sup>。カメラはミラー・モノクロメーター型点収束光学系で、X線の波長は0.15nmであった。X線の検出にはイメージング・プレートを用い、ドラム式の読み取り装置を使用した<sup>16)</sup>。試料まわりの様子は図4に示したようなものである。試料と検出器の距離は2000mm前後とした。ホタルイカの解剖はハッチの中で行い、ギロチンによって網膜を1×3mmに切って試料とした。試料の温度は4°Cに設定した。図2から分かるように、X線は微絨毛の長軸に平行に入射する必要があるので、眼球の周りにある発光器の並びを参照して網膜の切る方向を決めた。X線の露出時間は2~5分としたが、解剖から露出開始までに15~20分を要している。実験はハッチ内を暗くして赤ランプの下で行った。

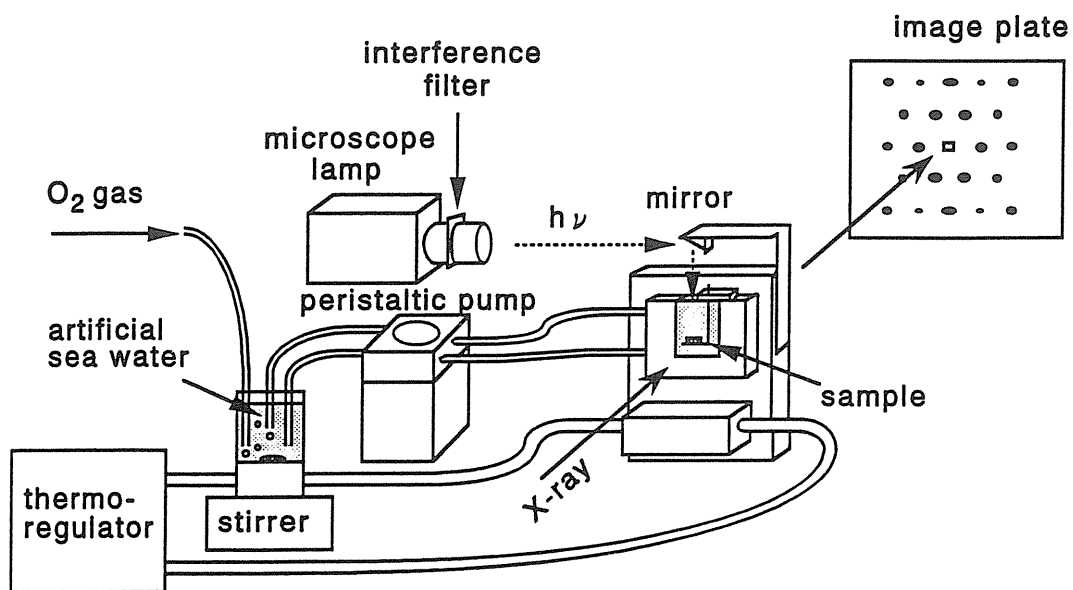


Figure.4 Schematic diagram of experimental arrangement for X-ray diffraction experiments.

## 6. X線回折像

図5に得られたX線回折像を示した。回折点は格子定数が60nmの2次元6方格子として指数づけができた。また、この回折像は水平および垂直軸に関して対称になっているので6mm対称性を持つことになる。しかし、実際には等価なBragg反射の強度が一致せず、垂直軸に近い反射ほど強くなっている。また、垂直軸上の反射は非常に強い。これは、以下に述べる2つの理由によっている。まず、微絨毛の長軸に垂直に切った横断面は上に述べたように格子定数60nmの6方格子を作っている。一方、長軸に沿った長さは1 $\mu$ m程あるが、その方向にはっきりした周期構造を持っていないので、逆空間の拡がり小さい( $\sim (1\mu\text{m})^{-1}$ )。したがって、逆格子は実質的には2次元格子となっている。次に、図2に示したように隣り合った視細胞から出ている微絨毛は互いに垂直な向きを持っている。X線を一方の微絨毛の長軸に平行に入射させると、この向きを持った微絨毛からは2次元の回折像が得られる。しかし、X線の入射方向に直角の向きを持った微絨毛からは垂直軸上の逆

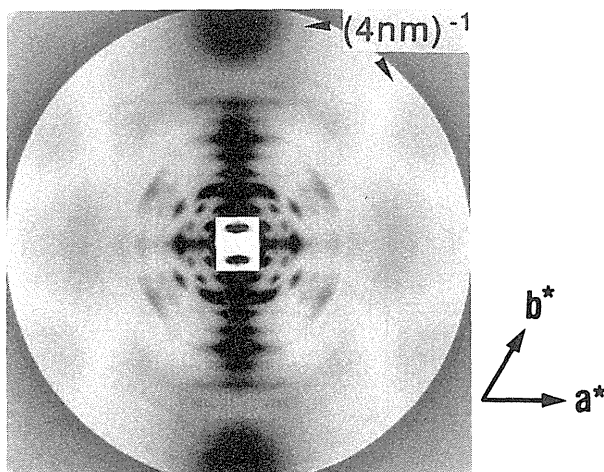


Figure.5 The X-ray diffraction pattern from a slice of live retina of the firefly squid. The (0, 1) and its equivalent reflections are represented on a reduced intensity scale within a small central box. The background scattering was radially subtracted. The exposure time was 5 min.

格子点(-h, 2h)のみが反射条件を満足するので垂直軸上の反射強度は2倍となる。これが第1番目の理由である。つぎに、微絨毛の方向は網膜中のどこでもきちんと2方向を向いているかと言うとそうではない。光学顕微鏡で観察すると、たしかに視細胞10個位の局所的範囲では方向がそろっているが、網膜試料全体では少しずつ方向がずれているのが分かる。つまり、微絨毛の方向は試料全体として見ると網膜に垂直な軸に関して回転して分布をもっている。実際、回転結晶の場合と同じLorentz補正を行うと、等価な反射の強度は一致した。これが第2の理由である。

図5を見ると、高角側の $(4\text{nm})^{-1}$ 付近に散漫な回折像が6つ認められる。強度スケールを変えて良く見ると、結晶性の反射点と散漫な回折とが重なったものである事がわかる。この散漫な回折は微絨毛が平均の格子点のまわりで揺らいでパッキングしているために現われていると思われる。そうだとすると、高角側では、結晶的サンプリングを受けていない1つの微絨毛による回折像が現われている事になる。この解釈が正しいとすると、散漫な回折像が六角形の頂点に位置するように配置しているので、微絨毛の形は六角形をしている事を示している。もし、微絨毛が円形であるとすると、円環状の散漫な回折像が現われるはずである。

## 7. 構造解析

図5に示した回折データから $(8\text{nm})^{-1}$ までの反射点について積分強度を求めて構造解析を行った。得られた回折強度をプロットしたものを図6(a)に示した。解析はモデルを立てて行った。図7に用いたモデルとその電子密度分布を示した。ただし、ここでは最終的に得られたものを示している。また、これから述べるモデルに使われているパラメータは微絨毛の直径以外は最適モデルで得られた値を用いている。

最初のモデルとして Saibilら<sup>6)</sup>が化学的に固定し

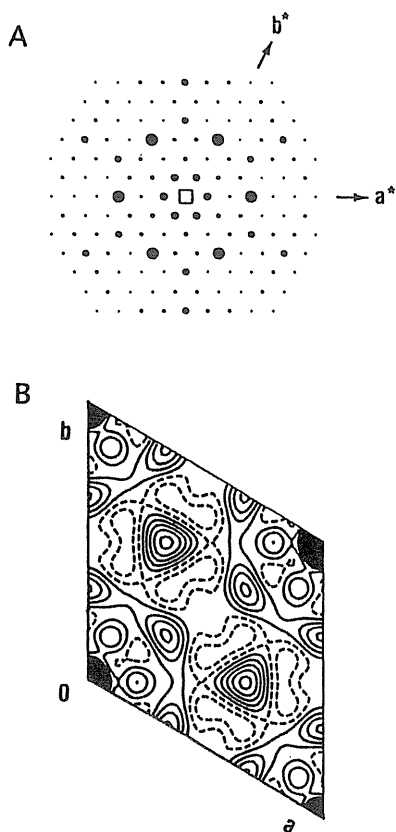


Figure.6 (a) Lorentz-corrected intensity map obtained from Figure 5. (b) The Patterson map obtained by the direct Fourier transform of the observed X-ray diffraction intensities up to  $(8\text{nm})^{-1}$ . Negative contours are shown as broken lines.

たイカ網膜について電子顕微鏡とX線回折で得たものを採用した。それは、図8(a)に示すような、中心に細胞骨格を持つ微絨毛モデルとしたが微絨毛間にはほとんど隙間のないものであった。また、Saibilらは、浸透圧を上げて作った試料の電子顕微鏡像では微絨毛間に何か構造体が見られるけれど、X線回折強度には寄与しない程度のものであると述べているので、出発のモデルでは除いて考えた。しかし、図8(b)から分かるように、このモデルについて計算した回折強度は実測の回折強度とはかなり異なるものであった。回折強度の計算値と実測値の一致の度合は  $R = \frac{\sum |F_o| - |F_c|}{\sum |F_o|}$  で定義されるR-因子を目安にした。ここで、 $F_o$ および $F_c$ はそれぞれ構造因子 ( $|F| = I^{1/2}$ ;  $I$ は回折強度) の実測値と計算値である。そこで、図9(a)に示すように微絨毛の直径を小さくしてみると定性的には良い方向に進み、R-因子も下がったけれど、まだ、一致は悪い(図9(b))。

いろいろとパラメータの値を変えて見たが良い結果が得られないので、次に示すような Patterson 関数を計算してみた。

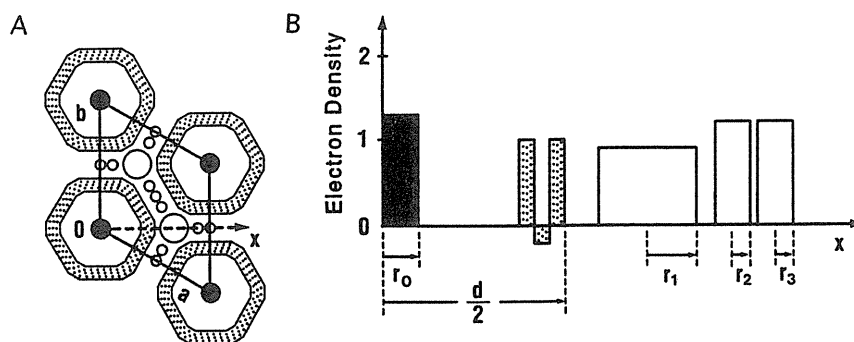


Figure.7 Model construction of the photoreceptor outer segments. A: The cross section of the rhabdome, in which the microvillar membrane (dotted hexagon), cytoskeleton core (filled circle) and inter-microvillar material (open circle) are positioned in a hexagonal lattice. B: The electron density profile approximated by step functions, along the dashed line in A. The microvillar membrane is assumed to have the bilayer electron distribution. The zero level of electron density is set at the aqueous medium and the relative electron densities are normalized to that of the hydrophilic region of the bilayer profile. In the following models,  $r_0=4.6\text{nm}$  (1.3),  $r_1=6.2\text{nm}$  (0.9),  $r_2=2.4\text{nm}$  (1.2) and  $r_3=2.4\text{nm}$  (1.2), where the figure in parentheses stands for the relative electron density. The electron density in the hydrophobic trough of bilayer membrane is close to the zero.

$$P(x, y) = \sum I(h, k) \cos(2\pi(hx + ky))$$

$$= \int \rho(u, v) \rho(u + x, v + y) du dv$$

ここで、 $I(h, k)$  は回折強度を、 $\rho(x, y)$  は電子密度分布を表わす。Patterson関数は回折強度を直接に Fourier変換したものであるから、強度データと同一の情報を含んでいる事になるが、実空間で情報を引き出せる利点がある。しかし、上式から分かるように電子密度間の相関を表わすものであって直接に構造を示している訳ではない。それ故に、Patterson関数は低分子の結晶構造解析では大変に有用であるけれども、この様な構造で、しかも低分解能の場合に有効であるか疑問もあった。ところが、実際に計算してみると、もちろん直接にモデル構造を引き出すことは出来ないけれども、予想外に有用である事が分かった。Patterson関数の様子はモデルのパラメータを変えると敏感に変化した。また、図8で考慮しなかった構造体の存在も明確に示された。

図6(b)に実測の回折強度から得られた Patterson関数を示した。図9(c)に示したモデル Patterson関数と実測の Patterson関数とを比べて著しく違う点は、実測のものでは  $(1/3, 2/3)$  および  $(2/3, 1/3)$  の位置に高いピークが存在するのに、モデルの方では見られない事である。この結果は  $(1/3, 2/3)$  および  $(2/3, 1/3)$  の位置に微絨毛間物質が存在することを示している。実際、図10(a)に

示すように  $(1/3, 2/3)$  および  $(2/3, 1/3)$  に構造体を置いたモデルは実測の Patterson関数を定性的に説明する。しかし、まだ一致は十分とは言えず、R-因子も高い値を示している。特に、原点付近のピークはうまく説明がついていない。そこで、微絨毛間物質として図11(a)に示したような少し複雑な構造を考えて見たところ、Patterson関数も回折強度の一致もかなり良い結果が得られた。

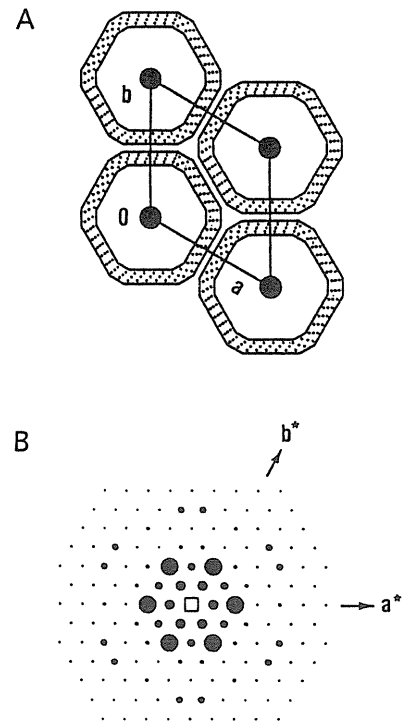


Figure.8 (a) The initial model consists of microvillar membranes and cytoskeletons.  $d=61.5\text{nm}$ . (b) The diffraction intensity map calculated from this model.  $R=0.73$ .

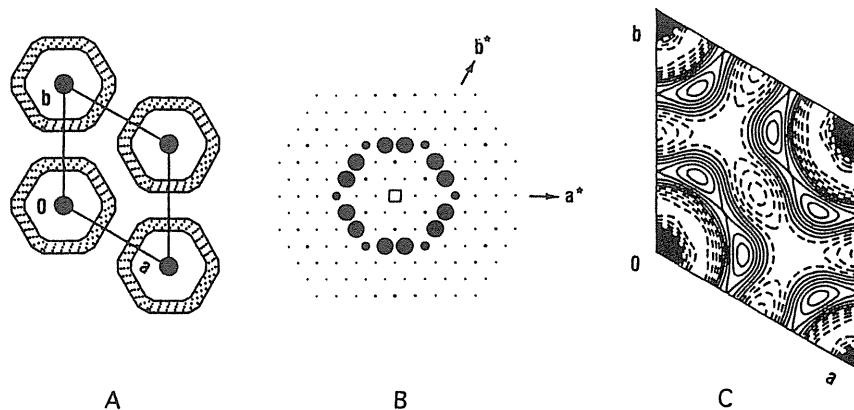


Figure.9 A: The model without the inter-microvillus material but with smaller microvillar membranes than Figure 8.  $d=50.6\text{nm}$ . The diffraction intensity map (B) and the Patterson map (C) calculated based on the model (A).  $R=0.69$ .



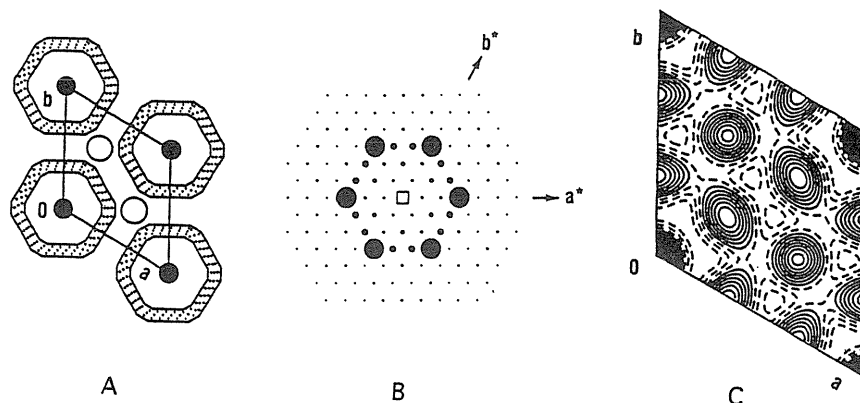


Figure.10 The diffraction intensity map (B) and the Patterson map (C) calculated from the model (A) in which the inter-microvillous material is considered. The diameters of microvilli are the same as Figure 9.  $R=0.57$ .

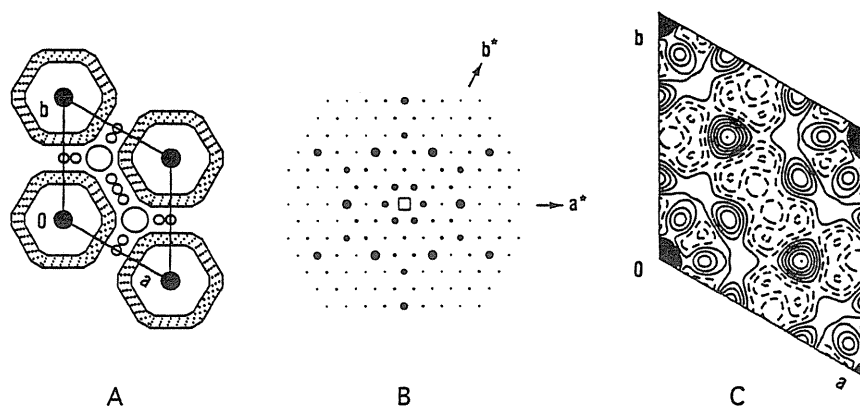


Figure.11 The diffraction intensity map (B) and the Patterson map (C) of the best-fit model (A), having a complicated structure for the inter-microvillous material. The diameters of microvilli are the same as Figure 9.  $R=0.13$ .

微絨毛の直径を変えると Patterson関数がどの様  
に変わるかを示す例を図12に示した。(a)は図11  
のモデルより微絨毛の直径が2nm大きく、(b)は  
2nm小さくした場合である。これから、2nm変え  
ただけで Patterson関数の様子は大きく変わり、R  
-因子の値も変わる事が分かる。

次に、微絨毛のモデルとして、六角形とした場  
合と円形の場合との比較について述べる。ただ  
し、六角形と言っても、微絨毛膜の厚みを出来る  
だけ一定にしようとする、これまで示したモデ  
ルから分かるように正確には12角形となってお  
り、円形とあまり違いのないものとなっている。  
図13に円形微絨毛モデルに対して得られた結果を  
示した。Patterson関数も回折強度もモデルのパ  
ラメータに強く依存するので単純に比較できない点

もあるが、ここで示した結果は回折強度も Patter-  
son関数も共に実測のものと最も良い一致を示した  
モデルに関するものである。この結果からは、6  
角形モデルと円形モデルではあまり違いが無いよ  
うに思われる。しかし、(2, 2) 反射の強度を比  
べた場合、六角形モデルの方が実測の強度との一  
致は良い。また、(0, k) 反射において  $k=4$  以  
上の反射の実測強度はほとんど0に近い。円形モ  
デルの方が六角形モデルより2~5倍強くなってお  
り、この点でも六角形モデルの方が良さそうであ  
る。

このX線構造解析で得られた重要な結果として  
2つの事が言える。1つは、微絨毛間に12nm位の  
隙間があると言う事である。これはナトリウムイ  
オンが視細胞の内節から外節に向かって流れ、そ

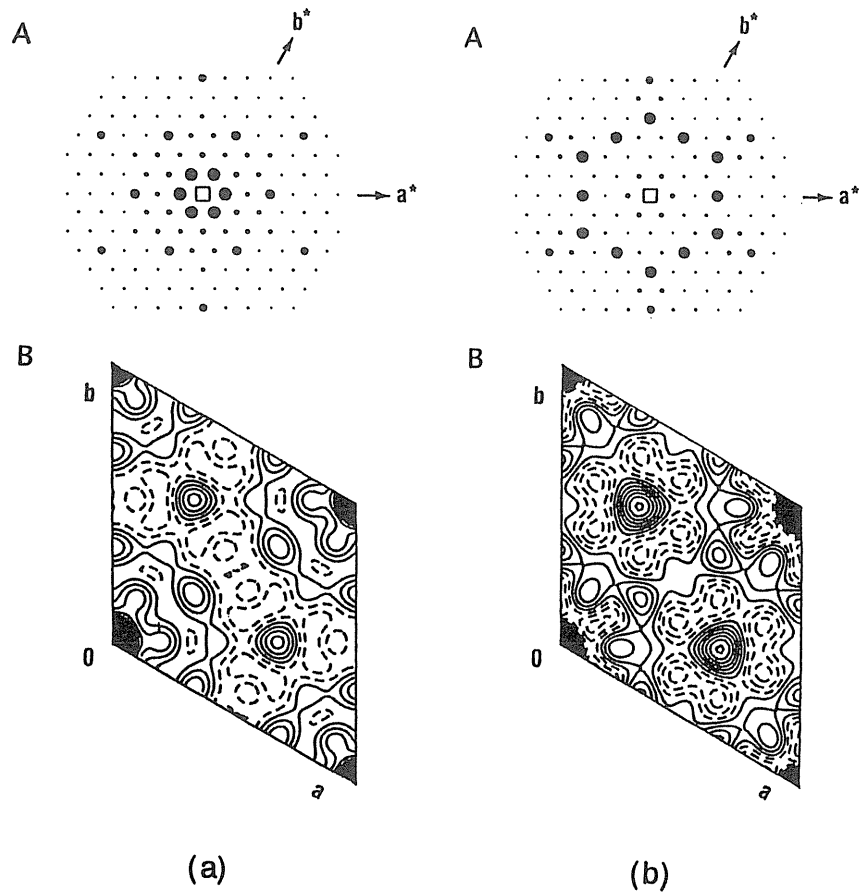


Figure.12 Dependences of the diffraction intensity (A) and the Patterson map (B) on the size of microvilli. (a)  $d=52.8\text{nm}$  and  $R=0.28$ . (b)  $d=48.5\text{nm}$  and  $R=0.29$ . Other parameters are the same as Figure 11.

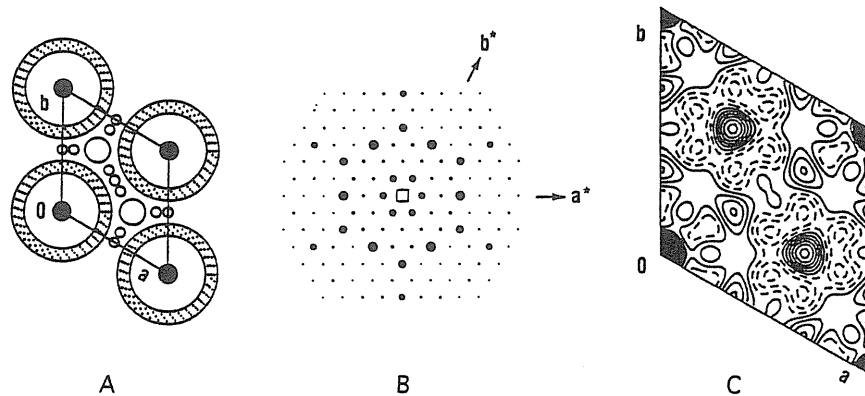


Figure.13 The circular microvillar membrane model with a microvillus diameter of 49 nm which corresponds to the hexagonal one shown in Figure 11.  $R=0.15$ .

ここで細胞内に流れ込んでいる事実から期待されていた事である。しかし、化学固定した試料についてなされた電子顕微鏡やX線回折による研究はほとんど隙間の無い構造を示していた<sup>6)</sup>。この結果は、生きた細胞について生理的条件下で研究する事がいかに重要であることを教えてくれるものであ

る。2つ目には、微絨毛間にかなりの質量を持った構造体の存在が明確に示された事である。現在のところ、この構造体がどのような物質から出来ており、どのような機能を果たしているのかは全く分かっていない。今後、明らかにされなければならない重要な問題が出されたと思っている。

## 8. 視物質は結晶配列を取っているか？

イカやタコは昆虫など他の無脊椎動物と同様に偏光を識別する能力があるとされている<sup>17)</sup>。実際、電気生理学的研究で微絨毛の長軸に平行に偏向した光と垂直に偏向した光で電氣的応答が異なる事が見いだされている<sup>18)</sup>。また、動物によってはその偏光比が2を越える場合も報告されている。図1や図2で示したように微絨毛は細胞体から反対向きの2方向に突き出しており、互いに隣り合う細胞から出ている微絨毛は直角になっている。それ故、もし、微絨毛自身に直線2色性(光吸収の異方性)があるとすれば偏光の方向は決まる事になる。つまり、互いに直角に微絨毛を出している2つの視細胞からの信号を比べる事は、アナライザーを90°回転して測定する事になっている。次に、視物質は微絨毛膜の膜面に垂直な軸に対して一定の向きを取っていると思われる。もし、図14(a)に示すように視物質が膜面に垂直な軸の回りで自由に回転しようとする時、したがって、発色団の遷移モーメントの向きが垂直軸に関してランダムな分布をしているとすると、微絨毛の長軸方向の光吸収とそれに垂直な方向の光吸収との比である直線2色性の値は最大2となる。しかし、図14(b)のように、遷移モーメントが微絨毛の長軸に平行になるように向いて分布しているとすると直線2色性は2を越えた値となりうる。それ故に、偏光比が2以上の値を与える網膜では微絨毛中で視物質は高い規則性を持って配列しているのでは無いかと考えられている。実際、電子顕微鏡による研究で視物質は結晶配列していると言う報告もある<sup>19)</sup>。また、Saibilら<sup>9)</sup>は化学固定した試料のX線回折像に鋭いストリーク状の反射が(5nm)<sup>-1</sup>付近に見られるので、視物質は高い規則構造を持って配列していると述べている。しかし、我々が生きた視細胞から得たX線回折像(図5)にはそのような反射は認められない。また、我々がグルタルアルデヒドで固定した試料から得たX線回折像にもしばしば鋭いストリーク状の反射が見られた事か

ら、この反射は化学固定した事で生じたアーティファクトと考えられる。我々のデータからは視物質は微絨毛中で結晶配列していないと思われる。

## 9. 光照射に伴う構造変化

Youngはイカやタコの網膜に定常光を照射しながら光学顕微鏡で観察していると厚みが減少する事を見出した<sup>20)</sup>。また、Tasaki and Nakayeはプローブとして小さな重り(針)を網膜にのせて、フラッシュ光を照射した後の重りの位置の変化を電氣的に検出する事によって網膜の厚みを測った<sup>21)</sup>。その結果、フラッシュ光を照射後の約50msの間は網膜の厚みが増し、その後の100ms位の間は逆に厚みが減少する事を見出した。彼らは最初の50msに起こっている現象は視細胞の興奮と直接に結び付いていると解釈している。また、Tsukitaらは急速凍結法を用いた電子顕微鏡による観察から、光照射によって微絨毛の中心に存在する細胞骨格が乱れた構造になると報告している<sup>22)</sup>。

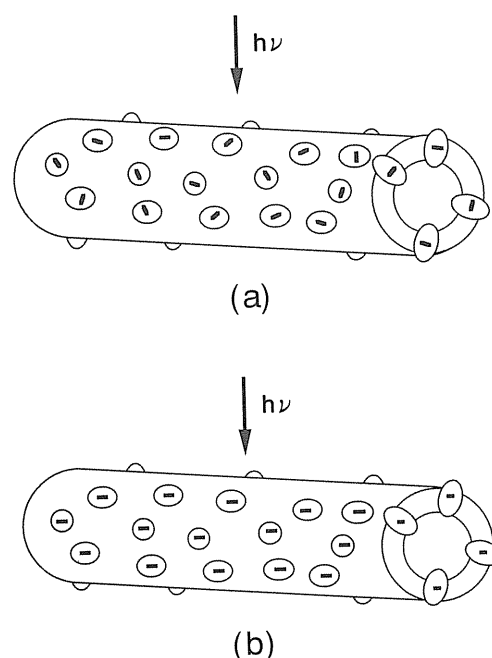


Figure 14 Alignment of visual pigment chromophores in photoreceptor microvilli. A heavy line within circle shows the transition moment of chromophore. (a) Chromophores can freely rotate about an axis perpendicular to the microvillar membrane plane. Dichroic ratio < 2: 1. (b) Chromophores align parallel to the microvillar axis. Dichroic ratio > 2: 1.

生の状態の試料を用いてX線回折実験を行うと、化学固定などによるアーティファクトをさける事が出来るほかに、光照射に伴う構造変化を調べる事が出来るという大きな利点がある。図15に同一試料について暗下と定常光照射下で得られたX線回折像を示した。この場合、光照射に伴って反射の位置が中心に寄っているので格子定数が大きくなっていると言える。また、特に高角側で反射がぼけているので結晶格子に乱れが生じている事が分かる。しかし、試料によって格子定数は光照射によって大きくなる場合と小さくなる場合の2通りが見られた。実験は全く同一条件で行っていると思っているので、現在のところ、この違いが出て来る原因は分かっていない。

#### 10. おわりに

これまで、イカの視細胞の構造に関してX線回折法による研究は3つほどあったが、圧倒的に電子顕微鏡によって行われてきた。しかし、いずれの場合も試料は化学的に固定されたものが用いられてきた。さらに、電子顕微鏡の場合は重原子で

染色した像をみている。したがって、得られた構造は試料作製の条件に左右される。最近、発達した急速凍結法はかなり生に近い状態の構造を見ていると言われており、実際、これまで見えなかった構造が鮮明に見えてきたという報告もある<sup>23)</sup>。また、我々の結果と一致して微絨毛間に隙間が存在する事も観察されている。しかし、瞬時に凍結するのは網膜の表面から20-30 $\mu\text{m}$ 位までであり、その辺の微絨毛の配列は規則性が悪いと言われている。また、この場合も染色した試料を見ているという問題もある。

生きた状態のイカ視細胞のX線回折法による研究はこれが初めてであって、まだ初期の段階にあると言える。また、X線回折法では直接に実像を見ている訳では無いので、回折データが得られても構造を出すには色々困難が付きまとう。それでも、上述したように微絨毛間にけっこう隙間が開いていてナトリウムイオンの流れが可能で有る事や微絨毛間にかなりの質量を持った構造体が存在する事が明確に示されるなど重要な知見が得られた。さらに、光照射によって構造変化が起こっている事も捉えられた。また、この研究を通じて、あらためてPatterson関数の有用性を認識した。今後は、急速凍結法を用いた電子顕微鏡による研究と相補的に行うことによって、より生理学と結びついた構造研究へと進んで行きたいと思っている。

ホタルイカを材料とする実験を行う事で、これまで考えても見なかった問題に出会った。ホタルイカは富山湾で取れたものを高エネルギー物理学研究所まで運んで使用している。ホタルイカの漁は3月から7月まで行われるが、田んぼに水が入る5月には海の水が汚れだすし海面の温度も上がるので、実験に使える元気なホタルイカが得難くなる。したがって、実験は3月下旬から5月上旬の間に行わなければならない。また、マシントイムが近づくと何時も、富山地方の天候が悪くてホタルイカが手に入らない事態が起こるのでは無いかと言う

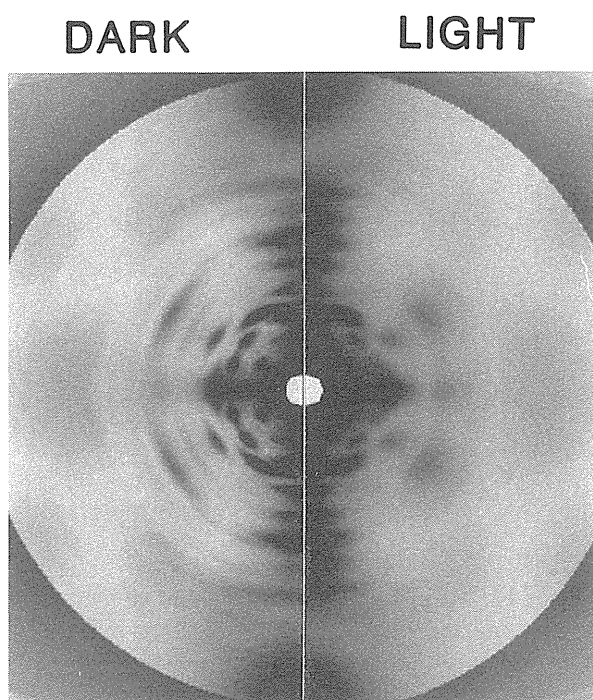


Figure.15 X-ray diffraction patterns in the dark (left) and light (right).

心配で非常に緊張する。さらに、網膜は非常に弱い組織のようで、ホタルイカは一見元気に泳いでおり、かつ手でつかむと光を発するにもかかわらず、解剖してみると網膜は白っぽく濁っていて柔らかくなっている事が時々ある。そのような時は、極めて結晶性の悪いX線回折像しか得られない。

しかし、ホタルイカは色々な意味で魅力のある生き物である。最近、ホタルイカの第4腕中の発光器に直接X線を当てたところ、粉末結晶に由来するリング状の鋭い回折線がえられた。かなり以前から、発光器には大きさが数 $\mu\text{m}$ の結晶様体と呼ばれるものが多数存在する事が知られていた。我々の実験は確かにそれは微結晶の集まりである事を明らかにした。格子定数は10nmを越える事から、恐らく蛋白結晶では無いかと考えている。また、吸収スペクトルからルシフェリンを結合して貯蔵する蛋白質では無いかと思っている。ルシフェリンはルシフェラーゼと呼ばれる酵素に基質として結合して発光に与かっている。残念ながら、現在のところは回折線に重なりがあって空間群も決定するには至っていない。ちなみに、この微結晶は発光器から取り出して10分もしないうちに消失する厄介なものである。今後も、受光と発光の両方の機構に目をやりながらホタルイカと付き合い行こうと思っている。

ここで述べた研究で、共同実験者として若林克三氏(阪大・基礎工)、雨宮慶幸氏(PF)および道之前允直氏(甲南大・理)に協力して頂きました。ここに記して感謝の意を表わします。また、本研究はPF共同利用実験(研究課題87-040および89-062)として進められました。

## 文献

- 1) A. E. Blaurock and M. H. F. Wilkins, *Nature (London)* **223**, 906 (1969).
- 2) C. R. Worthington, *Annu. Rev. Biophys. Bioeng.* **3**, 53 (1974).
- 3) M. Chabre, *Biochim. Biophys. Acta* **382**, 322 (1975).
- 4) C. R. Worthington, S. K. Wang and C. M. Folzer, *Nature (London)* **262**, 626 (1976).
- 5) H. R. Saibil, *J. Mol. Biol.* **158**, 435 (1982).
- 6) H. Saibil and E. Hewat, *J. Cell Biol.* **105**, 19 (1987).
- 7) T. Hamanaka, Y. Kito, M. Seidou, K. Wakabayashi and Y. Amemiya, in *Structures and Functions of Retinal Proteins*, edited by J. L. Rigaud. (John Libbey Eurotext Ltd., Montrouge, 1992) 37.
- 8) T. Hamanaka, Y. Kito, M. Seidou, K. Wakabayashi M. Michinomae and Y. Amemiya, *J. Mol. Biol.* **238**, 139 (1994).
- 9) T. Hamanaka, Y. Kito, M. Seidou, K. Wakabayashi and Y. Amemiya, *Photon Factory Activity Report* **7**, 131 (1989).
- 10) J. Bacigalupo, E. Johnson, P. Robinson and J. E. Lisman, in *Transduction in Biological Systems*, edited by C. Hidalgo et al. (Plenum Publishing Co., 1990).
- 11) S. Yarfitz and J. B. Hurley, *J. Biol. Chem.* **269**, 14329 (1994).
- 12) W. A. Hagins, H. V. Zonana and R. G. Adams, *Nature (London)* **194**, 844 (1962).
- 13) L. H. Pinto and J. E. Brown, *J. Comp. Physiol.* **122**, 241 (1977).
- 14) 鬼頭勇次, 清道正嗣, 成田欣弥, 道之前允直, *日経サイエンス* **1**, 30(1992).
- 15) Y. Amemiya, K. Wakabayashi, T. Hamanaka, T. Wakabayashi, T. Matsushita and H. Hashizume, *Nucl. Instrum. Methods* **208**, 471 (1983).
- 16) Y. Amemiya, T. Matsushita, A. Nakagawa, Y. Satow, J. Miyahara and J. Chikawa, *Nucl. Instrum. Methods* **A266**, 645 (1988).
- 17) W. M. Saidel, J. Y. Levttvin and E. F. MacNichol, *Nature (London)* **304**, 534 (1983).
- 18) K. Tasaki and K. Karita, *Nature (London)* **209**, 934 (1966).
- 19) D. E. Cincotta and W. L. Hubbell, *Invest. Ophthalm. Visual Sci.* **16** (Suppl.) 165 (1977).
- 20) J. Z. Young, *Proc. Zool. Soc. London* **140**, 255 (1963).
- 21) I. Tasaki and T. Nakaye, *Science* **223**, 411 (1984).
- 22) S. Tsukita, S. Tsukita and G. Matsumoto, *J. Cell Biol.* **106**, 1151 (1988).
- 23) J. P. Walrond and E. Z. Szuts, *J. Neurosci* **12**, 1490 (1992).
- 24) P. J. Herring, *The Mollusca* (Academic Press Inc., 1988) **11**, 449.

## きいわーど

### 視物質 (visual pigment)

視物質は視細胞の細胞膜中に存在して光受容を行う蛋白質分子である。この蛋白質の分子量は多くは約 40,000 であるが、頭足類のイカやタコでは約 50,000 である。脊椎動物の桿体細胞 (rod cell) に存在する視物質は紅色 (rhod) をした蛋白質 (opsin) なのでロドプシン (rhodopsin) と呼ばれている。視覚は視物質による光吸収を引き金として起こる。光吸収は視物質の持つ発色団の共役 2 重結合鎖の  $\pi$  電子の励起と言う形で行われる。この発色団として吸収極大波長の異なるレチナール (ビタミン A アルデヒド), 3-デヒドロレチナール, 3-ヒドロキシレチナールおよび 4-ヒドロキシレチナールの 4 種類の存在が知られている。発色団は視物質のリジン残基とプロトン化 Schiff 塩基結合している。非プロトン化 Schiff 塩基の場合は 370nm に吸収極大波長

があるが、プロトン化によって 440nm に移る。さらに蛋白質との相互作用によって 400~600nm の範囲に分布する。このように、視物質の吸収極大波長は発色団の種類を変える事と発色団と蛋白質部分との相互作用を変える事で違ったものになっており、環境光に合うように調節されていると考えられている。ところで、視物質の発色団は光を吸収すると 11-シス型からトランス型に立体異性化する。この変化によって蛋白質部分に構造変化が引き起こされてメタと呼ばれる中間体になる。この状態で視物質は GTP 結合蛋白質に酵素活性を起こさせる。この様にして、視物質による光受容と言う信号は化学的信号に変換され、いくつかの酵素反応を経て視細胞電位という電気的信号の発生につながる。