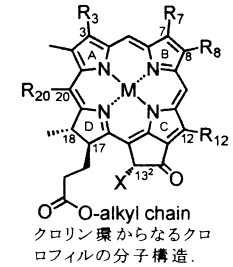


論文内容の要旨

氏名	平井友季		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	理第65号		
学位授与の日付	平成23年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	Physicochemical study on demetalation of natural chlorophylls and synthetic chlorophyll derivatives (天然クロロフィルと合成クロロフィル誘導体の脱金属反応の物理化学的研究)		
論文審査委員(主査)	教授	柏村成史	
(副主査)	教授	黒田義孝	
(副主査)	教授	山口仁宏	
(副査)	准教授	佐賀佳央	

天然に存在するクロロフィルは3種類の環状のテトラピロール骨格を有し、この環骨格周辺に異なる置換基を持つ。そのためクロロフィル分子は非常に多様な分子構造からなる(右図)。光合成生物は細菌から高等植物まで多種多様であるが、酸素発生型光合成生物に広く存在するのがクロリン環からなるクロロフィル(Chl) *a* である。Chl *b* と Chl *d* は Chl *a* 分子とただ一箇所の置換基のみが異なり、それぞれ7位または3位にホルミル基を有する。また、緑色黄光合成細菌の集光色素として存在するバクテリオクロロフィル(BChl) *c, d, e* 分子もクロリン環からなる。これらのBChl分子は7位または20位に異なる置換基を有しており、BChl *c* と BChl *d* の7位がメチル基であるのに対し、BChl *e* の7位はホルミル基である。また、BChl *c, e* は20位にメチル基を有している。さらに、これらには3'位の立体配置が異なるエピマーと、8位と12位のアルキル基が異なる同族体の異性体混合物として存在している。天然に存在するクロリン環からなるクロロフィル分子は中心にマグネシウムが配位し、大きなπ電子系を有しており、光機能性素子として光合成器官内で重要な役割を担っている。



クロロフィルは年間に十億トン以上も生合成・分解されており、クロロフィル分解は地球上で最も大きなバイオマス変化の一つである。しかし、クロロフィルの生合成に関する研究が盛んに行われているのに対し、クロロフィル分解は未解明な点が多く残されている。生体内でのクロロフィル分解初期過程は、17位の長鎖アルキル基の切断(酵素による加水分解反応)と中心金属の脱離(脱金属反応)である。17位の長鎖アルキル基が切断されても可視吸収スペクトルは変化しないのに対し、脱金属反応は可視吸収スペクトルの変化をとらなう。クロロフィル分子の光機能性素子として役割を担うためにも中心金属は重要な要素の一つであるため、クロロフィルの脱金属反応はクロロフィル分解初期過程において鍵となる段階である。しかし、その機構の詳細は明らかではない。また、分子構造の多様性をもたらす分解特性に関する知見はあまりない。これらのことから、本研究ではクロロフィルの脱金属反応に着目し、分子構造に依存した脱金属反応特性を調べることが目的とした。クロリン環からなる天然クロロフィル分子とこれらの代謝中間体、およびモデル化合物の脱金属反応を行い、分子構造との相関関係、特にホルミル基に着目し解析した。

3種類の緑色硫黄光合成細菌 *Chlorobium(Chl.) tepidum*, *Chl. vibrioforme*, *Chl. phaeobacteroides* からそれぞれ BChl *c, d, e* を単離し、逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって異性体を単離した。Chl *a, b* はハウレン草から、Chl *d* は

*Acaryochloris marina* から単離した。

7 位にホルミル基を有する Chl *b* は 7 位がメチル基である Chl *a* から生成される。この 7 位変換経路はクロロフィルサイクル(Chl cycle)と呼ばれ、Chl *a* からヒドロキシメチル基を有する中間体(7<sup>1</sup>OH-Chl *b*)を介して Chl *b* へと可逆的に改変される。また、Chl *a* は 17-18 位炭素原子間が二重結合(ポルフィリン環でプロトクロロフィル(PChl)と呼ばれる)で、8 位にビニル基(8V)を有する中間体から生成される。そこで、これらの代謝中間体(7<sup>1</sup>OH-Chl *b*, PChl *a*, 8V-Chl *a*)の脱金属反応特性を天然物と比較した。続いて、天然物およびこれらの代謝中間体をモデル化したクロロフィル誘導体 1-6 の脱金属反応特性を調べた。化合物 1-3 は Chl *a*, 7<sup>1</sup>OH-Chl *b*, Chl *b* のモデル化合物で、化合物 4 は化合物 3 の類縁体として 8 位にホルミル基を有する。化合物 5 は Chl *d* モデル化合物(3 位にホルミル基をもつ)であり、化合物 4 のホルミル基位置異性体である。化合物 4 と 5 の対照化合物として 3 位と 8 位がエチル基である化合物 6 を用いた。

全てのクロロフィル分子は脱金属反応を行う直前に逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製し、25 °C に保ったアセトン/蒸留水(体積比 3/1)中に少量の塩酸を加えることで脱金属反応を行った。まず、クロロフィル分子の脱金属反応にともなう可視吸収スペクトルの経時変化を観測した。Chl *a* の場合、Soret 帯と呼ばれる 431 nm の極大吸収波長の吸光度が減少し、短波長側に新たな吸収帯(脱金属反応の生成物の吸収帯)の吸光度が増加した。また、664 nm に観られた Q<sub>y</sub> 帯の極大吸収波長の吸光度が減少し、500 から 600 nm 付近の小さな吸収帯の吸光度が増減した。そして、等吸収点が 420 nm、457 nm と 555 nm に観測された。天然クロロフィルおよびクロロフィル誘導体の脱金属反応において同様の傾向が観られた。そこで、本研究では、クロロフィル分子の Soret 帯の吸光度の減少率を追跡することで脱金属反応を速度論的に解析した。

各クロロフィル分子の Soret 帯の極大吸収波長の吸光度を一定時間毎に測定した。吸光度を下式(1)に従って対数に変換し経過時間に対してプロットした。

$$\ln[(A - A_{\infty}) / (A_0 - A_{\infty})] = -kt \quad (1)$$

$A$  はある反応時間  $t$  の吸光度を表し、 $A_{\infty}$  と  $A_0$  はそれぞれ反応終了時と反応前の吸光度を表す。全てのクロロフィル分子で直線が得られたため、本研究で行ったクロロフィル分子の脱金属反応は全て疑一次反応とみなした。これは、クロロフィル分子に対して水素イオンが大過剰の条件下で脱金属反応を行っており実験条件とも矛盾しない。よって、直線の傾きからクロロフィル分子の脱金属反応速度定数  $k$  を算出した。各クロロフィル分子の脱金属反応において、独立した 3 回以上の実験を行い平均値と

その標準偏差を求めた。全てのクロロフィル分子において再現性が得られた。

続いて、5-35 °C または 15-35 °C で脱金属反応を行い、各温度で得られた反応速度定数の平均値を絶対温度の逆数に対してプロットした。その結果、全てのクロロフィル分子において直線が得られた。よって、アレニウスの式(2)に従って各クロロフィル分子の脱金属反応の活性化エネルギー  $E_a$  を算出した。

$$\ln k = -(E_a / RT) + B \quad (2)$$

同一条件で測定したクロロフィル分子の脱金属反応特性( $k$ ,  $E_a$ )を比較した結果、ホルミル基を有することでクロロフィル分子は脱金属反応に耐性を示すことが明らかとなった。ホルミル基が脱金属反応特性に与える影響は、3 位、7 位、または 8 位とホルミル基の位置が異なっても観測された。また、ホルミル基が還元されたヒドロキシメチル基を有するクロロフィル分子は、ホルミル基による脱金属反応への高い耐性は示さなかった。また、3 位または 8 位において、エチル基を有するものよりもビニル基を有するクロロフィル分子のほうが脱金属反応に耐性を示した。単結合から二重結合になることで脱金属化されにくくなる傾向は、17-18 位炭素原子間においても示された。不飽和化やホルミル基による脱金属反応への耐性は電子的な効果に起因すると考えられる。また、BChl *c* 分子のエピマーや 8 位アルキル基が異なる同族体は同じ可視吸収スペクトルを示すにも関わらず脱金属反応速度定数に違いが観測された。これは置換基の電子的な違いを反映したのではなく、わずかな疎水性の違いによって微細な溶媒と構造が変化した可能性が考えられる。

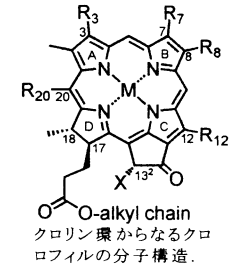
ホルミル基の電子吸引力はクロリン環内の電子状態に影響を与えると考えられる。そこで、7 位にホルミル基を有する BChl *e* と、7 位がメチル基である BChl *c* の <sup>15</sup>N NMR を測定し、クロリン環内の 4 つの窒素原子(N<sub>21</sub>-N<sub>24</sub>)の化学シフト値を比較した。その結果、<sup>15</sup>N 同位体標識した BChl *c* と BChl *e* では、ピロール B 環にある窒素原子の化学シフト値に有意の差があった。それに対して、その他の窒素原子の化学シフト値はほぼ同じであった。7 位とピロール B 環の窒素原子は直結していないにも関わらずこのような差が観測されたことから、電子吸引力の 7 位ホルミル基はクロリン環内の電子状態に影響を与えている可能性が示された。

以上、ホルミル基を有するクロロフィル分子は脱金属反応に耐性を明らかにした。この耐性は 3 位、7 位または 8 位にホルミル基を有するクロロフィル分子の脱金属反応において示されることを明らかにした。ホルミル基をもたないクロロフィル分子と比べてホルミル基を有するクロロフィル分子は、ホルミル基の電子吸引力によってクロリン環内の電子状態が変化したため脱金属反応が起りにくくなったことを示した。

論文内容の要旨

氏名	平井友季		
学位の種類	博士(理学)		
学位記番号	理第65号		
学位授与の日付	平成23年3月22日		
学位授与の要件	学位規程第4条第1項該当		
学位論文題目	Physicochemical study on demetalation of natural chlorophylls and synthetic chlorophyll derivatives (天然クロロフィルと合成クロロフィル誘導体の脱金属反応の物理化学的研究)		
論文審査委員(主査)	教授	柏村成史	
(副主査)	教授	黒田義孝	
(副主査)	教授	山口仁宏	
(副査)	准教授	佐賀佳央	

天然に存在するクロロフィルは3種類の環状のテトラピロール骨格を有し、この環骨格周辺に異なる置換基を持つ。そのためクロロフィル分子は非常に多様な分子構造からなる(右図)。光合成生物は細菌から高等植物まで多種多様であるが、酸素発生型光合成生物に広く存在するのがクロリン環からなるクロロフィル(Chl) *a* である。Chl *b* と Chl *d* は Chl *a* 分子とただ一箇所の置換基のみが異なり、それぞれ7位または3位にホルミル基を有する。また、緑色黄光合成細菌の集光色素として存在するバクテリオクロロフィル(BChl) *c, d, e* 分子もクロリン環からなる。これらのBChl分子は7位または20位に異なる置換基を有しており、BChl *c* と BChl *d* の7位がメチル基であるのに対し、BChl *e* の7位はホルミル基である。また、BChl *c, e* は20位にメチル基を有している。さらに、これらには3'位の立体配置が異なるエピマーと、8位と12位のアルキル基が異なる同族体の異性体混合物として存在している。天然に存在するクロリン環からなるクロロフィル分子は中心にマグネシウムが配位し、大きなπ電子系を有しており、光機能性素子として光合成器官内で重要な役割を担っている。



クロロフィルは年間に十億トン以上も生合成・分解されており、クロロフィル分解は地球上で最も大きなバイオマス変化の一つである。しかし、クロロフィルの生合成に関する研究が盛んに行われているのに対し、クロロフィル分解は未解明な点が多く残されている。生体内でのクロロフィル分解初期過程は、17位の長鎖アルキル基の切断(酵素による加水分解反応)と中心金属の脱離(脱金属反応)である。17位の長鎖アルキル基が切断されても可視吸収スペクトルは変化しないのに対し、脱金属反応は可視吸収スペクトルの変化をとまらう。クロロフィル分子の光機能性素子として役割を担うためにも中心金属は重要な要素の一つであるため、クロロフィルの脱金属反応はクロロフィル分解初期過程において鍵となる段階である。しかし、その機構の詳細は明らかではない。また、分子構造の多様性をもたらす分解特性に関する知見はあまりない。これらのことから、本研究ではクロロフィルの脱金属反応に着目し、分子構造に依存した脱金属反応特性を調べることが目的とした。クロリン環からなる天然クロロフィル分子とこれらの代謝中間体、およびモデル化合物の脱金属反応を行い、分子構造との相関関係、特にホルミル基に着目し解析した。

3種類の緑色硫黄光合成細菌 *Chlorobium(Chl.) tepidum*, *Chl. vibrioforme*, *Chl. phaeobacteroides* からそれぞれ BChl *c, d, e* を単離し、逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって異性体を単離した。Chl *a, b* はハウレン草から、Chl *d* は

*Acaryochloris marina* から単離した。

7 位にホルミル基を有する Chl *b* は 7 位がメチル基である Chl *a* から生成される。この 7 位変換経路はクロロフィルサイクル(Chl cycle)と呼ばれ、Chl *a* からヒドロキシメチル基を有する中間体(7<sup>1</sup>OH-Chl *b*)を介して Chl *b* へと可逆的に改変される。また、Chl *a* は 17-18 位炭素原子間が二重結合(ポルフィリン環でプロトクロロフィル(PChl)と呼ばれる)で、8 位にビニル基(8V)を有する中間体から生成される。そこで、これらの代謝中間体(7<sup>1</sup>OH-Chl *b*, PChl *a*, 8V-Chl *a*)の脱金属反応特性を天然物と比較した。続いて、天然物およびこれらの代謝中間体をモデル化したクロロフィル誘導体 1-6 の脱金属反応特性を調べた。化合物 1-3 は Chl *a*, 7<sup>1</sup>OH-Chl *b*, Chl *b* のモデル化合物で、化合物 4 は化合物 3 の類縁体として 8 位にホルミル基を有する。化合物 5 は Chl *d* モデル化合物(3 位にホルミル基をもつ)であり、化合物 4 のホルミル基位置異性体である。化合物 4 と 5 の対照化合物として 3 位と 8 位がエチル基である化合物 6 を用いた。

全てのクロロフィル分子は脱金属反応を行う直前に逆相高速液体クロマトグラフィー(HPLC)で精製し、25 °C に保ったアセトン/蒸留水(体積比 3/1)中に少量の塩酸を加えることで脱金属反応を行った。まず、クロロフィル分子の脱金属反応にともなう可視吸収スペクトルの経時変化を観測した。Chl *a* の場合、Soret 帯と呼ばれる 431 nm の極大吸収波長の吸光度が減少し、短波長側に新たな吸収帯(脱金属反応の生成物の吸収帯)の吸光度が増加した。また、664 nm に観られた Q<sub>y</sub> 帯の極大吸収波長の吸光度が減少し、500 から 600 nm 付近の小さな吸収帯の吸光度が増減した。そして、等吸収点が 420 nm、457 nm と 555 nm に観測された。天然クロロフィルおよびクロロフィル誘導体の脱金属反応において同様の傾向が観られた。そこで、本研究では、クロロフィル分子の Soret 帯の吸光度の減少率を追跡することで脱金属反応を速度論的に解析した。

各クロロフィル分子の Soret 帯の極大吸収波長の吸光度を一定時間毎に測定した。吸光度を下式(1)に従って対数に変換し経過時間に対してプロットした。

$$\ln[(A - A_{\infty}) / (A_0 - A_{\infty})] = -kt \quad (1)$$

$A$  はある反応時間  $t$  の吸光度を表し、 $A_{\infty}$  と  $A_0$  はそれぞれ反応終了時と反応前の吸光度を表す。全てのクロロフィル分子で直線が得られたため、本研究で行ったクロロフィル分子の脱金属反応は全て疑一次反応とみなした。これは、クロロフィル分子に対して水素イオンが大過剰の条件下で脱金属反応を行っており実験条件とも矛盾しない。よって、直線の傾きからクロロフィル分子の脱金属反応速度定数  $k$  を算出した。各クロロフィル分子の脱金属反応において、独立した 3 回以上の実験を行い平均値と

その標準偏差を求めた。全てのクロロフィル分子において再現性が得られた。

続いて、5-35 °C または 15-35 °C で脱金属反応を行い、各温度で得られた反応速度定数の平均値を絶対温度の逆数に対してプロットした。その結果、全てのクロロフィル分子において直線が得られた。よって、アレニウスの式(2)に従って各クロロフィル分子の脱金属反応の活性化エネルギー  $E_a$  を算出した。

$$\ln k = -(E_a / RT) + B \quad (2)$$

同一条件で測定したクロロフィル分子の脱金属反応特性( $k$ ,  $E_a$ )を比較した結果、ホルミル基を有することでクロロフィル分子は脱金属反応に耐性を示すことが明らかとなった。ホルミル基が脱金属反応特性に与える影響は、3 位、7 位、または 8 位とホルミル基の位置が異なっても観測された。また、ホルミル基が還元されたヒドロキシメチル基を有するクロロフィル分子は、ホルミル基による脱金属反応への高い耐性は示さなかった。また、3 位または 8 位において、エチル基を有するものよりもビニル基を有するクロロフィル分子のほうが脱金属反応に耐性を示した。単結合から二重結合になることで脱金属化されにくくなる傾向は、17-18 位炭素原子間においても示された。不飽和化やホルミル基による脱金属反応への耐性は電子的な効果に起因すると考えられる。また、BChl *c* 分子のエピマーや 8 位アルキル基が異なる同族体は同じ可視吸収スペクトルを示すにも関わらず脱金属反応速度定数に違いが観測された。これは置換基の電子的な違いを反映したのではなく、わずかな疎水性の違いによって微細な溶媒と構造が変化した可能性が考えられる。

ホルミル基の電子吸引力はクロリン環内の電子状態に影響を与えると考えられる。そこで、7 位にホルミル基を有する BChl *e* と、7 位がメチル基である BChl *c* の <sup>15</sup>N NMR を測定し、クロリン環内の 4 つの窒素原子(N<sub>21</sub>-N<sub>24</sub>)の化学シフト値を比較した。その結果、<sup>15</sup>N 同位体標識した BChl *c* と BChl *e* では、ピロール B 環にある窒素原子の化学シフト値に有意の差があった。それに対して、その他の窒素原子の化学シフト値はほぼ同じであった。7 位とピロール B 環の窒素原子は直結していないにも関わらずこのような差が観測されたことから、電子吸引力の 7 位ホルミル基はクロリン環内の電子状態に影響を与えている可能性が示された。

以上、ホルミル基を有するクロロフィル分子は脱金属反応に耐性を明らかにした。この耐性は 3 位、7 位または 8 位にホルミル基を有するクロロフィル分子の脱金属反応において示されることを明らかにした。ホルミル基をもたないクロロフィル分子と比べてホルミル基を有するクロロフィル分子は、ホルミル基の電子吸引力によってクロリン環内の電子状態が変化したため脱金属反応が起りにくくなったことを示した。

## 論文審査結果の要旨

本研究は、光合成において重要な役割を担っているクロロフィルの分解初期過程の主要反応のひとつである中心金属の脱離反応(脱金属反応)の物理化学的特性を詳細に解析し、分子構造との相関を解明した。自然界で高効率の太陽光エネルギー変換を行う光合成において重要な役割を担っているクロロフィルの代謝は地球上で最も大きなバイオマス変化の一つである。しかし、クロロフィルの生合成に関する研究が盛んに行われているのに対して、クロロフィル分解は未解明な点が多く残されている。そのなかで、本研究ではクロロフィル分解初期過程において鍵となる段階であるクロロフィルの脱金属反応に着目した。クロロフィル脱金属反応機構の詳細は明らかではなく、分子構造の多様性が分解特性に与える影響に関する系統的理解はあまり進んでいない。そこで、本研究ではクロロフィル分子構造に依存した脱金属反応の物理化学的特性を解明することを目的とし、クロリン環からなる天然クロロフィル分子とこれらの代謝中間体、およびモデル化合物を対象とした研究を行った。以下に本論文内容の審査要旨を示す。

自然界に存在するクロリン骨格を有する6種類のクロロフィルを高等植物やシアノバクテリア、緑色硫黄光合成細菌から単離し、生体外での詳細な速度論的解析を行った。また、クロロフィル代謝中間体である、ヒドロキシメチル基を有するクロロフィル(7<sup>1</sup>OH-Chl *b*)、17-18位炭素原子間が二重結合のプロトクロロフィル(PChl)、8位にビニル基を有するクロロフィル(8V-Chl *a*)を光合成生物からの単離やそれらの部分的改変で調製し、速度論的解析を行った。あわせて、天然クロロフィルのモデル化合物を有機化学的に調製し、解析を行った。これらの解析に際して実験条件の綿密な検討を行うことで、各クロロフィル分子の脱金属反応において非常に高い再現性を得ることに可能にした。また、脱金属反応の温度依存性を調べ、各クロロフィル分子において活性化エネルギーを求めることも成功した。その結果、クロロフィル分子の脱金属反応特性において、ホルミル基を有することでクロロフィル分子は脱金属反応に耐性を示すことを明らかにした。ホルミル基が脱金属反応特性に与える影響は、クロリン環に直結するホルミル基の位置が異なっても明確に存在することを示した。また、ホルミル基が還元されたヒドロキシメチル基を有するクロロフィル分子は、ホルミル基による脱金属反応への高い耐性を持たないことを明らかにした。あわせて、エチル基を有するクロロフィル分子よりもビニル基を有するクロロフィル分子のほうが脱金属反応に耐性を示すことを明らかにした。単結合から二重結合になることで脱金属化されにくくなる傾向は、17-18位炭素原子間においても存在することを示した。このような分子構造

の変化に依存した脱金属反応への耐性は電子的な効果に起因すると考察した。

クロロフィルに存在するホルミル基がクロリン環内の電子状態に与える影響を解析するため、窒素同位体(<sup>15</sup>N)を窒素源として緑色硫黄光合成細菌を培養し、<sup>15</sup>N原子が導入されたバクテリオクロロフィル *c* とバクテリオクロロフィル *e* を単離精製し、<sup>15</sup>N NMRを測定した。バクテリオクロロフィル *c* は7位にメチル基を有しているのに対して、バクテリオクロロフィル *e* は7位にホルミル基を有しており、その他の部分の構造が同じであるため、ホルミル基の影響を直接調べることが可能であった。両分子の<sup>15</sup>N NMR測定結果からクロリン環内の4つの窒素原子の化学シフト値を比較した結果、<sup>15</sup>N同位体標識したバクテリオクロロフィル *c* とバクテリオクロロフィル *e* では、ピロールB環にある窒素原子の化学シフト値に有意の差があることを明らかにした。それに対して、その他の窒素原子の化学シフト値はほぼ同じであることを示した。このことから、クロロフィルの7位の位置に存在する電子吸引性のホルミル基はクロリン環内の電子状態に影響を与えている可能性を明らかにした。

本研究で解明したクロロフィルの脱金属反応特性の分子構造依存性から、クロロフィル代謝に関する考察を行った。クロロフィルの脱金属反応の物理化学的特性は、自然界のクロロフィル分解や光合成反応中心の一次電子受容体形成などの生化学的現象と矛盾しないことを示した。

以上、本研究では天然クロロフィルやそれらの代謝中間体、およびモデル化合物の脱金属反応の詳細な物理化学的測定から、分子構造に依存したクロロフィル脱金属反応特性を明らかにした。とくに、クロリン環に直結したホルミル基は、クロロフィルに大きな脱金属反応の耐性を与えることを明らかにした。この耐性は3位、7位または8位にホルミル基を有するクロロフィル分子の脱金属反応において示されることを明らかにした。あわせて、クロロフィル脱金属反応特性に対する他の種類の置換基の影響も明らかにした。ホルミル基がクロロフィル脱金属反応特性に与える影響は、ホルミル基の電子吸引性によってクロリン環内の電子状態が変化したためである可能性を示した。

本研究で得られた成果は、光合成の主要色素であるクロロフィルの分子構造と反応特性の相関に関して重要な成果を挙げており高く評価されている。

以上のことから、本論文は博士(理学)の学位論文に充分値すると認められた。