

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23550201

研究課題名(和文)クロロフィル脱金属反応の精密解析と光合成超分子分解研究への展開

研究課題名(英文) Systematic Analysis of Demetalation Reactions of Chlorophylls and Degradation of Photosynthetic Supramolecules Induced by Chlorophyll Demetalation

研究代表者

佐賀 佳央 (SAGA, Yoshitaka)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：60411576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：光化学系II型の光合成反応中心の一次電子受容体の生成やクロロフィル代謝で重要な反応であるクロロフィル類の中心金属の脱離反応(脱金属反応)を生体外で速度論的に解析し、分子構造に依存した脱金属反応特性を明らかにした。また、クロロフィル脱金属反応によって緑色光合成細菌の主要な光捕集超分子であるクロロソーム型の色素集積超分子の分解を誘起し、その挙動を構成クロロフィル分子の脱金属反応特性に関する情報を取り入れて解析した。

研究成果の概要(英文)：Demetalation of chlorophylls is important in the formation of the primary electron acceptor in photosystem-II type photosynthetic reaction centers and the degradation processes of Chl molecules. To understand such important phenomena in photosynthesis, structure-dependent demetalation properties of various Chls were elucidated. Additionally, degradation behaviors of chlorosome-type supramolecules were analyzed based on demetalation properties of monomeric Chl molecules.

研究分野：複合化学

科研費の分科・細目：生体機能関連化学

キーワード：クロロフィル フェオフィチン 光合成 光合成細菌 脱金属反応 酸素発生型光合成生物

## 1. 研究開始当初の背景

太陽光エネルギーを化学エネルギーに変換する光合成超分子システムでは、クロロフィルなどの色素分子が精密に配置され、高効率の可視光エネルギー変換を実現している。クロロフィルは光機能性部位として環状テトラピロール骨格を有しており、その中心には一般的にマグネシウムが配位している。しかし、クロロフィルの中心金属が脱離した分子であるフェオフィチンが光合成機能発現やクロロフィル代謝で重要となる場合がある。例えば、光化学系 II (PS II) タイプの光合成反応中心では、電子伝達系における一次電子受容体はフェオフィチン分子である。また、クロロフィル分解過程では、フェオフィチンタイプの分子は分解中間体として重要である。

しかし、このような生物学的重要性にも関わらず、クロロフィルの中心金属の脱離反応(脱金属反応)のメカニズムは不明である。多くの光合成生物の遺伝子情報が明らかになっている現在でもクロロフィル脱金属反応を触媒する酵素は存在そのものが不明であり非酵素的な反応である可能性があることから、分子構造に依存したクロロフィル類の脱金属反応特性を物理化学的な視点から明らかにすることは光合成系におけるクロロフィル脱金属反応の理解に資すると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、光合成で重要な役割を果たしているクロロフィル類の脱金属反応の物理化学的特性を生体外で精密に解析し、テトラピロール環の周辺置換基や環構造などに依存した反応特性を明らかにすることを第一の目的とした。

また、クロロフィル脱金属反応の物理化学的特性を基盤として、クロロフィル類が集積化した光合成超分子の安定性や分解挙動を調べる研究へ展開することを第二の目的とした。対象とする光合成超分子として、緑色光合成細菌の集光アンテナ超分子・クロロゾームを選択した。クロロゾームの光捕集部位はクロロフィル分子の自己組織化で形成されており、その超分子形成にはタンパク質は関与していない。このようなユニークな超分子構造は光合成研究分野のみならず超分子化学や光エネルギー変換化学などの研究分野でも興味をもたれている。しかし、クロロゾームの超分子分解機構や安定性には不明な点がある。そのような状況で、構成クロロフィル分子の脱金属によって誘起されるクロロゾーム型超分子の分解解析が行われているが、構成クロロフィル分子の詳細な脱金属反応特性をあまり考慮していないことが問題点のひとつであった。そこで、本研究で得られた精度の高い脱金属反応特性の情報を取り入れた超分子分解解析を行い、光合成超分子の動的挙動に関する研究への展開を

目指した。

## 3. 研究の方法

多様な分子構造を有するクロロフィル分子を対象とした脱金属反応の速度論的解析を行うために、テトラピロール環の周辺置換基や環構造が異なった天然クロロフィルを複数の光合成生物から単離精製した。また、テトラピロール環に直結した置換基の影響を系統的に調べるために、天然には存在しないタイプのクロロフィル誘導体を合成した。これらのクロロフィル類の脱金属反応を酸性条件で誘起し、紫外可視分光法によって反応を速度論的に解析した。また、反応物を高速液体クロマトグラフィー(HPLC)によって分析した。

また、構成クロロフィル分子の脱金属反応によって誘起されるクロロゾーム型超分子の分解挙動の解析を行うために、緑色光合成細菌からクロロゾームを単離するとともに、ミセル系でクロロフィル類を自己会合させたクロロゾーム型色素集積超分子を調製した。これらの超分子を酸性溶液中でインキュベートすることによる色素集積超分子の分解と構成クロロフィルの脱金属体の生成を紫外可視分光法と円偏光二色性分光法で解析した。

## 4. 研究成果

光合成生物から単離した天然クロロフィル、およびそれらから誘導した半天然クロロフィル類の脱金属反応の速度論的解析を行ったところ、脱金属反応速度はテトラピロール環に直結する置換基の電気陰性度に依存することを明らかにした。すなわち、自然界に最も多く存在するクロロフィル *a* の 3 位ピニル基のエチル基への変換やジピニルクロロフィル *a* の 8 位ピニル基のエチル基への変換は、テトラピロール環中心のマグネシウムの脱離を加速することを示した。また、クロロフィル *c* 関連の脱金属反応特性の比較では、17 位アクリル酸残基が同様に脱金属反応特性に影響を与えていることが明らかとなった。あわせて、クロロフィル *c* やプロトクロロフィル *a*、プロトクロロフィル *d* の光機能性部位であるポルフィリン環は、対応するクロリン環色素(クロロフィル *a* やクロロフィル *d*) に比べて脱金属反応が遅くなることが示され、テトラピロール環構造もクロロフィル類の脱金属反応特性を支配する要因であることを明らかにした。

天然クロロフィルを用いた研究のみでは対象とする分子構造の多様性に制限があることから、有機合成的手法で系統的に構造改変したクロロフィル誘導体を調製し、それらの脱金属反応特性を解析した。テトラピロール環の 3 位の置換基の電子吸引性・供与性を系統的に改変したクロロフィル誘導体の脱金属反応解析では、3 位置換基の相対的な電子吸引性の増加にしたがって脱金属反応が

遅くなった。これらのクロロフィル誘導体の脱金属反応速度定数と3位置換基のハメットシグマ値には良い相関があることを明らかにした。また、クロロフィル類の脱金属反応特性に与える置換基の位置の効果や相乗効果を調べるために、テトラピロール環のB環やC環の置換基を改変したクロロフィル誘導体を合成し脱金属反応特性を解析した。その結果、B環やC環に直結した置換基の電子吸引性・供与性が脱金属反応特性に与える影響がA環の置換基の場合と同様であることや、複数の置換基の影響は加算的に脱金属反応特性に影響を及ぼすことを示した。さらに、テトラピロール環構造が脱金属反応特性に与える影響を合成クロロフィル誘導体でも明確に示した。

クロロゾーム型超分子の酸性条件下での分解挙動解析では、クロロフィル類の脱金属反応によって誘起される超分子分解の挙動を追跡し、単量体レベルでの脱金属反応特性に依存した超分子分解挙動を明らかにした。また、脱金属反応特性が異なるクロロフィル誘導体を混合した状態での超分子は、脱金属反応を起こしにくいクロロフィルが酸性条件下でクロロゾーム型超分子を安定化する効果が示唆された。

本研究によって得られた研究成果は、これまでそれほど明確ではなかったクロロフィル分子構造と脱金属反応特性の相関を解明するとともに、そのような反応特性を考慮することでクロロフィル類で形成される超分子の分解挙動をさらに明確にすることが可能となった。これらの研究成果は、クロロフィル代謝や光合成超分子の動的挙動を理解するうえで有用な情報となると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計7件)

[1] 定岡香菜、大庭亨、民秋均、柏村成史、佐賀佳央、Demetalation kinetics of the zinc chlorophyll derivative possessing two formyl groups: effects of formyl groups conjugated to the chlorin macrocycle on physicochemical properties of photosynthetic pigments, *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 査読有、17巻、2013、pp.1120-1128、doi: 10.1124/S1088424613500788

[2] 定岡香菜、庄司淳、廣田圭耶、塚谷祐介、吉富太一、民秋均、柏村成史、佐賀佳央、Pheophytinization kinetics of chlorophyll *c* under weakly acidic conditions: effects of acrylic acid residue at the 17-position, *Bioorganic & Medicinal Chemistry*、査読有、21巻、2013、pp.6915-6919、doi: 10.1016/j.bmc.2013.09.032

[3] 佐賀佳央、丸子茜、定岡香菜、高橋直哉、Effects of the 13-keto group in the E-ring of zinc chlorophyll derivatives on demetalation kinetics under acidic conditions, *Chemistry Letters*、査読有、42巻、2013、pp.672-674

[4] 佐賀佳央、平井友季、定岡香菜、伊佐治恵、民秋均、Structure-dependent demetalation kinetics of chlorophyll *a* analogs under acidic conditions, *Photochemistry and Photobiology*、査読有、89巻、2013、pp.68-73、doi: 10.1111/j.1751-1097.2012.01213.x

[5] 佐賀佳央、小走裕太、定岡香菜、Systematic analysis of the demetalation kinetics of zinc chlorophyll derivatives possessing different substituents at the 3-Position: effects of the electron-withdrawing and electron-donating strength of peripheral substituents, *Inorganic Chemistry*、査読有、52巻、2013、pp.204-210、doi: 10.1021/ic3016782

[6] 佐賀佳央、民秋均、Demetalation of chlorophyll pigments, *Chemistry & Biodiversity*、査読有、9巻、2012、pp.1659-1683、doi: 10.1002/cbdv.201100435

[7] 佐賀佳央、三浦諒介、定岡香菜、平井友季、Kinetic analysis of demetalation of synthetic zinc cyclic tetrapyrroles possessing an acetyl group at the 3-position: effects of tetrapyrrole structures and peripheral substitution, *The Journal of Physical Chemistry B*、査読有、2011、115巻、pp.11757-11762、doi: 10.1021/jp206534x

[学会発表](計13件)

[1] 定岡香菜、庄司淳、塚谷祐介、吉富太一、民秋均、佐賀佳央、Demetalation Properties of Chlorophyll *c* Isolated from the Diatom *Chaetoceros gracilis*, 15th Congress of the European Society for Photobiology、2013年9月4日、P082、Liège, Belgium.

[2] 佐賀佳央、丸子茜、定岡香菜、高橋直哉、クロロフィル誘導体の脱金属反応に対するテトラピロール環外側の5員環構造の影響、第24回基礎有機化学討論会、2013年9月5日、学習院大学、東京、1P120.

[3] 定岡香菜、廣田圭耶、庄司淳、塚谷祐介、吉富太一、民秋均、佐賀佳央、*Chaetoceros gracilis* から単離したクロロフィル *c* の脱金属反応特性、第21回光合成の色素系と反応中心に関するセミナー、2013年7月6日、名古屋工業大学、名古屋、P-1.

[4] 定岡香菜、大庭亨、民秋均、佐賀佳央、クロロフィル類の脱金属反応特性に対するテトラピロール環置換基の影響

日本化学会第93春季年会、2013年3月24日、立命館大学、草津、3D510.

[5] 定岡香菜、民秋均、佐賀佳央  
Structure-Dependent Pheophytinization  
Properties of Natural Chlorophylls and Their  
Synthetic Analogs  
Second International Symposium on Biosynthesis  
of Tetrapyrroles、2012年12月1日、ST-3、  
Kusatsu, Japan.

[6] 佐賀佳央、定岡香菜、平井友季、伊佐治  
恵、小走裕太、三浦諒介、飯田康広、民秋均  
分子構造に依存したクロロフィル類の脱金  
属反応特性  
第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年  
9月6日、北海道大学、札幌、1A-08.

[7] 定岡香菜、大庭亨、福住高則、大島希、  
民秋均、佐賀佳央  
3,7-ジホルミルクロロフィル誘導体の合成と  
物性解析  
第6回バイオ関連化学シンポジウム、2012年  
9月7日、北海道大学、札幌、2P-016.

[8] 定岡香菜、平井友季、伊佐治恵、民秋均、  
佐賀佳央  
Kinetic Analysis of Demetalation of Chlorophyll  
*a* and Its Analogs: Effects of the Molecular  
Structures  
24th IUPAC Symposium on Photochemistry、  
2012年7月17日、PO127, Coimbra, Portugal.

[9] 佐賀佳央、定岡香菜、平井友季、伊佐治  
恵、民秋均  
クロロフィルの脱金属反応特性から考える  
光合成生物のフェオフィチン生成  
第20回光合成の色素系と反応中心に関する  
セミナー、2012年7月1日、大阪大学、豊中、  
O-12.

[10] 定岡香菜、平井友季、伊佐治恵、民秋均、  
佐賀佳央  
弱酸性条件における天然クロロフィル*a*とそ  
の類縁体の脱金属反応解析  
日本化学会第92春季年会、2012年3月25日、  
慶応義塾大学、横浜、1D204.

[11] 佐賀佳央、飯田康広、平井友季  
Demetalation Kinetics of Zinc Chlorophyll  
Derivatives Possessing Different Substituent at  
the 3-Position  
15th International Conference on Biological  
Inorganic Chemistry、2011年8月8日、85、  
Vancouver, Canada.

[12] Y. Saga, R. Miura, K. Sadaoka, Y. Hirai  
Demetalation Kinetics of Synthetic Zinc  
Bacteriochlorophyll, Chlorophyll, and  
Protochlorophyll Analogs

5th Asia and Oceania Conference on  
Photobiology、2011年7月31日、PS-9, Nara,  
Japan.

[13] 定岡香菜、佐賀佳央  
Physicochemical Properties of Formyl Groups in  
Natural Chlorophylls: Kinetic and Spectroscopic  
Analyses  
7th International Workshop on Supramolecular  
Nanoscience of Chemically Programmed  
Pigments、2011年6月11日、P28, Kusatsu,  
Japan.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐賀 佳央 (SAGA, Yoshitaka)

近畿大学・理工学部・准教授

研究者番号：60411576