

助成番号 0818

海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィルの分解挙動解析

佐賀 佳央

近畿大学理工学部理学科

概要 海洋性光合成微生物は海洋の二酸化炭素吸収や地球規模での物質循環の基礎となる光合成で重要な役割を果たしている。その光合成反応で主要な役割を担っているのがクロロフィル分子である。このような海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィル類は、海洋資源の食品利用の際に悪影響を及ぼす場合がある。とくに、海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィル類の分解産物であるフェオフォルバイドやピロフェオフォルバイドはヒトが摂取すると強い光毒性を発現することが報告されており、海洋資源の食品への利用においては注意が必要である。したがって、海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィルの分解挙動に関する知見は生物化学の基礎分野の発展に寄与するのみではなく、海洋資源に由来する食品製造の安全性確保の観点からも重要であると考えられる。そこで本研究では、最近発見された海洋性光合成微生物アカリオクロリスの主要色素クロロフィル *d* と、多くの海洋性光合成微生物の主要色素クロロフィル *a* を研究対象とし、これらの分解初期過程および分解産物の物性を解析することを目的とした。特にクロロフィル *d* を含むアカリオクロリスは1996年の発見から間もないため、その物性や分解挙動は不明な点が多い。そこで、クロロフィル *d* の重要な分解初期過程である脱金属反応の物理化学的な解析を行い、クロロフィル *a* やクロロフィル *b* の脱金属反応特性と比較した。その結果、3位にホルミル基を有するクロロフィル *d* は同じ部位にビニル基を有するクロロフィル *a* と比較して脱金属反応速度が遅かった。しかし、その反応速度定数は7位にホルミル基を有するクロロフィル *b* よりも大きいことが示された。クロロフィル環に直結するホルミル基が脱金属反応に与える影響を分子構造の観点から調べるために、窒素同位体 (^{15}N) が光合成微生物の生育段階でクロロフィル分子に導入しやすい緑色硫黄光合成細菌の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* を用いた実験を行った。その結果、7位にホルミル基を有するバクテリオクロロフィル *e* は7位にメチル基を有するバクテリオクロロフィル *c* に比べて脱金属反応速度が遅かった。また、核磁気共鳴分光からクロロフィル環に直結するホルミル基が環の電子構造に影響を与えることで脱金属反応速度を遅くすることが示された。また、クロロフィル分解産物の光毒性を調べる方法論を開発するため、藍藻から抽出したクロロフィル *a* を出発原料とし、クロロフィル *a* とクロロフィル *d* の主要分解産物およびその誘導体を合成し、その物性を調べた。

1. 研究目的

海洋にはさまざまな光合成生物が存在し、海洋の二酸化炭素吸収や地球規模での物質循環の基礎となる光合成で重要な役割を果たしている。そのような大規模で重要な反応である光合成で主要な役割を担っているのがクロロフィル分子である。海洋性光合成微生物に主に含まれるクロロフィル色素であるクロロフィル *a* とクロロフィル *d* の分子構造を **図1** に示す。このような海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィル類は、海洋資源の食品利用の際に悪影響を及ぼす場合がある。とくに、海洋性光合成微生物

物に含まれるクロロフィル類の分解産物であるフェオフォルバイド *a* やピロフェオフォルバイド *a* (これらの分子構造を **図2** に示す)はヒトが摂取すると強い光毒性を発現することが報告されており、海洋資源の食品への利用においては注意が必要である。したがって、海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィルの分解挙動とその過程で発生する分解産物の物性に関する知見は生物化学の基礎分野の発展に寄与するのみではなく、海洋資源に由来する食品製造の安全性確保の観点からも重要であると考えられる。

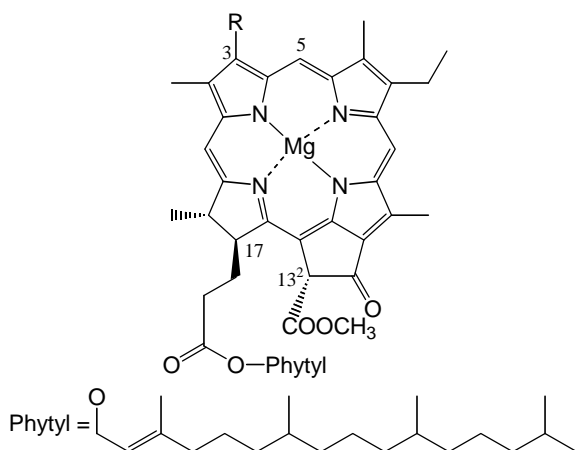


図1. クロロフィル a とクロロフィル d の分子構造。クロロフィル a: R=CHCH₂、クロロフィル d: R=CHO。

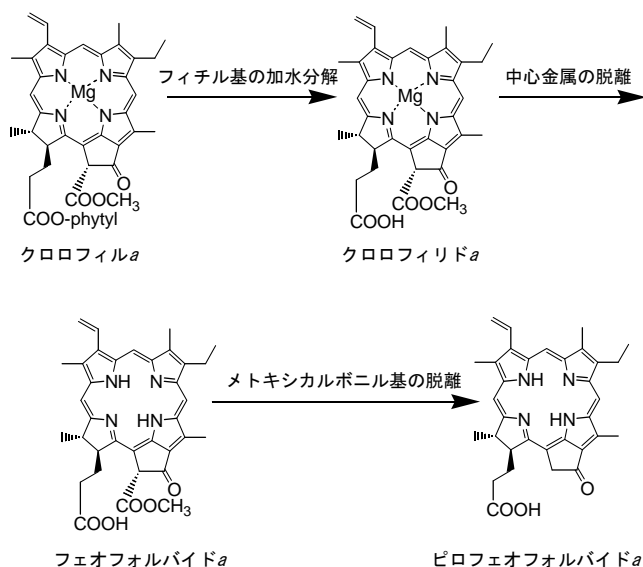


図2. 現在推定されている高等植物のクロロフィル a の分解経路

クロロフィルの分解は地球上で最大のバイオマス変換反応のひとつであると言え、紅葉などでも我々には馴染み深い代謝反応である。それにもかかわらず、クロロフィルの分解過程に関しては現段階ではそれほど解明されていない。現在推定されている高等植物のクロロフィル a の分解初期過程を 図 2 に示す¹⁻⁴。クロロフィル a の 17 位(クロロフィル分子構造における場所は 図 1 を参照)に存在する長鎖エステル鎖(フィチル鎖)がクロロフィラーゼと呼ばれる酵素によって加水分解されクロロフィリド a となる^{5,6}。その後、分子の中心に存在するマグネシウムが脱離し、フ

ェオフォルバイド a となる^{7,8}。13²位のメキシカルボニル基(-COOCH₃)の脱離がその後起こりピロフェオフォルバイド a に変換されると考えられているが詳細は定かではなく、この脱離反応がどのようにして起こっているのかは明らかではない。ピロフェオフォルバイド a は酸化によって 5 位が解裂し鎖状テトラピロールに変換され、その後の分解系によってさらに分解されると考えられる。しかし、最近では 17 位のエステル加水分解に先駆けてマグネシウムの脱離反応(脱金属反応)が先に起こっていると提案している論文が発表されている⁹。

そこで本研究では、最近発見された海洋性光合成微生物アカリオクロリスの主要色素クロロフィル d と、多くの海洋性光合成微生物の主要色素クロロフィル a を研究対象とし、これらの分解初期過程および分解産物の物性を解析することを目的とした。特にクロロフィル d を含むアカリオクロリスは 1996 年の発見¹⁰から間もないため、その物性や分解挙動は不明な点が多い。そこで、クロロフィル d の重要な分解初期反応である脱金属反応(クロロフィルからフェオフィチンへの転換反応)の物理化学的な解析を行い、クロロフィル a やクロロフィル b の場合と比較した。また、このような分解反応特性と分子構造の関係をより詳細に解析するため、緑色硫黄光合成細菌の集光色素である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 を対象とした解析を行った。さらに、クロロフィル分解産物の光毒性を検証する方法の開発を目指して、クロロフィル a とクロロフィル d のそれぞれの分解産物であるピロフェオフォルバイド a とピロフェオフォルバイド d、およびそれらの誘導体を大量調製した。これらの研究によって、海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィルの分解初期過程とその主要分解産物の物性、およびヒト細胞への影響を明らかにし、将来的には海洋に由来する食品の安全性に役立つ情報を得ることができるような基礎研究を目指した。

2. 研究方法

2.1 クロロフィル d の脱金属反応の実験

海洋性光合成微生物の一種であるアカリオクロリス・マリナーナ (*Acaryochloris marina*) を定常光照射下で 30°C に保って人工海水中で通気培養した。一定期間培養後に、遠心分離でアカリオクロリスの細胞を集菌した。クロロフィル d は集菌したアカリオクロリスの細胞からアセトン/メタノール

混合溶媒(体積比で1:1)で抽出した。抽出液をジエチルエーテルで希釈し、飽和食塩水と分液することで水溶性物質を取り除いた。その後、無水硫酸ナトリウムで有機層の脱水を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去した。その後ヘキサンを用いて低極性画分を取り除いた。最後に逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて精製し、高純度のクロロフィル *d* を得た。クロロフィル *a* とクロロフィル *b* はほうれん草から同様の操作で単離精製し、最後に逆相高速液体クロマトグラフィーによって高純度のものを得た。

クロロフィルの脱金属反応の速度論的解析は弱酸性条件下で行った。各クロロフィルの濃度を一定に保ったアセトン/水の混合溶液(アセトン:水 = 3:1)の微量の塩酸を添加し、脱金属反応を開始した。温度を一定に保った条件下で紫外可視吸収分光光度計でスペクトル変化、または吸光度変化を一定時間ごとに測定し、その経時変化から脱金属反応速度定数を求めた。温度を変化させて反応を行い、得られた脱金属反応速度定数から各クロロフィルの脱金属反応の活性化エネルギーを算出した。また、反応後のクロロフィル分解産物を順相高速液体クロマトグラフィーで分析した。

2.2 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* の脱金属反応の実験

バクテリオクロロフィル *c* を含む緑色硫黄光合成細菌クロロビウム・テピダム(*Chlorobium tepidum*)とバクテリオクロロフィル *e* を含む緑色硫黄光合成細菌クロロビウム・フェオバクテロイデス(*Chlorobium phaeobacteroides*)は定常光照射・嫌気条件下で培養した。一定期間培養後に、遠心分離で緑色硫黄光合成細菌をそれぞれ集菌した。バクテリオクロロフィル *c* または *e* は集菌した緑色硫黄光合成細菌からアセトン/メタノール混合溶媒(体積比で1:1)で抽出した。抽出液をジエチルエーテルで希釈し、飽和食塩水と分液することで水溶性物質を取り除いた。その後、無水硫酸ナトリウムで有機層の脱水を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去した。その後ヘキサンを用いて低極性画分を取り除いた。最後に逆相高速液体クロマトグラフィーを用いて同族体・光学異性体を分離精製し、純粋なバクテリオクロロフィル *c* 異性体、またはバクテリオクロロフィル *e* 異性体を得た。窒素同位体(^{15}N)が分子内に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* は、

緑色硫黄光合成細菌の培地の窒素源を $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ に変えて培養¹¹することで得た。各バクテリオクロロフィル異性体や ^{15}N ラベル化した各バクテリオクロロフィル異性体は過去の研究における逆相高速液体クロマトグラフィーの溶出パターン¹²⁻¹⁵と質量分析検出高速液体クロマトグラフィー(LC-MS)で同定した。 ^{15}N 核磁気共鳴分光($^{15}\text{N-NMR}$)は ^{15}N ラベル化した各バクテリオクロロフィル異性体を重クロロホルム/重メタノール混合溶媒(重クロロホルム:重メタノール = 9:1)に溶解し、 ^{15}N -ホルムアミドを基準物質として測定した。

各バクテリオクロロフィル異性体の脱金属反応の速度論的解析は弱酸性条件下で前項と同様の方法で行った。

2.3 クロロフィル分解産物とそれらの誘導体の大量調製

クロロフィル *a* の主要分解産物で光毒性が報告されているピロフェオフォルバイド *a* と、そのメチルエステル(メチルピロフェオフォルバイド *a*)およびメチルフェオフォルバイド *a* をクロロフィル *a* から 図3 の手順に従って有機化学的に調製した。クロロフィル *a* は藍藻の一種であるスピルリナ(*Spirulina*)から石油エーテル/メタノール混合溶媒(石油エーテル/メタノール = 1:2)によって抽出し、抽出液をろ過した。その溶液に2% HCl 水溶液を作用させることで脱金属化を行い、フェオフィチン *a* を得た。フェオフィチン *a* を含む有機層を4% 炭酸水素ナトリウム水溶液で洗浄した後、無水硫酸ナトリウムで有機層の脱水を行い、ロータリ

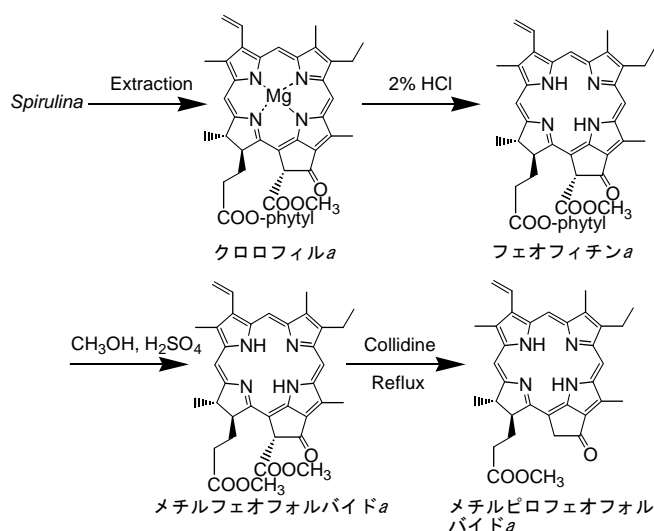


図3. クロロフィル *a* からメチルフェオフォルバイド *a* とメチルピロフェオフォルバイド *a* の合成経路

エバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られたフェオフィチン *a* をメタノールに溶解させ、氷浴しながらその 1/10 量の硫酸を滴下した後に窒素気流下で暗所、室温で一晩攪拌し 17 位エステル交換を行った。その反応液を氷水に希釈し、ジクロロメタンで反応物を抽出した。ジクロロメタン層を 4% 炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した後に、無水硫酸ナトリウムで有機層の脱水を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去した。得られたメチルフェオフォルバイド *a* を 2,4,6-コリジンを溶解させ 3 時間還流を行った。その後、2,4,6-コリジンを減圧留去した。フラッシュシリカゲルカラムクロマトグラフィーによってメチルピロフェオフォルバイド *a*、およびメチルフェオフォルバイド *a* をそれぞれ精製した。化合物の同定は ¹H-NMR と質量分析によって行った。ピロフェオフォルバイド *a* は 図4 に示すようにメチルピロフェオフォルバイド *a* から一段階で合成した。メチルピロフェオフォルバイド *a* を濃塩酸に溶解させ窒素気流下で暗所、室温で攪拌した。薄層クロマトグラフィー (TLC) 分析で反応が終了したことを確認し、その反応液を氷水に希釈した。クロロホルムで反応物を抽出し、5% 硫酸水素カリウム水溶液と蒸留水で洗浄した後に、無水硫酸ナトリウムで有機層の脱水を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去した。ヘキサンを用いた再結晶によってピロフェオフォルバイド *a* を精製した。化合物の同定は質量分析によって行った。

クロロフィル *d* の主要分解産物のひとつと考えられるピロ

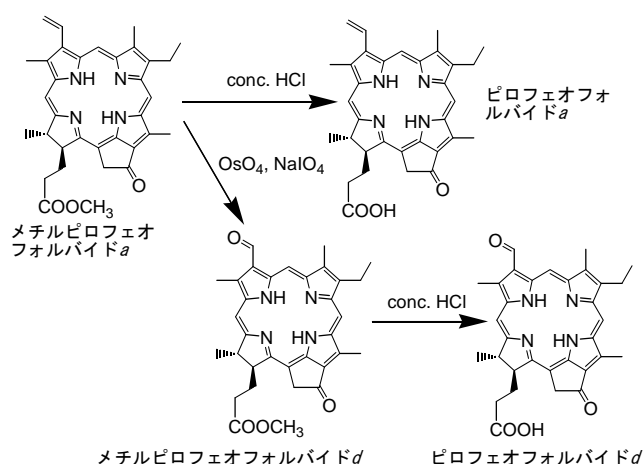


図4. ピロフェオフォルバイド *a*、およびメチルピロフェオフォルバイド *d* とピロフェオフォルバイド *d* の合成経路

フェオフォルバイド *d* とそのメチルエステル (メチルピロフェオフォルバイド *a*) は 図4 に示すようにメチルピロフェオフォルバイド *a* から合成した。メチルピロフェオフォルバイド *a* をテトラヒドロフラン (THF) に溶解させ、氷浴しながらマイクロカプセル化四酸化オスミウムと過ヨウ素酸ナトリウムを添加した後に窒素気流下で暗所、室温で一晩攪拌した。その反応液をろ過した後に蒸留水とジクロロメタンで分液した。ジクロロメタン層を 4% 炭酸水素ナトリウム水溶液と飽和食塩水で洗浄した後に、無水硫酸ナトリウムで有機層の脱水を行い、ロータリーエバポレーターで溶媒を減圧留去した。化合物の同定は ¹H-NMR と質量分析によって行った。ピロフェオフォルバイド *d* はピロフェオフォルバイド *a* の合成と同様の方法で合成し、質量分析によって同定した。

3. 結果と考察

3.1 クロロフィル *d* の脱金属反応の解析

人工海水中で通気培養しているアカリオクロリス・マリナを 図5 に示す。このようにして培養したアカリオクロリスの細胞からクロロフィル *d* を抽出し精製した後に脱金属反応解析を行い、クロロフィル *a* やクロロフィル *b* の脱金属反応特性と比較した。クロロフィル *d* は弱酸性条件下で可視吸収スペクトルが徐々に変化し 451 nm に存在したソーレ帯の吸光度が減少し、新たなソーレ帯が 423 nm に現れた。すなわち、クロロフィル *d* の脱金属反応が進行し、しだいにフェオフィチン *d* に変化していることが示された。この反応



図5. 人工海水中で通気培養している *Acaryochloris marina* の写真。三角フラスコの中で *Acaryochloris marina* が生育している。

がきれいに進行していることは、反応後の生成物の順相高速液体クロマトグラフィー分析からも確認できた。このような反応進行具合はクロロフィル *a* やクロロフィル *b* の場合でも同様であった。

各クロロフィルのソーレ帯の吸光度の減少の経時変化から脱金属反応の速度定数を求めた。ソーレ帯の吸光度の対数が反応時間と直線関係にあったことから、この反応を擬一次反応として解析しその傾きから反応速度定数を算出した。その結果、3 位にホルミル基を有するクロロフィル *d* の脱金属反応速度定数は3 位にビニル基を有するクロロフィル *a* よりも小さくなった。しかし、7 位にホルミル基を有するクロロフィル *b* の脱金属反応速度定数よりも大きいことが明らかとなった。すなわち、脱金属反応の起こりやすさは、クロロフィル *a* > クロロフィル *d* > クロロフィル *b* の順であった。脱金属反応速度定数の温度依存性からアレニウスプロットによって活性化エネルギーを求めたところ、クロロフィル *b* とクロロフィル *d* の脱金属反応の活性化エネルギーはそれぞれクロロフィル *a* の 1.7 倍と 1.5 倍大きいことが示された。このような脱金属反応特性は電子吸引基であるホルミル基の位置に依存すると考えられた。これらのことから、海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィルにおいてそれらの分子構造に依存した分解初期過程の存在が示唆されるとともに、クロロフィル *a* 以外のクロロフィル分解産物の物性と光毒性を詳細に調べる必要性が示唆された。

3.2 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* の脱金属反応の解析

分子内にホルミル基を有するクロロフィル *d* やクロロフィル *b* はクロロフィル *a* に比べて脱金属反応が起こりにくいことが示され、クロロフィル環に直結したホルミル基が影響を与えていることが示唆された。その影響を詳細に解析するため、緑色硫黄光合成細菌の主要な光合成色素である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* を対象とした脱金属反応解析を行った。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* の分子構造を 図 6 に示す。バクテリオクロロフィル *e* は7 位にホルミル基が直結しており、バクテリオクロロフィル *c* はその部位がメチル基である以外は分子構造はバクテリオクロロフィル *e* と同じである。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* の分子構造の関係はクロロフィル *a* とクロロフィル *b* の構造の関係と同様であり、よい研究対象であるといえる。また、緑色硫黄光合成細菌

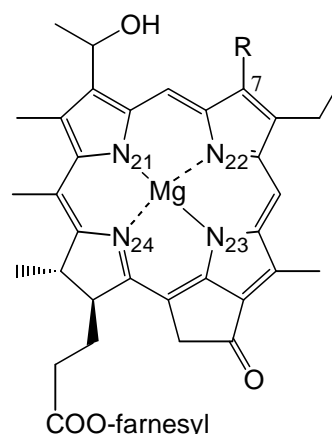


図 6. バクテリオクロロフィル *c* ($R = \text{CH}_3$) とバクテリオクロロフィル *e* ($R = \text{CHO}$) の分子構造

の培養方法を改変することで、これらのバクテリオクロロフィル分子の窒素を同位体標識することが可能¹¹であり、詳細な構造解析を行うことができることも利点として挙げられる。そこで、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* をクロロフィル *a*、*b*、*d* の場合と同様に弱酸性条件下で脱金属反応を進行させ、速度論的解析を行った。

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* ともに弱酸性条件下で可視吸収スペクトルがクロロフィル *d* の場合と同様に徐々に変化し脱金属反応によってそれぞれバクテリオフェオフィチン *c* とバクテリオフェオフィチン *e* に変化していることが示された。これらのスペクトル変化におけるソーレ帯の吸光度の減少の経時変化から脱金属反応の擬一次反応速度定数を求めたところ、7 位にメチル基を有するバクテリオクロロフィル *c* に比べて7 位にホルミル基を有するバクテリオクロロフィル *e* のほうが脱金属反応速度定数が小さくなることが示された。反応速度定数の温度依存性からアレニウスプロットによって脱金属反応の活性化エネルギーを求めたところ、バクテリオクロロフィル *e* の活性化エネルギーはバクテリオクロロフィル *c* の 1.5 倍大きいことが示された。このような脱金属反応特性はクロロフィル環に直結する7 位ホルミル基の電子吸引性の影響を受けた結果であると考えられた。

この影響をより詳細に検討するため、 ^{15}N ラベル化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* の ^{15}N -NMR を測定した。これらの分子の窒素原子が完全に ^{15}N 同位体に置き換わっていることは質量分析と NMR で確認した。 ^{15}N -NMR 測定の結果、バクテリオクロロフィル *e*

の N₂₁、N₂₂、N₂₃ 原子の化学シフト値がバクテリオクロロフィル *c* の対応する N 原子のものに比べて低磁場シフトし、そのシフト幅はホルミル基に最も近接した N₂₂ 原子が最も大きかった。この ¹⁵N-NMR の結果から、電子吸引基であるホルミル基がクロロフィル環の窒素原子の電子状態、とくに 7 位ホルミル基に近い N₂₂ 原子の電子状態に影響を与えることで、脱金属反応を起こりにくくしていることが示唆された。

3. 3 クロロフィル分解産物とそれらの誘導体の大量調製

クロロフィル分解産物およびそれらの誘導体の大量調製は、それらの光毒性の原因となる光反応の解析や細胞への影響の解析を行ううえで必要である。そこで、藍藻の一種であるスピルリナ (*Spirulina*) から抽出したクロロフィル *a* を出発原料とした有機合成を行った。図 3 の合成スキームに従って 3 段階で、クロロフィル *a* の主要分解産物の誘導体(メチルエステル)であるメチルピロフェオフォルバイド *a* とメチルピロフェオフォルバイド *a* をグラム単位のオーダーの収量で調製した。また、図 4 に示すようにメチルピロフェオフォルバイド *a* のエステル結合を濃塩酸で加水分解することでクロロフィル *a* の主要分解産物であるピロフェオフォルバイド *a* を大量に調製できた。

クロロフィル *d* の分解過程に関しては不明であるが、分解初期産物の一種の可能性としてピロフェオフォルバイド *d* (図 4) が考えられる。そこで、メチルピロフェオフォルバイド *a* を原料としオスミウム酸化によって 3 位のビニル基をホルミル基に変換し、メチルピロフェオフォルバイド *d* を合成した。また、図 4 に示すようにメチルピロフェオフォルバイド *d* の 17 位のエステル結合を濃塩酸で加水分解することでピロフェオフォルバイド *d* を合成できた。このように大量に入手可能なクロロフィル *a* を出発原料とすることでクロロフィル *d* の主要分解産物を高収量で合成することが可能となったことから、未解明な部分が多いクロロフィル *d* の主要分解産物の物性解析に今後役に立つことが期待できる。

これらのクロロフィル分解産物やその誘導体を用いて、光毒性発現の基盤となる光励起一重項酸素発生の解析や細胞への影響を予備的に調べた。

5. 今後の課題

本研究では最近発見された海洋性光合成微生物アカリ

オクロリスの主要色素クロロフィル *d* と多くの海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィル *a* の分解初期反応の特性を明らかにするとともに、これらのクロロフィルの主要分解産物およびそれらの誘導体の大量調製と物性測定を行った。得られた成果は、海洋性光合成微生物に含まれるクロロフィルの分解初期過程とその分解産物の物性を明らかにするための基礎となりうることが期待できる。今後の課題として、クロロフィル分解経路とその過程で生ずる分解産物の人体への影響を解明し、海洋に由来する食品の安全性に役立てる基礎的知見を得ることが挙げられる。

参考文献

1. B. Kräutler and P. Matile, Solving the riddle of chlorophyll breakdown, *Acc. Chem. Res.*, 1999, 32, 35-43.
2. B. Kräutler, Chlorophyll breakdown and chlorophyll catabolites in leaves and fruit, *Photochem. Photobiol. Sci.*, 2008, 7, 1114-1120.
3. B. Kräutler, Chlorophyll breakdown and chlorophyll catabolites, in *The Porphyrin Handbook*, ed. K. M. Kadish, K. M. Smith and R. Guilard, Academic Press, San Diego, 2000, vol. 13, p. 183-209.
4. B. Kräutler and S. Hörtensteiner, Chlorophyll catabolites and the biochemistry of chlorophyll breakdown, in *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*, ed. B. Grimm, R. J. Porra, W. Rüdiger and H. Scheer, Springer, Dordrecht, 2006, p. 237-260.
5. D. Jacob-Wilk, D. Holland, E. E. Goldschmidt, J. Riov and Y. Eyal, Chlorophyll breakdown by chlorophyllase: isolation and functional expression of the *Chlase1* gene from ethylene-treated *Citrus* fruit and its regulation during development, *Plant J.*, 1999, 20, 653-661.
6. T. Tsuchiya, H. Ohta, K. Okawa, A. Iwamatsu, H. Shimada, T. Masuda and K. Takamiya, Cloning of chlorophyllase, the key enzyme in chlorophyll degradation: Finding of a lipase motif and the induction by methyl jasmonate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 15362-15367.
7. T. Suzuki and Y. Shioi, Re-examination of

- Mg-dechelation reaction in the degradation of chlorophylls using chlorophyllin *a* as a substrate, *Photosynth. Res.*, 2002, 74, 217-223.
8. T. Kunieda, T. Amano and Y. Shioi, Search for chlorophyll degradation enzyme, Mg-dechelataase, from extracts of *Chenopodium album* with native and artificial substrates, *Plant Sci.*, 2005, 169, 177-183.
9. S. Schelbert, S. Aubry, B. Burla, B. Agne, F. Kessler, K. Krupinska and S. Hörtensteiner, Pheophytin Pheophorbide Hydrolase (Pheophytinase) is involved in chlorophyll breakdown during leaf senescence in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 2009, 21, 767-785.
10. H. Miyashita, H. Ikemoto, N. Kuroono, K. Adachi, M. Chihara and S. Miyachi, Chlorophyll *d* as a major pigment, *Nature*, 1996, 383, 402.
11. Z.-Y. Wang, M. Umetsu, M. Kobayashi, T. Nozawa, ¹³C- and ¹⁵N-NMR studies on the intact bacteriochlorophyll *c* dimmers in solutions, *J. Am. Chem. Soc.*, 1999, 121, 9363-9369.
12. Y. Saga, T. Wazawa, T. Mizoguchi, Y. Ishii, T. Yanagida, and H. Tamiaki, Spectral heterogeneity in single light-harvesting chlorosomes from green sulfur photosynthetic bacterium *Chlorobium tepidum*, *Photochem. Photobiol.*, 2002, 75, 433-436.
13. Y. Saga, H. Oh-oka, T. Hayashi and H. Tamiaki, Presence of exclusively bacteriochlorophyll-*c* containing substrain in the culture of green sulfur photosynthetic bacterium *Chlorobium vibrioforme* strain NCIB 8327 producing bacteriochlorophyll-*d*, *Anal. Sci.*, 2003, 19, 1575-1579.
14. Y. Saga, K. Matsuura and H. Tamiaki, Spectroscopic studies on self-aggregation of bacteriochlorophyll-*e* in non-polar organic solvents: effects of stereoisomeric configuration at the 3¹-position and alkyl substituents at the 8¹-position, *Photochem. Photobiol.*, 2001, 74, 72-80.
15. Y. Saga and H. Tamiaki, Comparison between chlorosomes containing bacteriochlorophyll-*c* and chlorosomes containing bacteriochlorophyll-*d* isolated from two substrains of green sulfur photosynthetic bacterium *Chlorobium vibrioforme* NCIB 8327, *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.*, 2004, 75, 89-97.

No. 0818

Analysis of Degradation of Chlorophylls in Marine Photosynthetic Prokaryotes

Yoshitaka Saga

Department of Chemistry, Faculty of Science and Engineering, Kinki University

Summary

Chlorophylls in marine photosynthetic prokaryotes play important roles in photosynthetic activity in the ocean. In contrast, degradation products of chlorophylls such as pheophorbide and pyropheophorbide were reported to have photo-toxicity. We should pay attention to photo-toxic chlorophyll degradation products in foods from the ocean. Therefore, elucidation of chlorophyll degradation in marine photosynthetic prokaryotes and biochemical properties of their degradation products will be useful in the research area of biological chemistry as well as food science. In this project, we study demetalation of chlorophylls *d* and *a*, which is one of the important steps in chlorophyll degradation pathway. In addition, we synthesize and characterize degradation products and their derivatives of chlorophylls *d* and *a*.

Demetalation kinetics of chlorophyll *d* from a cyanobacterium *Acaryochloris marina* under weakly acidic conditions, and is compared with those of chlorophylls *a* and *b*. Demetalation rate constants of chlorophyll *d* possessing a formyl group at the 3-position were smaller than those of chlorophyll *a*, which had no formyl group, but larger than those of chlorophyll *b* possessing a formyl group at the 7-position. In order to the effects of formyl groups on demetalation properties, demetalation kinetics and NMR measurements of bacteriochlorophylls *c* and *e* from green sulfur photosynthetic bacteria were examined. Demetalation rate constants of bacteriochlorophyll *e* possessing a formyl group at the 7-position were significantly smaller than those of bacteriochlorophyll *c*, which had a methyl group at this position. ¹⁵N-NMR spectra of ¹⁵N-labeled bacteriochlorophyll *c* and *e* isomers, which were purified from green sulfur bacteria grown in a medium containing ¹⁵NH₄Cl, were measured. These spectra suggest that the electron-withdrawing formyl groups of chlorophyll molecules affect electronic states of the chlorophyll π -system and caused chlorophylls possessing a formyl group to be tolerant for demetalation.

Degradation products of chlorophyll *a* and chlorophyll *d* and their derivatives were successfully synthesized from naturally occurring chlorophyll *a* from a cyanobacterium *Spirulina*, and their chemical and biochemical properties were characterized.