嫌気条件下におけるポルフィリンの生合成

阿久津 秀 雄*・小 澤 潔*・佐 野 晴 洋**

Anaerobic Porphyrin Biosynthesis

Hideo AKUTSU*, Kiyoshi OZAWA* and Seiyo SANO**

In the experiments of specific deuteration of cytochrome c_3 (*D. vulgaris*, Miyazaki), it was found that the deuterated methyl group of methionine-methyl- d_3 in the medium was incorporated not only into the methionine residues of the polypeptide but also into the C-2 and C-7 positions of the heme groups. It shows that methionine is involved in the biosynthesis of porphyrin in this sulfate-reducing bacterium. In the known porphyrin biosynthetic pathway, all four methyl groups of protoporphyrin IX are transformed from acetate groups by uroporphyrinogen decarboxylase. This pathway cannot explain the incorporation of methyl groups into the C-2 and C-7 positions from methionine. Therefore, our result is the strong evidence for the existence of previously unknown pathway of anaerobic porphyrin biosynthesis in *D. vulgaris*. Intermediates from uroporphyrinogen III to coproporphyrinogen III would be formed through methylation at the C-2 and C-7 positions, followed by decarboxylation of the acetate groups at the C and D rings.

Key words : Porphyrin, Biosynthesis of porphyrin, Anaerobic bacterium, Sulfate-reducing bacterium, Anaerobic biosynthesis, Nuclear magnetic resonance, Mass spectroscopy.

ポルフィリンとは4つのピロールが環状に結合した構造を骨格とした一群の化合物を指す。ポルフィリンとその類縁物質は生体内に広く分布して重要な役割を果たしている。最もポピュラーなものはポルフィリンと鉄の錯体であり、ヘム(図1)と呼ばれる。ヘムはヘモグロビンやミオグロビンのような酸素結合タンパク質、チトクロムのような電子伝達タンパク質、さらにはカタラーゼやペルオキシダーゼのような酵素の活性中心となっている。ポルフィリン誘導体としてはマグネシウムとの錯体であるクロロルイル、コバルトとの錯体であるビタミンB₁₂など(図1)がよく知られている。

このようなポルフィリンの幅広い反応性は医療あるいは工学の分野の研究者の関心をも集め、さまざまな応用

が研究されている。ポルフィリンがガン組織に集積しやすい性質を利用して、これをターゲットとしたガンミサイル治療法の開発、人工酵素機能を持つさまざまなポルフィリン誘導体の合成、エネルギー変換素子の開発など活発な研究が展開されている。

生体内におけるポルフィリンの合成については多くの研究がされており、その合成経路についても全容が解明されたと考えられていた^{1,2)}。ところが、ここに来てまだまだ未知の部分があることが明らかになってきた。よく考えてみると今までの研究はそのほとんどが酸素呼吸生物を対象としたものであった。生物界には嫌気性生物という、好気性生物よりも古い歴史を持つ世界が存在している。酸素存在下でこのような生物の生化学反応の研究をするのはいろいろな困難が伴う。特に、ポルフィリン生合成の研究に対してはガードがかたかった。しかし、全く偶然なことから我々はこの世界を覗く幸運を得た。酸素があると生きていけない偏性嫌気性菌である硫酸還元菌においては酸素呼吸生物とは異なったポルフィリンの生合成経路が働いていることを我々は見いだした。この発見はポルフィリンの生合成経路が進化の過程を辿ってきたことを伺わせるものである。

* 横浜国立大学工学部 ()

** 滋賀医科大学 ()

* Faculty of Engineering, Yokohama National University ()

** Shiga University of Medical Science ()

Fig.1 Metal complexes of porphyrin and its derivatives.

1. 酸素呼吸生物におけるヘムの生合成

動物細胞でのポルフィリンおよびヘムの生合成は図2のような経路で行われる。ここでの特徴はミトコンドリアの内部で起こる反応と細胞質での反応の両方から構成されていることである。ポルフィリン生合成の出発物質は5-アミノレブリン酸であるが、出発物質の合成は生物種によって異なることが知られている。動物では図2のようにグリシンとコハク酸補酵素Aから5-アミノレブリン酸が合成されるが、植物やバクテリアの多くではグルタミン酸からこれが合成されることが知られている。しかし、5-アミノレブリン酸からヘムに至る合成経路は酸素呼吸生物では1つしか知られていない。5-アミノレブリン酸からポルフィリノーゲンが合成され、これが4つつながって、環を巻く。この反応に関わる酵素(ピリノーゲンデアミナーゼ)の結晶構造が1992年に報告され³⁾、その反応機構が明らかになりつつある。この反応の生成物がウロポルフィリノーゲンⅢであり、すべ

てのポルフィリン誘導体の出発物質である。このウロポルフィリノーゲンⅢが合成される際にはD環が1回転して酢酸基とプロピオン酸基が入り替わる。この段階では側鎖として4つの酢酸基と4つのプロピオン酸基を持ち、合計、8つのカルボキシル基を持つ。

ウロポルフィリノーゲンⅢはウロポルフィリノーゲン脱炭酸酵素によって4つの酢酸基からの脱炭酸が起こり、コプロポルフィリノーゲンⅢとなる。この脱炭酸反応の結果、4つのヘムメチル基が生成する。ここで残ったカルボキシル基はいずれもプロピオン酸基に由来するもので、合計4つある。コプロポルフィリノーゲンⅢはコプロポルフィリノーゲンⅢ酸化酵素によってA、B環の2つのプロピオン酸基で脱炭酸が起こり、プロトポルフィリノーゲンⅨとなる。この際、電子受容体としては分子状酸素が必須であることが知られている。4つのプロピオン酸基のうち2つがビニル基に変化して、カルボキシル基は2つ残される。これ以降の反応は真核生物ではミトコンドリアの中で起こる。プロトポルフィリノー

apoprotein ← cytoplasmic ribosome system

hemeprotein

Heme

in mitochondria

Fig. 2 Biosynthetic pathway of porphyrins and hemes in mammalian cells¹⁾.

Enzymes involved are (1) 5-aminolevulinic acid synthase, (2) 5-aminolevulinic acid dehydratase, (3) hydroxymethylbilane synthase, (4) uroporphyrinogen III decarboxylase, (5) coproporphyrinogen III oxidase, (6) ferrochelatase, (7) ferrochelatase.

ゲンIX酸化酵素によってプロトボルフィリンIXとなり、フェロキラーゼによって鉄が配位してプロトヘムIXが完成する。このプロトヘムIXはヘムbと呼ばれるものであるが、ヘムa, c, d, oなどはこれを基にして合成される。

一方、マグネシウムキラーゼ(magnesium chelatase)によって生成するMg-プロトボルフィリンからクロロフィル類が合成されていく。

2. 嫌気性バクテリアにおけるボルフィリン合成経路の探索

前節で述べたボルフィリンの生合成においては分子状の酸素が必須の要素となっている。それでは酸素のあるところでは生きていけない偏性嫌気性菌ではボルフィリンがつくられていないかといえばそうではない。嫌気状態ではボルフィリンはどのように合成されているのであろうか。それを明らかにしようとする努力は相当長期にわたって行われてきた。

Tait は1969年に光合成細菌 *Rhodobacter Sphaeroides* の細胞抽出液を用いて、コプロボルフィリノーゲンからプロトボルフィリノーゲンへの酸化反応の条件が好気条件下と嫌気条件下で異なることを初めて報告した^{4,5)}。嫌気条件下で上記の反応を進めるためには Mg^{2+} 、ATPとL-メチオニン(あるいはS-アデノシルメチオニン)が必須であるとしている。さらに、ゲル濾過で低分子物質を除くとニコチンアミドアデニンジヌクレオチド(NAD^+)あるいは $NADP^+$ が必要になる。この結果は嫌氣的生合成に関与する酵素が好気性のものとは異なること、および嫌氣的生合成においては NAD^+ あるいは $NADP^+$ が分子状酸素の代わりに電子受容体となっている可能性を示唆している。Tait は偏性嫌気性の光合成細菌 *Chromatium D* についても同様な結果を得ている。しかし、その後いくつかのグループがこれを確かめようとしたが、むしろ否定的な結果に終わった。例えば、*Chromatium D* から部分精製された酵素では酸素が存在すればコプロボルフィリノーゲンからプロトボルフィリノーゲンへの変換は観察されたが、酸素が存在しないときは Mg^{2+} 、ATP、メチオニンを加えてもプロトボルフィリノーゲンの生成は見られなかった⁶⁾。

これについてはその後しばらく決定的な研究が出なかったが、遺伝子工学の発展によって、遺伝子の方からその一部にはっきりした回答が出た。1992年、Coomberらは嫌気条件下で働いている *R. Sphaeroides* のコプロボルフィリノーゲンIIIオキシダーゼが、好気条件下で働いているコプロボルフィリノーゲンIIIオキシダーゼと

は異なる遺伝子によってコードされていることを示した⁷⁾。彼らはさらに嫌気条件下で働く酵素の遺伝子をクローニングしてその全塩基配列を決定した。その遺伝子領域の塩基配列と酵素の予想されるアミノ酸配列を図3に示す。この嫌気条件下で働くコプロボルフィリノーゲンIIIオキシダーゼの遺伝子は他のバクテリアでも見いだされており、*hem N*と呼ばれる。それに対して、酸素存在下で働く上記の酵素の遺伝子は *hem F* と呼ばれる。

この2つの遺伝子の性質は *Salmonella typhimurium* の変異株を用いて詳しく調べられている⁸⁾。この菌を嫌気条件下で培養すると、*hem F* 変異株は正常に生育するが、*hem N* 変異株はヘムを培地に加えないと生育できない。すなわち、ヘム要求性を示すようになる。それとともに、*hem N* 変異株の培地中に多量のボルフィリンが放出される。それを高速液体クロマトグラフィーで分析すると図4Aのように、そのほとんどがコプロボルフィリンであった。このことは細胞内でコプロボルフィリノーゲンIIIからプロトボルフィリノーゲンIXへの変換が止まったため、前者が蓄積されていることを示す。したがって、嫌気条件下でのヘム合成には *hem N* のつくるコプロボルフィリノーゲンIIIオキシダーゼが必須であることがわかる。一方、好気条件下で培養すると *hem F hem N* の二重変異株の場合にのみヘム要求性を示すようになり、その場合細胞内には図4Bのようにコプロボルフィリノーゲンが蓄積される。したがって、好気性条件下では *hem F* と *hem N* のどちらかの酵素が存在すれば、コプロボルフィリノーゲンからプロトボルフィリノーゲンへの変換が起こることがわかる。

最近、*S. typhimurium* と *Escherichia coli* で *hem F* と *hem N* の遺伝子がともにクローニングされ、その塩基配列が決定された⁹⁻¹²⁾。*E. coli* でみると、*hem F* 由来のコプロボルフィリノーゲンIIIオキシダーゼは299個のアミノ酸からなるのに対して *hem N* 由来の酵素は457個のアミノ酸からなる。したがって、この2つの酵素は全く別種のものであることがわかる。*E. coli* の *hem N* 由来の酵素のアミノ酸配列は *S. typhimurium* のそれとは92%の相同性を示すが、*R. sphaeroides* のそれとは35%の相同性しか示さない。この酵素の電子受容体が何であるかということは今のところ明らかではない。

嫌気条件下でのプロトボルフィリノーゲンIXからプロトボルフィリンIXへの交換については硫酸還元菌 *Desulfovibrio gigas* に関する報告がある^{13,14)}。この交換を触媒するのはプロトボルフィリノーゲンオキシダーゼで、膜タンパク質である。上記の研究ではこの酵素を膜より可溶化してその性質を調べている。好気性生物では、酸素

1 TGCCTCGAGCTAGAGGATGGGGGGCCCGCGGCGCTGACGCCCAACGAGCGCGCTCGCG
61 GCCTTCGGGGCCACCGCGCTCTTCCTGCTGCGCCCGCTGGTGCATGCGCACTGGGTGAAG
121 CAGAAAGAGGACCACTCTCCCGGGCTTCTGGGGGTCTGGGGGTCTGGGGCGCGGGCG
181 CTGGCGCTGCATCCGATCTCTCTGGGTCTGGCGGCTCCCGCTCTAGCGTCGACACCC
241 TGTCCGGGGCTTTGATCCTCGCGCAAGCTCTAACTCTCTCTGTAACCGTTATTGGGTTCAG
301 CATGACAAACAATCCGCTCTCTCCAGAGTCTCGGACTCTTCGATGCGCGGTCGCCGGCTA
361 CACGAGCTATCCTCGGGCGCGGTCTTCTCGGGCGCGCTCGGAGCGGACTTTCAGGCACA
421 GCGATCGAAGCCCTCGATCCCGCGTCCGATCTCGGTCTATGTCCAGTCCCGCTCTG
481 CGAGCGCTCTGCTGGTCTCGCGCTCGGACGCGAGGGACCCAGACGCTGCGCGCGGT
541 CGAAGCCTATGTGGGCACGCTCTCGAGAGCTCGAGCTGTGTGAAGCAGCACTGCGCCGC
601 CGGCTGAAGCGCGGGCTGCACTGGGGGGGGGACGCCACGATCTCTGTCGCCCA
661 GCTGATCCACAAGCTCGCGCAGCGCATCAAGCGCCCTCATCCCGCTTCGCGGAGGACTACGA
721 ATTCTCGTTCGATCGATCGATGATGTCGATGAGCCCAAGATCCGGGGCTGAGCGA
781 GAGGGGCAATGAACCGCGCTCGATCGGATCCAGACTTCACCGACATCGTCGACAGATGC
841 GATCGGGCGGACGAGCCCTTCGAGAAACCAAGGCGCTCGTGCAGAGCGTTCGCGCGCTA
901 CGGTTCATTCGCTGAACACCGACCTGCTACGGGTGCGCGCACCAAGACGGGAGAG
961 CTTTGGCGCACCATCGACAAGGTGCTCTCGTGAAGCCGACCGCGTGGCGATCTTCGG
1021 CTATGCCCATGTCCGTGTGATGCCAAGCCCAAGAGCTGATCGACGAGACCGTGTGCGC
1081 CCGGACATCGACGCGCACGAGCTGCCCAATCTGGCGCGCGCTCTTCACCGAAGCGG
1141 GTTCGAGCGCATCGGATCGACCATTTTCGGCTGCGCGACGACGACGATGCGCGTGTGCG
1201 CCGCAGCAGAAAGCTCGCGCGCAATCTTCAGGGCTACACCGACGACACCTGCCCGAGGCT
1261 TCTGGCATCGGGCGCTCTCGGATCTCGAAGTTTCGAGCAGGGCTATCTGCAGAACACGGC
1321 CGCCACCGCGCTATATCAAGTTCGATCGAGGAGGGCGGCTGCCCGGCTACCGGGGCA
1381 CGGCATGACGAGGAGGATTTACCTCCAGCGCGCGCATCGAGATGATCATGTGCGACTT
1441 CTTCTCGAGCTCGCGCGCTGGCGCGCTTGGGAGCGCGCGGAGACCATGCTTCT
1501 CGGCACTCGCGAAGCGCGCGAGAAATTACCGCTTCGTCACGGTGGACGCGGAGCGCTC
1561 GATGTCGATTCGAAAGCGCGCGCGCTGGCGCGGATCATCGCGCGCTGTTCCAGCG
1621 CTACGAGCGCGGAAAGCGCGCTACTCGCAGGCTCTGTGAAGCAATCGCGCGCGCGCA
1681 GGGGGCGGGCATCGCGCGCTCGGCTCAGGAGGCGGACCTTCTCCCGCGACATGCTG
1741 GAATTCAGCTTGAAGCAGCTTCGGTGGCGGTTCTTCCCGCGAGCTTCTTCATGATGTTG
1801 CGAATATGCACCT

1 TGCCTCGAGCTAGAGGATGGGGGGCCCGCGGCGCTGACGCCCAACGAGCGCGCTCGCG
61 GCCTTCGGGGCCACCGCGCTCTTCCTGCTGCGCCCGCTGGTGCATGCGCACTGGGTGAAG
121 CAGAAAGAGGACCACTCTCCCGGGCTTCTGGGGGTCTGGGGGTCTGGGGCGCGGGCG
181 CTGGCGCTGCATCCGATCTCTCTGGGTCTGGCGGCTCCCGCTCTAGCGTCGACACCC
241 TGTCCGGGGCTTTGATCCTCGCGCAAGCTCTAACTCTCTCTGTAACCGTTATTGGGTTCAG
301 CATGACAAACAATCCGCTCTCTCCAGAGTCTCGGACTCTTCGATGCGCGGTCGCCGGCTA
361 CACGAGCTATCCTCGGGCGCGGTCTTCTCGGGCGCGCTCGGAGCGGACTTTCAGGCACA
421 GCGATCGAAGCCCTCGATCCCGCGTCCGATCTCGGTCTATGTCCAGTCCCGCTCTG
481 CGAGCGCTCTGCTGGTCTCGCGCTCGGACGCGAGGGACCCAGACGCTGCGCGCGGT
541 CGAAGCCTATGTGGGCACGCTCTCGAGAGCTCGAGCTGTGTGAAGCAGCACTGCGCCGC
601 CGGCTGAAGCGCGGGCTGCACTGGGGGGGGGACGCCACGATCTCTGTCGCCCA
661 GCTGATCCACAAGCTCGCGCAGCGCATCAAGCGCCCTCATCCCGCTTCGCGGAGGACTACGA
721 ATTCTCGTTCGATCGATCGATGATGTCGATGAGCCCAAGATCCGGGGCTGAGCGA
781 GAGGGGCAATGAACCGCGCTCGATCGGATCCAGACTTCACCGACATCGTCGACAGATGC
841 GATCGGGCGGACGAGCCCTTCGAGAAACCAAGGCGCTCGTGCAGAGCGTTCGCGCGCTA
901 CGGTTCATTCGCTGAACACCGACCTGCTACGGGTGCGCGCACCAAGACGGGAGAG

Fig. 3 The base sequence of *hem N* gene of *Rhodobacter sphaeroides* and the deduced amino acid sequence of coproporphyrinogen III oxidase⁷⁾.
A possible site of transcription initiation is shown with an arrow on the left. An underlined sequence of the upstream of this site could be a part of the promoter. The underlines at around the initiation of the amino acid sequence are possible ribosome binding sites. Down stream of the termination codon is an inverted repeat.
Amino acids are shown by one-letter codes.

Fig. 4 HPLC analysis of porphyrins accumulated in *hem F* and *hem N* mutants of *Salmonella typhimurium*[®]. Samples were analyzed on a silica column run in 50% ethyl acetate-50% heptane. A, porphyrins released into the medium; B, porphyrins in the cells.

を電子受容体としてこの酸化反応は進むが、偏性嫌気性菌である *D. gigas* の酵素は酸素を電子受容体として使うことはできなかった。一方、細胞内に最もふつうに存在する電子受容体である NAD⁺, NADP⁺, フラビンアデニンジヌクレオチド (FAD), フラビンモノヌクレオチド (FMN) なども働かなかった。電子受容体として働いたのは生体内には存在しない 2,6-ジクロロフェノールインドフェノール (2,6-dichlorophenol-indophenol) であり、生理的な電子受容体は不明のままである。

以上のように、嫌気条件下では好気条件下とは異なる酵素が存在することや電子受容体が酸素と異なることが

確認されているので、ポルフィリンの異なる生合成機構があることが予想された。しかし、その詳細については明らかにならなかった。

3. 偏性嫌気性菌である硫酸還元菌における新しい生合成経路の発見

我々は硫酸還元菌の電子伝達タンパク質の構造と機能に関する研究をここ 10 年近く進めてきた。硫酸還元菌は偏性嫌気性菌で、酸素の存在するところでは生きていけない。進化的には、地球上に最初に現れた生物が非生物的に蓄えられた有機物を食べ尽くした頃、その生物が

我々は *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F のチトクロム c_3 における電子移動のメカニズムについて NMR による詳細な研究を行っている。その中で、このタンパク質のメチオニン由来の ^1H NMR のシグナルを帰属するために、 γ メチルを重水素化したメチオニンを培地に加えて培養を行った。そこから得たチトクロム c_3 の ^1H NMR スペクトルを測定すると、奇妙なことが観察された。メチオニン残基の γ メチル基のシグナルは重水素化によって予想どおり消失し、帰属を行うことができた。意外に

酸化型の重水素化タンパク質と非重水素化タンパク質

Fig. 5 A crystallographic structure of cytochrome c_3 from *Desulfovibrio vulgaris* Miyazaki F⁽¹⁶⁾.

Fig. 6 ^1H NMR spectra of cytochrome c_3 from *D. vulgaris* Miyazaki F at 400 MHz⁽¹⁵⁾.

Top, nonlabeled protein; bottom, deuterated protein obtained from cells cultured in a minimal medium with L-methionine-*methyl*- d_3 . The assignment of heme methyl signals is given on the top. H_i stands for the heme numbering. The signals affected by deuteration are indicated by broken lines. The spectra were observed at pH 7.0 and 30°C.

の低磁場領域のスペクトルを図6に示す¹⁵⁾。酸化型のチトクロム c_3 は常磁性の低スピン状態をとっているため、スペクトルは常磁性シフトにより反磁性のものよりも広がっている。この低磁場側の領域には鉄の影響を受けやすいヘムプロトン由来のシグナルが多く集まっている。2つのスペクトルを比較すると明らかなように、この領域で8本のシグナルが重水素化によって消失している。メチオニンのシグナルはもっと高磁場側に現れるので、メチオニンに由来するものではない。我々はヘム由来の

かなりのシグナルの帰属を既に終えており、消失したシグナルはヘムメチル基によるものであることが直ちに明らかになった。チトクロム c_3 は4つのヘムを持っているので、合計16個のヘムメチル基が存在する。したがって、消失したのは全部ではない。図に示した帰属から明らかなように、消失したのはすべて2位および7位のヘムメチル基である。この結果から、硫酸還元菌ではヘムの生合成の過程でメチオニンのメチル基がポルフィリン骨格の2位と7位に導入されると結論できる。

Fig. 7 Biosynthetic pathway of vitamin B₁₂¹⁷⁾.

ところで、この結論は今までに確立されている図2のようなポルフィリン生合成経路と明らかに矛盾する。この経路によれば、ヘムメチル基はすべてウロポルフィリンの酢酸基の脱炭酸によって生じており、どこにもメチオニンからのメチル基転位が起こる可能性はない。したがって、硫酸還元菌におけるポルフィリンの生合成は今まで考えられてきたものとは異なった経路で行われていることが明らかになった。

ポルフィリンへのメチル基の転移反応として一番有名なのはビタミンB₁₂の生合成経路である。図7のように、ビタミンB₁₂はウロポルフィリノーゲンⅢからプレコリン、コピリン酸を経て合成される。ここでは多くのメチル基付加反応が起こるが、それらはすべてS-アデノシルメチオニンから転位される。したがって、これらはすべてメチオニンのメチル基由来である。特に、プレコリン2は2位と7位の位置にメチル基が入ったものであり、硫酸還元菌のヘムの前駆体になりうる可能性を持っている。実はプレコリン2は別名ジヒドロシロヒドロクロリンと呼ばれ、これが酸化されたシロヒドロクロリンに鉄が配位するとシロヘムとなる。シロヘムは亜硫酸還元酵素(硫酸還元菌ではデスルフォビリジンとも呼ばれる)の補欠分子で、この酵素は硫酸還元菌の細胞質に大量に存在している。このような状況を考えると、硫酸還元菌ではジヒドロシロヒドロクロリンがポルフィリンの生合成の中間体となっていると考えるのが最も自然である。

そこで我々は、硫酸還元菌 *D. vulgaris* Miyazaki F を使って *in vivo* でのポルフィリン生合成中間体の探索を

始めた。まず、菌体内のポリフィリン中間体が最も多くなる条件を探したところ、通常の培地に5-アミノレブリン酸とメチオニンを加えるとういことがわかった。そこで、表1のような組成の培地を使って硫酸還元菌を大量に培養し、菌体内で生成するポルフィリンの中間体をシリカゲルの薄層のクロマトグラフィー、高速液体クロマトグラフィー、マスペクトルを用いて分析した。また、安定な化合物として分析するために、中間体は酸化してメチルエステル化する。分析においては全過程を可能な限り嫌気的に行うことが重要である。

菌体を破碎し、直ちに乾固して塩酸メタノールにより

Table 1 The composition of the medium for the culture of sulfate-reducing bacteria (g/l).

KH ₂ PO ₄	0.5
NH ₄ Cl	1.0
Na ₂ SO ₄	4.5
CaCl ₂ 2H ₂ O	0.04
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.06
FeSO ₄ 7H ₂ O	0.004
Sodium citrate	0.3
Sodium lactate	6.0
Yeast extract	1.0
5-aminolevulinic acid	0.01
L-methionine	0.2

Distilled water 1 liter pH 7.4

Yeast extract is purchased from DIFCO.

Fig. 8 A LDI-MAS spectrum of porphyrins extracted from the cells of *D. vulgaris* Miyazaki F. Porphyrins extracted from the whole cells were esterified by the HCl-methanol method.

メチルエステル化を行って得られたポルフィリン分画のLDI-MASスペクトルを図8に示す。LDI-MASとは飛行時間型の質量分析計で分子量に対応する質量ピークを与える。図8を見ると、最も強いピークはシロヒドロクロリンモノラクトンヘプタメチルエステル(本来の質量数959)で、これはシロヒドロクロリンが酸性のプロトン存在下でのメチルエステル化の過程で酸化されたものである。次に強いのがシロヒドロクロリンオクタメチルエ

テル(同, 975)で、菌体内にはジヒドロシロヒドロクロリンが圧倒的に多いことを示している。その他には、ウロポルフィリンオクタメチルエステル(同, 943), コプロポルフィリンテトラメチルエステル(同, 711), プロトポルフィリンジメチルエステル(同, 591)の分子量に対応するところにピークが現れている。これらのものは薄層クロマトグラフィーにより精製した後、質量数と R_f 値を確認した。いずれの場合も上記の化合物の R_f と

Fig. 9 LDI-MAS spectra of porphyrins extracted from the cells of *D. vulgaris* Miyazaki F cultured in a medium containing L-methionine-*methyl-d*₃. Porphyrins obtained from the supernatant (A) and precipitation (B) of sonicated cell suspension were esterified by the sulfate-methanol method.

一致することが確かめられた。図8の結果は硫酸還元菌においてはジヒドロシロヒドロクロリンが大きなプールをつくっており、これがシロヘムとプロトヘムの前駆体となっていることを示唆する。

細胞破碎液を遠心分離機にかけ、膜分画と可溶性分画に分けてエステル化を行うと、膜分画にはコプロポルフィリンとプロトポルフィリンが多く、可溶性分画にはウロポルフィリンとシロヒドロクロリンが多い。それが合成の部位の違いによるのか、カルボキシル基が減少するとともに、親水性が落ちるので膜への親和性が増すことによるのかは定かではない。いずれにしても、このような局在は中間体の精製には役に立つ。

ジヒドロシロヒドロクロリンがほんとにプロトポルフィリノーゲンの前駆体であるかどうかを確かめるために、メチル基を重水素化したメチオニンを培地に加えて菌を培養し、中間体を分析した。この試料は膜分画と可溶性分画に分けて硫酸メタノールによりエステル化した。2つの分画から得られたポルフィリン中間体のLDI-MASスペクトルを図9に示す。可溶性分画を見ると、ウロポルフィリンの質量数は全く変わっていないが、シロヒドロクロリンは質量数が5、コプロポルフィリンは4大きくなっている。膜分画を見ると、プロトポルフィリンの質量数がやはり5大きくなっている。ウロポルフィリン以外のものではいずれも質量数が有意に増加しており、コプロポルフィリノーゲンとプロトポルフィリノーゲンはジヒドロシロヒドロクロリンから合成されることがわかる。この実験では質量数の変化が6よりも小さく出ているが、個々の重水素化合物を精製して測った場合には6あるいは7となっていた。

それでは、ジヒドロシロヒドロクロリンからコプロポルフィリノーゲンへと直接変化するのだろうか。図8には質量数858のピークが観測されており、これはシロヒドロクロリンの2つの環の酢酸基から脱炭酸されたものに対応する。実際、この化合物を単体として精製し、質量数を確認するとともに、吸収スペクトルを測定することができた。単離されたものの蛍光がオレンジ色であること(クロリン環の特徴)と吸収スペクトルがシロヒドロクロリンのものとよく似ているので、脱炭酸はC、D環で起こっているものと考えられる。したがって、まずジヒドロシロヒドロクロリンの脱炭酸が起り、次にA、B環から酢酸基が外れてコプロポルフィリノーゲンⅢができると考えられる。現時点で明らかになった中間体を用いて硫酸還元菌におけるポルフィリンの生合成経路をまとめると図10のようになる。

この生合成経路を確立するためには、まだ多くのこと

Fig. 10 A proposed anaerobic biosynthetic pathway of porphyrins in sulfate-reducing bacteria.

がなされねばならない。まず、中間体を大量に精製して、NMRによる構造決定を行い、質量分析の結果を確認せねばならない。また、今後は*in vitro*の実験および遺伝子工学的な実験により、この生合成経路に関わる酵素を明らかにし、反応機構を解明する必要がある。中でも、コプロポルフィリノーゲンの酸化の機構の解明は重要な課題である。

4. 新しく発見された生合成経路の持つ意味

まだ全容が明らかになったわけではないが、硫酸還元菌では今まで知られていたのとは異なる嫌気的なポルフィリンの生合成経路が働いていることが明らかになった。この生合成経路が硫酸還元菌特有なものなのか、それとも嫌気性生物に共通のものであるのかは今後の研究を待たねばならない。しかし、ポルフィリンのような重要な生体分子の生合成経路が多種類あるとは考えられず、少なくとも偏性嫌気性菌には共通である可能性がある。シロヘムが亜硫酸還元酵素や亜硝酸還元酵素など硫酸呼吸や硝酸呼吸の中心的な酵素の活性中心になっていることから考えて、進化の初期の段階ではシロヘムが酸化還元反応において重要な役割を果たしていた可能性がある。さらに、シロヘムの元になっているジヒドロシロヒドロクロリンはさまざまなポルフィリン誘導体への分岐点となる。これらは多様な金属と錯体をつくり、チトクロム類(中心金属は鉄)、ビタミンB₁₂(中心金属コバルト)、補酵素F₄₃₀(中心金属ニッケル)、クロロフィル(中心金属マグネシウム)など多様な反応中心を生み出した。しかし、生物が酸素を利用するようになって反応をより効率的にするためにジヒドロシロヒドロクロリンをスキップする新しいポルフィリン合成の経路が生まれてきたのであろう。ポルフィリン合成系の進化は今後の興味ある課題の1つである。

(平成7年12月5日受理)

文 献

- 1) 佐野晴洋, 「金属タンパク質の化学」講談社, 東京, 1983, p.88
- 2) H.C. Friedmann, R.K. Thauer, *Encyclopedia of Microbiology* Vol.3, p.1~19, Academic Press Inc. (1992)
- 3) G.V. Louie, P.D. Brownlie, R. Lambert, J.B. Cooper, T.L. Blundell, S.P. Wood, M.J. Warren, S.C. Woodcock, P.M. Jorda, *Nature*, 359, 33 (1992)
- 4) G.H. Tait, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 37, 116 (1969)
- 5) G.H. Tait, *Biochem. J.*, 128, 1159 (1972)
- 6) M. Mori, S. Sano, *Biochim. Biophys. Acta*, 264, 252 (1972)
- 7) S.A. Coomber, R.M. Jones, P.M. Jordan, C.N. Hunter, *Mol. Microbiol.*, 6, 3159 (1992)
- 8) K. Xu, J. Delling, T. Elliot, *J. Bacteriol.*, 174, 3953 (1992)
- 9) K. Xu, T. Elliot, *J. Bacteriol.*, 175, 4990 (1993)
- 10) K. Xu, T. Elliot, *J. Bacteriol.*, 176, 3196 (1994)
- 11) B. Troup, M. Jahn, C. Hungerer, D. Jahn, *J. Bacteriol.*, 176, 673 (1994)
- 12) B. Troup, C. Hungerer, D. Jahn, *J. Bacteriol.*, 177, 3326 (1995)
- 13) D.J. Klemm, L.L. Barton, *J. Bacteriol.*, 164, 316 (1985)
- 14) D.J. Klemm, L.L. Barton, *J. Bacteriol.*, 169, 5209 (1987)
- 15) H. Akutsu, J.-S. Park, S. Sano, *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 12185 (1993)
- 16) Y. Higuchi, M. Kusunoki, Y. Matsuura, N. Yasuoka, M. Kakudo, *J. Mol. Biol.*, 172, 109 (1984)
- 17) A.I. Scott, *Acc. Chem. Res.*, 23, 308 (1990)