



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	バクテリオクロフィルの分析
Author(s)	民秋, 均; 溝口, 正
Description	3章 単離・精製・活性測定 5. 色素の分析 c
Relation	光合成研究法. 北海道大学低温科学研究所, 日本光合成研究会共編
Citation	低温科学, 67, 339-346
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39164
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-049.pdf



5. 色素の分析

c. バクテリオクロロフィルの分析

民秋 均¹⁾, 溝口 正²⁾

バクテリオクロロフィルは、光合成アンテナや反応中心において、光収穫・エネルギー伝達や電子移動を行う光応答性の色素分子である。本章では酸素非発生型光合成細菌からのバクテリオクロロフィルの抽出・分析方法について紹介する。

Analysis of Bacteriochlorophylls

Hitoshi Tamiaki, Tadashi Mizoguchi

Bacteriochlorophylls are photoactive pigments in photosynthetic antennas and reaction centers where light-harvesting, energy-transferring and electron-transferring processes occur. In this chapter, we describe analytical methods of bacteriochlorophylls in anoxygenic photosynthetic bacteria. variety of bacteriochlorophylls, their biosynthesis and principle of their analysis are also described.

5.c.1 バクテリオクロロフィルの種類

バクテリオクロロフィルは、酸素非発生型光合成細菌から見出されたクロロフィルに名付けられている。そのような光合成細菌にあるクロロフィル類は、主としてバクテリオクロロフィルであるが、一部マイナーなクロロフィル（緑色硫黄細菌やヘリオバクテリアの反応中心における一次電子受容体）には、酸素発生型光合成生物に見出されるクロロフィル *a* の誘導体として名付けられているものも有るので注意しましょう。

バクテリオクロロフィルには、*a* から *g* までの7種類が有り、これまで *f* を除く6種類が確認されている（バクテリオクロロフィル *f* は名前が予約されているだけで、天然界からは発見されていない）。17位上のプロピオネート残基における長鎖炭化水素基の多様性を除けば、バクテリオクロロフィル *a*、バクテリオクロロフィル *b*、バクテリオクロロフィル *g* は、B・D両環のβ位の炭素-炭素二重結合が単結合に還元されたバクテリオクロリン骨格を有する単一の分子構造を示し、バクテリオクロロフィル *c*~*f* は、D環のみが還元されたクロリン骨格を有する同族体分子の総称である（図1）¹⁾。名称とπ骨格とが一致しない（クロリン骨格を有するバクテリオクロロフィルが存在する）ので、混乱しないように心掛けるべきである。酸素非発生型光合成細菌から単離されたクロロフィル型分子に、バクテリオクロロフィルという

名称が与えられているのであって、バクテリオクロリン骨格を有する化合物にバクテリオクロロフィルという名称が与えられている訳ではないことを、再確認しましょう。

まず17位上の長鎖エステル基の多様性を無視して、バクテリオクロロフィルの分子構造について簡単に説明しましょう。バクテリオクロロフィル *a* は多くの紅色細菌に見られるが（表1）、その8位と8¹位から各1個の水素原子を除いて（*E*）-8-エチリデン基になったものが、バクテリオクロロフィル *b* である（図1）。バクテリオクロロフィル *b* も一部の紅色細菌から見出されているが、その天然界における分布はさほど多くない。バクテリオクロロフィル *b* の3-アセチル基をビニル基にしたものが、ヘリオバクテリアで見出されたバクテリオクロロフィル *g* である。好酸性紅色細菌の中にはバクテリオクロロフィル *a* の中心金属がマグネシウムから亜鉛に置き変わったものも有り、亜鉛バクテリオクロロフィル *a* と呼ばれている。

バクテリオクロロフィル *c* は多くの緑色細菌に見られるが、その20位のメチル基を水素原子に置き換えたものがバクテリオクロロフィル *d* に、その7位のメチル基をホルミル基に置き換えたものがバクテリオクロロフィル *e* になる。なお、バクテリオクロロフィル *e* の20位脱メチル体がバクテリオクロロフィル *f* という名前で予約されている。バクテリオクロロフィル *c*~*e* は、8²や12¹位上でのメチル化度が異なる同族体の総称であり、これまで8位にエチル・プロピル・イソブチル・ネオペンチル基が、12位にメチル・エチル基が見出されている。

1) 立命館大学総合理工学院薬学部薬学科

2) 立命館大学総合理工学院生命科学部応用化学科

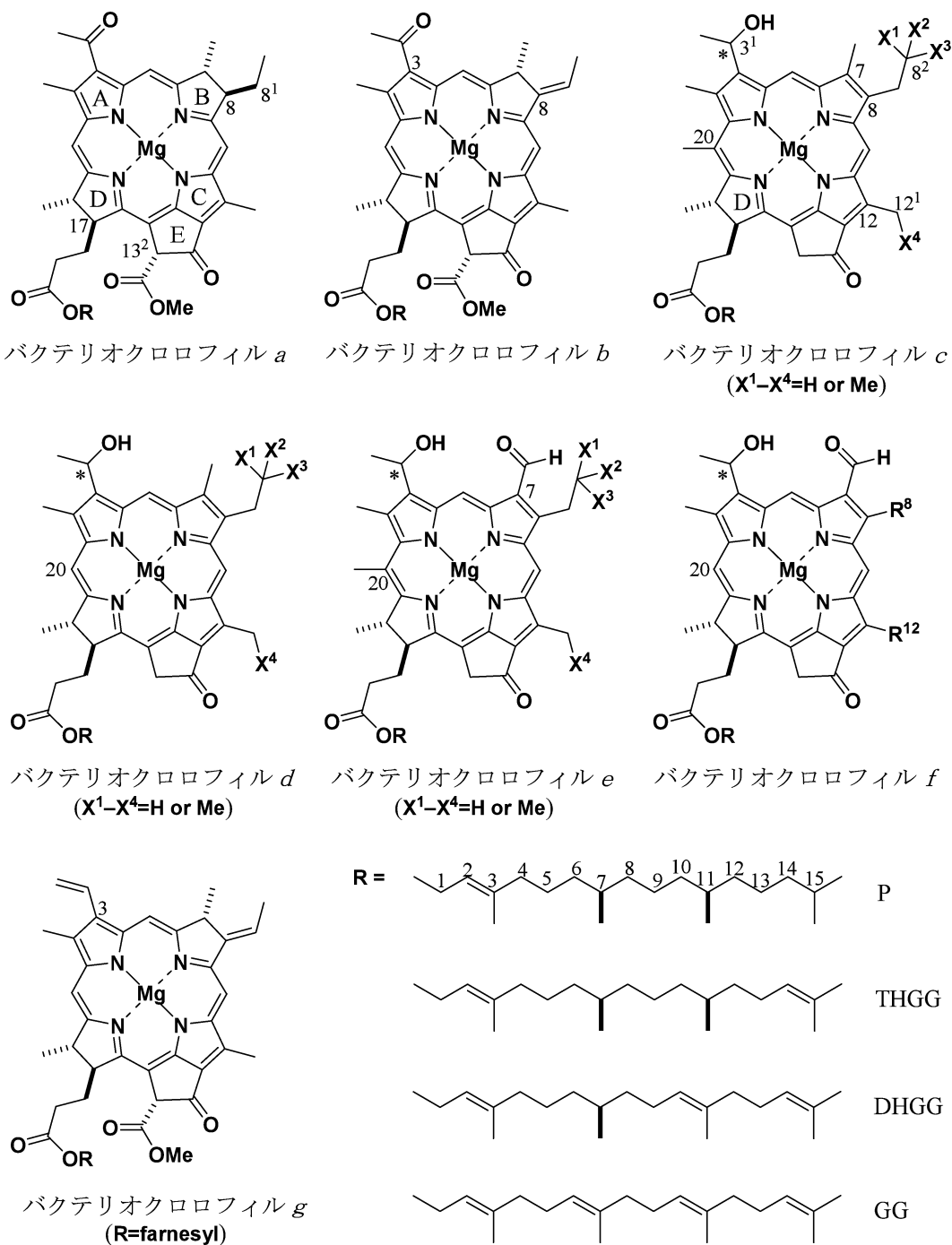


図1：バクテリオクロロフィル *a*～*g* の分子構造

さらに、それぞれの同族体において、 3^1 位の不斉炭素原子に関して立体構造の異なるもの (*R* 体と *S* 体) が存在することも多い。

17 位上の長鎖エステル基は、バクテリオクロロフィル *a* やバクテリオクロロフィル *b* では通常フィチル基 (P) である。種によってはその生合成途上のゲラニルゲラニル (GG)・ジヒドロゲラニルゲラニル (DHGG)・テトラヒドロゲラニルゲラニル (THGG) もみられることがあ

る(図1)²⁾。バクテリオクロロフィル *g* ではファルネシル基しかこれまで見つかっていない。緑色硫黄細菌のバクテリオクロロフィル *c*～*e* では、主としてファルネシル基であるが、それ以外の多様な炭化水素基も見出されている。緑色非硫黄細菌のバクテリオクロロフィル *c* では、上記の分枝炭化水素基以外に、ステアリルやオレイル基のような直鎖状のものまでが見られる。

バクテリオクロロフィルの中心金属を除いたもの

表1: バクテリオクロロフィルの種類および存在する器官と生物種

バクテリオクロロフィル類	光合成器官	生物種
バクテリオクロロフィル <i>a</i>	LH1, LH2, LH3, LH4, RC (紅色細菌) ベースプレート, FMO, RC 複合体 (綠色硫黄細菌) ベースプレート, 膜内アンテナ, RC (綠色非硫黄細菌)	紅色細菌 綠色細菌
バクテリオクロロフィル <i>b</i>	LH1, RC	紅色細菌
バクテリオクロロフィル <i>c</i>	クロロゾーム	綠色細菌
バクテリオクロロフィル <i>d</i>	クロロゾーム	綠色硫黄細菌
バクテリオクロロフィル <i>e</i>	クロロゾーム	綠色硫黄細菌
バクテリオクロロフィル <i>f</i>	未発見	
バクテリオクロロフィル <i>g</i>	RC 複合体	ヘリオバクテリア
亜鉛バクテリオクロロフィル <i>a</i>	LH1, LH2, RC	好酸性紅色細菌
バクテリオクロロフィル <i>a'</i>	RC の一次電子供与体 (綠色硫黄細菌)	綠色硫黄細菌
バクテリオクロロフィル <i>g'</i>	RC の一次電子供与体 (ヘリオバクテリア)	ヘリオバクテリア
バクテリオフェオフィチン <i>a</i>	RC の一次電子受容体 (紅色細菌)	紅色細菌
	RC の一次電子受容体とアクセサリ一部 (綠色非硫黄細菌)	綠色非硫黄細菌
バクテリオフェオフィチン <i>b</i>	RC の一次電子受容体 (紅色細菌)	紅色細菌

(フェオフィチン化)を, バクテリオフェオフィチンと呼び, 紅色細菌や綠色非硫黄細菌の PS 2 型の反応中心における一次電子受容体として機能している (表 1)。また, バクテリオクロロフィルの 17 位上のプロピオネート残基のエステルを加水分解して得られるカルボン酸体を, バクテリオクロロフィリドと呼び, このようなカルボン酸が生合成途上で見られる。さらに, 13² 位の不斉炭素原子における立体異性体 (エプimer) をプライム体と呼び, 「'」を名称の後に付ける。バクテリオクロロフィル *a'* とバクテリオクロロフィル *g'* が, 綠色硫黄細菌とヘリオバクテリアの PS 1 型の反応中心における一次電子供与体にあるとされている (表 1)³⁾。

バクテリオクロロフィル *a・b・g* は, オリゴペプチドと非共有結合して, バクテリオクロロフィルータンパク複合体を形成しており, その中心マグネシウムはアキシャル位から配位を受けて, 必ず五配位錯体となっている。この第五配位子は, オリゴペプチド中のヒスチジン残基のイミダゾール基であることが多いが, それ以外の残基や水分子などの場合も有る⁴⁾。バクテリオクロロフィル *c~f* は, 自己集積して巨大な J 会合体を形成しており, その中心マグネシウムは隣接分子の 3¹ 位の水酸基の酸素原子のアキシャル位配位を受けている⁵⁾。いずれのバクテリオクロロフィルでも天然界では, 中心マグネシウムは五配位型であり, 四配位や六配位錯体では存在していないことに注意しましょう⁶⁾。

5.c.2 バクテリオクロロフィルの生合成

ヘムやクロロフィルと共通して, プロトポルフィリン IX が生合成経路における前駆体となる (図 2)。マグネシ

ウムを中心に挿入し, 13 位上でのプロピオネート残基のメチルエステル化とそれに続く嫌気下でのオキシ化とエキソ五員環形成によって, (3,8-)ジビニルプロトクロロフィリド *a* が合成される。ここまでは, 酸素発生型光合成で見られるクロロフィル *a・b* と同じである。この後, どのような経路でバクテリオクロロフィルを合成されるのかは, いくつかの経路が提唱されており, まだ確定していない⁷⁻¹⁰⁾。以下に, ジビニルプロトクロロフィリド *a* からバクテリオクロロフィリドに至る酵素による官能基変換を列挙する (図 2)。

- 1) 3-ビニル基は, マルコフニコフ型で水分子の付加を受け 1-ヒドロキシエチル基になり, さらに酸化されることでアセチル基に変換される。
- 2) 7 位のメチル基が酸化されて, ホルミル基になる。
- 3) 7-8 位の二重結合がトランス型で「水素分子」の付加 (還元) を受ける。
- 4) 8-ビニル基は還元を受けてエチル基になり, その末端のメチル基の水素原子が順次メチル化されることで, プロピル・イソブチル・ネオペンチル基へと変換される。また, 7-8 位の二重結合と共役した 8-ビニル基は, 1,4-水素付加 (還元) を受けて 8-エチリデン基に変換されうる。8-エチリデン基は, 7-8 位の二重結合の還元後の 8-ビニル基の異性化によって合成される可能性と, 7-8 位の二重結合と 8-ビニル基の両方の還元後に 8 位と 8¹ 位の水素脱離 (脱水素・酸化) によって合成される可能性が有る。
- 5) 12 位のメチル基の水素原子がメチル化されて, エチル基になる。
- 6) 13² 位のメトキシカルボニル基が加水分解を受けてカルボキシ基となり, さらに脱炭酸して水素原子にな

表2：バクテリオクロロフィルのジエチルエーテル中での吸収極大 $\lambda_{\max}$ (nm) と吸光係数 ϵ ($\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

バクテリオクロロフィル類		ソーレー帯	Q_x 帯	Q_y 帯	文献
バクテリオクロロフィル <i>a</i>	$\lambda_{\max}$	358	577	773	11
	ϵ			90.0	
	$\lambda_{\max}$	357		771	12
バクテリオクロロフィル <i>b</i>	ϵ	75.3		97.0	
	$\lambda_{\max}$	368	578	794	11
	ϵ			106	
バクテリオクロロフィル <i>c</i>	$\lambda_{\max}$	372		791	12
	ϵ	77.2		106	
	$\lambda_{\max}$	429		659	11
バクテリオクロロフィル <i>d</i>	ϵ			112.5	
	$\lambda_{\max}$	429		660	12
	ϵ	112		73	
バクテリオクロロフィル <i>e</i> *	$\lambda_{\max}$	423		651	11
	ϵ			113.5	
	$\lambda_{\max}$	423		651	12
バクテリオクロロフィル <i>e</i> *	ϵ	117		88.3	
	$\lambda_{\max}$	458		647	11, 12
	ϵ	100		34	
バクテリオクロロフィル <i>g</i>	$\lambda_{\max}$	364, 404	565	767	11
	$\lambda_{\max}$	364 (0.94)*		767 (1.00)*	12
亜鉛バクテリオクロロフィル <i>a</i>	$\lambda_{\max}$	353 (0.80)*		763 (1.00)*	12
バクテリオフェオフィチン <i>a</i>	$\lambda_{\max}$	358		749	12
	ϵ	114		67.5	
バクテリオフェオフィチン <i>b</i>	$\lambda_{\max}$	398		776	12
	ϵ	237		100	

* アセトン中, * 相対吸光強度.

である。さらに、蛍光発光による検出法を用いれば、高感度な分析が可能であり、質量分析を検出に用いる LC-MS 法を用いれば、高感度分析の上に、エステル鎖と同族体の決定にも威力を発揮する。なお、 3^1 位の立体構造は、誘導体の結晶構造解析によって決定できるが、これまでの多くの分析結果に基づき、HPLC の溶離順によってほぼ確定できる (5.c.6 参照)。

5.c.4 光合成細菌からのバクテリオクロロフィルの抽出法

酸素非発生型光合成細菌は、自然から単離精製するか研究室のストックや各種団体からの分与によって入手することになる。この種菌をゲルや液体培地で培養して増殖してから、バクテリオクロロフィルを抽出することになる。いずれの場合でも、コロニー形成による精製を行っておいた方が、微量バクテリオクロロフィルの分析には安心である。

通常は、液体培地で培養後に、菌体を遠心沈降によって分離し、そのウェットセルから抽出することになる。以下に菌体からのバクテリオクロロフィルの抽出法を述べる。

光合成細菌からのバクテリオクロロフィルの抽出法は、利用可能な溶媒・器具等により様々であるが、本稿では一般的な化学系実験室で可能な方法について記述する。なお、バクテリオクロロフィルを変性させる外部因子として、光・熱・酸素があげられる。必要に応じこれらの因子の低減を心がけるべきである。

(1) 少量の抽出 (吸収スペクトル測定, HPLC 分析)

器具＝卓上型遠心分離器(あると便利)、キャップ付き試験管

試薬・溶媒＝アセトン、メタノール、ジエチルエーテル、飽和食塩水、窒素ガス

操作①：培養液 5 mL 程度を遠心沈降し、ウェットセルを得る (1000 g 程度を発生させる卓上型遠心器で十分に沈降できる)。卓上型遠心器が無い場合は、培養液 (1 mL 程度) そのものを用いて以下の操作を行うことも可能である。バクテリオクロロフィルは脂溶性であるため、水の割合 (培養液量) が増えると抽出効率が悪くなる。必要に応じて、溶媒量を調節すること。

操作②：ウェットセルに、アセトン／メタノール混合溶液 (≒1:1(v/v)) (2 mL) を加え、よく攪拌する (超音波照射等の激しい破碎を行わなくても十分抽出され

る)。

操作③：再度遠心分離し，上清画分を回収する（ろ過により残渣を除去してもよい）。

操作④：回収した上清画分（アセトン／メタノール混合溶液＋微量の水）に同量のエーテルを加え（2 mL），更に（蒸留）水を加えて色素をエーテル層に抽出する。

操作⑤：エーテル層は，飽和食塩水を用いて脱水・洗浄する。

操作⑥：エーテル層を回収し，窒素ガス気流などで溶媒を留去後，目的の溶媒に再溶解し，種々の測定・分析に用いる。

以上の操作は数分間で十分行えるので，通常の白色蛍光灯下で作業しても大抵のバクテリオクロロフィルは安定に抽出できる。

(2) 大量の抽出

原理的には上記(1)の少量での抽出と同じである。作業時間が幾分長くなるので，各操作中，容器をこまめに遮光することを心がけること。

器具＝磁気攪拌器，三角フラスコ，分液ろうと，ロータリーエバポレータ

試薬・溶媒＝アセトン，メタノール，ジエチルエーテル，飽和食塩水，無水硫酸ナトリウム，窒素ガス

操作①：ウェットセルにアセトン／メタノール混合溶液を加え，磁気攪拌器を用いてよく攪拌する。必要に応じて（特にバクテリオクロロフィル *b* や *g* などの空気酸化が起こりやすい試料の場合），窒素ガスを通気した窒素雰囲気下で行うことで試料の変性が低減される。

操作②：デカンテーションにて溶液を回収し，残渣に対して①と同様の操作を色素が抽出されなくなるまで行う。

操作③：アセトン／メタノールの抽出液を混合し，エーテルと（蒸留）水で分液・洗浄する。

操作④：エーテル層は飽和食塩水で脱水・洗浄し，無水硫酸ナトリウムを加え 15 分以上脱水する。

操作⑤：ロータリーエバポレータを用いて溶媒を留去する。

試料の保存は，乾燥状態の場合，窒素ガスを封入し（空気による酸化に注意），冷凍保存する。溶液保存の場合は，ジエチルエーテルやアセトン等を溶媒として用い冷凍保存する。いずれの保存法でも容器は遮光しておく。バクテリオクロロフィルの変性を誘起する因子（光・熱・酸素）を低減させれば，長時間，安定に保存できる（年単位での保存も可能）。

(3) 単離・精製法

上記の抽出操作では，目的のバクテリオクロロフィル以外にカロテノイド色素も抽出されるので，カラムクロマトグラフィーや再結晶等による精製が必要となる。その精製時における注意点を下記に示す。

- 一般的に市販されているシリカゲルによるバクテリオクロロフィルの単離は，試料の変性を誘起しやすいため困難である（固定相であるシリカゲルが酸性であるため）。
- バクテリオクロロフィルの単離に適した固定相としては，Sephrose（アガロース）やセルロースがあげられる。Sephrose は，幾分高価であるが分離能は極めて高い。一方，セルロースは，安価であるが分離能の点で Sephrose に劣る。
- 緑色細菌に含まれるバクテリオクロロフィル *c*～*e* に関しては，ヘキサン等の無極性溶媒への溶解度が低いので，再結晶により単離が容易に行える。

なお，十分に純度の高いバクテリオクロロフィルを得るためには，5.c.6 で述べる HPLC を利用する必要がある。

5.c.5 吸収スペクトル測定によるバクテリオクロロフィルの同定

一般的なダブルビーム型分光光度計を用いた同定法を以下に記述する。

光合成細菌に含まれるバクテリオクロロフィルは，それらに固有の吸収帯を有しているので，吸収スペクトルから容易に同定が行える（表 2）。特に最長波長吸収帯である Q_y 帯は，バクテリオクロロフィルの種類により大きな差があるので，識別に適している。測定に用いる溶媒は，ジエチルエーテルやアセトン等が一般的で，これらの溶媒中でのモル吸光係数も決定されているので便利である。溶媒の吸収にも配慮し，使用する溶媒を選定する（アセトンは紫外部に吸収を有するため，350 nm よりも短波長領域での測定は出来ない）。バクテリオクロロフィル *a*・*b*・*g* では， Q_x 帯の吸光度も大きいので，色素の同定に有効である。特に，脱マグネシウム化したか否かの確認（あるいはバクテリオフェオフィチンの生成）の際に威力を発揮する。緑色細菌のバクテリオクロロフィル *c*～*e* では， Q_x 帯の強度が低いので，ソーレー帯によるフェオフィチン化の識別が有効である（ Q_y 帯に比べ波長の変化が大きく識別が容易）。バクテリオクロロフィルは，大きなモル吸光係数を有するため，目視にて着色が確認できる程度の濃度（ μM オーダー）で十分測定可能であ

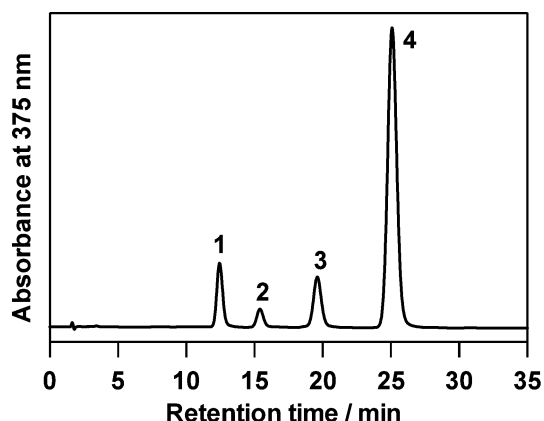


図3：紅色光合成細菌のバクテリオクロロフィル *a* の逆相 HPLC 分析例。

- 1：ゲラニルゲラニルエステル
- 2：ジヒドロゲラニルゲラニルエステル
- 3：テトラヒドロゲラニルゲラニルエステル
- 4：フィチルエステル

Cosmosil 5C18-AR-II(4.6 x 150 mm), 7.5% (v/v) 水-メタノール, 1.0 mL/min²⁾。

る。バクテリオクロロフィル *a*・*b*・*g* の場合、可視部の吸収が弱いので注意を要する（容易に吸収が飽和する）。

5.c.6 HPLC によるバクテリオクロロフィルの同定

HPLC のための注入試料の調製は次の通りである。まず、抽出・単離したバクテリオクロロフィルを、HPLC で使用する移動相溶媒に置換する。0.45 μ m の細孔径を有すフィルターでろ過後、HPLC に注入する。ろ過フィルター以外にも多種の前処理カートリッジが市販されているので、カロテノイド色素の除去に便利である。

大部分のバクテリオクロロフィルは、メタノール/水 (10%程度) の混合溶媒を用いた逆相系 HPLC により容易に分離・同定が行える。オクタデシルシリル (ODS) カラムを固定相とした逆相 HPLC による分離・同定について以下に記述する。

- ・バクテリオクロロフィル *a*・*b* では、17 位の長鎖エステルの微細な構造の違いも分離可能である (図3)²⁾。また、バクテリオクロロフィル *a* とその 13² 位における光学異性体のバクテリオクロロフィル *a'* の分離も簡単に行える。
- ・緑色細菌に含まれるバクテリオクロロフィル *c*~*e* では、8 位および 12 位のアルキル基におけるメチル化度の異なる一連の同族体の分離も可能である¹³⁾。メチル化度が高い化合物ほど、その脂溶性が高くなるので逆相系 HPLC では溶出が遅くなる (図4)。また、3¹ 位に

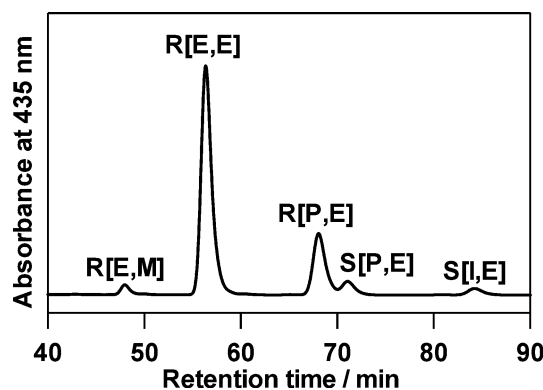


図4：緑色光合成細菌のバクテリオクロロフィル *c* の逆相 HPLC 分析例。

- R [E, M]: (3¹R)-8-エチル-12-メチル体
 R [E, E]: (3¹R)-8-エチル-12-エチル体
 R [P, E]: (3¹R)-8-プロピル-12-エチル体
 S [P, E]: (3¹S)-8-プロピル-12-エチル体
 S [I, E]: (3¹S)-8-イソブチル-12-エチル体

Cosmosil 5C18-AR-II(4.6 x 150 mm), 10% (v/v) 水-メタノール, 0.5 mL/min¹³⁾。

おける光学異性体 (*R* または *S* 型) も分離ができ、*R* 型配置の方が溶出は早い (図4)。

バクテリオクロロフィルの順相系 HPLC 分析では、用いるカラム (=シリカゲル) の酸性度に注意が必要である。バクテリオクロロフィル *b*・*g* では、分析中に容易に B 環の異性化が生じクロロフィル誘導体へと変性する。また、ヘキサン等の無極性溶媒がベースとなるため、緑色細菌のバクテリオクロロフィル *c*~*e* に対しては、溶解度が低いため、不向きと言える。

参考文献

- 1) H. Tamiaki, R. Shibata & T. Mizoguchi, *Photochem. Photobiol.* **83** (2007) P.152.
- 2) T. Mizoguchi, J. Harada & H. Tamiaki, *FEBS Lett.* **580** (2006) P.6644.
- 3) 小林正美, 大橋俊介, 光合成微生物の機能と応用 (上原 赫監修), 第1章の3, シーエムシー出版, 2006.
- 4) T. Oba & H. Tamiaki, *Photosynth. Res.* **74** (2002) P.1.
- 5) H. Tamiaki, *Coord. Chem. Rev.* **148** (1996) P.183.
- 6) 民秋 均, 金属錯体の光化学 (佐々木陽一・石谷 治編著), 13章, 三共出版, 2007.
- 7) T. Masuda & Y. Fujita, *Photochem. Photobiol. Sci.* **7** (2008) P.1131.
- 8) R. D. Willows & A. M. Kriegel, *The Purple Phototrophic Bacteria* (C. N. Hunter, F. Daldal, M. C. Thurnauer & J. T. Beatty, ed.) [*Adv. Photosynth. Respiration* 28], Chapter 4, Springer, 2009.
- 9) N.-F. Frigaard, A. G. M. Chew, J. A. Maresca & D. A.

- Bryant, *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls* (B. Grimm, R. J. Porra, W. Rüdiger & H. Scheer, ed.) [*Adv. Photosynth. Respiration* 25], Chapter 15, Springer, 2006.
- 10) T. Mizoguchi, H. Oh-oka & H. Tamiaki, *Photochem. Photobiol.* **81** (2005) P.666.
- 11) *Chlorophylls* (H. Scheer, ed.), P.731, CRC Press, 1991.
- 12) *光合成事典* (日本光合成研究会編), P.392, 学会出版センター, 2003.
- 13) T. Mizoguchi, T. Y. Kim, S. Sawamura & H. Tamiaki, *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) P.16759.