

BIOSYNTHESIS
OF TETRAPYRROLIC
PIGMENTS

A. F. MIRONOV

Key points of biosynthesis of porphyrins, chlorophylls, and cobalamines, the major pigments in the living nature, are described.

Излагаются современные представления о путях формирования в живых организмах таких важнейших биологически активных соединений, как порфирины, хлорофиллы и витамин В₁₂.

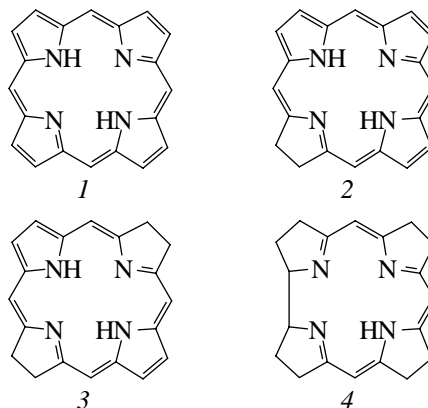
**БИОСИНТЕЗ
ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ
ПИГМЕНТОВ**

А. Ф. МИРОНОВ

Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

ВВЕДЕНИЕ

Тетрапиррольные пигменты – порфирины, хлорофиллы и кобаламины играют исключительно важную роль в жизни животных, растений и бактерий. Эти ярко окрашенные соединения содержат в своем составе макроцикл, состоящий из четырех молекул пиррола. У порфиринов, имеющих красный цвет, пирролы соединены между собой метиновыми мостиками и макроцикл носит название “порфин” (1). В хлорофиллах, для которых характерна зеленая окраска, частично гидрированы один или два пиррола и молекула носит название “хлорин” (2) и “бактериохлорин” (3). Для кобаламинов, важнейшим среди которых является витамин В₁₂, все четыре кольца частично гидрированы и вместо одного метинового мостика имеется непосредственная связь между двумя пирролами. Этот цикл называется коррином (4)



В составе гемоглобина, миоглобина, цитохромов, каталазы и пероксидазы порфирины выступают в виде комплексов с ионами железа – гемов. Хлорофиллы и бактериохлорофиллы содержат магний. Витамин В₁₂ и родственные ему кобаламины, как следует из названия, имеют в качестве центрального иона кобальт.

Вслед за установлением строения основных природных порфиринов, хлорофиллов и кобаламинов перед учеными, работающими в этой области, встала грандиозная задача по раскрытию путей биосинтеза этих соединений в природе. Структурное подобие этих пигментов позволило предположить

наличие общих исходных метаболитов и близкие пути их превращений. Выполненные в дальнейшем исследования блестяще подтвердили это. В настоящее время в результате полувековых усилий большой армии химиков и биохимиков общая картина биосинтеза протогема, хлорофилла *a* и витамина B_{12} в значительной мере расшифрована.

ОБЩИЙ ПУТЬ ОБРАЗОВАНИЯ ТЕТРАПИРРОЛЬНЫХ ПРЕДШЕСТВЕННИКОВ

Начало исследований обычно принято относить к 1945 году, когда молодой американский ученый Шемин поставил эксперимент на собственном организме, приняв порцию простейшей аминокислоты глицина, которая отличалась от обычной аминокислоты заменой изотопа ^{14}N на ^{15}N . Через некоторое время он выделил из крови гемоглобин и затем гемин, содержащий повышенное содержание изотопа ^{15}N . Позднее было показано, что глицин конденсируется с сукцинил-коэнзимом А, давая δ -аминолевулиновую кислоту (δ -АЛК; схема 1, 1). Этот процесс катализируется ферментами АЛК-синтетазой, и его обязательным участником является фосфорилированная форма витамина B_6 – пиридоксальфосфат. Последующими исследованиями было показано, что δ -АЛК выступает в качестве общего предшественника в биосинтезе всех природных тетрапиррольных пигментов. Описанное образование δ -АЛК характерно для животных и фотосинтетических бактерий. В растениях и у некоторых прокариотов δ -АЛК синтезируется из глютаминовой кислоты.

Две молекулы δ -АЛК под действием фермента порфобилиноген-синтетазы (схема 2) конденсируются в молекулу пиррола (2), получившего название

“порфобилиноген” (ПБГ). Следующая стадия биосинтеза – превращение четырех молекул ПБГ в макроцикл уропорфириноген III (Уро'ген III, 3). Конденсация ПБГ в Уро'ген III состоит из двух этапов. На первом происходит полимеризация ПБГ под действием фермента ПБГ-дезаминазы в линейный тетрапиррол. На втором в присутствии фермента косинтетазы происходит не только замыкание билана (схема 2, 4) в макроцикл, но и поворот одного из пиррольных колец (пиррола D) с образованием природного III типа изомера – Уро'гена III. При отсутствии косинтетазы билан (4) замыкается в другой изомер – Уро'ген I, который в последующем биосинтезе не участвует. Только при наличии двух ферментов – деаминазы и косинтетазы – ПБГ замыкается в изомер III типа. Отдельно взятая косинтетаза не полимеризует ПБГ и не в состоянии изомеризовать Уро'ген I в Уро'ген III. Лишь в начале 90-х годов был окончательно раскрыт механизм образования Уро'гена III.

После получения деаминазы высокой степени чистоты генноинженерными методами стало возможным показать, что фермент (Е) содержит активный центр – кофактор, состоящий из двух соединенных между собой молекул ПБГ. Этот дипирролилметан ковалентно связан с белком через атом серы остатка цистеина. Молекулы ПБГ последовательно присоединяются к дипирролилметану (с потерей NH_3), образуя цепочку из трех (ES_1), четырех (ES_2), пяти (ES_3) и шести (ES_4) пирролов. Причем все присоединения происходят по типу “голова к хвосту”, и, следовательно, полипиррольная цепь имеет регулярно чередующиеся заместители $A-P-A-P-A-P-$ и т.д. После присоединения четвертой молекулы ПБГ тетрапиррольная цепочка

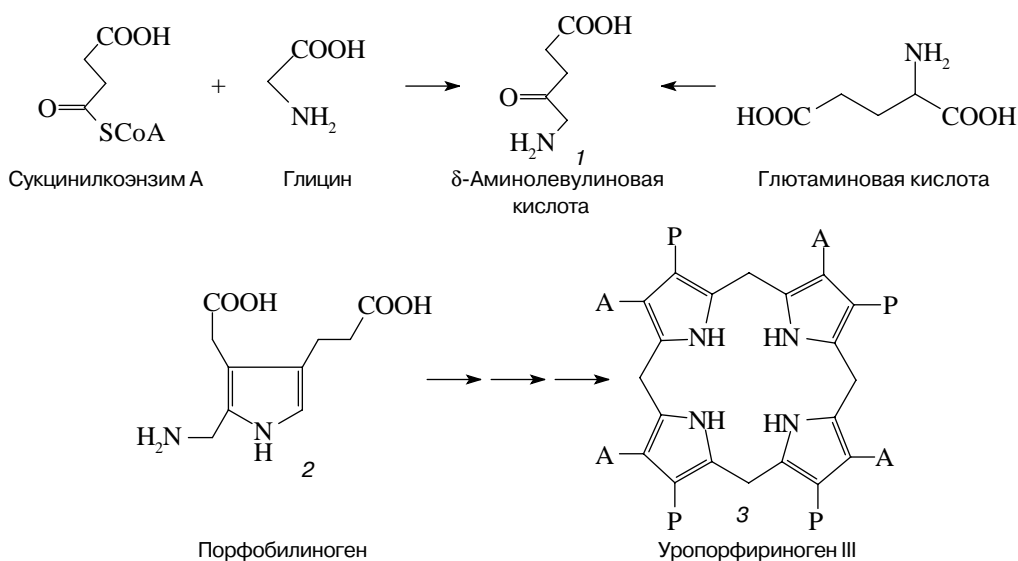


Схема 1. Начальный этап биосинтеза тетрапиррольных пигментов (А и Р – остатки уксусной и пропионовой кислот соответственно)

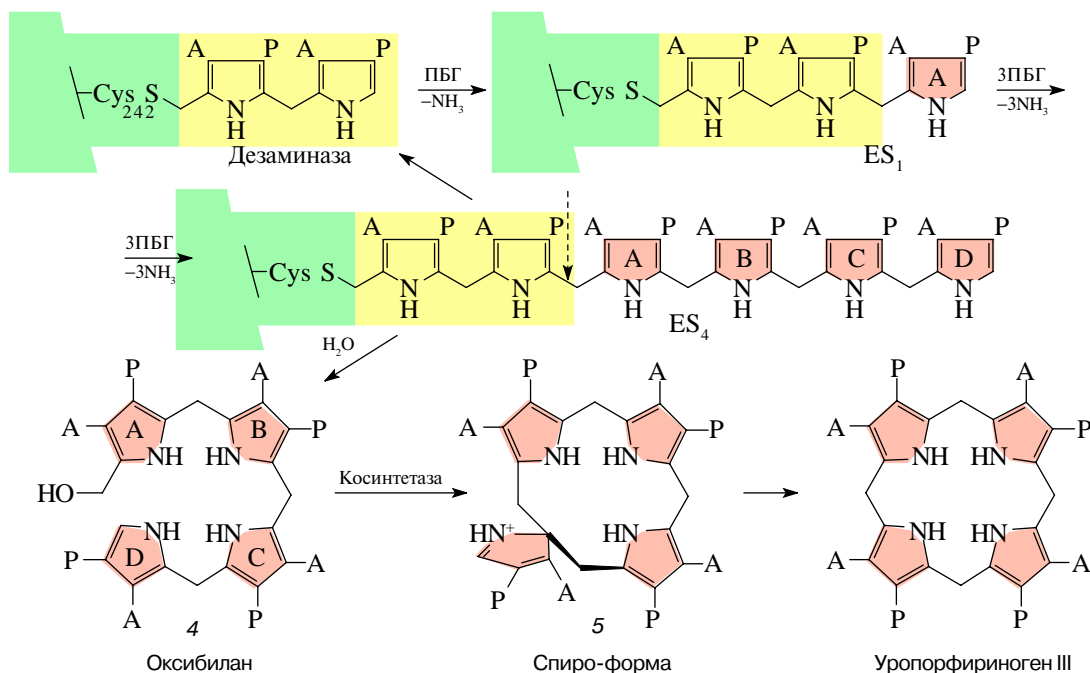


Схема 2. Нарастание полипиррольной цепи на ферменте дезаминаза (E) (показано присоединение одной (ES₁) и четырех (ES₄) молекул ПБГ), отщепление оксибилана и замыкание его в Уро'ген III в присутствии косинтетазы с обращением кольца D через спиро-соединение

отделяется с образованием оксибилана (4). Дипирролиметан дезаминазы снова готов к наращиванию полипиррольного ансамбля (схема 3).

Наличие протетической группы в дезаминазе, построенной из молекул, подобных субстрату, – явление необычное для ферментов. Известно только, что, действуя на дезаминазу сильными кислотами, удается отщепить дипирролиметан. Полученный апофермент уже не обладает каталитической активностью. Лишь после присоединения первых двух молей ПБГ при определенном pH дезаминаза снова становится способной к обратимому присоединению четырех молекул ПБГ.

Синтезированный оксибилан (схема 2, 4) под действием второго фермента косинтетазы превращается в Уро'ген III (схема 1, 3). Для этой циклизации, сопровождающейся обращением пиррольного кольца D, за долгие годы изучения этой реакции предложено свыше двух десятков механизмов. В настоящее время наиболее обоснованным представляется поворот кольца D за счет образования спиро-структуры (5).

После образования Уро'гена III происходит первое разветвление путей биосинтеза тетрапиррольных пигментов. Декарбоксилирование Уро'гена III ведет к порфиринам и хлорофиллам, а С-метилирование через Прекоррин-1 – к витамину В₁₂ и другим кобаламинам (схема 4, 6).

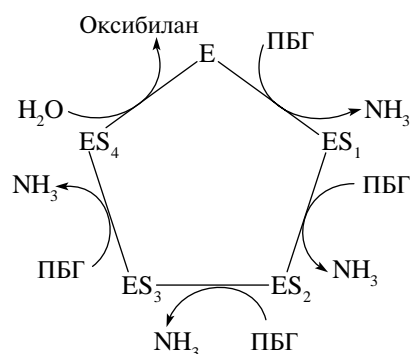


Схема 3. Каталитический цикл дезаминазы

БИОСИНТЕЗ ПРОТОГЕМА

Рассмотрим путь, ведущий к главному порфирину в животном мире – протопорфиру IX (схема 4, 9) и его железосодержащему комплексу – протогему. Превращение Уро'гена III под влиянием соответствующего фермента включает последовательное декарбоксилирование остатков уксусной кислоты до метильной группы с образованием копропорфириногена III (Копро'ген III). Декарбоксилирование начинается с кольца D и далее продолжается по часовой стрелке через кольца A, B и C. Имеется также указание, что в определенных условиях возможен и иной порядок декарбоксилирования.

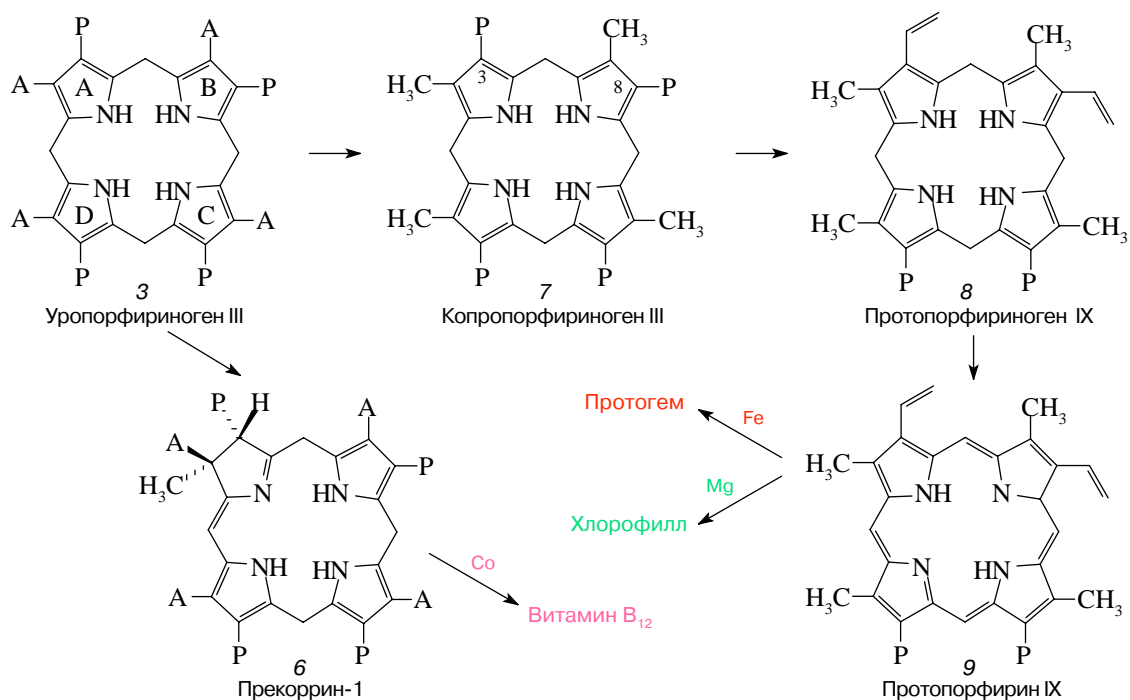


Схема 4. Общая схема образования протопорфина IX и разветвление путей биосинтеза к зеленым пигментам и кобаламинам

Копро'ген III под действием копропорфириногена оксидазы подвергается окислительному декарбоксилированию. В результате два остатка пропионовой кислоты в положениях 3 и 8 превращаются в винильные группы и образуется протопорфириноген IX (8, Прото'ген IX). Последний ферментативно окисляется в протопорфин IX (9, Прото IX). На этом участке происходит дальнейшее разветвление путей биосинтеза. Введение ионов двухвалентного железа (фермент феррохелатаза) приводит к образованию протогема, который является протетической группой в многочисленных природных белках — гемопroteидах.

БИОСИНТЕЗ ХЛОРОФИЛЛОВ

Включение в Прото IX магния начинает новую цепь биосинтетических превращений, ведущих к хлорофиллу *a*, бактериохлорофиллу и другим зеленым пигментам, общее количество которых сегодня превышает 50 типов.

На схеме 5 показаны основные превращения магниевого комплекса Прото IX в хлорофилл *a* (15, Хл *a*). Существенным отличием этой ветви биосинтеза от ранее рассмотренной является то, что при биосинтезе Прото IX большая часть промежуточных соединений находится в растворах, перемещаясь от одного фермента к другому, причем сами ферменты также по большей части растворены в цитоплазме клетки. Биосинтез хлорофиллов, напротив, проте-

кает только в хлоропластах, все ферменты закреплены в мембранах и часто образуют сложные ассоциаты. Это значительно затрудняет изучение отдельных стадий, механизмы превращений промежуточных соединений, и в связи с этим общая картина биосинтеза Хл *a* остается менее ясной.

В целом же об этом биосинтезе известно следующее. После введения иона магния (схема 5, 10) происходит этерификация остатка пропионовой кислоты в положении 13 (11). Далее этот остаток окисляется через несколько промежуточных стадий, давая после замыкания кольцо E (12). Затем происходит восстановление винильной группы до этильной в положении 8 с образованием 3-винилпротохлорофиллида (13).

Следующая важная стадия включает восстановление двойной связи в кольце D. Исключительно важную роль при этом играет освещение растений. Показано, что при отсутствии света у высших растений накапливается протохлорофиллид (13). Даже короткая световая экспозиция приводит к превращению протохлорофиллида в хлорофиллид (14). В то же время низшие растения и водоросли могут синтезировать хлорофиллид и при отсутствии света. На заключительном этапе происходит этерификация хлорофиллида природным спиртом фитолом при участии особого фермента хлорофиллсинтетазы. В результате образуется хлорофилл *a* (15).

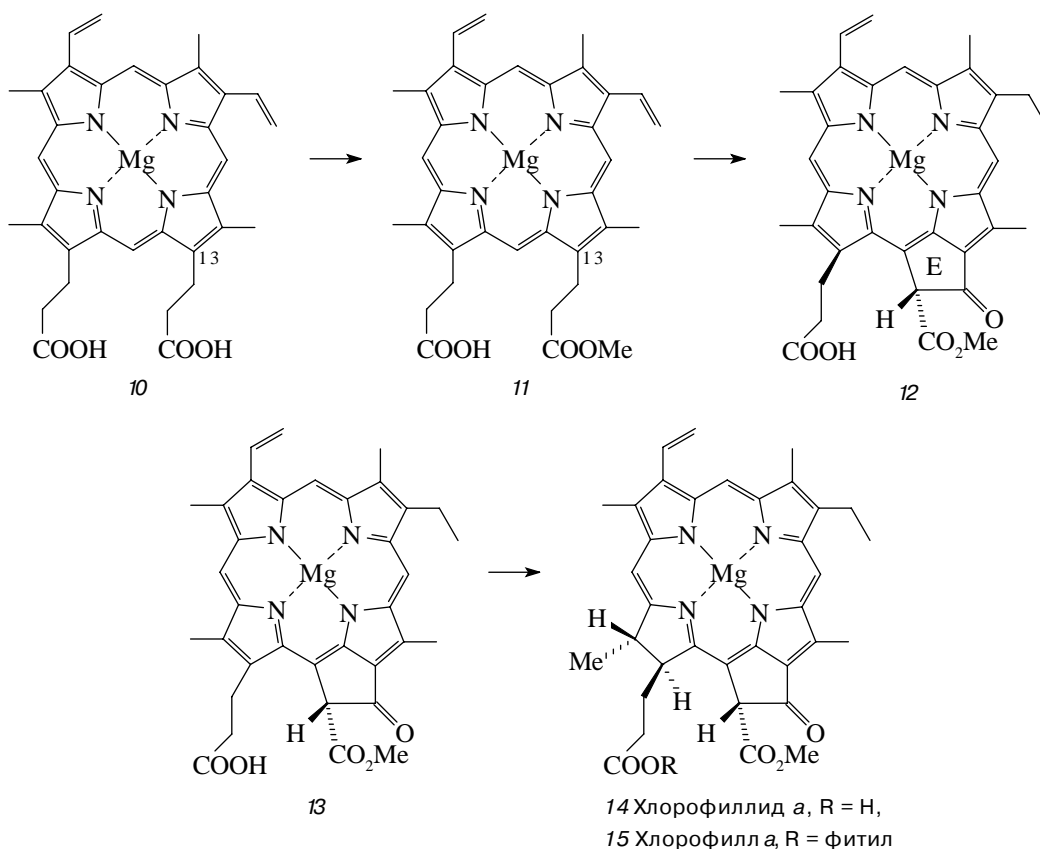
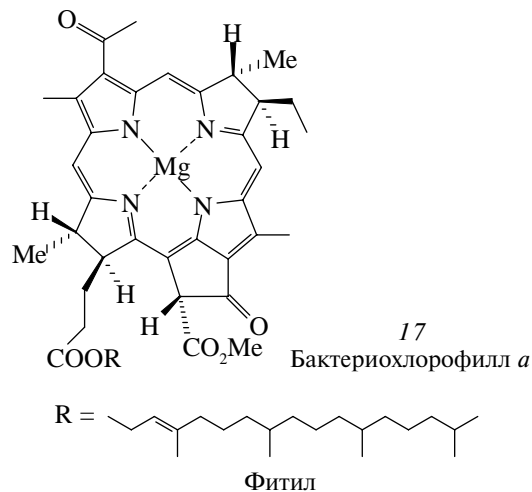
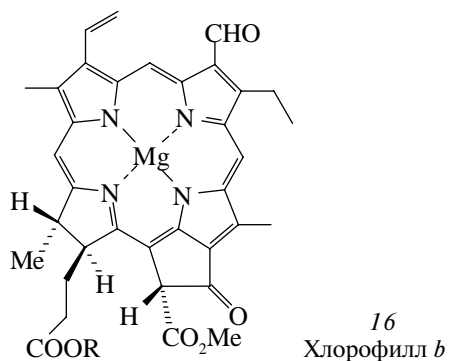


Схема 5. Биосинтез хлорофилла а

Пути биосинтеза других хлорофиллов, а также бактериохлорофиллов изучены пока недостаточно. Известно, однако, что все эти пигменты образуются через Хл а. В случае хлорофилла *b* происходит окисление метильной группы в положении 7 до формильной (16). Образование самого распространенного среди бактериохлорофиллов *a*-изомера (17) включает превращение винильной группы в ацетильную, гидрирование второго пиррольного кольца В и этерификацию остатка пропионовой кислоты фитолом.



БИОСИНТЕЗ ВИТАМИНА В₁₂

Витамин В₁₂ и родственные ему кобаламины играют важную роль в жизнедеятельности человека. Они участвуют в различных биохимических превращениях, предотвращают развитие злокачественной анемии крови, различных заболеваний печени,

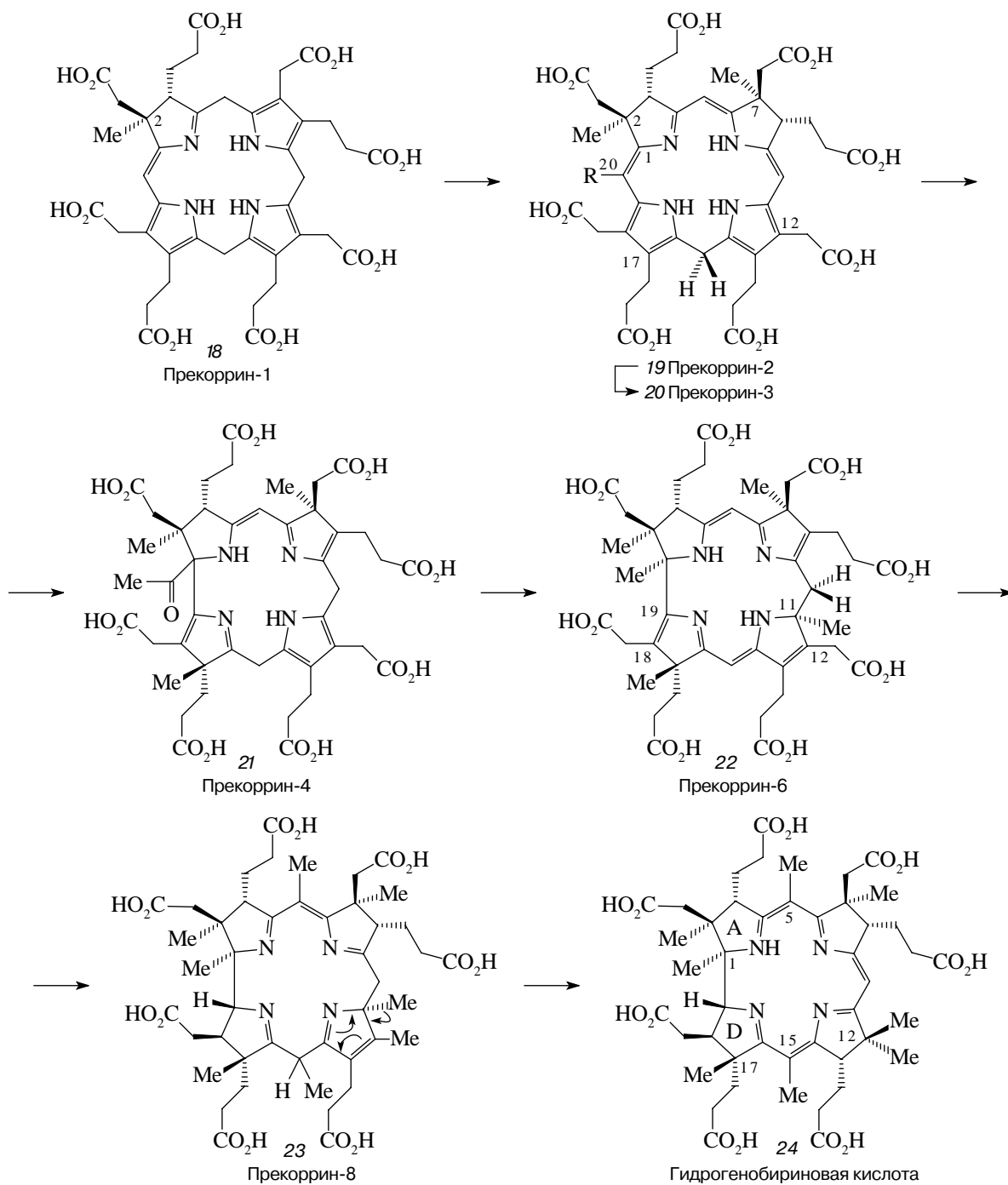


Схема 6. Первый этап биосинтеза V_{12}

используются при лечении лучевой болезни. Кобаламины синтезируются различными микроорганизмами. В промышленности производство витамина V_{12} основано на использовании пропионовокислых бактерий.

Механизм образования витамина V_{12} , наиболее сложного из известных тетрапиррольных пигментов,

выяснен значительно лучше, чем, например, хлорофиллов и бактериохлорофиллов. По образному выражению известного английского ученого А. Баттерсби, внесшего большой вклад в раскрытие биосинтеза витамина V_{12} , эта задача потребовала преодолеть “Эверест биосинтетических проблем”. В журнале “*Angewandte Chemie*” (1995. Bd. 34. S. 383–411) он

отмечает, что 1993 год наряду с 40-й годовщиной покорения высочайшей горы планеты Эверест англичанином Хиллари и шерпом Тенцингом ознаменовался завершением грандиозной работы по созданию единой картины биосинтеза витамина В₁₂.

Как отмечено выше, разветвление основного пути биосинтеза тетрапиррольных пигментов в сторону витамина В₁₂ начинается с Урогена III (3). Сначала под действием особых ферментов происходит введение метильной группы в положение 2 (схема 6). Соединение, получившее название прекоррин-1 (18), далее подвергается метилированию по С-7 с образованием прекоррина-2 (19). Третье метилирование проходит по мезо-углеродному мостику в положении 20, и в результате возникает частично восстановленный макроцикл прекоррина-3 (20).

Последующие превращения, каждое из которых контролируется своими ферментами, включает метилирование в положение 17, сужение макроцикла с образованием корринового цикла (21), введение метильных групп в положения 11 и затем 1 (22), два метилирования по мезо-мостикам 5 и 15 и декарбоксилирование остатка уксусной кислоты в положении 12 (23). Заключает этот цикл превращений перегруппировка метильной группы из положения 11 в положение 12 с образованием важного промежуточного соединения – гидрогенобириновой кислоты (24).

На заключительном этапе биосинтеза (схема 7) кислота (24) амидируется по остаткам уксусной кислоты в положениях 2 и 7 (25) и включает ионы двухвалентного кобальта, превращаясь в диамид кобировой кислоты (26). Далее происходит восстановление $Co^{2+} \rightarrow Co^{+}$, и эта активная форма (27) превращается в диамид аденозилкобировой кислоты (28). Наличие аденозильного лиганда, как было показано, является необходимым условием для дальнейшего ступенчатого амидирования четырех карбоксильных групп. Оставшаяся карбоксильная группа в положении 17 кобировой кислоты (29) участвует в образовании так называемой нуклеотидной петли.

Первоначально происходит присоединение 1-аминопропанола-2 с образованием соединения (30). Ферменты, контролирующие этот процесс, обладают высокой специфичностью к аденозилкобировой кислоте (28). Фосфорилирование по гидроксильной группе аминопропанола дает фосфат (31). Последний превращается в коферментную форму витамина В₁₂ аденозинкобаламина (32). Замена остатка аденозина на циано-группу приводит к цианкобаламину (33) – лекарственной форме витамина В₁₂. В организме происходит обратная замена.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изложенные здесь пути биосинтеза протогема, хлорофилла *a* и витамина В₁₂ показывают, насколько близко переплетаются фундаментальные процессы жизнедеятельности в бактериях, высших растениях

и животном мире. При значительных различиях объектов исследования в рассмотренных схемах используются общие или близкие методы построения исходных и промежуточных соединений. Речь, таким образом, идет о построении общей картины жизни на нашей планете.

Успешное раскрытие биосинтеза “пигментов жизни” можно рассматривать как важный этап в развитии современной молекулярной биологии и биохимии. Полученные знания могут быть использованы и в медицинской практике в борьбе с определенными наследственными заболеваниями, при химических отравлениях и других процессах, связанных с нарушениями биосинтеза гемопротеидов. Примером успешного использования биосинтеза гема явился предложенный недавно модифицированный метод фотодинамической терапии рака, основанный на введении в организм пациента δ-АЛК, которая превращается в Прото IX, а последний накапливается в злокачественных опухолях. Более подробно об этом методе можно прочитать в нашей статье в “Соросовском Образовательном Журнале” (1996. № 8. С. 32). Возможны, очевидно, и другие примеры моделирования биосинтетических путей получения этих важных соединений и их производных.

В заключение хочу выразить благодарность профессору В.Я. Быховскому за ценные советы и полезную дискуссию при обсуждении этой статьи.

ЛИТЕРАТУРА

1. Общая органическая химия. М.: Химия, 1986. Т. 11. С. 634–685.
2. Химия биологически активных природных соединений / Под ред. Н.А. Преображенского, Р.П. Евстигнеевой. М.: Химия, 1976. С. 100–184.
3. Быховский В.Я., Зайцева З.И. Микробиологический синтез тетрапиррольных соединений // Итоги науки и техники. Сер. Биол. химия. 1989. Т. 32. 173 с.
4. Гудвин Т., Мерсер Э. Введение в биохимию растений. М.: Мир, 1986. Т. 2. С. 106–121.
5. Бриттон Г. Биохимия природных пигментов. М.: Мир, 1986. 422 с.

* * *

Андрей Федорович Миронов, профессор, зав. кафедрой химии и технологии тонких органических соединений, декан факультета биотехнологии и органического синтеза Московской государственной академии тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, академик Российской инженерной академии. Научные интересы связаны с химией природных и синтетических порфиринов и хлоринов, их металлокомплексов. Под его руководством разработан первый отечественный сенсбилизатор Фотогем для фотодинамической терапии рака, создаются препараты второго поколения на основе природных хлорофиллов. Автор свыше 250 научных публикаций, обзоров, двух монографий.