

## 高等植物におけるヘムの生合成・分配・輸送機構

### Mechanism of Biosynthesis, Distribution, and Transport of Hemes in Higher Plants

(日本植物学会推薦)

代表研究者	東京大学	増田 建	The University of Tokyo	Tatsuru Masuda
共同研究者	東京大学	高橋 重一	The University of Tokyo	Shigekazu Takahashi
	東京工業大学	永井 聡	Tokyo Inst. Technol.	Satoshi Nagai
	国立環境研	青野 光子	Natl. Inst. Environ. Studies	Mitsuko Aono

In plant cells, heme is synthesized in plastids and transported to various organelles. Our previous study showed that oxidative stresses induced the expression of isoforms of plastidic heme biosynthetic enzymes (HEMA2 and FC1), together with various defensive hemoproteins outside plastids, indicating heme distribution is important for defensive function in plant cells. Since the mechanism by which the proteins in organelles receive their hemes from plastids is poorly understood, here we examined the mechanism of biosynthesis, distribution, and transport of hemes in *Arabidopsis thaliana*. To determine a small amount of heme, we first developed extremely sensitive heme assay using chemiluminescent detection. With this method, we showed the oxidative stress increased heme levels in wild-type *Arabidopsis*, whereas such increase was repressed in knock-out *Arabidopsis* mutants of HEMA2 and FC1. These results are first demonstration of the existence of the heme biosynthetic pathway responsive to oxidative stresses in plastids, which may function heme supply for defensive hemoproteins. To elucidate heme transport in cytosols, we then analyzed putative

cytosolic heme binding proteins (HBP), homologous to animal p22HBP/SOUL family. Purified recombinant HBPs showed specific binding to heme, while they non-specifically bound to other metal porphyrins. Biochemical and physiological analysis of *Arabidopsis* HBPs are currently underway.

## 研究目的

ヘムは葉緑体やミトコンドリア、ペルオキシソーム、細胞質でアポ蛋白質と結合することで、電子伝達反応、酸化還元反応、活性酸素消去など様々な機能を果たしている。また、ヘムは転写や翻訳、蛋白質輸送など、細胞内の様々な制御に関わることが知られている。これまで、高等植物では、ヘムは葉緑体およびミトコンドリアで生合成されると考えられてきた。しかし、我々は高等植物では、ヘムは葉緑体においてのみ生合成されることを明らかにした。さらに傷害などの酸化ストレス条件下で、ヘム生合成系が細胞質における防御関連アポ蛋白質と協調的に誘導を受けることを見出した。しかしながら、高等植物における葉緑体から各オルガネラへのヘムの分配・輸送機構、そして傷害などのストレス防御を含む環境応答に果たす役割は殆ど分かっていない。そこで本研究では、高等植物におけるヘムの生合成、分配、輸送機構の解明を目的として、以下に述べる解析を行った。

## 研究経過

### アポ蛋白質とヘムとの結合によるペルオキシダーゼ活性の再構成を用いた高感度なヘム定量系の開発

これまでヘムの定量は、主にアルカリピリジンヘムクロム法などにより行われてきた。しかしこの方法は、ピリジンヘムクロムの吸光係数が低いことやピリジンが毒性を有する有機溶媒であることなど、問題が多かった。植物細胞内でのヘムの動態を解析するためには、ピリジンヘムクロム法に代わる安全かつ高感度なヘム定量系が必要である。そこで、西洋ワサビ・ペルオキシダーゼ(HRP)のアポ蛋白質がヘムと結合することにより再構成されたペルオキシダーゼ活性を、ルミノールを基質として用いて、化学発光検出を行うことで、高感度なヘム定量系の開発を行った。

HRP とヘムの結合によるペルオキシダーゼ活性の再構成はインキュベーション開始 30 分後に飽和に達した。またルミノール添加後の化学発光は、反応開始後 30 分で安

定な発光が見られた。化学発光値と添加したヘムの濃度には直線的な関係が得られ、検出限界濃度はおよそ 10 pM であった。ヘム以外のポルフィリン類や金属ポルフィリン類は全くペルオキシダーゼ活性を上昇させなかった。またルミノールを酸化する  $Fe^{2+}$  の影響はヘムの濃度より3桁以上低く、無視できるものであった。

#### 酸化ストレスにより誘導されるヘム生合成系の解析

ヘム生合成系において、グルタミン酸 tRNA 還元酵素(HEMA)とフェロキラーターゼ(FC)のアイソフォーム、HEMA2 と FC1 は、主に根や胚軸などの非光合成組織で主に発現している。我々は、シロイヌナズナ *HEMA2*、*FC1* の発現が傷害処理により、光合成組織において誘導されることを明らかにした。さらに、*HEMA2*、*FC1* の発現は、オゾン処理や活性酸素発生剤処理により誘導されることを見出した。従って、*HEMA2*、*FC1* の発現誘導には細胞内における活性酸素の発生が関与していることが明らかとなった。*HEMA2*、*FC1* の遺伝子破壊株について、先に開発したヘム定量系で解析したところ、野生株に対して、根におけるヘム含量の低下が認められた。また 0.2ppm オゾン処理を 6 時間行ったところ、野生株ではヘム含量の増加が認められたが、破壊株ではいずれもヘム含量の増加が抑制されていることが明らかとなった。以上の結果から、*HEMA2* と *FC1* は、通常の生育条件では非光合成組織におけるヘムの供給に機能しているが、酸化ストレス時には防御応答に関わるヘム蛋白質へのヘム供給に機能していることが示唆された。

#### シロイヌナズナのヘム結合タンパク質の解析

高等植物のヘムの分配・輸送にはヘム結合タンパク質が関わっていると考えられている。我々は、ヒトやマウスで報告されたテトラピロール結合タンパク質 SOUL/p22HBP の相同遺伝子が、シロイヌナズナゲノム上に 6 遺伝子存在することを見出した。そのうち 2 遺伝子の N 末端にシグナルペプチドが付加しており、オルガネラに局在することが予測された。我々は、シグナルペプチドを持たない細胞質型と考えられる、残る 4 つのヘム結合タンパク質(HBP)の解析を行った。4 遺伝子のうち、1 つの遺伝子 (*At1g78450*) の ORF には欠失が認められたため、偽遺伝子であると考えられた。*At1g17100* について、GFP 融合タンパク質を作製し、タマネギの表皮細胞で一過的に発現させたところ、細胞質で GFP 蛍光が認められた。そこで、*At1g17100* と *At3g37970* の組換えタンパク質を作製・精製し、生化学的な解析を行った。その結果、組換えタンパク質へのヘム添加により、ヘム結合による 400nm 近辺での吸収スペクトルの増加が

認められた。金属ポルフィリン類に対する結合特異性実験を行った結果、2つのタンパク質はヘム(Fe-プロトポルフィリン IX)に対して特異的な結合を示したが、その他の金属ポルフィリン類(Mn-, Sn-, Mg-, Co-プロトポルフィリン IX)に対しては非特異的な結合しか示さなかった。また、プロトポルフィリン IX に対して、At1g17100 の組換え蛋白質は特異的な結合を示したが、At3g37970 の組換え蛋白質は非特異的な結合しか示さなかった。また、ヘムを結合した2つの組換え蛋白質は、HRP のアポ蛋白質を活性型に再構成できたことから、ヘム結合は可逆的であることが明らかとなった。以上の結果から、At1g17100 および At3g37970 はシロイヌナズナの細胞質型 HBP として、テトラピロールの細胞内輸送に機能している可能性が考えられた。またこれら2つの組換え蛋白質はプロトポルフィリン IX に対して異なる結合性を示すため、細胞内で異なる機能を果たしている可能性も考えられる。現在、さらに詳細な生化学的な解析を進めているところである。

## 考察

本研究は、植物細胞におけるヘムの生合成、分配、輸送の機構を明らかにすることを目的とした。この解析には、細胞中における微量なヘムの定量系が不可欠である。今回、我々が開発したヘム定量系は、有害な有機溶媒を使用しない、ヘムに特異的な酵素学的アッセイ系であり、従来の測定法に比べて1万倍以上の感度を有すると考えられる。HRP 再構成の安定性や化学発光値の再現性に未だ改善の余地があるが、本アッセイ系を活用することで、今後、植物細胞内における微量なヘム量の変化を明らかに出来ることが期待出来る。実際、本方法を用いて、我々はシロイヌナズナの HEMA2 と FC1 が、通常条件では非光合成組織におけるヘム合成に、また酸化ストレス条件では光合成組織におけるヘム量の増加に機能していることを明らかにした。これは、従来の測定法では解析が不可能であったことから、学術的な意義のある成果であると考えられる。酸化ストレスに対する HEMA2 と FC1 の詳細な生理機能は現在解析中であるが、今後、二重変異体や過剰発現株の解析を行うことで、高等植物の酸化ストレス応答に果たすヘムの役割について、新たな知見を与えることが期待される。

また我々は、植物細胞内におけるヘム輸送機構を明らかにするため、シロイヌナズナのヘム結合蛋白質(HBP)の解析を行った。SOUL/p22HBP は動物で同定されたヘム結合蛋白質で、細胞内のヘム輸送に関わっていることが示唆されている。今回、我々は、SOUL/p22HBP 相同遺伝子がシロイヌナズナに存在することを見出し、細胞質局在型と考えられる HBP 蛋白質の解析を行った。その結果、At1g17100 と

At3g37970 の組換えタンパク質は、ヘムに対する特異的な結合が認められた。しかし、プロトポルフィリン IX に対する結合性には違いが認められた。また、その吸光スペクトル特性や分子量にも違いが認められたことから、これら2つの細胞質型HBPは植物細胞内で異なる機能を果たしている可能性が考えられる。今後、組換え蛋白質の生化学的解析や分子遺伝学的解析により、その機能を詳細に明らかにしていきたいと考えている。

## 研究発表

### 口頭発表

1. 高橋重一、増田建;「シロイヌナズナの細胞質型テトラピロール結合タンパク質の解析」、日本植物生理学会(筑波、2006)
2. Tatsuru Masuda;「Regulation of Tetrapyrrole Biosynthesis」、日本-フィンランド二国間共同研究(フィンランド・ツルク、2006)
3. Tatsuru Masuda;「Regulation of Metal Chelation Steps of Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants」、Japan-Finnish Seminar 2006(奈良、2006)
4. 増田建;「高等植物の葉緑体における光合成色素の生合成」、大阪大学蛋白質研究所セミナー(大阪、2006)
5. Tatsuru Masuda;「Tetrapyrrole Trafficking in Higher Plants」、Pre-symposium of 7th International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors on Photosynthetic Organisms(京都、2006)
6. 増田建;「クロロフィル合成系におけるMg-キラターゼのATP利用」、日本生体エネルギー研究会第32回討論会(東京、2006)
7. Tatsuru Masuda;「Regulation of Metal Chelatases of Tetrapyrrole Biosynthesis in Higher Plants」、日本-フィンランド二国間共同研究(フィンランド・ツルク、2007)

### ポスター発表

1. 増田建、高橋重一;「アポ蛋白質とヘムとの結合によるペルオキシダーゼ活性の再構成を用いた高感度なヘム定量系の開発」、日本植物生理学会(筑波、2006)
2. 永井聡、青野光子、菊田章弘、佐々木(関本)結子、太田啓之、高宮建一郎、増田建;「ストレスによる誘導されるテトラピロール生合成系アイソフォームの発現誘導機構とその生理機能」、日本植物生理学会(筑波、2006)

3. 高橋重一、増田建;「シロイヌナズナの細胞質型テトラピロール結合タンパク質 (TBP)のポルフィリン結合特異性の解析」、日本植物生理学会(愛媛、2007)
4. 小出真維、永井聡、青野光子、高橋重一、増田建「シロイヌナズナのヘム生合成系アイソフォームの酸化ストレスによる発現誘導およびその生理機能」、日本植物生理学会(愛媛、2007)

誌上発表

1. Masuda Tatsuru and Takahashi Shigekazu; “Chemiluminescent-based method for heme determination by reconstitution with horseradish peroxidase apo-enzyme” *Analytical Biochemistry*, 355,307-309 (2006)
2. Satoshi Nagai, Masumi Koide, Shigekazu Takahashi, Akihiro Kikuta, Mitsuko Aono, Yuko Sasaki-Sekimoto, Hiroyuki Ohta, Ken-ichiro Takamiya, and Tatsuru Masuda; “Induction of isoforms of tetrapyrrole biosynthetic enzymes, atHEMA2 and atFC1, under stress conditions and their physiological functions in *Arabidopsis thaliana*” *Plant Physiology*, submitted (2007)