

植物細胞におけるヘム代謝研究の新展開[‡]

東京大学大学院総合文化研究科

増田 建*

1. はじめに

ヘムはポルフィリンの鉄錯体の慣用名で、ヘムタンパク質の補欠分子族として、ほとんどの生物において必須な役割を果たしている。ヘムには多くの種類が存在するが、細菌から真核生物にまで広く存在するヘムは、ヘム*a*、ヘム*b*、ヘム*c*である(図1)。特に断りがない場合、一般に「ヘム」とよぶと、生体内に存在する最も代表的なヘム*b*(プロトヘム)のことを意味し、本稿でもそのように扱う。アポタンパク質の構造、ヘムの種類、ヘムとタンパク質の結合様式によって多種類のヘムタンパク質が存在するが、機能的には、1)カタラーゼやオキシダーゼなどの酸化還元酵素、2)シトクロム*b5*や*c*などの電子伝達体、3)ヘモグロビンやミオグロビンなどの酸素運搬体の3種類に分類することができる。また、ヘム鉄に酸素や一酸化炭素、一酸化窒素などのガス性シグナルが結合したり、あるいはヘム分子そのものがタンパク質に結合・解離したりすることで、細胞内のさまざまな生理作用に機能するヘムセンサータンパク質も存在する。光

合成生物においても、ヘムは必須の役割を果たし、またビリル色素合成の基質としても使われる。本解説では、植物細胞におけるヘム代謝研究の最近の展開について、筆者らのこれまでの研究および関連する研究を交えて解説する。紙面の都合上、全てを網羅することは出来ないため、興味を持たれた読者は最近の総説などを参照して頂きたい¹⁻⁵⁾。

2. 古くて新しいヘム代謝研究

ヘムは色素として知られ、赤血球のヘモグロビンや筋肉中のミオグロビンの補欠分子族として、酸素運搬の機能を担っている。実験材料として入手しやすく、また色を持つことから、生化学におけるヘム研究の歴史は古い。ヘムタンパク質であるシトクロムについては、1886年に Mac Munn 博士によりその存在が指摘され⁶⁾、1925年に Keilin 博士によってその機能が実証され、名付けられた⁷⁾。これはシトクロム(cytochrome)が色素であるヘムを結合することで、その名の通り「細胞の(cyto)色素(chrome)タンパ

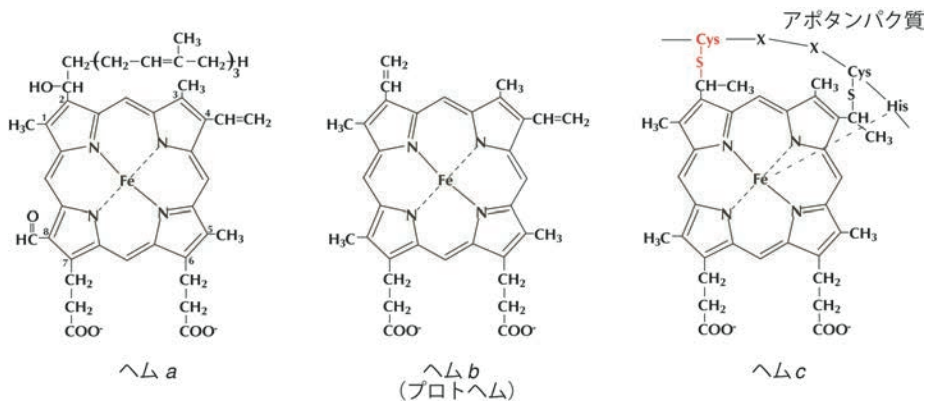


図1 代表的なヘムの構造

ヘム*a*は3位に1-ヒドロキシ-2-*trans,trans*-ファルネシルエチル基を持ち、8位にホルミル基を持つ。ヘム*b*(プロトヘム)はプロトポルフィリンIX骨格を持つ。ヘム*c*は4つのメチル基を持ち、通常2つのチオピニルエーテル基がヘムタンパク質のシステイン残基と共有結合をしている。生物種によっては、赤で示したシステイン残基は置換されており、単一の結合をしているものもある。ヒスチジン残基は中心の鉄と配位する。

[‡] 解説特集「植物、藻類等を利用した物質生産の新しい展開とその課題」

* 連絡先 E-mail: ctmasuda@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

ク質」として容易に見つけられたこと、そしてその高い安定性による。ヘムタンパク質は生化学研究初期の中心的な研究対象となり、その後のミオグロビンの結晶化やヘモグロビンの酸素結合のアロステリック性などの解明に結びついていった。一方、近年、ヘムが動物、植物、微生物を問わず、多様な生理作用を調節する細胞内シグナルとしての機能することが明らかとなってきた。実際ヘムは、動物細胞や酵母において、転写⁸⁾、翻訳⁹⁾、翻訳後のジスルフィド結合の形成¹⁰⁾、翻訳後のタンパク質輸送¹¹⁾の制御に関わることが報告されている。さらに近年、microRNAのプロセシング¹²⁾、概日リズム¹³⁾やイオンチャネルの制御¹⁴⁾など、さらに幅広い生理現象を調節することが見出された。また後述のように、光合成生物においても、ヘムが転写調節シグナルとして機能する可能性が提唱されて

いる。ヘム代謝を研究していると、言う、「今更ヘムの何を研究することがあるの？」と聞かれることがあるが、往年のスーパースターが再び表舞台にカムバックしてきた感があり、本稿で述べるように、まだまだその機能の詳細は明らかでなく、解明すべき点が多く残されている。

3. 植物におけるヘム合成系

植物におけるヘム合成系は、プロトポルフィリン IX (Proto IX) に至るまでは、クロロフィル合成系と共通の代謝系で合成される (図2A)。その第1段階は5-アミノレブリン酸 (ALA) の生合成であり、生合成系全体の律速段階であることが知られている。動物

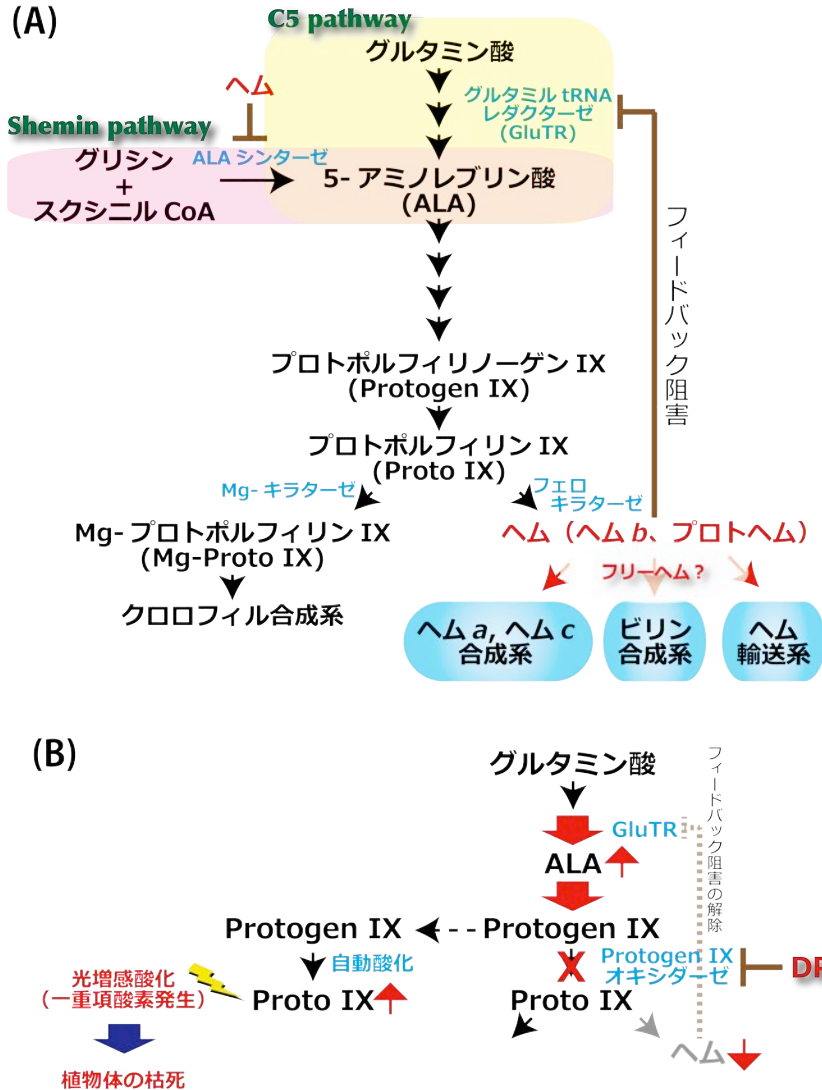


図2 ヘム生合成系の概略

(A) ヘム生合成の第1段階はALAの合成で、高等植物などではグルタミン酸を出発物質とするC5 pathway で合成される。一方、動物細胞などでは、ALAはグリシンとスクシニルCoAの縮合による1段階反応で合成される (Shemin pathway)。いずれのALA合成系も、ヘムによるフィードバック阻害を受けることが知られている。ヘム (ヘムb、プロトヘム) はフェロキラーターゼによる Proto IX への鉄の配位反応により触媒される。生成したヘムはヘムタンパク質の補欠分子族としての他、他のヘムやビリリン合成系の基質として、また多様な生理作用のために輸送されると考えられる。これら代謝の中間的な状態にあるフリーヘムの存在が想定されている。(B) DPEによる光に依存した除草機構。DPEは Proto IX オキシダーゼを阻害する。蓄積した Proto IX は代謝系から外れ、自動的な酸化を受けて Proto IX に変換される。一方、ヘム合成に使われる Proto IX の生成は阻害されるため、ヘム含量は減少し、フィードバック阻害の解除によりALA合成も活性化される。このような連鎖反応により、DPE処理により多量の Proto IX の蓄積が引き起こされる。Proto IX は光増感酸化能により、活性酸素 (一重項酸素) を発生し、植物を枯死に至らしめる。

や酵母、ある種の細菌では、ALAはALAシンターゼによるスクシニルCoAとグリシンとの縮合反応により1段階で合成される (Shemin pathway)。一方、植物やシアノバクテリア、多くの細菌では、ALAはグルタミン酸を出発物質とする3段階の酵素反応により合成される (C5 pathway)。その後、2分子のALAが縮合

して1つのピロール環を形成し、これが4つ連なってテトラピロールを形成する。さらに環状化してポルフィリン環を形成後、側鎖の修飾や環全体の共鳴系が完成し、Proto IXが生成する。ヘム（ヘム b 、プロトヘム）の合成は、フェロキラーターゼにより Proto IX に Fe^{2+} が配位することで合成される。またヘムはピリン合成の基質であり、フィトクロム発色団のフィトクロモビルンやフィコビリソームのピリン色素は、ヘムオキシゲナーゼによるヘムの酸化の開裂により合成が開始される。一方、Mg-キラーターゼによりProto IXに Mg^{2+} が配位するとクロロフィル合成系へと流れる。

ヘムはALA合成系のALAシターターゼやC5 pathwayの第2番目の酵素である glutamyl-tRNA reductase (GluTR) をフィードバック阻害する代謝産物であることが知られている（図2A）。さらに酵母では、ヘムはALAシターターゼ遺伝子（*ALAS1*）の転写やmRNA安定化、翻訳、タンパク質輸送に対して、負のフィードバック制御を行なうことが知られている¹⁵⁾。植物細胞においては、ヘムはGluTR活性をフィードバック阻害するが、その他の制御機構の存在については明らかではない。

4. ヘム代謝研究との出会い

著者は1988～90年度に神戸大学大学院農学研究科の修士課程で、光要求性除草剤の作用機作に関する研究を行っていた。ジフェニルエーテル系除草剤（DPE）はその殺草効果に光を要求することが知られており、DPEが阻害する標的酵素の同定と光に依存した殺草作用を調べるのが研究目的であった。残念ながら、フランスのMatringe博士のグループに先を越され、DPEがポルフィリン合成系のプロトポルフィリノーゲン酸化酵素を阻害することで、蓄積したプロトポルフィリノーゲンIXが自動酸化により Proto IX に変換されること、また光照射により Proto IX が活性酸素種である一重項酸素を生成して植物を枯死させることが報告された（図2B）¹⁶⁾。当時、著者らのグループは、DPE処理により植物細胞の膜画分にある物質が蓄積すること、この物質を含む膜画分に光を当てると膜脂質の過酸化が起こり、急激な酸素消費活性を示すことを突き止めていたが、その物質が Proto IX であることが後から確認できた¹⁷⁾。その後、DPE処理によりProto IXが蓄積するメカニズムを調べたところ、ALA合成が活性化していること、さらにこの活性化はヘム含量の減少によるALA合成のフィードバック阻

害の解除によることを見出した（図2B）¹⁸⁾。この時、ヘム定量実験に大変苦労した経験が、後述の高感度ヘム定量系の開発に結びついている。また植物が、このような危険な物質を中間体としながら、厳密な制御により大量のクロロフィルを合成している仕組みそのものに興味を持ったのが、現在の研究の第一歩である。

その後、京都大学大学院理学研究科の博士課程に進学し、ALA合成系の植物ホルモンによる制御機構に関する研究を行っていたが、分子生物学の手法を習いに行っていた生物物理学教室の井口研究室で、再び Proto IX と出会うこととなった。当時、井口研究室では光感受性の*visA*株の解析を行っており、なぜ光で大腸菌が死んでしまうのかを研究していた。井口研究室のセミナーでその話を聞いた著者は、これまでの経験からすぐに Proto IX の蓄積によるものではないかと考え、調べてみると、*visA*株において Proto IX が顕著に蓄積していた¹⁹⁾。そして、*visA*株では大腸菌のフェロキラーターゼ遺伝子（*hemH*）に変異を持つことが明らかとなった¹⁹⁾。その後、*visA*株は、サプレッサー株の単離や機能的相補により、多くのポルフィリン合成系遺伝子の同定に貢献した。また植物（キュウリとオオムギ）のフェロキラーターゼ遺伝子もこの株の機能的相補により初めて単離された²⁰⁾。丁度同じ年に、酵母のフェロキラーターゼ変異体の機能的相補により、イギリス・ケンブリッジ大のSmithらのグループがシロイヌナズナのフェロキラーターゼ遺伝子のクローニングに成功した²¹⁾。さらにシロイヌナズナやキュウリにおいて、フェロキラーターゼには2つのアイソフォーム（FC1とFC2）が存在することが明らかとなった²²⁾。興味深いことに、FC2のC末端には、FC1には認められない、LHC（Light harvesting chlorophyll *a/b* protein complex）と相同な1回膜貫通型のドメインを有していた²³⁾。

5. 植物のフェロキラーターゼの局在性解析

動物細胞のフェロキラーターゼはミトコンドリアに存在しており、肝臓のミトコンドリアにおけるフェロキラーターゼについては古くから生化学的な研究が成されてきた。一方、植物のフェロキラーターゼについては、色素体に局在する事が示されていたが、動物細胞同様にミトコンドリアにも局在する可能性が考えられていた。特にフェロキラーターゼの前段階を触媒す

る、DPEの標的酵素でもあるプロトポルフィリノーゲン酸化酵素が、ホウレンソウ²⁴⁾とタバコ²⁵⁾において色素体とミトコンドリアの双方に存在するとの報告が成されていたため、ミトコンドリア型のフェロキラーゼの存在が予想されていた。この問題は、光合成光化学系および呼吸鎖のヘムが、それぞれどのオルガネラから供給されるかという点で重要である。Smithらは、エンドウより単離した葉緑体およびミトコンドリアを用いて *in vitro* 輸送実験を行ない、フェロキラーゼのFC2は葉緑体のみ輸送されるが、FC1は葉緑体とミトコンドリアの双方に輸送されると報告した²⁶⁾。著者らもSmithらと共同研究を行い、キュウリFC1が葉緑体とミトコンドリアの双方に輸送されることを報告した²³⁾。しかしその後、エンドウの単離ミトコンドリアは輸送ペプチドの認識に対する特異性が低く、プラストシアニンなどの葉緑体タンパク質を*in vitro*で受容すること、そしてシロイヌナズナの単離ミトコンドリアにはFC1が輸送されないことが報告された²⁷⁾。筆者らはキュウリのフェロキラーゼの局在性を解析し、GFP融合タンパク質の局在性観察および免疫学的な解析から、2つのフェロキラーゼ・アイソフォームが色素体のみ局在することを報告した²⁸⁾。以上の結果から、緑色植物ではフェロキラーゼは色素体のみ存在し、ミトコンドリアを含む全てのオルガネラのヘムは、色素体から供給されると考えられている。しかし、実はこの問題は未だ完全に決着していない。未報告ながら、タバコにはミトコンドリア型フェロキラーゼが存在すると考えている研究者もいる。果たしてその解析結果がどのようなになるか、その研究成果を待っている段階である。

分子系統樹から考えると、緑色植物の2つのフェロキラーゼ・アイソフォームは明らかにシアノバクテリア由来である²⁹⁾。また緑藻のクラミドモナスにはフェロキラーゼとプロトポルフィリノーゲン酸化酵素の遺伝子が1コピーずつ存在し、どちらの遺伝子産物も葉緑体のみ局在する³⁰⁾。一方、紅藻シアニジウムやアピコンプレクサのフェロキラーゼは、 α -プロテオバクテリアを起源としており、ミトコンドリアに局在している²⁹⁾。テトラピロール代謝系ではこのようなモザイク進化が良く見られるのは面白い特徴である。

6. ヘム定量系の開発

さて話は変わるが、ヘム代謝系を研究する上で、植物中のヘム含量を定量することは重要である。筆者は、分子遺伝学的解析が容易なシロイヌナズナを用いて、ヘム代謝を研究したいと考えていたが、微小な実験材料を用いてヘムを正確に定量することはこれまで非常に困難であった。従来、ヘムの定性・定量には、ヘムの第5、第6配位座にピリジンなどのN塩基が配位したフェロヘモクロムを生成させ、その可視光域での吸収や酸化還元差スペクトルにより行なう方法が一般的であった。しかし、この測定には相当量の実験材料が必要で、精製操作も煩雑であった。そこで、微小な実験材料からでも、簡便かつ高感度にヘムを定量する方法を開発することとした。この方法は、ThomasとWeinstein³¹⁾が行なった、ヘム抽出液と西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) のアポタンパク質を混合し、ホロHRPを自発的に再構成させ、その活性を発色法により検出するという手法を応用したもので、HRP活性をルミノールの化学発光検出により、

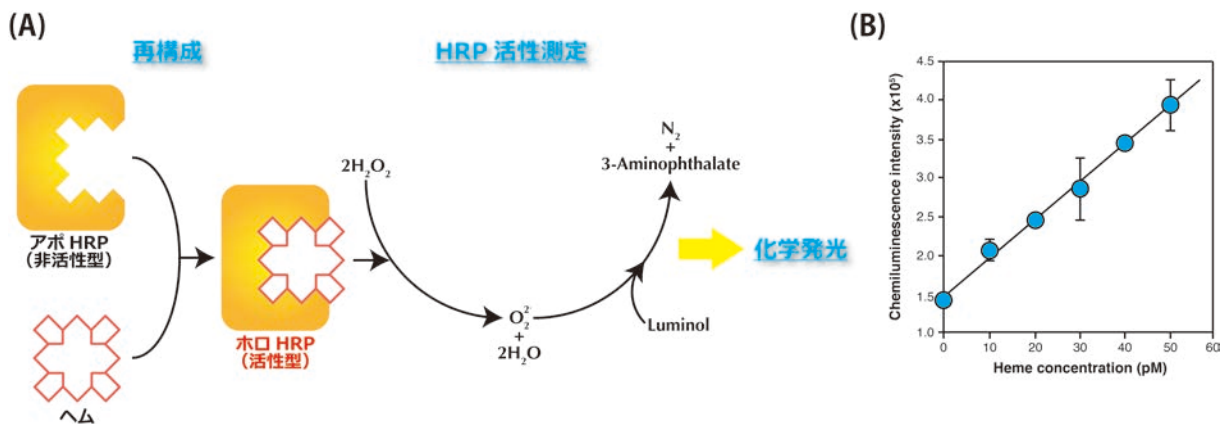


図1 HH法によるヘム定量の原理

(A) 不活性型のアポHRPをヘムと混合すると、活性型のホロHRPに自発的に再構成する。HRP活性はルミノールを用いた化学発光検出により、高感度に測定することが可能である。(B) HH法におけるヘム検量線の一例。

さらに高感度かつ簡便に測定するという方法である (図3)³²⁾。HRP-based Heme assay (HH assay)と名付け、その至適化を行なった³³⁾。現在では、市販の高感度なウエスタンブロット検出試薬と化学発光検出可能なマルチプレートリーダーを用いることで、検出限界は1 pM以下に達し、数mgのサンプル中に含まれるヘムを1時間程度で定量することを可能にしている (図3)。測定法の詳細については、筆者らの論文を参考にされたい^{5,32-34)}。

近年、ヘムは植物、動物、微生物を問わず、多様な生理作用を調節することが明らかとなってきた。またヘムはマラリア診断³⁵⁾や抗がん剤³⁶⁾のターゲットとしても注目をあびている。おかげさまで、筆者たちが開発した HH assay は、植物分野だけでなく、様々な分野の研究者から多くの問い合わせを頂いている。今後、ヘム代謝研究の有用なツールとなってくれることを願っている段階である。

7. 植物細胞においてヘムやMg-Proto IXはシグナルとして機能する

植物細胞において、ヘムやクロロフィル中間体である Mg-Proto IX が葉緑体の機能状態を核に伝えるシグナル (レトログレードシグナル) として機能していることが提案されてきた。緑藻クラミドモナスにおいて、Mg-Proto IX³⁷⁾およびヘム³⁸⁾が HSP70A や LHC などの核遺伝子の転写制御に関わることが報告された。その後、クラミドモナスにおける、これらテトラピロールによる遺伝発現の誘導は一過的であり、主に光合成とは関係しない遺伝子の発現の誘導に関わることが示されている³⁹⁾。また、紅藻シアニジオンゾンにおいて、Mg-Proto IX が葉緑体由来のシグナルとして核のDNA複製を誘導し、細胞周期を調節することが報告され⁴⁰⁾、さらにその受容体が単離された⁴¹⁾。高等植物では、Choryらのグループにより、シロイヌナズナを材料として、分子遺伝学的にレトログレードシグナルに異常を来したと考えられる *genome uncoupled (gun)* 変異体が単離された⁴²⁾。カロテノイド合成阻害剤であるノルフルラゾン (NF) を処理し、葉緑体の機能を欠損させると野生株では Mg-Proto IX が蓄積し、*gun*変異体ではこの蓄積が認められないことから、Mg-Proto IX がレトログレードシグナルの実体であると提案された⁴³⁾。しかし近年、著者を含む複数のグループにより、Mg-Proto IXの蓄積レベルが*gun*

表現型と相関しない事が明らかにされた^{44,45)}。昨年、Choryらのグループは、FC1の過剰発現株が*gun*表現型を示すことを報告し、葉緑体においてFC1により合成されるヘムがシグナルとして機能しているとの報告を行った⁴⁶⁾。興味深いことにFC2はシグナル生成には関与しておらず、2つのアイソフォーム間で異なる機能を果たすことが予想された。本研究結果は非常に興味深いのが、これまでの分子遺伝学的な解析と同様、シグナルの実体を直接明らかにしたのではなく、今後も更なる研究が必要であると考えられる。

8. フェロキラーゼ・アイソフォームの機能解析

実際、FC1およびFC2は、その遺伝子発現様式が大きく異なっている。興味深いことに、これらの発現様式は、ALA合成系の律速段階であるGluTRのアイソフォーム (HEMA1とHEMA2) と類似していた。FC1とHEMA2は主に根や茎などの非光合成器官で発現が認められ光にตอบสนองしないのに対し、FC2とHEMA1は光合成器官で発現しており光応答性を示す^{23,47)}。さらに、筆者らはタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミド処理により、光合成器官においてFC1とHEMA2の発現が劇的に誘導されることを見出した。このことから、これらの発現は通常、リプレッサータンパク質により抑制されており、何かの条件で解除されるのではと考えた。実際、FC1とHEMA2の発現は、ウイルス感染による過敏反応や傷害、オゾン処理などのストレス条件下で顕著に誘導を受けることが明らかとなった^{48,49)}。傷害によるFC1 mRNAレベルの誘導は一過的で、他の傷害誘導性遺伝子と似た発現プロファイルを示した。これらの中には、細胞質型アスコルビン酸ペルオキシダーゼや二次代謝に関わるシトクロムP450が含まれていたため、FC1はこれら葉緑体外のヘムタンパク質にヘムを供給している可能性が考えられた⁴⁹⁾。

筆者らはさらにFC1とFC2の機能の違いに着目して、変異体の解析を行なった (Ninoら、論文準備中)。FC1のノックアウト変異体は致死性を示すことが報告されている⁴⁶⁾。そこで、シロイヌナズナのFC1のノックダウン変異体 (*fc1-1*)⁴⁹⁾とFC2のノックアウト変異体 (*fc2-1*) の解析を行なった。その結果、*fc2-1*の初期芽生えが *pale green* の表現型を示すことが分かった。この株では、ヘム含量の低下や葉緑体シ

トクロム*f*の欠損が認められた。また興味深いことに、光化学系IIのCP43およびCP47蓄積が野生株に比べ大きく減少していた。シアノバクテリアでは、CP47部位特異的の変異体におけるCP47蓄積が、*fc2*型フェロキラーゼの変異により安定化することが報告されている⁵⁰。FC2のC末端に存在するLHC相同領域へのクロロフィル結合が、クロロフィル分配による光化学系IIのCP47アセンブリに関与する可能性が議論されている。このメカニズムの詳細は明らかでは無いが、FC2が主に葉緑体内にヘムを供給し、さらに光化学系IIのアセンブリに関与することについて、今後さらに研究を進めていきたいと考えている(図4)。

一方*fc1-1*は、見た目は野生株と変わらなかったが、ミトコンドリア・シトクロム*c*含量の低下や、ミクロソーム画分においてヘム染色されるタンパク質の低下が認められた(Ninoら、論文準備中)。以上の結果は、FC1が葉緑体外のオルガネラへヘムを供給しているという仮説と一致している。通常の生育条件下、光合成器官におけるFC1の発現レベルは非常に低い、ストレス条件下での防御機構以外に、FC1は細胞内のヘム供給においてハウスキーピングな役割を果たしている可能性が考えられる(図4)。

9. 植物細胞中にフリーのヘムは存在するか?

ヘムは、ヘム*a*やヘム*c*、そしてピリン合成の基質として、ヘムタンパク質の補欠分子族として、さらに細胞内シグナルとしてなど、多様な消長を辿ることから(図2A)、特定のタンパク質に結合していないフリーの状態のヘムが細胞中に存在するのではないかと考えられてきた。しかし、フリーのヘムはフェントン反応により活性酸素を生成し、細胞に毒性を与えることから、動物細胞では細胞内におけるフリーヘムのレベルは

非常に低く抑えられている(<0.1 μM)ことが知られている⁵¹。

一般にヘムを抽出するには、pHの異なるアセトン抽出法が行なわれる⁵²。この方法では、まず、植物サンプルのホモジェネートを、アンモニアを含む塩基性アセトンで抽出し、クロロフィルやカロテノイドなどの色素を取り除く。次に残渣を中性のアセトンで洗浄後、塩酸を含む酸性アセトンで残渣中のヘムを抽出するという手順で、この方法により、クロロフィルなどの吸収に邪魔されずにヘムを分光学的に測定することを可能にしている。ThomasとWeinsteinは、植物細胞中でルーズに結合したヘム(フリーヘム)が塩基性アセトン中に抽出されると考え、色素体中のフリーヘムの定量を行なった³¹。その結果、色素体の総ヘム量中のおよそ23~28%がフリーヘムであると見積もられた。また近年、シロイヌナズナの*gun*変異体より、塩基性アセトンにより抽出し、HH assayで定量したフリーヘムのレベルが、*gun*表現型と相関しないことが報告されている⁵³。

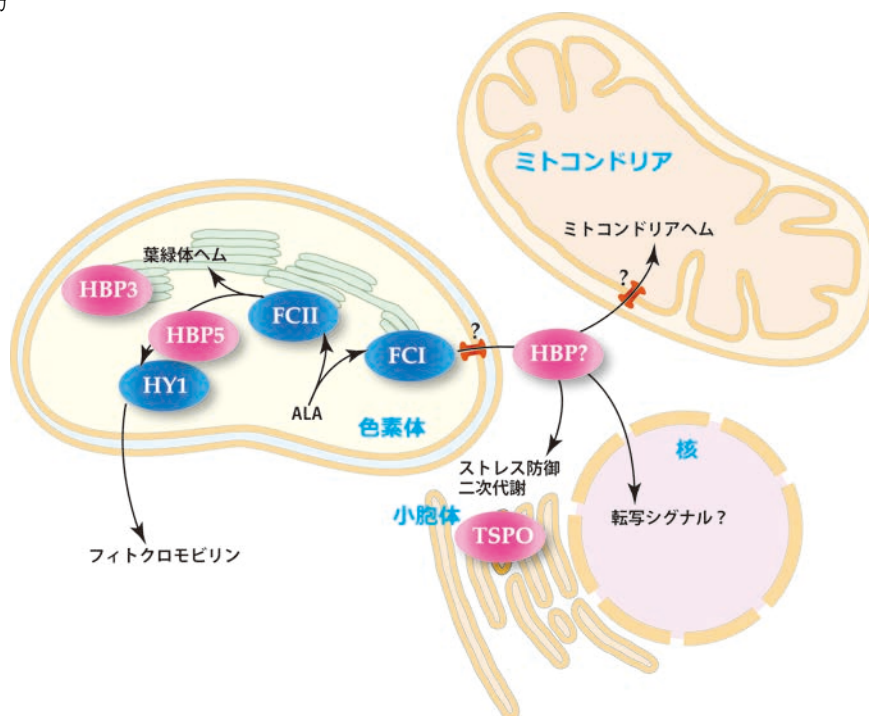


図4 想定される植物細胞でのヘム輸送系

高等植物ではヘム合成関わるフェロキラーゼは色素体に局在する。多くの植物ではフェロキラーゼには2つのアイソフォームが存在する。C末端にLHCモチーフを有するFCIIは主に色素体にヘムを供給する。また色素体内で、ヘムはHBP5を介してHY1に輸送される。一方、FCIは主に色素体外のヘム供給に機能する。ヘム輸送に関わるトランスポーターは未だ同定されていないが、HBPなどのキャリアタンパク質によりヘムは輸送されると考えられる。ヘムはミトコンドリアや核、小胞体などに輸送され、多様な生理機能を果たす。また小胞体・ゴルジ体にはヘム輸送に関わると考えられるTSPOが局在している。

筆者らは、植物細胞中のフリーヘムのレベルに興味を持ち、まず標準ヘムタンパク質を用いて、上記のアセトン抽出法によるヘム定量を行なった³⁴⁾。その結果、塩基性アセトンはヘモグロビンやミオグロビンなどを溶解させることで、ヘムを抽出出来ることを見出した。一方、酸性アセトンはヘムタンパク質の溶解度に関係なく、全ての非共有結合性ヘムを定量的に抽出できた。また異なる親和性で2分子のヘムを結合することが知られているBSAとヘムの複合体を形成させ、抽出を行なった結果、塩基性アセトンはタンパク質に低い親和性で結合したヘムを抽出できることが明らかとなった。一方、中性アセトンはタンパク質結合性のヘムは全く抽出出来なかったが、非結合性のヘムを抽出出来ることが分かった。従って、中性アセトンにより抽出されるヘムが、植物細胞中のフリーヘムを示す1つの指標となると考えられた。実際、植物ホモジェネートから中性アセトンで抽出を行ない、HH assayによりヘム定量を行なうと、非常に低いレベルながらヘムを検出することができた³⁴⁾。シロイヌナズナ、パセリ、ホウレンソウの葉で実験を行なったが、いずれにおいても、そのレベルは総ヘム量の約3%であった。またALA添加を行なうと総ヘム量は増加したが、中性アセトンに抽出されるフリーヘム量は変化しなかった。一方、NFを処理し、葉緑体の内部構造を破壊すると、フリーヘム量の増加が認められた。このことから、葉緑体の内部膜構造がヘムのリザーバーとして機能している可能性が考えられた。しかし、NF処理によるフリーヘム量の変化と*gun*表現型には相関が認められなかったことから、増加したフリーヘムが直接シグナルとして機能している可能性は低い。以上の結果から、ヘムがレトログレードシグナルとして機能すると仮定すれば、それらは遊離したヘムではなく、制御された輸送系で運ばれる必要があると考えられた。

10. ヘムを輸送するメカニズム

動物細胞や細菌におけるヘム輸送に関しては、いくつかのトランスポーターが単離され、その輸送機構が解析されている⁵¹⁾。その多くはABCトランスポーターであるが、植物細胞においてヘム輸送に関わるABCトランスポーターは未だ同定されていない。また、植物細胞において、色素体で合成されたヘムがどのように他のオルガネラに輸送されるかについては、

これまで殆ど知られていない。最近、植物ではTSPO (Tryptophan-rich sensory protein) がヘム輸送に関与しているとの報告が成された⁵⁴⁾。TSPOのホモログは、哺乳類のミトコンドリア外膜に存在し、ポルフィリンなどをリガンドとすることが知られている。シロイヌナズナでは、TSPOは小胞体やゴルジ体に局在し、ヘム依存的にオートファジーによる分解を受ける(図4)。さらにアブシジン酸処理により、一過的にTSPO発現の誘導とヘム含量の上昇が起こることや、TSPO過剰発現体ではALA添加によるポルフィリン蓄積が引き起こす植物体の白化が抑制されていることから、TSPOはヘム結合を介してストレスを抑制していると提案されている⁵⁴⁾。しかし、色素体から小胞体やゴルジ体にヘムがどのように輸送されるかについては、未だ不明である。

筆者らは、疎水性分子であるヘムの輸送にはキャリアタンパク質が必要であると考え、植物のヘム結合性タンパク質 (Heme Binding Protein: HBP) の解析を行なった。このタンパク質は、動物細胞に存在するp22HBP/SOULと相同なタンパク質で、ポルフィリン結合性を有し、その輸送に関与すると考えられている。シロイヌナズナには5つのHBPが存在し、その2つはN末端に葉緑体への transit peptide を有していた。筆者らはまず transit peptide を有しない2つのHBP (HBP1とHBP2) について生化学的解析を行なった。その結果、これらは可溶性タンパク質であり、ヘムを含むポルフィリン類と可逆的に結合出来ることを明らかにした⁵⁵⁾。また最近、transit peptideを持ち、葉緑体型HBPと考えられるHBP3およびHBP5について検討したところ、HBP5のみがヘムに特異的に結合することが分かった⁵⁶⁾。さらにHBP5がヘム分解に関わるヘムオキシゲナーゼ (HY1) と葉緑体内で相互作用することを、酵母ツーハイブリッド法とbimolecular fluorescence complementation (BiFC) 法により明らかにした。HBP5ノックアウト変異体では*hy1*変異体に見られるフィトクロム欠損の表現型が認められないため、ヘム分解に必須ではない。しかし、メチルジャスモン酸の過剰処理により過酸化水素の生成を誘導すると、野生株に対しHBP5変異体では過酸化水素の蓄積上昇が認められた⁵⁶⁾。このことは、ヘム代謝の効率低下が酸化ストレスと関係していることを示しているが、その詳細については今後の研究が必要である。本研究成果は植物体内におけるヘムの動態を知る上で、初めてその

実体に迫るものであり、今後HBP全体の機能を含めて、解析を進めていきたいと考えている段階である。現在までに明らかに成ってきている、植物細胞におけるヘム輸送系について図4にまとめている。

11. おわりに

以上、植物細胞における最近のヘム研究の展開について、筆者の研究の変遷も交えながら総括した。生化学研究初期の花形スターであったヘムは、近年、その多様な機能が再び注目を浴びるようになってきた。しかし、その細胞内の動態を含めて、未だに多くが不明のままである。今後、様々な切り口で、その実体に迫っていききたいと考えている。

謝辞

本稿をまとめるにあたり、協力して頂いた大学院生ならびに共同研究者に謝辞を申し上げる。また、共同研究者であり、本論文を纏める上でコメントを頂いた東京大学の小林康一先生に感謝申し上げる。最後に、本解説特集の Guest Editor を引き受けて下さり、また執筆の機会を与えて下さった、北海道大学の田中亮一先生に心から感謝申し上げる。

Received June 26, 2012, Accepted July 18, 2012, Published August 31, 2012

参考文献

- Mochizuki, N., Tanaka, R., Grimm, B., Masuda, T., Moulin, M., Smith, A. G., Tanaka, A., and Terry, M. J. (2010) The cell biology of tetrapyrroles: a life and death struggle, *Trends Plant Sci.* 15, 488-498.
- Masuda, T., and Fujita, Y. (2008) Regulation and evolution of chlorophyll metabolism, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1131-1149.
- Tanaka, R., Kobayashi, K., and Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*, *The Arabidopsis Book* 9, e0145.
- Kobayashi, K., and Masuda, T. (2012) Tetrapyrrole Biosynthesis in Plant Systems, in *The Handbook of Porphyrin Science* (Kadish, K. M., Smith, K. M., and Guillard, R., Eds.) Vol 16-20, pp 143-212, World Scientific, Singapore.
- 高橋重一, 増田建 (2008) ヘムの分析, in 光合成研究 (「光合成研究法」編集委員会, Ed.) pp 327-337.
- Mac Munn, C. A. (1886) Researches on myohaematin and the histohaematin, *Philos. T. Roy. Soc. Lond. B* 177, 267-298.
- Keilin, D. (1925) On cytochrome, a respiratory pigment, common to animals, yeast, and higher plants, *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 98, 312-339.
- Guarente, L., and Mason, T. (1983) Heme regulates transcription of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site, *Cell* 32, 1279-1286.
- Joshi, B., Morley, S. J., Rhoads, R. E., and Pain, V. M. (1995) Inhibition of protein synthesis by the heme-controlled eIF-2 alpha kinase leads to the appearance of mRNA-containing 48S complexes that contain eIF-4E but lack methionyl-tRNA(f), *Eur. J. Biochem.* 228, 31-38.
- Chen, J. J., Yang, J. M., Petryshyn, R., Kosower, N., and London, I. M. (1989) Disulfide bond formation in the regulation of eIF-2 alpha kinase by heme, *J. Biol. Chem.* 264, 9559-9564.
- Lathrop, J. T., and Timko, M. P. (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif, *Science* 259, 522-525.
- Faller, M., Matsunaga, M., Yin, S., Loo, J. A., and Guo, F. (2007) Heme is involved in microRNA processing, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14, 23-29.
- Yin, L., Wu, N., Curtin, J. C., Qatanani, M., Szwergold, N. R., Reid, R. A., Waitt, G. M., Parks, D. J., Pearce, K. H., Wisely, G. B., and Lazar, M. A. (2007) Reverbalpha, a heme sensor that coordinates metabolic and circadian pathways, *Science* 318, 1786-1789.
- Wang, S., Publicover, S., and Gu, Y. (2009) An oxygen-sensitive mechanism in regulation of epithelial sodium channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 2957-2962.
- Furuyama, K., Kaneko, K., and Vargas, P. D. (2007) Heme as a magnificent molecule with multiple missions: heme determines its own fate and governs cellular homeostasis, *Tohoku J. Exp. Med.* 213, 1-16.
- Matringe, M., Camadro, J. M., Labbe, P., and Scalla, R. (1989) Protoporphyrinogen oxidase as a molecular target for diphenyl ether herbicides, *Biochem. J.* 260, 231-235.
- Kouji, H., Masuda, T., and Matsunaka, S. (1988) Action mechanism of diphenyl ether herbicides: Light-dependent O₂ consumption in diphenyl ether-treated tobacco cell homogenate, *J. Pestic. Sci.* 13, 495-499.
- Masuda, T., Kouji, H., and Matsunaka, S. (1990) Diphenyl ether herbicide-decreased heme contents stimulate 5-aminolevulinic acid synthesis, *Pestic. Biochem. Physiol.* 36, 106-114.
- Miyamoto, K., Nishimura, K., Masuda, T., Tsuji, H., and Inokuchi, H. (1992) Accumulation of protoporphyrin IX in light-sensitive mutants of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.* 310, 246-248.
- Miyamoto, K., Tanaka, R., Teramoto, H., Masuda, T., Tsuji, H., and Inokuchi, H. (1994) Nucleotide sequences of cDNA clones encoding ferrochelatase from barley and cucumber, *Plant Physiol.* 105, 769-770.

21. Smith, A. G., Santana, M. A., Wallace-Cook, A. D. M., Roper, J. M., and Labbe-Bois, R. (1994) Isolation of a cDNA encoding chloroplast ferrochelatase from *Arabidopsis thaliana* by functional complementation of a yeast mutant, *J. Biol. Chem.* 269, 13405-13413.
22. Chow, K. S., Singh, D. P., Walker, A. R., and Smith, A. G. (1998) Two different genes encode ferrochelatase in *Arabidopsis*: mapping, expression and subcellular targeting of the precursor proteins, *Plant J.* 15, 531-541.
23. Suzuki, T., Masuda, T., Singh, D. P., Tan, F. C., Tsuchiya, T., Shimada, H., Ohta, H., Smith, A. G., and Takamiya, K. (2002) Two types of ferrochelatase in photosynthetic and nonphotosynthetic tissues of cucumber: their difference in phylogeny, gene expression, and localization, *J. Biol. Chem.* 277, 4731-4737.
24. Watanabe, N., Che, F. S., Iwano, M., Takayama, S., Yoshida, S., and Isogai, A. (2001) Dual targeting of spinach protoporphyrinogen oxidase II to mitochondria and chloroplasts by alternative use of two in-frame initiation codons, *J. Biol. Chem.* 276, 20474-20481.
25. Lermontova, I., Kruse, E., Mock, H.-P., and Grimm, B. (1997) Cloning and characterization of a plastidal and a mitochondrial isoform of tobacco protoporphyrinogen IX oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 8895-8900.
26. Chow, K.-S., Singh, D. P., Roper, J. M., and Smith, A. G. (1997) A single precursor protein for ferrochelatase-I from *Arabidopsis* is imported *in vitro* into both chloroplasts and mitochondria, *J. Biol. Chem.* 272, 27565-27571.
27. Lister, R., Chew, O., Rudhe, C., Lee, M. N., and Whelan, J. (2001) *Arabidopsis thaliana* ferrochelatase-I and -II are not imported into *Arabidopsis* mitochondria, *FEBS Lett.* 506, 291-295.
28. Masuda, T., Suzuki, T., Shimada, H., Ohta, H., and Takamiya, K. (2003) Subcellular localization of two types of ferrochelatase in cucumber, *Planta* 217, 602-609.
29. Obornik, M., and Green, B. R. (2005) Mosaic origin of the heme biosynthesis pathway in photosynthetic eukaryotes, *Mol. Biol. Evol.* 22, 2343-2353.
30. van Lis, R., Atteia, A., Nogaj, L. A., and Beale, S. I. (2005) Subcellular localization and light-regulated expression of protoporphyrinogen IX oxidase and ferrochelatase in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 139, 1946-1958.
31. Thomas, J., and Weinstein, J. D. (1990) Measurement of heme efflux and heme content in isolated developing chloroplasts, *Plant Physiol.* 94, 1414-1423.
32. Masuda, T., and Takahashi, S. (2006) Chemiluminescent-based method for heme determination by reconstitution with horseradish peroxidase apo-enzyme, *Anal. Biochem.* 355, 307-309.
33. Takahashi, S., and Masuda, T. (2009) High throughput heme assay by detection of chemiluminescence of reconstituted horseradish peroxidase, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 12, 532-535.
34. Espinas, N. A., Kobayashi, K., Takahashi, S., Mochizuki, N., and Masuda, T. (2012) Evaluation of unbound free heme in plant cells by differential acetone extraction, *Plant Cell Physiol.* 53, 1344-1354.
35. Ferreira, A., Balla, J., Jeney, V., Balla, G., and Soares, M. P. (2008) A central role for free heme in the pathogenesis of severe malaria: the missing link?, *J. Mol. Med.* 86, 1097-1111.
36. Zhang, S., and Gerhard, G. S. (2009) Heme mediates cytotoxicity from artemisinin and serves as a general anti-proliferation target, *PLoS One* 4, e7472.
37. Kropat, J., Oster, U., Rüdiger, W., and Beck, C. F. (1997) Chlorophyll precursors are signals of chloroplast origin involved in light induction of nuclear heat-shock genes, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94, 14168-14172.
38. von Gromoff, E. D., Alawady, A., Meinecke, L., Grimm, B., and Beck, C. F. (2008) Heme, a plastid-derived regulator of nuclear gene expression in *Chlamydomonas*, *Plant Cell* 20, 552-567.
39. Voss, B., Meinecke, L., Kurz, T., Al-Babili, S., Beck, C. F., and Hess, W. R. (2011) Hemin and magnesium-protoporphyrin IX induce global changes in gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 155, 892-905.
40. Kobayashi, Y., Kanesaki, Y., Tanaka, A., Kuroiwa, H., Kuroiwa, T., and Tanaka, K. (2009) Tetrapyrrole signal as a cell-cycle coordinator from organelle to nuclear DNA replication in plant cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 803-807.
41. Kobayashi, Y., Imamura, S., Hanaoka, M., and Tanaka, K. (2011) A tetrapyrrole-regulated ubiquitin ligase controls algal nuclear DNA replication, *Nat. Cell Biol.* 13, 483-487.
42. Susek, R. E., Ausubel, F. M., and Chory, J. (1993) Signal transduction mutants of *Arabidopsis* uncouple nuclear *CAB* and *RBCS* gene expression from chloroplast development, *Cell* 74, 787-799.
43. Strand, A., Asami, T., Alonso, J., Ecker, J. R., and Chory, J. (2003) Chloroplast to nucleus communication triggered by accumulation of Mg-protoporphyrin IX, *Nature* 421, 79-83.
44. Moulin, M., McCormac, A. C., Terry, M. J., and Smith, A. G. (2008) Tetrapyrrole profiling in *Arabidopsis* seedlings reveals that retrograde plastid nuclear signaling is not due to Mg-protoporphyrin IX accumulation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15178-15183.
45. Mochizuki, N., Tanaka, R., Tanaka, A., Masuda, T., and Nagatani, A. (2008) The steady-state level of Mg-protoporphyrin IX is not a determinant of plastid-to-nucleus signaling in *Arabidopsis*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 15184-15189.
46. Woodson, J. D., Perez-Ruiz, J. M., and Chory, J. (2011) Heme synthesis by plastid ferrochelatase I regulates

- nuclear gene expression in plants, *Cur. Biol.* 21, 897-903.
47. Tanaka, R., Yoshida, K., Nakayashiki, T., Masuda, T., Tsuji, H., Inokuchi, H., and Tanaka, A. (1996) Differential expression of two *hema* mRNAs encoding glutamyl-tRNA reductase proteins in greening cucumber seedlings, *Plant Physiol.* 110, 1223-1230.
 48. Singh, D. P., Cornah, J. E., Hadingham, S., and Smith, A. G. (2002) Expression analysis of the two ferrochelatase genes in *Arabidopsis* in different tissues and under stress conditions reveals their different roles in haem biosynthesis, *Plant Mol. Biol.* 50, 773-788.
 49. Nagai, S., Koide, M., Takahashi, S., Kikuta, A., Aono, M., Sasaki-Sekimoto, Y., Ohta, H., Takamiya, K., and Masuda, T. (2007) Induction of isoforms of tetrapyrrole biosynthetic enzymes, AtHEMA2 and AtFC1, under stress conditions and their physiological functions in *Arabidopsis*, *Plant Physiol.* 144, 1039-1051.
 50. Sobotka, R., Komenda, J., Bumba, L., and Tichy, M. (2005) Photosystem II assembly in CP47 mutant of *Synechocystis* sp. PCC 6803 is dependent on the level of chlorophyll precursors regulated by ferrochelatase, *J. Biol. Chem.* 280, 31595-31602.
 51. Khan, A. A., and Quigley, J. G. (2011) Control of intracellular heme levels: heme transporters and heme oxygenases, *Biochim. Biophys. Acta* 1813, 668-682.
 52. Stillman, L. C., and Gassman, M. L. (1978) Protoheme extraction from plant tissue, *Anal. Biochem.* 91, 166-172.
 53. Voigt, C., Oster, U., Bornke, F., Jahns, P., Dietz, K. J., Leister, D., and Kleine, T. (2009) In-depth analysis of the distinctive effects of norflurazon implies that tetrapyrrole biosynthesis, organellar gene expression and ABA cooperate in the GUN-type of plastid signalling, *Physiol. Plant.* 138, 503-519.
 54. Vanhee, C., Zapotoczny, G., Masquelier, D., Ghislain, M., and Batoko, H. (2011) The *Arabidopsis* multistress regulator TSPO is a heme binding membrane protein and a potential scavenger of porphyrins via an autophagy-dependent degradation mechanism, *Plant Cell* 23, 785-805.
 55. Takahashi, S., Ogawa, T., Inoue, K., and Masuda, T. (2008) Characterization of cytosolic tetrapyrrole-binding proteins in *Arabidopsis thaliana*, *Photochem. Photobiol. Sci.* 7, 1188-1195.
 56. Hye-Jung, L., Masuda, T., and Buckhout, T. (2012) Disrupting the bimolecular binding of the heme binding protein 5 (AtHBP5) to heme oxygenase 1 (HY1) leads to oxidative stress in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.*, in press

Recent Advances in Heme Research in Plant Cells

Tatsuru Masuda*

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo