

論文の内容の要旨

論文題目

Fundamental studies for the elucidation of distribution mechanism of heme in higher plant cells

(高等植物細胞内のヘム輸送機構の解明に向けた基礎研究)

氏 名

高橋 重一

【背景と目的】

ヘムは、プロトポルフィリン IX と鉄から成るテトラピロール分子であり、酸素運搬、電子伝達等の多様な生理機能を果たしている。テトラピロール中間体は光増感作用を示す為、その生合成および蓄積は厳密に制御されることが知られている。この生合成制御においても、ヘムはフィードバック阻害物質として中心的な役割を果たしている。さらに最近、ヘムが細胞内シグナルとして、核の転写制御などに関わることが明らかとなってきた。高等植物細胞内でのヘム生合成は葉緑体で行われるが、ヘムを補欠分子族として要求するヘムタンパク質は葉緑体に限らず、ミトコンドリア、ペルオキシソーム、小胞体、細胞質等の、細胞内の多様なオルガネラに存在している。従って、細胞内にはヘムの分配・輸送に関わる機構が存在すると考えられる。ヘム生合成経路については詳細な研究が行われているが、ヘムの細胞内での分配・輸送機構については全く明らかとなっていない。細胞内におけるヘムの動態を明らかにする上で、高感度かつ正確なヘムの抽出・定量系の確立は必須である。しかし、これまでのヘム定量法は、毒性を持つ試薬を使用したり、検出感度やヘムに対する特異性が低かったり等、多くの問題点を抱えていた。さらにその抽出方法も、細胞内での存在が想定されているタンパク質に結合していないフリーのヘムを、選択的に抽出出来るかどうかなど未だ曖昧な点が残されており、その手法の確立は重要である。またヘムは疎水性分子であり、その細胞内輸送には輸送タンパク質の関与が考えら

れている。最近、動物細胞において、細胞質に局在するヘム結合タンパク質の存在が示され、動物細胞内でのヘム輸送に機能することが示唆されている。しかし、植物細胞における、このようなヘム結合タンパク質の同定・解析はこれまで全く成されていない。そこで本研究では、私は植物細胞内でのヘムの動態を明らかにすることを目的として、1.高感度かつ特異的なヘム定量法の開発、2.植物細胞からのヘムの抽出方法の確立、3.植物細胞におけるヘム結合タンパク質の解析について、研究を行った。

【実験結果と考察】

1. 高感度かつ特異的なヘム定量法の確立

ペルオキシダーゼは過酸化水素存在下でルミノール分解反応を触媒し、その際に化学発光が生じる。西洋ワサビペルオキシダーゼ(HRP)のアポタンパク質(ApoHRP)は、ヘムを持たないために不活性型であるが、ヘムの添加により活性型であるホロタンパク質へと自発的に再構成することが知られている。ApoHRP にヘムを添加すると、再構成する HRP 量は添加したヘム量に依存するため、これを利用した酵素学的なヘム定量系が開発できるのではないかと考えた。そこで、ApoHRP をヘム溶液と混合して再構成した後、化学発光試薬による HRP 活性の検出を行った。その結果、発光試薬添加後直ちに化学発光強度が上昇し、その強度は添加したヘム濃度に対して高い直線性を示すことが明らかとなった。市販のウエスタンブロッティング用の発光試薬を用いた場合、検出限界は 5 pM であり、極めて高感度にヘム定量を行うことができた。また検量線は発光試薬添加後、60 分間は安定であった。さらに、他のポルフィリン類および金属ポルフィリン類は、ApoHRP を活性型に全く再構成できないことから、本方法はヘムの特異的な定量法として利用できることが明らかとなった。本ヘム定量法を HH(HRP-based heme assay)法と命名し、以後の解析に用いた。

2.植物からのヘムの抽出方法の確立

現在、主に行われている植物試料からのヘムの抽出法は、1978 年に Stillman と Gassman により報告された、pH の異なるアセトンを用いた段階的な抽出法である。この抽出法では、最初にアンモニアを含む塩基性アセトンによって試料からクロロフィルおよびカロテノイドを除去し、次いで中性アセトンで洗浄を行い、最後に塩酸を含む酸性アセトンによりヘムの抽出を行う。植物細胞にはタンパク質非結合性のフリーのヘムが存在すると想定されており、塩基性アセトンに抽出されるヘムが、フリーヘムのレベルを表すとの報告が成されている。この仮説を検証するため、代表的なヘムタンパク質であるヘモグロビン、ミオグロビン、カタラーゼから塩基性、中性、酸性アセトンを用いて、ヘム抽出を行った。その結果、塩基性アセトンに抽出されるヘムは、ヘムタンパク質の塩基性アセトンへの溶解度に依存し、ヘムとタンパク質の結合状態とは無関係であることが、一方、酸性アセトンはヘムタンパク質の酸性アセトンへの溶解度に関係なく、全てのヘムを抽出できることが明らかとなった。次に、植物試料に外部から既知濃度のヘムをフリーヘムとして添加したサンプルから、HH 法を用いてヘム抽出・定量を行ったと

ころ、外部から添加したヘムは全てのアセトンに定量的に抽出された。以上の結果は、植物細胞中のほぼ全てのヘムは、特異的あるいは非特異的にタンパク質や脂質に結合した状態で存在しており、非結合性のフリーのヘムは殆ど存在しないことを示唆する。さらに、植物組織からの定量的なヘムの抽出には、従来の段階的な抽出法ではむしろ途中でヘムを失う可能性が高く、酸性アセトンによる一度の抽出の方が、定量的なヘム抽出に適していることが明らかとなった。そこで、この抽出法と HH 法を組み合わせ、シロイヌナズナの鉄代謝変異株 *fro7* のヘム含量の測定を行ったところ、十分栄養条件下で生育させた場合は、*fro7* は野生株と同じヘム含量を示すが、鉄欠乏条件下で生育させた場合は、野生株に比べ有為に低いヘム含量を示す結果が得られた。以上の結果から、酸性アセトンによる一度のヘム抽出と HH 法を組み合わせることで、これまでは定量不可能であった微量の植物試料中のヘム含量を正確に測定する系を開発することに成功した。

3.植物細胞のヘム結合タンパク質の解析

データベース解析により、シロイヌナズナのゲノム中に、動物細胞内でヘム輸送に機能することが示唆されているヘム結合タンパク質と相同性を有する 6 遺伝子(*cHBP*)が存在することを見出した。この内の 1 遺伝子については ORF 内に 10 塩基の欠損を持っていたことから、偽遺伝子であると推定された。また、2 遺伝子の推定アミノ酸配列の N 末端には、オルガネラ局在と予測されるシグナルペプチドが存在していた。本研究ではヘムの細胞質輸送に着目し、細胞質局在のタンパク質をコードすると考えられる残りの 3 遺伝子(*cHBP1~3*)についての解析を行った。半定量 RT-PCR 解析により、組織特異的遺伝子発現を調べた結果、*cHBP1* は葉で、一方 *cHBP2* は根で高い発現レベルを示した。また、*cHBP3* は両組織で共に低い発現レベルを示した。次に、*cHBP1*、*cHBP2* がコードするタンパク質について、組換えタンパク質を用いた生化学的な解析を行った。*cHBP3* については、組換えタンパク質を得ることができなかった。*cHBP1* および *cHBP2* を大腸菌中で His-tag 融合タンパク質として発現させたところ、共に inclusion body を形成していた。そこで、8 M の尿素溶液を用いて可溶化・精製し、その後尿素を除き、リフォールディングを行った。得られたタンパク質にヘムを添加し、ニッケルアフィニティカラムで精製したところ、両タンパク質溶出画分は茶色を呈した。本画分の吸収波長スペクトルを測定したところ、タンパク質およびヘム由来のピークが認められたため、両タンパク質はヘム結合性を有している事が明らかとなった。トリプトファン消光実験により、ヘムの解離定数を求めたところ、*cHBP1* が 0.38 μM 、*cHBP2* が 0.7 μM と、共に高い親和性を有していた。また、プロトポルフィリン IX および Mg-プロトポルフィリン IX ジメチルエステルに対しても親和性を持つことが明らかとなった。また、ヘム結合型 *cHBP1* あるいは *cHBP2* と Apo-HRP を混合したところ、両 *cHBP* の濃度に依存した HRP の再構成による活性化が認められたことから、*cHBP1* および *cHBP2* のヘム結合性は可逆的であり、アポヘムタンパク質にヘムを受け渡す能力を持つことが明らかとなった。以上の結果から、*cHBP1* および *cHBP2* は植物細胞内でテトラピロールの輸送タンパク質としての条件を満たす新規なヘムタンパク質であることが明らか

となった。

【まとめ】

本研究では、高等植物細胞内におけるヘム輸送機構の解明を目的として、その基盤となる研究を行った。第 1 に、HRP 再構成系を用いて、従来の方法に比べて 5000 倍以上高感度でヘムに特異的な定量系である、HH 法を開発した。HH 法は、多検体を同時に測定できるハイスループットな測定系であり、植物だけでなく動物や医療面でも応用が期待出来るアッセイ系であり、基礎研究用のキットとして商品化されることが決定している。第 2 に、植物細胞からのヘムの抽出法を確立した。酸アセトンによる一度の抽出と HH 法を組み合わせることにより、従来不可能であった微量の試料からの、簡便かつ正確なヘム抽出・定量を行う系を開発した。さらに、これらのヘムの抽出・定量系の開発を通して、植物細胞内における殆どのヘムが、従来考えられていたフリーヘムとしてではなく、タンパク質や脂質との結合型として存在することを示した。第 3 に、植物細胞内でのテトラピロール輸送タンパク質として機能しうる生化学的な条件を満たす新規なヘムタンパク質 cHBP を見出した。cHBP はこれまで全く謎であった色素体から細胞質へのテトラピロールの移行を解き明かす鍵となるタンパク質として、注目されている。