HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ヘムの分析
Author(s)	高橋, 重一; 増田, 建
Description	3章 単離・精製・活性測定 5. 色素の分析 b
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, 327-337
Issue Date	2009-03-31
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/39163
Type	departmental bulletin paper
File Information	67-048.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

5．色素の分析
b．ヘムの分析

高橋　重一[1)]，増田　　建[1)]

光合成においてヘムは，光化学系のシトクロムや活性酸素消去系のカタラーゼなどのヘムタンパク質の補欠分子族として，酸化還元や電子伝達に機能している．本章では植物組織からのヘムの抽出・分析方法について紹介する．

Analysis of Heme in Photosynthetic Organisms

Shigekazu Takahashi, Tatsuru Masuda

Heme is prosthetic group of hemoproteins, which are responsible for various biological processes including reduction and oxygenation, oxygen metabolism, oxygen transfer, electron transfer and secondary metabolism. In this chapter, we introduce analytical methods of heme in photosynthetic organisms. Variety of hemes, biosynthesis, principle of heme analysis, and several heme assays have been described.

5.b.1　ヘムおよびヘムタンパク質の種類

ヘムはポルフィリンの鉄錯体の慣用名である（表1）．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）．その他にヘム*o*，クロロクルオロヘム，またポルフィリンのD環が還元されたクロリン骨格を持つ，ヘム *d*，ヘム d_1，シロヘムが存在する（表2）．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* のことを意味する．

ヘムは，ヘムタンパク質の補欠分子族として機能する．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 b_5 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種類に分類できる[1,2)]．また近年，ヘムセンサータンパク質とよばれる一群のタンパク質が同定されている[3)]．これらのタンパク質は，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[3)]，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がシグナルとなって[4)]，細胞内のさまざまな生理作用に機能している．酸化還元酵素と酸素運搬体のヘムは，主にヘム *b* であり，シトクロムにはヘムの違いにより多くの種類がある（表2）．結合しているヘムが Fe(II) と Fe(III) の酸化還元を繰り返すことで，電子伝達体として機能する．還元型 Fe(II) シトクロムの吸収スペクトルには特徴的な3つのピーク，α，β，γ（Soret）帯がある．最も長波長側の α 帯のピークは還元型シトクロムにのみ認められ，吸収波長はシトクロムの種類によって異なる．またシロヘムは植物および細菌の，亜硝酸還元酵素および亜硫酸還元酵素の補欠分子族として機能する．

図1に主要なヘムである，ヘム *a*，ヘム *b*，ヘム *c* の構造を示す．ヘム *a* はプロトポルフィリンIXの側鎖の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 *o* は8位がメチル基である以外はヘム *a* と同じ構造をもつ．また古細菌には3位に異なるプレニル骨格を持つヘム *a* やヘム *o* が存在する[5)]．ヘム *b* はプロトポルフィリンIX骨格を持

表1：ポルフィリン鉄錯体の慣用名

ヘム（heme）	ポルフィリンの鉄錯体
フェロヘム（ferroheme）	ポルフィリンの2価鉄錯体
フェリヘム（ferriheme）	ポルフィリンの3価鉄錯体
ヘモクロム（hemochrome）	含窒素化合物などが1あるいは2個配位したポルフィリンの鉄錯体
フェロヘモクロム（ferrohemochrome）	2価鉄のヘモクロム
フェリヘモクロム（ferrihemochrome）	3価鉄のヘモクロム，ヘミクロムともいう
ヘミン（hemin）	Cl^- が1個配位したポルフィリンの3価鉄錯体
ヘマチン（hematin）	OH^- が1個配位したポルフィリンの3価鉄錯体

1）東京大学大学院総合文化研究科広域科学専攻

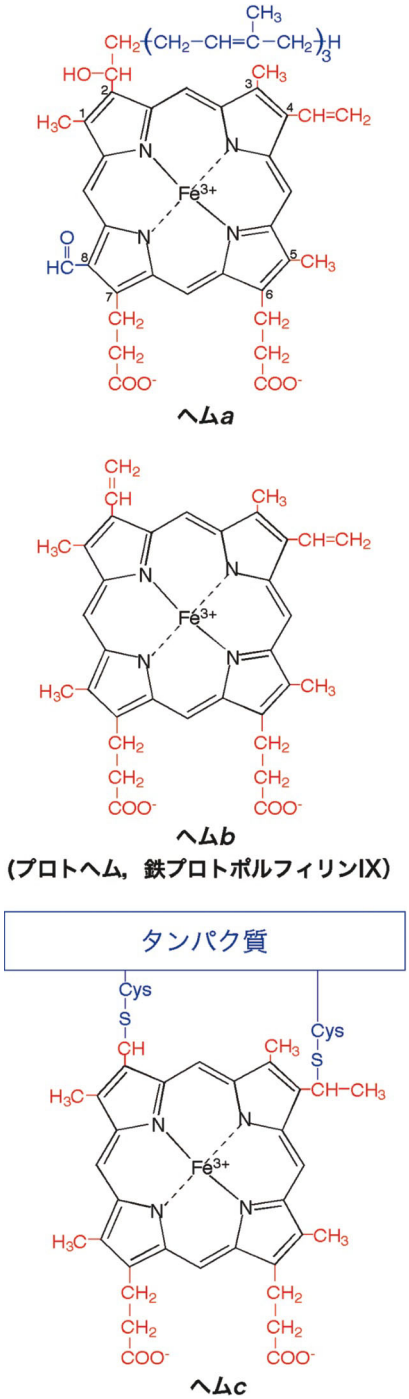

図1：ヘム *a*，ヘム *b*，ヘム *c* の構造

ち，プロトヘムあるいは鉄-プロトポルフィリン IX ともよばれる．ヘム *c* は 4 つのメチル基，2 つのプロピオン酸基，そして 2 つのビニルチオエーテル基を持つ．ヘム *a* とヘム *b* はタンパク質とは非共有結合によりタンパク質と結合しているが，ヘム *c* は 2 つのビニルチオエーテル基がヘムタンパク質のシステイン残基とそれぞれ共有結合している．

5.b.2　ヘムの生合成

植物のヘムの生合成（図 2）[6–8] の第 1 段階は 5-アミノレブリン酸（5-aminolevulinic acid：ALA）の合成である．ALA 合成は，全てのテトラピロールの合成量を調節する律速段階となっている．動物，酵母やある種の細菌では，ALA は ALA シンターゼが触媒するスクシニル CoA とグリシンの縮合反応により 1 段階で合成される．これに対して，植物の色素体，シアノバクテリアや多くの細菌では，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．グルタミン酸は最初に色素体ゲノムにコードされたグルタミン酸 tRNA と ATP 依存的にアミノアシル化される．このアミノアシル $tRNA^{Glu}$ は，テトラピロール合成だけでなく，色素体タンパク質合成にも使われる．このように代謝系においてアミノアシル tRNA を利用する反応は非常に珍しい．次に，グルタミル tRNA 還元酵素により NADPH 依存的に還元され，アミノ基転移反応によって ALA が生成する．次の一連の反応では，2 分子の ALA が縮合しピロール環を形成した後，さらにそれが 4 分子縮合し，開環テトラピロールを形成する．そして，閉環したテトラピロール環であるウロポルフィリノーゲン III が生成される．ウロポルフィリノーゲン III はシロヘム生合成の基質でもあり，メチル化，酸化，そして鉄配位反応によりシロヘムが合成される．また，ウロポルフィリノーゲン III が 2 段階の酸化的な脱カルボキシル化反応および酸化反応を受けることによりプロトポルフィリン IX が合成される．このプロトポルフィリン IX はクロロフィルとヘム生合成の共通の基質であり，Mg-キラターゼにより Mg^{2+} が配位するとクロロフィル合成系に，フェロキラターゼにより Fe^{2+} が配位するとヘム *b*（プロトヘム）が合成される．ヘム *b* は ALA 合成系のグルタミル tRNA 還元酵素のフィードバック阻害剤として働き，テトラピロール代謝系の合成量を調節する重要な役割を担っている[6,9]．

プロトポルフィリン IX 合成の最後の段階を触媒するプロトポルフィリノーゲン酸化酵素より，前の段階を触媒する全ての酵素は可溶性のタンパク質であり，葉緑体のストロマに局在している[10]．一方，プロトポルフィリノーゲン酸化酵素とフェロキラターゼは膜タンパク質であり，葉緑体の包膜とチラコイド膜の両方に存在すると考えられている[11,12]．これらの酵素は，動物細胞ではミトコンドリアに局在しており，植物細胞においてもミトコンドリアに活性やアイソフォームが存在すると報告されている[13,14]．しかし，植物では色素体におけるヘムの生合

表 2：ヘムの種類と吸収特性，機能および存在する生物種

ヘムの種類	α 吸収ピーク（nm）	補欠分子族（機能）	生物種
ヘム *a*	584[a]	シトクロム *c* オキシダーゼ（シトクロム aa_3）（電子伝達）	細菌から真核生物
ヘム *b*	557[a]	ヘモグロビン（酸素運搬） ミオグロビン（酸素運搬） カタラーゼ（酸化還元） ペルオキシダーゼ（酸化還元） シトクロム P−450（酸化還元・電子伝達） *b* 型シトクロム（電子伝達）	細菌から真核生物
ヘム *c*	551[a]	*c* 型シトクロム（電子伝達）	細菌から真核生物
ヘム *o*	553[a]	シトクロム *o*（シトクロム *bo*，シトクロム *co*）（電子伝達）	細菌のみ
クロロクルオロヘム		クロロクルオリン（細胞外ヘモグロビン）（酸素運搬）	環形動物多毛綱 カンザシゴカイ科 ケヤリ科
ヘム *d*	613[a]	シトクロム *d*（シトクロム *bd*）（電子伝達）	細菌のみ
ヘム d_1	620[a]	亜硝酸塩還元酵素（シトクロム cd_1）（酸化還元）	細菌のみ
シロヘム	550〜560	亜硫酸還元酵素および亜硝酸還元酵素（酸化還元）	細菌から真核生物

[a] ピリジンフェロヘムクロムの α 吸収ピーク

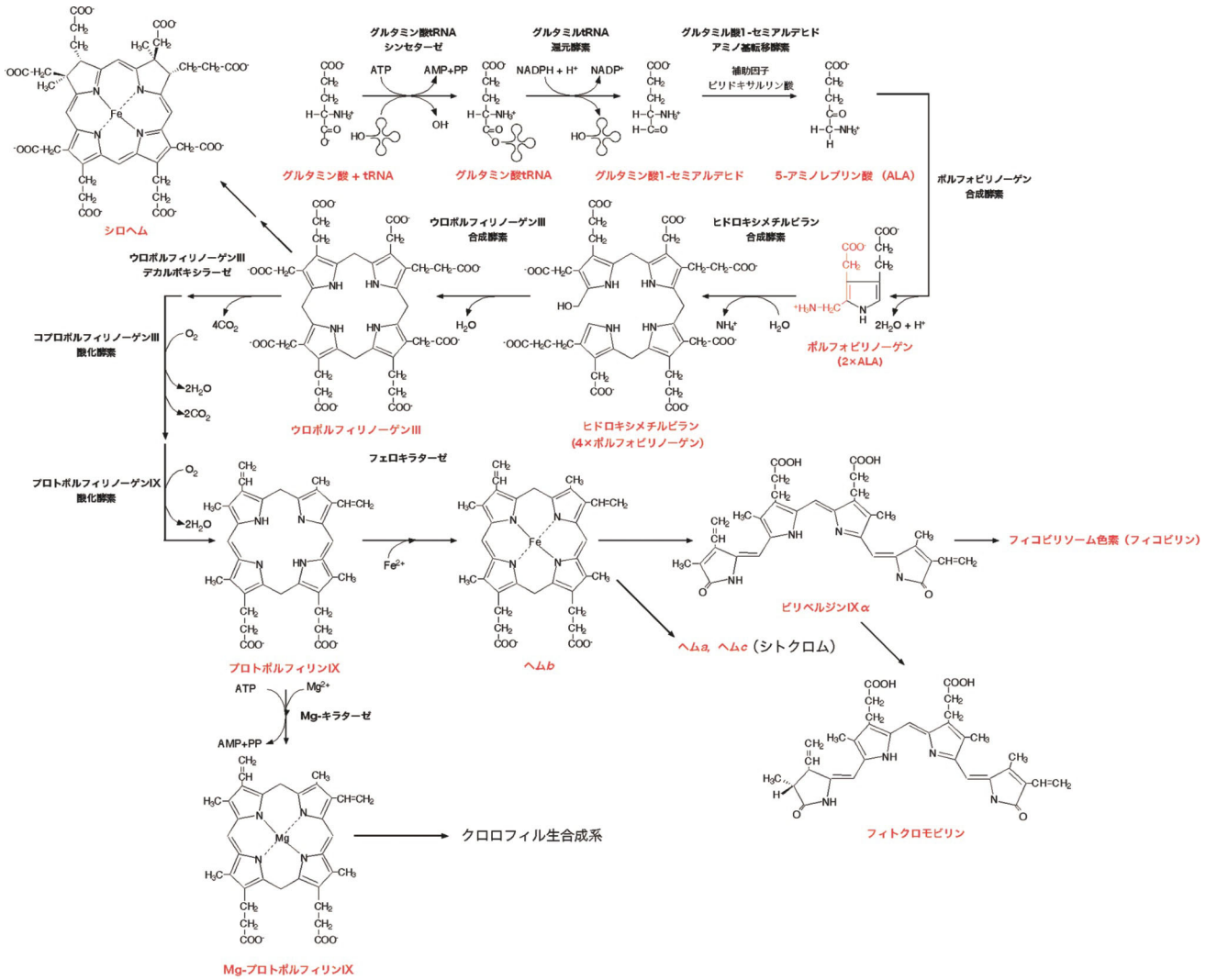

図 2：ヘム生合成系．ヘム生合成の第 1 段階は ALA の合成で，高等植物などではグルタミン酸 tRNA に依存した珍しい代謝系である．2 分子の ALA がピロール環を形成し，これが 4 分子縮合して開環テトラピロールを生じた後，閉環して中間体であるプロトポルフィリン IX が作られる．Fe^{2+} が配位することでヘムが合成され，Mg^{2+} が配位するとクロロフィル合成系に進む．

成量が殆どを占めることから，ミトコンドリアにおけるヘム合成の生理的意義は未だ明らかではない[15]．

合成されたプロトヘムは，ヘムオキシゲナーゼによる酸化的開裂を受けビリベルジン IXα に変換される．高等植物ではさらにフィトクロモビリンに変換され，光受容体であるフィトクロムの発色団として機能する．またビリベルジン IXα は，シアノバクテリアや紅藻などのアンテナ系であるフィコビリソーム色素（フィコビリン）の前駆体であり，フィコシアノビリンやフィコエリスロビリンに変換され，アンテナ色素として機能する．

ヘム a の合成に関与する酵素は，未だ同定されていない．ヘム c の合成に関しては，シトクロム c の成熟化過程として研究が行われている．生物種によって異なる 3 つのシトクロム c 成熟システムが存在すると考えられている．いずれも，アポシトクロム c，ヘム，アポシトクロム c のシステイン残基とヘムを還元するタンパク質，これらの輸送に関わるタンパク質，そしてヘムを共有結合させる酵素（リアーゼ）などにより構成される，複雑なシステムである[16]．

5.b.3　ヘム分析の原理

ヘムの種類を知るには，ヘムの第 5，第 6 配位座にピリジンなどのN塩基が配位結合したフェロヘモクロムを形成させる．フェロヘモクロムの可視光領域での強い吸収帯はポルフィリン側鎖の電子吸引性の増加とともに長波長側にシフトする性質をもつことから，α 帯の極大吸収波長と吸光係数からヘムの種類の同定と定量を行うことが出来る（表 3）[1,17–20]．また，ヘモクロムの Fe(III) 酸化型（フェリヘモクロム）と $Na_2S_2O_4$ で還元した Fe(II) 還元型（フェロヘモクロム）の差スペクトルを測定し，α 帯の吸光度と等吸収点（isosbestic point）の吸光度の差を求める方法（酸化還元差スペクトルの測定）も一般的なヘムの定量・分析方法である[21]．また非共有結合によりタンパク質に結合しているヘム a とヘム b は，塩酸酸性アセトンで抽出することができる．一方，ヘム c はタンパク質とチオエーテル結合しているため，塩酸酸性アセトン処理では遊離してこない．従って，ヘムタンパク質に結合しているヘムの種類を調べるには，塩酸酸性アセトンによるヘムの抽出の可，不可とフェロヘモクロムの α 吸収帯のピークの位置により分析することができる．

タンパク質と結合した状態のヘムを調べる場合には，そのタンパク質を精製して，分光学的な解析を行う必要がある．また本章では詳しく述べないが，タンパク質に結合しているヘムの配位状態やスピン状態は，共鳴ラマンスペクトル[22,23]や電磁常磁気共鳴（電子スピン共鳴：EPR あるいは ESR）[24–26]により調べることができる．また，非共有結合性のヘムは，塩酸酸性アセトンで抽出後，定量することが可能である．共有結合性のヘム c は，チオエーテル結合を Ag_2SO_4 もしくは Hg_2SO_4 処理で切断後，酢酸-エーテル混合液で抽出することが可能であるが，この場合最終的に得られる物質は，3，8 位の側鎖がヒドロキシエチル基に変化したヘマトヘムとよばれる化合物であり，本来の状態とは異なるので注意が必要である．

ヘムはアルカリ性の溶液や生理的な pH では界面活性剤を含む溶液に可溶である[21]．本章では塩酸酸性アセト

表 3：ピリジンヘモクロムの吸収と吸光係数

ヘム		Soret 帯 (nm)	β (nm)	α (nm)	文献
ヘム b	λmax	418.5	526　(525)	557　(557)	17)(1))
(プロトヘム)	εmM	191.4	17.5(16.0)	34.4(32.0)	
				εmM$_{(557nm-541nm)}$20.7	
ヘム a	λmax	427		585　(584)	17)
				(30.8)	
ヘム c	λmax		522	551	17)
	εmM		18.6	29.1	
シロヘム	λmax	401		557	19)
	εmM			15.7	
メソヘム	λmax	407　(407)	518　(518)	547　(547)	17)(19))
	εmM	140.4(139.5)	(20.9)	33.2(35.8)	
				εmM$_{(547nm-531nm)}$21.7	
デューテロヘム	λmax	406　(405.5)	514　(514)	545　(544)	17)(19))
	εmM	97.3(134.6)	(18.3)	24.0(26.4)	
				εmM$_{(543nm-531nm)}$15.3	

ンで抽出可能な非共有結合性のヘム，主にヘム b の分析法について述べる．

5.b.4　植物からのヘムの抽出法

ヘムは赤血球の血色素として古くから研究されて来ており，動物細胞におけるヘム代謝の研究報告は多く，ヘムの抽出･定量法も確立している[1,17−20]．一方，植物からのヘムの抽出・定量法について述べた論文の数は限られている．ここでは，1978 年の Stillman と Gassman[27] に基づいた，植物組織からのヘム b の抽出法を紹介する．後で述べる，高感度なヘム b の定量系で測定する場合には，実験のスケールを 100 分の 1 に下げ，5．までの抽出操作を行うことでヘム b を定量することが可能である．

［実験方法］

原論文では，ペルオキシド生成によるヘムの分解を防ぐため，全ての操作は照明を暗くした条件(1 fc（カンデラ）以下）で行うとしているが，エーテル抽出までの過程は通常の実験室光下でも問題ないと考えられる．

1．植物組織（1～2 g）に 30 ml の 90%アセトン/10% 0.1 N アンモニアを加え，ワーリングブレンダーなどのホモジナイザーで完全に破砕する．
2．50 ml 遠心管に移し，10,000 xg で 10 分間遠心分離後，上清を取り除く．この上清画分にはクロロフィルおよびその中間体，カロテノイド，脂質などが含まれているため，別途分析に供することが可能である．
3．沈殿を 30 ml の 80%アセトンで洗浄し，再度遠心分離後，上清を取り除く．上清にクロロフィルなどの色素が完全に含まれなくなるまで，操作を繰り返す．
4．沈殿に 25 ml の 2 %塩酸を含むアセトンを加え，ヘムを抽出する．遠心分離後，上清は別の容器に移し，沈殿を再度 25 ml の塩酸アセトンで抽出する．
5．遠心分離後，2 回分の上清を合わせヘム粗抽出液とする．ヘムは塩酸アセトン中では比較的安定であり，少なくとも−20°C暗所で数日間保存することができる．
6．ヘム粗抽出液を 500 ml の分液漏斗に移し，30 ml のペルオキド・フリーのジエチルエーテル[注1]，100 ml の脱イオン水の順に分液漏斗に加え，混合する．
7．ヘム b はエーテル層に抽出される．エーテルによる抽出は 1 回で十分である．
8．エーテル層を濃縮フラスコに移し，ロータリーエバポレーターを用いて，22°C暗所で減圧濃縮を行い，1～2 ml まで濃縮する．高温や光照射下ではエーテル中にペルオキシドが生成されるため注意が必要である．
9．濃縮液を 10 ml の目盛り付き試験管に移す．濃縮フラスコを 2.5 ml のピリジン，そして 1～2 ml の脱イオン水で順に洗浄し，目盛り付き試験管に加える．（総量が 9 ml を越えないように加える洗浄水の量を調整する．）
10．すぐに定量しない場合には 5 °C暗所で保存する．

5.b.5　アルカリ-ピリジンヘモクロムの酸化還元差スペクトル測定によるヘムの定量

［実験方法］

1．ピリジン−ヘムを含む溶液に 1 ml の 1N NaOH を加え，脱イオン水で 10 ml に定容する．ピリジンの終濃度は 25%，NaOH の終濃度は 0.1 N となる．
2．暗所に放置後（1 時間以内），溶液を 2 本のキュベットに等量ずつ（～1.5 ml）加え，分光光度計（デュアルビーム型が望ましい）にセットする．
3．5 mg 程度の $K_3Fe(CN)_6$ の結晶を，リファレンス側のキュベットに加え，良く混合して完全に溶解させる．
4．10 mg 程度の $Na_2S_2O_4$[注2] の結晶を，サンプル側のキュベットに加え，転倒撹拌などにより穏やかに混合し溶解する．還元後，測定までに数分から数十分間放置する場合は，流動パラフィンなどを重層して酸素の浸透を防ぐ．スペクトル測定後，念のために再度 $Na_2S_2O_4$ を加え，再還元による吸収の増加がないことを確認すれば確実である．
5．535 nm～560 nm の吸収スペクトルを測定する．通常の条件では，吸光度のスケールは 0～0.1 の範囲

注1　試薬メーカーからはペルオキシド･フリーのジエチルエーテルが販売されているが，本論文では，エーテル中のペルオキシドを完全に取り除くため，ジエチルエーテルを 1/2～1/3 容の 5 %硫酸中 5 % $FeSO_4$(w/v) で 3 回洗浄し，終濃度0.1%のフェノールをペルオキシドのスカベンジャーとして加えている．このエーテルを 0 °C暗所で保管後，ヨウ化カリウム溶液を用いて完全にエーテル中のペルオキシドが除かれていることを確認してから，実験に供されている．論文中では以上の操作を行わないとヘムは完全に分解し，全く検出されていない．

注2　$Na_2S_2O_4$ は大変分解しやすいため，新品の封を切った後は密閉できる容器に小分けにしておく．1 回蓋を開けたものは数日で使い終わるようにする．

に収まる．

6．557 nm と 541 nm における吸光度の差を求め，吸光係数 20.7 mM^{-1} を用いて，ヘム *b* の濃度を定量する[17]．

7．ヘム *a* の濃度を求める場合は，ピリジンの終濃度を90%とし，584 nm における $Na_2S_2O_4$ 還元による吸光度を求め，吸光係数 30.8 mM^{-1} を用いて定量する[28,29]．

5.b.6 フェロキラターゼの活性測定法

ヘムの生合成（2.）でも述べたように，フェロキラターゼはプロトポルフィリン IX に Fe^{2+} を配位させヘム *b* を合成する酵素である[21,30]．高等植物では，フェロキラターゼ活性は葉緑体に検出されている[31,32]．本酵素の活性測定にはプロトポルフィリン IX をはじめ，人工基質であるメソポルフィリン IX やデューテロポルフィリン IX が用いられ，精製したヘムのピリジンヘモクロムの酸化還元差スペクトルを測定することで行われる（表3）[33]．基質である Fe^{2+} の酸化を防ぐため，酵素反応はツンベルグ管を用いて行われる．図3にキュウリのフェロキラターゼ組換えタンパク質におけるデューテロヘム生成の経時変化を示す[34]．

［実験方法］

1．ツンベルグ管の反応管内に，50 μM デューテロポルフィリン IX 0.5% Triton X－100，2 mM ジチオトレイトール，100 mM Tris－HCl，pH 8.0，酵素抽出液を最終容量が 1 ml となるよう加える．

2．側管内に 100 μM Fe^{2+}-クエン酸塩を含む同緩衝液を 1 ml 入れる．

3．ツンベルグ管を，窒素置換を数回行いながら，真空ポンプで 2～3 分間減圧下におく．

4．側管内の溶液を反応管内に移し，反応を開始する．

5．反応は 30℃で暗所下，30 分間浸とうする．

6．0.5 ml の 0.1 M ヨードアセトアミドを加えて反応を停止させ，0.5 ml ピリジンと 0.5 ml の 0.1 N NaOH を加える．

7．反応液を二分し，5．の実験操作 2 からに従って，酸化還元差スペクトルを測定する．

8．543 nm と 531 nm における吸光度の差を求め，吸光係数 15.3 mM^{-1} を用いて，デューテロヘムの濃度を計算する．

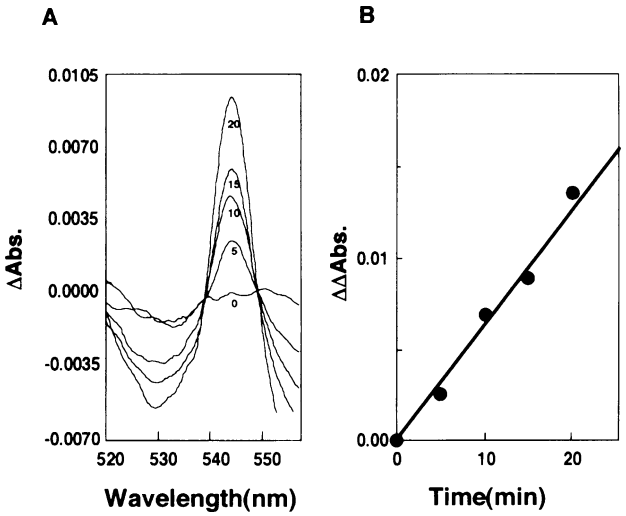

図3：ピリジンヘモクロム法によるフェロキラターゼ活性の測定．キュウリフェロキラターゼ組換えタンパク質によるデューテロヘムの経時的生成．A：反応時間ごとの酸化還元差スペクトル．B：定量結果．

5.b.7 高速液体クロマトグラフィーによるヘムの定量

非共有結合性のヘムは，高速液体クロマトグラフィーにより分離し，400 nm 近辺の吸光度を分光検出器で検出することで，定量することが可能である．逆相の C_{18} カラムを用い，展開溶媒に 0.5%トリフルオロ酢酸を含むアセトニトリルと 0.5%トリフルオロ酢酸を含む水の段階的な濃度グラジエント（30～100%）で分離することにより，ヘム *a*，ヘム *b*，およびヘム *o* を検出している[5,35]．

植物のヘム分析については Weinstein と Beale により報告されている[36]．この方法では，ヘム *a* とヘム *b* の両方を同時に測定している．この論文では，DEAE 樹脂を用いてヘムの精製を行った後，高速液体クロマトグラフィーにサンプルをアプライしているが，この操作の必要性はそれぞれの実験条件によって判断されたい．分離は逆相カラムを用い，ヘムの検出には 402 nm の吸光度を測定している．

［実験方法］

1．先に述べた植物からのヘムの抽出操作の 8．まで行う．エーテル層は 0.2 ml 以下になるまで濃縮する．

2．ヘムを 0.1 ml のピリジンと 2 ml の酢酸に溶解後，0.5 ml のベッド容量の DEAE Sepharose CL-6B（酢酸型）カラムにアプライする．

3．DEAE カラムを 5 ml の酢酸，4 ml の 80%アセトンで洗浄することで，陽イオン性や中性の脂質を取り除く．

4．ヘムを 4 ml の 2％(v/v) 氷酢酸を含む 80%アセト

ンで溶出し，ロータリーエバポレーターで真空減圧濃縮し，乾固させる．

5．ヘムを66.5%エタノール／17%酢酸／16.5% 0.1 N アンモニア(v/v/v)に溶解する．まず，アンモニアに溶解してから，酢酸を加え，ヘムを溶解する．

6．Altex Ultrasphere ODS カラム（25 cm×4.6 mm，5 μm particle）を装着した高速液体クロマトグラムを用いる．展開溶媒は66.5%エタノール／17%酢酸／16.5%水(v/v/v)を用い，1 ml/min の流速で，カラム温度を30°Cで分離し，装着した分光検出器(402 nm)を用いて測定する．インジェクション容量は100 μl．

7．上記の実験条件で，ヘム *b* およびヘム *a* の保持時間は，それぞれ10.6 min および30.6 min である．それぞれのヘムの定量には双方の分画を回収し，ヘム *b* は398 nm の吸光度を測定し，吸光係数144 mM^{-1} を用いて，またヘム *a* は406 nm の吸光度を測定し，吸光係数123 mM^{-1} を用いて計算する．あるいはヘム *a*，ヘム *b* の標準物質のピークから検量線を作成し，濃度を求めても良い．

5.b.8 発色法などによるヘムの定量

先に述べたアルカリ-ピリジンヘモクロム法によるヘムの定量は，歴史的にも古くから行われており，操作に熟練すれば，ある程度高い再現性が得られている．しかし，操作が煩雑で，有機化学に縁のない生化学や分子生物学の実験室では，新たにガラス器具や実験装置を準備する必要がある．さらに，ペルオキシド・フリーのジエチルエーテルの調製に注意を要すること，有毒な溶媒であるピリジンをスペクトル測定時に使用すること，アルカリ-ピリジンヘモクロムのモル吸光係数が低いために，比較的多くの実験材料から抽出を開始する必要があることなど，微量サンプルを多検体測定したい場合には問題点が多い．

そこで，いくつかの発色法による定量法が報告されている[37-39](表4)．その中で，Pandy ら[39]によるトリトン-メタノール発色法は簡便で，397 nm におけるモル吸光係数が165という，アルカリ-ピリジンヘモクロム法より8倍程度高い感度を示している．この方法は，0.1 N NaOH に溶解したヘム20 μl と2.5% Triton X−100を含むメタノール180 μl を混合し，405 nm の吸光度を測定するもので，96ウェルのマイクロタイタープレート上で反応させ，マイクロプレートリーダーによる測定も可能である．示されている検量線によれば，10^{-8}〜10^{-5} モル濃度程度のヘムが直線性をもって定量できている．実際，ヘモグロビンを直接0.1 N NaOH に溶解し，希釈することで，直接ヘモグロビン中のヘムの定量に成功している．しかし，本方法はポルフィリンの Soret 帯の吸収を測定しているため，他のポルフィリンが混入している場合には，これらの影響を大きく受けると考えられる．実際，著者らが本法に従い測定すると，ヘム以外のプロトポルフィリン IX や Zn-プロトポルフィリン IX も高い吸収を示すことが認められた．従って，本方法でヘムを測定する場合には，調製するサンプルに注意が必要である．本方法に基づいたと思われるヘムの定量キット Quanti-Chrom™ Heme Assay Kit（DIHM−250）が BioAssay Systems より販売されており，日本ではフナコシより購入することができる[40]．

また，ヘムのもつ偽ペルオキシダーゼ活性を利用して，ペルオキシダーゼ基質の発色を測定する方法が報告されている[41]．本方法では，市販のペルオキシダーゼ基質であるテトラメチルベンジジン（TMB）を基質としてヘムの定量を行い，トリトン-メタノール発色法よりも13.5倍高い感度を得ている．しかし本方法は，ヘモグロビンや鉄などの偽ペルオキシダーゼ活性を持つ夾雑物の影響を受けやすいと考えられるため，測定するサンプルの調製には注意を要する．

表4：分光学的手法によるヘム定量法の比較

測定方法	吸収極大波長 (nm)	ヘムの吸光係数 (mM^{-1} cm^{-1})
SDS 法	400	91
トリトン-メタノール法	397	165
ピリジンヘモクロム法	557	20.7
Direct NaOH 法	385	58

5.b.9 酵素学的アッセイによるヘムの高感度定量法

最後に著者らが最近開発した，酵素学的アッセイによるヘムの定量法について紹介する．著者らは高等植物のヘム代謝に関する研究を行ってきており，モデル植物であるシロイヌナズナなど，小さな実験材料からヘムを定量する必要に迫られていた．そこで著者らは迅速，簡便で高感度なヘム定量系の開発を行った[42]．この方法は，1990年の Thomas と Weinstein[43]が行った，ヘムの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することで，HRP 活性を自発的かつ定量的に再構成させ，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，さらに高感度かつ簡便に測定するものである．

本方法に従って，ルミノメーター（Turner design 社製，TD－20/20）を用いてヘムの標準溶液を測定すると，検出限界は 20 pM 程度であり，1 nM 程度まで直線性をもって定量することが可能であった．さらにこの反応はヘムに特異的であり，他のポルフィリンや金属ポルフィリンは全く HRP 活性を示さなかった．また，Fe(III) やヘムはそれ自身が偽ペルオキシダーゼ活性を持ち，ルミノール酸化活性を示すことから，ルミノール反応による血液の検出など警察の科学捜査などにも利用されている．そこで，Fe(III) やヘムのみが示す化学発光活性と比べたところ，同濃度のヘムで再構成した HRP 活性よりも 100 倍以上低いことが明らかとなり，これらの物質が共存しても，HRP 由来の化学発光には殆ど影響を与えないことが分かった．

一般に植物細胞には種や組織によっても異なるが，1～20 nmol/g 新鮮重程度のヘムが存在することが報告されている[27]．従って，先に述べた塩酸酸性アセトンによる抽出法に従い，1 g の植物体からヘムを抽出した場合，塩酸アセトンに含まれるヘムの濃度は，1～20 nmol/50 ml＝20～400 nM と計算できる．アセトンは HRP 活性を阻害するが，1％以下では殆ど活性を阻害しないことから，塩酸アセトン抽出液をバッファーで数百倍程度に希釈するだけで，HRP 活性に影響を与えない適度なヘム濃度の溶液を調製できることが分かった．実際，この方法で調製したヘム希釈液を用いて再構成した HRP 活性は十分検出可能であり，数 mg の植物体からでもヘム *b* の含量を測定することが可能であった．以上のことから，本方法はアセトン以外の有害な有機溶媒を用いず，しかも従来の測定法に比べて 100 倍以上の高感度で，夾雑物の影響を受けない，簡便かつ特異的なヘム定量法であることが明らかとなった．

その後，市販の化学発光によるウェスタンブロット検出試薬を用いて，検出感度の向上と試薬調製の手間の軽減を試みた．さらに，96 ウェルのマイクロタイタープレート上で反応させたサンプルの化学発光を，CCD カメラを内蔵したゲルドック内で測定することにより，多検体を同時測定することを可能にした[44]．現在，冷却 CCD を備えない旧式のゲルドックを用いて多検体を同時に測定しても，高い再現性と測定可能濃度の広いダイナミックレンジを実現している．実際，本測定法のヘムの検出感度は数 pM 以下にまで達し，さらに 1 nM 程度まで高い直線性を示している（図 4）．以下に最新の実験方法を紹介する．

［実験方法］

1．用意するべき試薬

(①) HRP アポザイム（APOHRP：Biozyme 社製，日本ではフナコシより購入可能）

(②) Hemin（どの試薬メーカーのものを用いても特に問題は無い．DMSO に溶解後，10 mM KOH で希釈して標準溶液を調製する[注3]．）

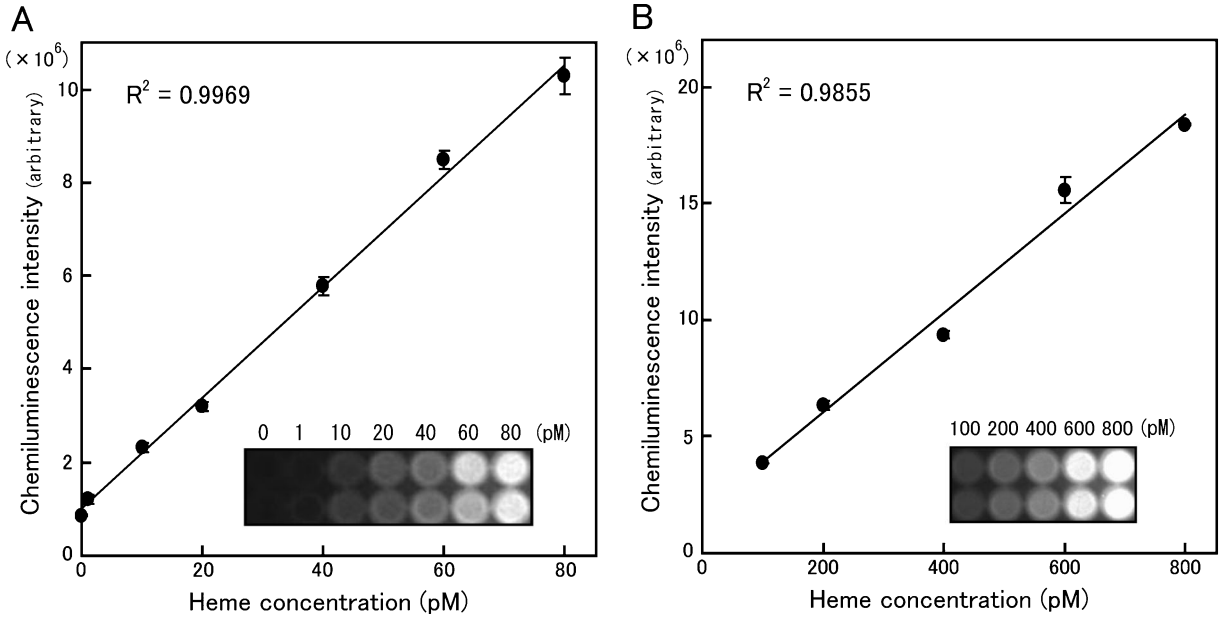

図 4：高感度定量法におけるヘムの検量線．A：0～80 pM および B：100～800 pM のヘム濃度における検量線を示す．図表内の写真はゲルドックで撮影し，定量に供した化学発光を示す．それぞれの濃度範囲で高い直線性を示すことが分かる．

(③) Immobilon™ Western Chemiluminescent HRP Substrate（ミリポア社製[注4]）

(④) 500 mM Tris－HCl，pH 8.4

2．96 ウェルのマイクロタイタープレートの各ウェルに，終濃度 2.5 nM HRP アポザイム，100 mM Tris－HCl，pH 8.4，ヘム標準溶液（1～100 pM あるいは 100～1000 pM の濃度段階）を，最終容量 100 μl となるように混合する．

3．HRP の再構成のため，30 分間室温で放置する．

4．Immobilon のキットに含まれる 2 液を等量混合する．

5．各ウェルに 100 μl の混合した溶液を添加し，混合する．

6．化学発光は反応開始後 2 分程度で最大に達し，15 分間は最大発光が維持される．化学発光検出用のゲルドックあるいはマイクロプレート対応のルミノメーターで化学発光を検出する[注5]．

7．各ウェルの化学発光を定量し，検量線を作成する．

8．植物組織のヘム濃度を測定する場合は，先に述べた酸性アセトンによる抽出法を，実験のスケールを 100 分の 1 に下げ，実験操作 5．まで行う．得られた塩酸アセトン抽出液を数百倍程度，100 mM Tris－HCl, pH 8.4 で希釈し，実験に用いる[注6]．最近の我々の研究結果によると，不特定のヘムタンパク質が実験操作 1．のアンモニア性アセトンに溶解することが明らかとなった（未発表）．従って，植物組織中の総ヘム量を正確に定量するためには，アンモニア性アセトンによる抽出操作を省き，破砕を 80％アセトンで行うべきである．この条件ではヘムは抽出されない．

注3 ヘムの濃度はアルカリ－ピリジン－ヘモクロム法で求めるか，66.5％エタノール／17％酢酸／16.5％水中でのヘムの 398 nm の吸光度を測定し，吸光係数 144 mM^{-1} を用いて計算する．

注4 GE Healthcare Bioscience 社の ECL Plus Western Blotting Detection System も同等の性能を有すると考えられる．

注5 測定感度は機器に応じて異なるため，それぞれの装置で調整する．浜松ホトニクス社製の ARGUS－50 を用いて測定を行った場合，integration frame の値を 100，bit range の値を 7～14 にセットすることで，安定して測定することが可能であった．

注6 本測定系は非常に感度が高いため，希釈率を誤るとヘム濃度は容易に検量線の範囲を越える．いくつかの希釈条件で測定を行い，濃度を確認する．またあまり高濃度のヘムを測定しようとすると，基質の枯渇による化学発光の kinetics の変化や，高発光による CCD 検出器の焼き付けなどを引き起こす場合があり得るので，注意する．

5.b.10 おわりに

これまでヘムは，ヘムタンパク質の補欠分子族として，酸化還元，電子伝達，そして酸素運搬として機能することが知られて来た．しかし近年ヘムが，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来た．実際ヘムは，転写[45-47]，翻訳[48,49]，翻訳後のタンパク質輸送[50]，そしてイオンチャネルの制御[51] など，幅広い生理現象を調節することが報告されている．さらに細胞内オルガネラ間のヘム輸送が，赤血球形成に重要な役割を持つことが報告された[52,53]．植物細胞においても，ヘムはテトラピロール生合成系の負のフィードバック制御を担い，また緑藻クラミドモナスの転写制御シグナルとして機能することが報告されている[54]．ヘムの高次な役割の解明には，細胞内の各オルガネラにおける微量なヘム濃度を正確に測定する必要がある．実際，葉緑体においてヘム合成のフィードバック制御に関わる遊離ヘムのプールが存在するのか，またその濃度は？などについての知見は殆ど得られていない．特にシロイヌナズナなどの微小な生物材料におけるヘムの定量は難しく，植物体に 2,2'-dipyridyl などの鉄キレーターを処理することでフェロキラターゼ活性を阻害し，ヘムによるフィードバック制御を解除した材料におけるポルフィリン蓄積や ALA 合成活性を測定することで，ヘムの含量を間接的に見積もる方法がとられている[55,56]．しかしこの方法が遊離ヘムの濃度と相関するかどうかはいまだ明らかではなく，本方法のような直接的な定量が望ましいことは明らかである．

また簡便かつ高感度なヘム定量系は，マラリアの感染診断にも有用であることが示されている．ヒトに感染したマラリア原虫は，肝臓から赤血球に侵入した後，ヘモグロビンを分解しヘムを放出させる．この放出された遊離ヘムはマラリア感染による致死率と相関することから，血中のヘム濃度を調べることがマラリア感染診断の重要な指標と成り得ることが報告されている[57]．またマラリア原虫は遊離ヘムを多量体化してヘモゾイン（マラリア色素）とよばれる物質に変換することで，ヘムを無毒化している．現在マラリア治療に用いられているキニーネやアルテミシニンといった治療薬は，マラリア原虫細胞内でのこのヘム多量体化による無毒化のステップを阻害することで，作用することが知られている．従って，抗マラリア治療薬を開発する上でも，ヘムは良い指標になると考えられ，今後，微量のヘムを簡便かつ迅速に定量する技術は，ますます重要になっていくと考えられる．

ヘムは比較的不安定な物質であり，植物における微量分析などはこれまで殆ど成されて来なかった．今後，高感度なヘム測定の需要はますます増加していくことが予想され，著者らが開発した酵素学的アッセイによるヘムの高感度定量法がその一助になれば幸いである．

引用文献

1）E. Antonini & M. Brunori, Hemoglobin and Myoglobin in Their Reactions with Ligands. Amsterdam, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 1971
2）M. Sono, M.P. Roach, E.D. Coulter, & J.H. Dawson, Chem. Rev. **96** (1996), P.2841.
3）K.R. Rodgers, Curr. Opin. Chem. Biol. **3** (1999), P.158.
4）J. Sun, M. Brand, Y. Zenke, S. Tashiro, M. Groudine, & K. Igarashi, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101** (2004), P. 1461.
5）M. Lubben & K. Morand, J. Biol. Chem. **269** (1994), P. 21473.
6）S.I. Beale, Photosynth. Res. **60** (1999), P.43.
7）I.U. Heinemann, M. Jahn, & D. Jahn, Arch. Biochem. Biophys. **474** (2008), P.238.
8）R. Tanaka & A. Tanaka, Annu. Rev. Plant Biol. **58** (2007), P.321.
9）S.P. Gough & C.G. Kannangara, Carlsberg Res. Commun. **44** (1979), P.403.
10）T. Masuda & Y. Fujita, Photochem. Photobiol. Sci. **7** (2008), P.1131.
11）M. Matringe, J.M. Camadro, P. Labbe, & R. Scalla, Biochem. J. **260** (1989), P.231.
12）T. Suzuki, T. Masuda, D.P. Singh, F.C. Tan, T. Tsuchiya, H. Shimada, H. Ohta, A.G. Smith, & K. Takamiya, J. Biol. Chem. **277** (2002), P.4731.
13）N. Watanabe, F.S. Che, M. Iwano, S. Takayama, S. Yoshida, & A. Isogai, J. Biol. Chem. **276** (2001), P.20474.
14）I. Lermontova, E. Kruse, H.-P. Mock, & B. Grimm, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94** (1997), P.8895.
15）T. Masuda, T. Suzuki, H. Shimada, H. Ohta, & K. Takamiya, Planta **217** (2003), P.602.
16）R. Kranz, R. Lill, B. Goldman, G. Bonnard, & S. Merchant, Mol. Microbiol. **29** (1998), P.383.
17）J.-H. Fuhrhop & K.M. Smith, Porphyrins and Metalloporphyrins, ed. K.M. Smith, Amsterdam, Elsevier, 1975, p.757
18）The Porphyrins, ed. D. Dolphin, Vol.I～VII, New York, Academic Press. 1978～1979
19）L.M. Siegel, M.J. Murphy, & H. Kamin, Methods in Enzymology, ed. S.P. Colowick & N.O. Kaplan, Vol.52, New York, Academic Press, 1978, p.436
20）T. Inubushi & T. Yonetani, Methods in Enzymology, ed. E. Antonini & L. Rossi-Bernardi, Vol.76, New York, Academic Press, 1981, p.88
21）R.J. Porra & O.T. Jones, Biochem. J. **87** (1963), P.181.
22）S.Z. Hu, I.K. Morris, J.P. Singh, K.M. Smith, & T.G. Spiro, J. Am. Chem. Soc. **115** (1993), P.12446.
23）S.Z. Hu, K.M. Smith, & T.G. Spiro, J. Am. Chem. Soc. **118** (1996) P.12638.
24）堀洋，蛋白質科学会アーカイブ，**10** (2008), e037.
25）L. Min, N.V. Strushkevich, I.N. Harnastai, H. Iwamoto, A.A. Gilep, H. Takemori, S.A. Usanov, Y. Nonaka, H. Hori, G.P. Vinson, & M. Okamoto, FEBS J. **272** (2005) P.5832.
26）S. Takahashi, T. Ogawa, K. Inoue, & T. Masuda, Photochem. Photobiol. Sci. **7** (2008) P.1216.
27）L.C. Stillman & M.L. Gassman, Anal. Biochem. **91** (1978) P.166.
28）W.S. Caughey, G.A. Smythe, D.H. O'Keeffe, J.E. Maskasky, & M.I. Smith, J. Biol. Chem. **250** (1975) P. 7602.
29）L.J. DeFilippi & D.E. Hultquist, Biochim. Biophys. Acta. **498** (1977) P.395.
30）R.J. Porra & O.T.G. Jones, Biochem. J. **87** (1963) P.186.
31）R.J. Porra & J. Lascelles, Biochem. J. **108** (1968) P.343.
32）M. Matringe, J.M. Camadro, J. Joyard, & R. Douce, J. Bio. Chem. **269** (1994) P.15010.
33）S. Taketani & R. Tokunaga, J. Biol. Chem. **256** (1981) P.12748.
34）T. Suzuki, T. Masuda, H. Inokuchi, H. Shimada, H. Ohta, & K. Takamiya, Plant Cell Physiol. **41** (2000) P. 192.
35）N. Sone & Y. Fujiwara, J. Biochem. **110** (1991) P.1016.
36）J.D. Weinstein & S.I. Beale, J. Biol. Chem. **258** (1983) P. 6799.
37）T. Asakura, K. Minakata, K. Adachi, M.O. Russell, & E. Schwartz, J. Clin. Invest. **59** (1977) P.633.
38）R.M.C. Dawson, D.C. Elliot, W.H. Elliot, & K.M. Jones, Data for Biochemical Research, Oxford, Oxford Univ Press, 1986, p.230
39）A.V. Pandey, S.K. Joshi, B.L. Tekwani, & V.S. Chauhan, Anal. Biochem. **268** (1999) P.159.
40）K. Haldar, S.C. Murphy, D.A. Milner, & T.E. Taylor, Annu. Rev. Pathol. **2** (2007) P.217.
41）N.T. Huy, D.T. Xuan Trang, D.T. Uyen, M. Sasai, S. Harada, & K. Kamei, Anal. Biochem. **344** (2005) P.289.
42）T. Masuda & S. Takahashi, Anal. Biochem. **355** (2006) P.307.
43）J. Thomas & J.D. Weinstein, Plant Physiol., **94** (1990) P.1414.
44）S. Takahashi & T. Masuda, Comb. Chem. High Throughput Screen. (2008) in press.
45）L. Guarente & T. Mason, Cell **32** (1983) P.1279.
46）R.S. Zitomer & C.V. Lowry, Microbiol. Rev., **56** (1992) P.1.

47) Y. Shan, R.W. Lambrecht, T. Ghaziani, S.E. Donohue, & H.L. Bonkovsky, J. Biol. Chem. **279** (2004) P.51769.
48) J.J. Chen, J.M. Yang, R. Petryshyn, N. Kosower, & I. M. London, J. Biol. Chem. **264** (1989) P.9559.
49) B. Joshi, S.J. Morley, R.E. Rhoads, & V.M. Pain, Eur. J. Biochem. **228** (1995) P.31.
50) J.T. Lathrop & M.P. Timko, Science **259** (1993) P.522.
51) X.D. Tang, R. Xu, M.F. Reynolds, M.L. Garcia, S.H. Heinemann, & T. Hoshi, Nature **425** (2003) P.531.
52) J.G. Quigley, Z.Yang, M.T. Worthington, J.D. Phillips, K.M. Sabo, D.E. Sabath, C.L. Berg, S. Sassa, B.L. Wood, & J.L. Abkowitz, Cell **118** (2004) P.757.
53) A. Rajagopal, A.U. Rao, J. Amigo, M. Tian, S.K. Upadhyay, C. Hall, S. Uhm, M.K. Mathew, M.D. Fleming, B.H. Paw, M. Krause, & I. Hamza, Nature **453** (2008) P.1127.
54) E.D. von Gromoff, A. Alawady, L. Meinecke, B. Grimm, & C.F. Beck, Plant Cell **20** (2008) P.552.
55) M. J. Terry & R. E. Kendrick, Plant Physiol. **119** (1999) P.143.
56) J. Moon, L. Zhu, H. Shen, & E. Huq, Proc. Natl. Acad. Sci. USA **105** (2008) P.9433.
57) A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, & M.P. Soares, J. Mol. Med. **86** (2008) P.1097.