

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 10日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21570035

研究課題名（和文） Mg-キラターゼの細胞内情報伝達に果たす役割

研究課題名（英文） Role of Mg-chelatase on intracellular signal transduction

研究代表者

増田 建（MASUDA TATSURU）

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授

研究者番号：00242305

研究成果の概要（和文）：

Mg-キラターゼはクロロフィル合成の第1段階を触媒する酵素で、CHLI, CHLD, CHLH の3つのサブユニットから構成される。植物において、核コードの光合成遺伝子は葉緑体の機能とリンクしていることが知られている。しかし葉緑体機能が失われても、核コードの葉緑体遺伝子の発現が抑制されない *gun* (genome uncoupled) 変異体が見出され、その原因遺伝子の多くが CHLH のミスセンス変異であることが明らかとなってきた。従って、Mg-キラターゼはクロロフィル合成系の酵素としてだけでなく、葉緑体から核への情報伝達（レトログレードシグナル）にも関与することが明らかとなってきた。

本研究では、Mg-キラターゼ活性の再構成系を構築し、解析を行った。その結果、*gun* 表現型は Mg-キラターゼ活性の低下が主要な原因と考えられた。現在のところ、Mg-キラターゼ活性の低下がなぜ CHLH タンパク質の蓄積を引き起こすのか、その原因は明らかではない。今後、Mg-キラターゼ複合体の機能や存在状態を含めた解析が重要になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：

Mg-chelatase, which is composed by CHLI, CHLD, and CHLH subunits, catalyzes the first committed step of chlorophyll biosynthetic pathway. In plants, it is known that the expression of nuclear-encoded photosynthesis related genes is coupled with chloroplast functionality. In Arabidopsis, mutants termed *gun* (genome uncoupled) were identified in which intracellular signaling was disrupted. Screening of *gun* mutants revealed many mutations were originated in mis-sense mutation of CHLH, suggesting Mg-chelatase functions not only for chlorophyll biosynthesis but also for the intracellular chloroplast to nucleus signal transduction (retrograde signaling).

In this study, we have constructed reconstitution system of Mg-chelatase activity and revealed that *gun* phenotype is mainly related to the repression of Mg-chelatase activity. However, it is not clear why such repression caused the accumulation of CHLH protein *in vivo*. Analysis of functionality and conformation of Mg-chelatase complex will give novel insight into the retrograde signaling pathway in plant cells.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理学

キーワード：クロロフィル、Mg-キラターゼ、葉緑体、Genome-uncoupled、遺伝子

1. 研究開始当初の背景

クロロフィルやヘムなどのテトラピロールは、生物において必須な役割を果たしている分子である。植物の光合成に利用されるクロロフィル生合成の第一段階は、Mg-キラターゼによって触媒される Protoporphyrin IX (Proto)への Mg²⁺配位反応である。Mg-キラターゼは、CHLI、CHLHD、CHLH の3つのサブユニットから形成され、クロロフィルの合成量を制御する最も重要な酵素である。CHLH は触媒サブユニットであり、基質である Proto、生産物である Mg-Protoporphyrin IX (Mg-Proto) および活性調節タンパク質である GUN4 と結合することが知られている。シロイヌナズナの *genome uncoupled (gun)* 変異体は、葉緑体から核へのコミュニケーションに欠損を持ち、葉緑体の機能が損傷しても核コードの光合成関連遺伝子の発現が抑制されない。CHLH にミスセンス変異が起きると、この *gun* 表現型を示すことから、Mg-キラターゼを中心とするテトラピロール代謝系が、プラスチド由来のシグナルとして核遺伝子の発現調節に関わると考えられている。特にこれまで、Mg-キラターゼの生成物である Mg-Proto が核コードの光合成関連遺伝子の発現を抑制するシグナルとして機能するとの報告が成されているが、最近それを否定する報告が成されており、その詳細な機構は未だ明らかではない。また最近、CHLH はアブシシン酸受容体としても注目を集めている。

2. 研究の目的

このように、Mg-キラターゼは Proto に Mg²⁺を配位させるとともに、クロロフィルとヘムの量的調節、*gun* 表現型の原因遺伝子、アブシシン酸情報伝達と様々な特徴を持つ非常に重要な酵素である。しかし、葉緑体から核への情報伝達に果たす役割を含めて、多くの研究が行われているにも関わらず、その機構については不明な点が多い。本研究では、葉緑体から核への情報伝達に異常をきたす Mg-キラターゼ H サブユニット (CHLH) の *gun* 変異タンパク質の機能解析を行なった。*in vitro*での CHLH ポルフィリン複合体での光分解について、*in vivo*で検証を行なった後、Mg-キラターゼ活性への影響を明らかにするため、単離葉緑体と組換えタンパク質を用いた独自の再構成系を構築し、活性に対する影響を明らかにした。さらに制御タンパク質である GUN4 との相互作用についても解析を

行ない、Mg-キラターゼ活性における *gun* 変異の影響を明らかにした。

3. 研究の方法

・ *in vivo*における Proto 蓄積量の解析

MS 液体培地にて4日間明所 (50 μmol m⁻²s⁻¹) で震盪培養を行い、生育させたシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) seedling に、終濃度 1 mM となるよう ALA を添加し、2 h 暗所でインキュベートした。その後、seedling を採取し、凍結サンプルを作成した。金属クラッシャーでサンプルを破砕し (バグクラッシャー・タイテック社)、400 μL の 80% acetone を加えてボルテックスし、遠心分離 (16,000×g, 5 min, 4°C) を行って上清を回収した。回収した上清に hexane を 300 μL 加えて転倒混和後、遠心分離 (16,000×g, 30 sec, 4°C) を行った後、hexane 層は取り除いた。Proto 蓄積量を測定するため、蛍光光度計により 404 nm の励起光で 630 nm の蛍光強度を測定した。

・ 組換えタンパク質の精製

Mg-キラターゼサブユニット組換えタンパク質の発現および精製では、菌株として BL21(DE3) codon plus RIL、発現ベクターとして pET-28c を用いて、6×His-tag 融合 CHLH タンパク質を以下の方法により発現、精製した。

・ CHLH 組換えタンパク質の免疫ブロット解析

上記の免疫ブロット解析と同様に、SDS-PAGE による分離後、blotting buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.037% SDS, 30% MeOH) を用いて、免疫ブロットを行った。抗体は、CHLI (ダイズ由来、Nakayama et al. 1995)、CHLH (ダイズ由来、Nakayama et al. 1998)、CHLD (シアノバクテリア由来、Masuda 1997)、GUN4 (シロイヌナズナ、Larkin より譲渡、Larkin et al. 2003) を使用した。

・ 葉緑体の単離

Douce and Joyard (1982) の方法を元に、植物体より葉緑体を単離した。

・ Mg-キラターゼサブユニットタンパク質の免疫ブロット解析

上記の免疫ブロット解析と同様に、SDS-PAGE による分離後、blotting buffer (48 mM Tris, 39 mM glycine, 0.037% SDS, 30% MeOH) を用いて、免疫ブロットを行った。

・ *in vitro* における Mg-キラーゼの反応

Walker and Weinstein (1994) の方法を元に、単離葉緑体を加えて全量 100 μL となるように incubation buffer (50 mM Tricine-KOH, pH 7.8, 4 mM ATP, 10 mM MgCl_2 , 1 mM DTT, 1 mM Deuteroporphyrin IX (Deutero)) を調製し、25°C、2 h インキュベーションを行った。内在の Protoporphyrin IX (Proto) から生成した Mg-Proto と区別するために用いた。

・ HPLC による Mg-キラーゼ活性の測定

インキュベーション後、100% acetone を 400 μL 加えてボルテックスし、遠心分離 (16,000 \times g, 5 min, 4°C) を行って上清を回収した。Zapata の系を用いて (Zapata et al. 2000)、10 μL のサンプルを流速 1.2 mL/min で分離した。この時、A 溶液 (methanol : acetonitrile : 0.25 M aqueous pyridine = 50 : 25 : 50 (v : v : v))、B 溶液 (methanol : acetonitrile : acetone = 20 : 60 : 20 (v : v : v)) を用いた。カラムは Symmetry C8, 3.5 μm , 150 x 4.6 mm Colum (Waters)、ポンプは L-2130 (Hitachi)、蛍光検出器は RF-550 (SHIMADZU) を用いた。

検出は Mg-Deutero 検出のため、404 nm の励起光で 580 nm の蛍光強度を測定した。

・ 蛍光光度計による Mg-キラーゼ活性の測定

インキュベーション後、100% acetone を 400 μL 加えてボルテックスし、遠心分離 (16,000 \times g, 5 min, 4°C) を行って上清を回収した。回収した上清に hexane を 300 μL 加えて転倒混和後、遠心分離 (16,000 \times g, 30 sec, 4°C) を行って hexane 層を捨てた。404 nm の励起光で 580 nm の蛍光強度を測定した。

4. 研究成果

・ *in vivo* における Proto の増加と CHLH の安定性

Mg-キラーゼのサブユニットである CHLH の発現は、光誘導を受け、日周期によって発現量が変化するが、CHLH の mRNA 量とタンパク質の蓄積量が一致しないことが報告されている (Nakayama et al., 1998)。日周期において、暗期の終わりに CHLH mRNA 量は急激に上昇し、そのレベルは明期開始後もしばらく維持されるが、CHLH タンパク質の蓄積は明期の始まりに一過的に認められるのみである。CHLH タンパク質の蓄積は、転写後レベルで制御を受けることを明らかにした。強い *gun* 表現型を示す *cch*、*gun5* では、CHLH mRNA の発現量は野生型とほぼ同じであるにも関わらず、CHLH タンパク質の蓄積が高いことが明らかとなった (図 1)。

また高い CHLH タンパク質の蓄積は *gun4* 変

異体でも認められた (図 1, A)。さらに、*in vitro* で CHLH 組換えタンパク質が Proto と結合性を持ち、この CHLH-ポルフィリン複合体が光分解を受けることを明らかにした (図 2)。この時、還元剤 (DTT) 添加により CHLH タンパク質の分解が抑制されることから、ポルフィリンの光増感酸化能による活性酸素生成が CHLH タンパク質の分解に関与していると考えられた。以上の結果から、*in vivo* においても葉緑体内のポルフィリン量が CHLH タンパク質蓄積レベルを調節している可能性が考えられた。

次に *in vivo* における CHLH の光安定性を調べた。前駆体である 5-アミノレブリン酸 (ALA) を暗所で添加して生体内の Proto を増加させ、CHLH タンパク質の蓄積量変化を調べた (図 3, A)。野生型および *gun* 変異体 (*gun4*、*gun5*、*cch*) に 1 mM の ALA を添加し、2 h 暗所にインキュベート後、Proto の蓄積量を蛍光光度計により測定した。その結果、野生株および *gun* 変異体では ALA 添加による Proto の増加が見られた。次に、ALA 処理と無処理サンプルを 1 h 明所 (80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に置き、CHLH 発現を誘導させた後の CHLH タンパク質の蓄積について調べた (図 3, B)。その結果、ALA 無処理では、*gun* 変異体の CHLH タンパク質の蓄積量は野生型よりも強く誘導された。ALA 無処理区では、*gun* 変異体における Proto のレベルが低かったが、そのレベ

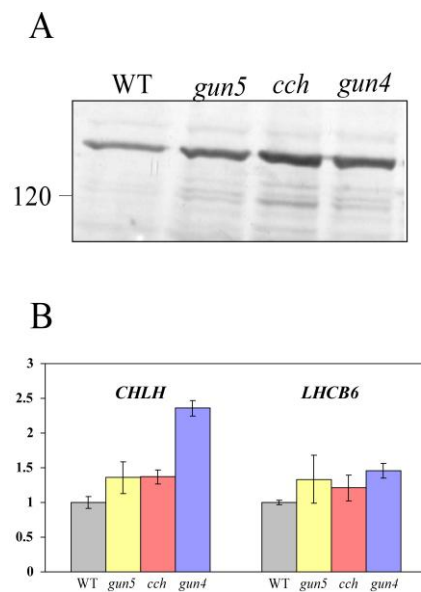


図 1. CHLH タンパク質の蓄積は、転写後レベルで制御を受ける

(A) *in vivo* における CHLH タンパク質の免疫ブロット解析。

(B) qRT-PCR による各変異体における CHLH と LHCb6 の発現解析。

ルと CHLH 蓄積のパターンは一致しなかった。

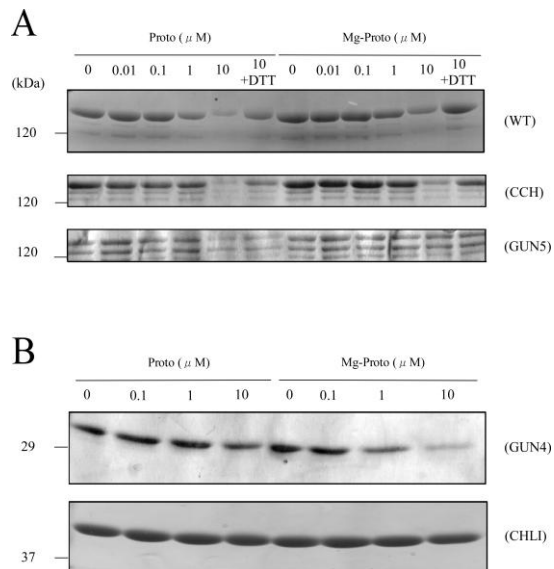


図2. *in vitro*でCHLH-ポルフィリン複合体が光分解を受ける

(A) CHLH タンパク質のポルフィリン濃度依存的な分解。各濃度の Proto および Mg-Proto とタンパク質を混合し、光処理 ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) を行った。還元剤 (DTT) 添加により CHLH タンパク質の分解が抑制されることから、ポルフィリンの光増感酸化能による活性酸素生成が CHLH タンパク質の分解に関与していると考えられる。

(B) GUN4 および CHLI タンパク質のポルフィリン濃度依存的な分解。GUN4 はより親和性の高い Mg-Proto と混合時に、光分解を受ける。Mg-キラターゼサブユニットの 1 つである CHLI はポルフィリンによる光分解を受けない。

また、ALA 添加区では、Proto の高い蓄積が認められるにも関わらず、*gun5* と *cch* は高い CHLH タンパク質を蓄積することが明らかとなった。以上の条件では、*gun5* と *cch* における CHLH mRNA のレベルは、野生株と変わらないことが知られており、*in vivo* における内在の Proto 量が直接 CHLH タンパク質の蓄積量と相関しないことが明らかとなった。

・Mg-キラターゼサブユニットの葉緑体内での局在と組み換えタンパク質の精製

これまで、*gun* 変異が Mg-キラターゼ活性にどのような影響を与えるかについては、明らかになっていない。本研究では、その影響を明らかにするため、組み換えタンパク質による Mg-キラターゼの再構成系の構築を検討した。大腸菌による発現誘導、精製を行なった。CHLD や CHLH では分解産物が認められたが、それぞれのサブユニットタンパク質の調製に成功した。これら組み換えタンパク質の組み合わせにより、Mg-キラターゼ活性の再構成を試みたが、最終的に活性を得ることは出来なかった。CHLI タンパク質では ATPase 活性

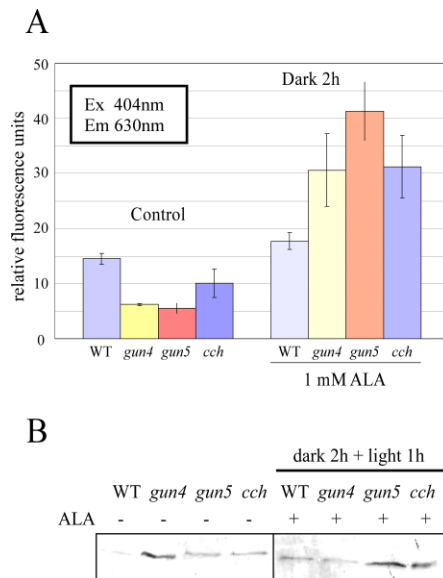


図3. *in vivo*におけるCHLHタンパク質の光安定性

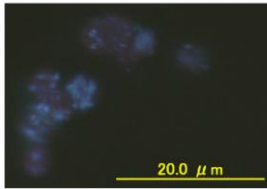
(A) ALA 添加による Proto の蓄積。seedling に Proto の前駆体である ALA を添加し、2 h 暗所にインキュベート後、蛍光光度計により Proto の蓄積量を測定した。

(B) 光処理による CHLH タンパク質の蓄積量。ALA 処理と無処理サンプルを 1 h 明所 ($80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) に置いて CHLH 発現を誘導させ、CHLH タンパク質の蓄積量を免疫プロットにて解析した。

が得られていること、また CHLH および GUN4 タンパク質では、ポルフィリン結合性を持つことが分かった。しかし、CHLD は aggregate を形成しやすく、また分解産物が多く認められる。CHLD の活性欠損により Mg-キラターゼ活性の再構成が出来なかった可能性が高いと考えられる。

そこで、単離葉緑体のサブフラクションとシロイヌナズナの Mg-キラターゼサブユニット組換えタンパク質を組み合わせることで、Mg-キラターゼの再構成を試みた。エンドウ単離葉緑体は高い Mg-キラターゼ活性を持ち、破碎した葉緑体、また分画したサブフラクションを組み合わせることで、Mg-キラターゼ活性が維持されることが報告されている。実際には、単離葉緑体を凍結融解により Lysis した後、超遠心分離によりストロマ画分と Light membrane 画分に分画し、これらを組み合わせることで、Mg-キラターゼ活性が再構成される (Walker and Weinstein, 1991)。そこで、市販のホウレンソウおよびエンドウ (グリーンピース：サカタのタネ) の単離葉緑体を用いて、Mg-キラターゼ活性再構成系の構築を目指した。ホウレンソウから無傷葉緑体を単離したところ、Mg-キラターゼ活性が認められた。しかし凍結融解により、Mg-キラターゼ活性は完全に消失することが分かった。一方、エンドウの無傷葉緑体

A



B

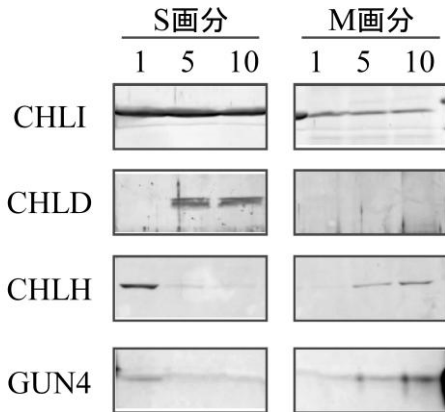


図 4. エンドウ単離葉緑体における Mg-キラーゼサブユニットの局在

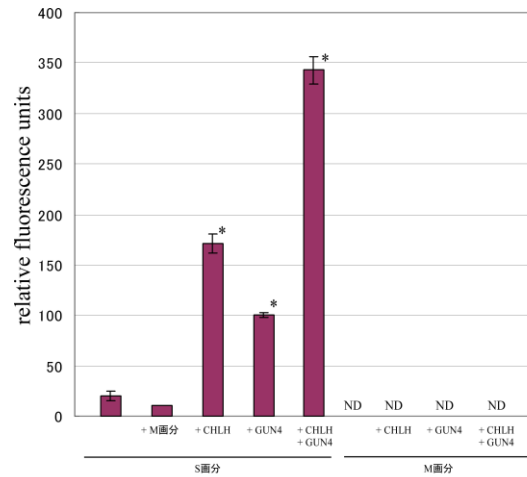
(A) 単離した無傷葉緑体。DAPI 染色した核様体の蛍光とクロロフィルの自家蛍光。

(B) Mg²⁺濃度による内在 Mg-キラーゼサブユニットの局在変化。単離したエンドウ無傷葉緑体を 1, 5, 10 mM の Mg²⁺を含む buffer に 10 min 静置し、凍結破碎した。その後、超遠心分離 (100,000 xg, 1 h at 4°C) により可溶性 (S) 画分と膜 (M) 画分に分離した。それぞれのサブユニットに対する抗体を用いて、免疫プロットを行った。

は Mg-キラーゼ活性を示し、この活性は凍結融解後も維持されることが分かった。従って、今後の実験ではエンドウからの単離葉緑体を用いることとした。

まず、エンドウより無傷葉緑体を単離した。この時、DAPI 染色した核様体の蛍光とクロロフィルの自家蛍光の観察し、無傷葉緑体が単離出来たことを確認した (図 4, A)。次に、可溶性画分 (S 画分) および膜画分 (M 画分) に、Mg-キラーゼのどのサブユニットが含まれるかを調べた。葉緑体内の Mg²⁺濃度の変化によって CHLH の局在が変化することが報告されているため (Nakayama et al., 1998)、Mg²⁺濃度に依存した Mg-キラーゼの各サブユニット (CHLI, CHLD, CHLH) と GUN4 の局在を調べた (図 4, B)。単離したエンドウ無傷葉緑体を 1, 5, 10 mM の Mg²⁺を含む buffer に 10 min 静置し、凍結破碎した。その後、超遠心分離 (100,000 xg, 1 h at 4°C) により S 画分と M 画分に分離した。それぞれのサブユニットに対する抗体を用いて、免疫プロットにより局在性の分布を調べたところ、CHLI は 40 kD 付近にバンドが見られ、CHLD、

A



B

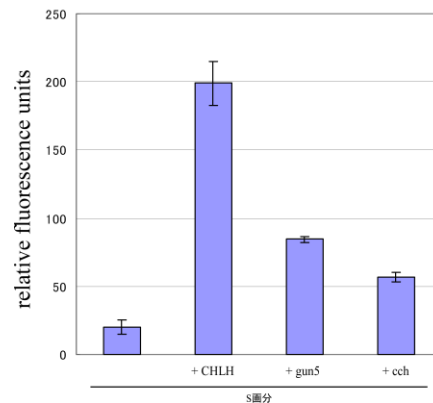


図 5. 単離葉緑体と組換えタンパク質による Mg-キラーゼの再構成

(A) S 画分と M 画分に分離後、CHLH および GUN4 組換えタンパク質を添加または無添加で Mg-キラーゼ活性の再構成をした。CHLH や GUN4、両方添加したサンプルは、S 画分のみのサンプルに対して有意差を示した (* : P < 0.05)

(B) *gun* 変異体である *gun5* および *cch* 組換えタンパク質による添加効果。A の Mg-キラーゼ再構成系を用いて、S 画分に CHLH、*gun5*、*cch* 組換えタンパク質を添加した。各添加サンプルは、S 画分のみのサンプルに対して有意差を示した (P < 0.05)

CHLH、GUN4 はそれぞれ 70 kD、140 kD、25 kD 付近にバンドが認められた。CHLH と GUN4 タンパク質の局在は、Mg²⁺濃度に依存しており、1 mM Mg²⁺存在下では S 画分に認められるのに対し、5, 10 mM Mg²⁺存在下では M 画分への移行が認められた。また CHLD のバンドは、1 mM Mg²⁺存在下で認められなかったが、5, 10 mM Mg²⁺存在下で S 画分のみ認められた。また CHLI は Mg²⁺濃度に関わらず、殆どが S 画分のみ存在した。以上の結果から、高 Mg²⁺存在下では、CHLI と CHLD は S 画分に、CHLH と GUN4 は M 画分に局在することが明らかとなった。

・CHLH と GUN4、*gun* 変異体添加による Mg-キラーゼ再構成

次に S 画分と M 画分に分画後、これらを組み合わせることで Mg-キラーゼ活性の再構成を行なった (図 5, A)。葉緑体を破碎後、2つの画分に分画すると、Mg-キラーゼ活性の大幅な低下が認められた。S 画分のみで、弱い Mg-キラーゼ活性が認められたが、M 画分では活性は認められなかった。またこれら 2つの画分を組み合わせたが、S 画分の持つ活性から大きく活性化されなかった。そこで、これらの画分に Mg-キラーゼサブユニットの組換えタンパク質を添加し、活性への影響を調べた。その結果、CHLI、CHLD を主に含む S 画分に CHLH のみ、あるいは CHLH と GUN4 を添加することで、高い Mg-キラーゼ活性を得ることが出来た (図 5, A)。一方で、M 画分に CHLH や GUN4 組換えタンパク質を添加しても、Mg-キラーゼ活性は得られなかった。また、GUN4 のみを添加しても、Mg-キラーゼの活性化が認められたが、その活性は CHLH の 59%であった。以上の結果から、葉緑体分画後の Mg-キラーゼ活性の低下は、M 画分に含まれる内在の CHLH の活性低下が主な原因であり、シロイヌナズナの CHLH 組換えタンパク質は、それを相補出来ることが明らかとなった。

そこで、S 画分にシロイヌナズナの組換え CHLH および GUN4 を添加する Mg-キラーゼ再構成系を用いて、*gun5* および *cch* 変異を導入した CHLH 組換えタンパク質について、それらの添加効果を検討した (図 5, B)。その結果、S 画分に、*gun5* や *cch* 変異導入 CHLH タンパク質を添加すると、同じタンパク質濃度あたりで、野生型に比べて低い Mg-キラーゼ活性を示すことが分かった。その活性は、*gun5* 変異型で野生型の 42%、*cch* 変異型で野生型の 29%であった。先攻研究において、これら *gun* 変異型 CHLH タンパク質は、基質や生成物である Proto、Mg-Proto との親和性には殆ど差が無いことが明らかとなっている。今回の解析によって、これら *gun* 変異が Mg-キラーゼの触媒活性の低下を引き起こすことが、初めて明らかとなった。

・GUN4 タンパク質による、Mg-キラーゼ活性の回復

GUN4 は Mg-キラーゼ活性の再構成には必須ではないが、Mg-キラーゼを活性化することが知られている (Larkin et al., 2003)。GUN4 による Mg-キラーゼ活性の活性化には、CHLH で生成した Mg-Proto に高い親和性で GUN4 が結合し、CHLH から生成物を除去することで、全体の代謝回転を高める機構が考えられている。実際、今回の Mg-キラーゼ再構成系では、S 画分に GUN4 を CHLH とともに

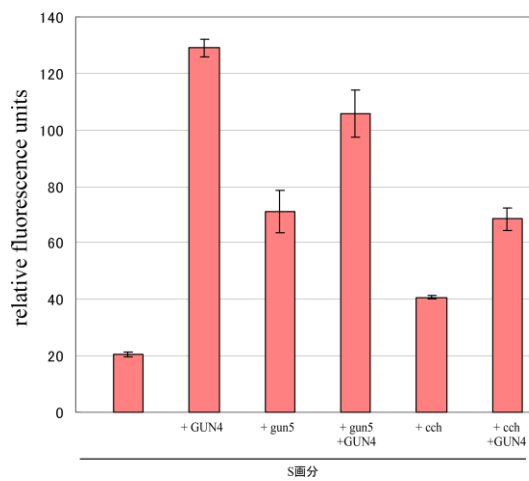


図6. GUN4によるMg-キラーゼ活性の活性化

Mg-キラーゼ再構成系を用いて、*gun* 変異体である *gun5* および *cch* 組換えタンパク質に GUN4 組換えタンパク質を添加した。各添加サンプルは、S 画分のみサンプルに対して有意差を示した ($P < 0.05$)

添加することにより、Mg-キラーゼ活性は 2 倍以上活性化されている。また GUN4 のみの添加でも、Mg-キラーゼ活性の上昇が認められることから、シロイヌナズナの組換え GUN4 はエンドウの CHLH と相互作用して、Mg-キラーゼ活性を活性化することが分かった。そこで、*gun5* 変異型、*cch* 変異型 CHLH タンパク質に対する GUN4 の効果を調べた (図 6)。S 画分に、それぞれ野生型、*gun5* 変異型と *cch* 変異型 CHLH タンパク質を 20 pmol 添加し、さらに GUN4 を 20 pmol 添加した。その結果、野生型に比べると活性化効果は小さいものの、GUN4 添加によって、Mg-キラーゼ活性が増加することが分かった。GUN4 による Mg-キラーゼの活性化効果は、野生型で約 2 倍 (図 6, A) に対して、*gun5* 変異型では 1.5 倍、*cch* 変異型では 1.7 倍であった。以上の結果から、CHLH への *gun* 変異は CHLH と GUN4 との相互作用において、低下は認められるものの、大きな影響を及ぼさないことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Mochizuki, M., 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 in Plant Sci.*, **15**: 488-498.
- ② Tanaka, R., Kobayashi, K., and Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole metabolism in *Arabidopsis thaliana*. The Arabidopsis Book, **9**: e0145.
- ③ Hedtke, B., Alawady, A., Albacete, A., Kobayashi, K., Melzer, M., Roitsch,

- T., Masuda, T., and Grimm, B. (2012) Deficiency in riboflavin biosynthesis affects tetrapyrrole biosynthesis by impaired cytokinin metabolism. *Plant Mol. Biol.*, 78: 77-93.
- ④ Kobayashi, K., Baba, S., Obayashi, T., Keranen, M., Aro, E.M., Fukaki, H., Ohta, H., and Masuda, T. (2012) Regulation of root greening by light and auxin/cytokinin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 24: 1081-1095.
- ⑤ Kobayashi, K., Obayashi, T., and Masuda, T. (2012) Role of the G-box element for regulation of chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis* root. *Plant Signal. Behavior*, 7: 922-926.
- ⑥ Espinas, A. N., Kobayashi, K., Takahashi, S., Mochizuki, N., and Masuda, T. (2012) Evaluation of unbound free heme by differential extraction method. *Plant Cell Physiol.* 53: 1344-1354.
- ⑦ Lee H.-Y., Masuda, T., and Buckhout, T. J. (2012) Disrupting the bimolecular binding of the heme binding protein 5 (AtHBP5) with heme oxygenase I (HYI) leads to oxidative stress in *Arabidopsis*. *J Exp Bot.* 63: 5967-5978.

[学会発表] (計 8 件)

- ① Kobayashi, K., Masuda, T. (2011) Characterization of chloroplast biogenesis in the root of GLK (Golden-2 like) overexpressed *Arabidopsis*. 2012 International Conference on Tetrapyrrole Photoreceptors in Photosynthetic Organisms, Berlin, Germany
- ② Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole in plants -Stories about chlorophyll and heme. International Seminar at CNRS Strasbourg, Strasbourg, France
- ③ 池邨、堀、増田 (2011年9月) Mg-キラターゼのサブユニットである CHLH のシロイヌナズナ *gun* 変異体における蓄積. 日本植物学会第 75 回大会, 東京
- ④ Espinas, N., Mochizuki, N., Masuda, T. (2011年9月) Heme regulation is strictly controlled in *Arabidopsis* ferrochelatase deficient mutants, *fc1* and *fc2*. 日本植物学会第 75 回大会, 東京
- ⑤ 増田、小林、Espinas, 高橋、望月 (2011年9月) 植物からのヘム抽出法の検討

-植物細胞におけるフリーヘムプールの評価-. 日本植物学会第 75 回大会, 東京

- ⑥ Lee, H. J., Masuda, T., Mochizuki, N., Buckhout, T. (2012年3月) Interaction of *Arabidopsis* heme binding protein 5 (HBP5) with heme oxygenase 1 (HY1) in plastids. 第 53 回日本植物生理学会, 京都
- ⑦ 池邨、増田 (2011年3月) エンドウ葉緑体画分とシロイヌナズナ組換えタンパク質による Mg-キラターゼ活性の再構成と調節機構の解析. 第 52 回植物生理学会年会, 仙台
- ⑧ 堀、池邨、望月、増田 (2010年3月) Mg キラターゼの CHLH サブユニットとポルフィリン複合体は光分解を受ける. 第 51 回植物生理学会年会, 熊本

[図書] (計 1 件)

- ① Kobayashi, K., and Masuda, T. (2011) Tetrapyrrole biosynthesis in plant systems. *The Handbook of Porphyrin Science*,

[その他]

ホームページ等

http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/masuda_lab/Masuda_Laboratory/Welcome.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 建 (MASUDA TATSURU)

東京大学・大学院総合文化研究科・准教授
研究者番号: 00242305

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: