

謝辞

本研究はNEDO産業技術研究助成(H20)等にご支援いただいたほか、萌芽期にご支援いただいた日本触媒株式会社に感謝申し上げます。また、本研究の根幹となるアイデアの生みの親である岡山大学名誉教授 山田秀徳先生に心より厚く御礼申し上げます。

- 1) Fauchere, J.L. & Pliska, V. (1983) *Eur. J. Med. Chem.-Chim. Ther.*, 18, 369–375.
- 2) Ryser, H.J. & Hancock, R. (1965) *Science*, 150, 501–503.
- 3) Futami, J., Kitazoe, M., Murata, H., & Yamada, H. (2007) *Exp. Opin. Drug Dis.*, 2, 261–269.
- 4) Futami, J., Maeda, T., Kitazoe, M., Nukui, E., Tada, H., Seno, M., Kosaka, M., & Yamada, H. (2001) *Biochemistry*, 40, 7518–7524.
- 5) Futami, J., Nukui, E., Maeda, T., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., & Yamada, H. (2002) *J. Biochem.*, 132, 223–228.
- 6) Futami, M., Watanabe, Y., Asama, T., Murata, H., Tada, H., Kosaka, M., Yamada, H., & Futami, J. (2012) *Bioconjug. Chem.*, 23, 2025–2031.
- 7) Futami, J., Kitazoe, M., Maeda, T., Nukui, E., Sakaguchi, M., Kosaka, J., Miyazaki, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., Sasaki, J., Huh, N.H., Namba, M., & Yamada, H. (2005) *J. Biosci. Bioeng.*, 99, 95–103.
- 8) Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Takaishi, M., Sakaguchi, Y., Makino, E., Kataoka, N., Yamada, H., Namba, M., & Huh, N.H. (2003) *J. Cell Biol.*, 163, 825–835.
- 9) Kitazoe, M., Murata, H., Futami, J., Maeda, T., Sakaguchi, M., Miyazaki, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., Huh, N.H., Namba, M., Nishikawa, M., Maeda, Y., & Yamada, H. (2005) *J. Biochem.*, 137, 693–701.
- 10) Murata, H., Futami, J., Kitazoe, M., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., & Yamada, H. (2008) *J. Biosci. Bioeng.*, 105, 34–38.
- 11) Murata, H., Futami, J., Kitazoe, M., Yonehara, T., Nakanishi, H., Kosaka, M., Tada, H., Sakaguchi, M., Yagi, Y., Seno, M., Huh, N.H., & Yamada, H. (2008) *J. Biochem.*, 144, 447–455.
- 12) Yamada, H., Seno, M., Kobayashi, A., Moriyama, T., Kosaka, M., Ito, Y., & Imoto, T. (1994) *J. Biochem.*, 116, 852–857.
- 13) Futami, J., Tsushima, Y., Tada, H., Seno, M., & Yamada, H. (2000) *J. Biochem.*, 127, 435–441.
- 14) Murata, H., Sakaguchi, M., Futami, J., Kitazoe, M., Maeda, T., Doura, H., Kosaka, M., Tada, H., Seno, M., Huh, N.H., & Yamada, H. (2006) *Biochemistry*, 45, 6124–6132.
- 15) Futami, J. & Yamada, H. (2008) *Curr. Pharm. Biotechnol.*, 9, 180–184.
- 16) Ikeuchi, N., Futami, J., Hosoi, A., Noji, S., Kurachi, M., Ueha, S., Fujii, S., Yamada, H., Matsushima, K., Moriyasu, F., & Kakimi, K. (2010) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 392, 217–222.

二見 淳一郎

(岡山大学大学院自然科学研究科(工学)
化学生命工学専攻)

Protein cationization techniques for artificial control of physical property of protein and their medical applications
Junichiro Futami (Division of Chemistry and Biochemistry, Graduate School of Natural Science and Technology, Okayama University, 3-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama 700-8530, Japan)

一酸化窒素(NO)結合性(S-ニトロシル化)タンパク質の網羅的同定

1. はじめに

NOはアルギニンからNO合成酵素(NOS)の作用により产生されるラジカル分子である。生体内において記憶形成や血圧コントロールなど多岐にわたる生理機能を担っている。NOの作用メカニズムはこれまで種々提唱されてきているが、とくに有力なものとしてNOが酵素や転写因子などのタンパク質に、直接あるいは間接的に酸化修飾を導入することが近年示され注目を浴びている。NO刺激に伴うタンパク質修飾には、1) チロシン残基へのニトロ化、2) ヘム鉄へのニトロシル化、3) システイン残基チオール部位へのニトロシル(SNO)化が知られている¹⁾が、ごく最近、活性化グアニル酸シクラーゼから产生されるcGMPのニトロ化体(8-ニトロ-cGMP)を介したタンパク質システイン残基への修飾(S-グアニル化)が惹起されることも明らかにされている²⁾。

タンパク質に対する修飾はNO適量产生下では多くの場合可逆的であり、このことはNOがシグナル分子として作用していることを示唆している。事実、タンパク質に導入されたSNO基は自発(非酵素)的あるいは酵素(GSNOレダクターゼ、III型アルコール脱水素酵素)によって還元されたり³⁾、タンパク質分子間で転移(トランスニトロシル化)されることも知られている⁴⁾。

SNO化タンパク質を同定することは、NOが関与する酸化/還元による生体内シグナル調節分子機構を明らかにすることはもちろんであるが、同時にそれらが関与する生理的/病態生理的機構を提示することにもつながる。

SNO化タンパク質を効率よく検出するビオチンスイッ

チ法の開発以来⁵⁾、生体内SNO化の理解が進んでいる^{6~8)}。この方法を用い、時間飛行型質量分析計（TOF-MASS）を利用したSNO化タンパク質の網羅的な同定が試みられているが^{9~11)}、現段階においては必ずしもすべてのSNO化タンパク質を同定するには至っていない。この理由として、SNO化タンパク質の安定性やそれぞれの実験系における当該タンパク質発現量の違い、あるいはMASSの感度などが考えられる。一方で検出感度を高めるために高濃度NOで細胞を処理する結果生じるアーティファクトな修飾を排除できず、生体内反応を必ずしも反映していないケースもある。このように、一つのスクリーニング系を用い、NOの基質を同定する手法には限界があるようである。

筆者らはこれらの問題を解決する一つの方法として、抗体アレイを利用した新規スクリーニングシステム系を構築し、バイアスの少ないSNO化タンパク質の網羅的同定を行った。その結果、AktシグナリングにおけるNOの新たな制御機構を見いだしたので、ここに紹介する¹²⁾。

2. 抗体アレイによるSNO化タンパク質の同定

ビオチンスイッチ法はアスコルビン酸で処理することにより-SNO基を-SH基に還元し、この部位を特異的にビオチン化する原理に基づいたSNO化タンパク質同定法である（図1）⁵⁾。一方、抗体アレイは発現量に差のあるタンパク質を検出するスクリーニング法である。実験手法は種々

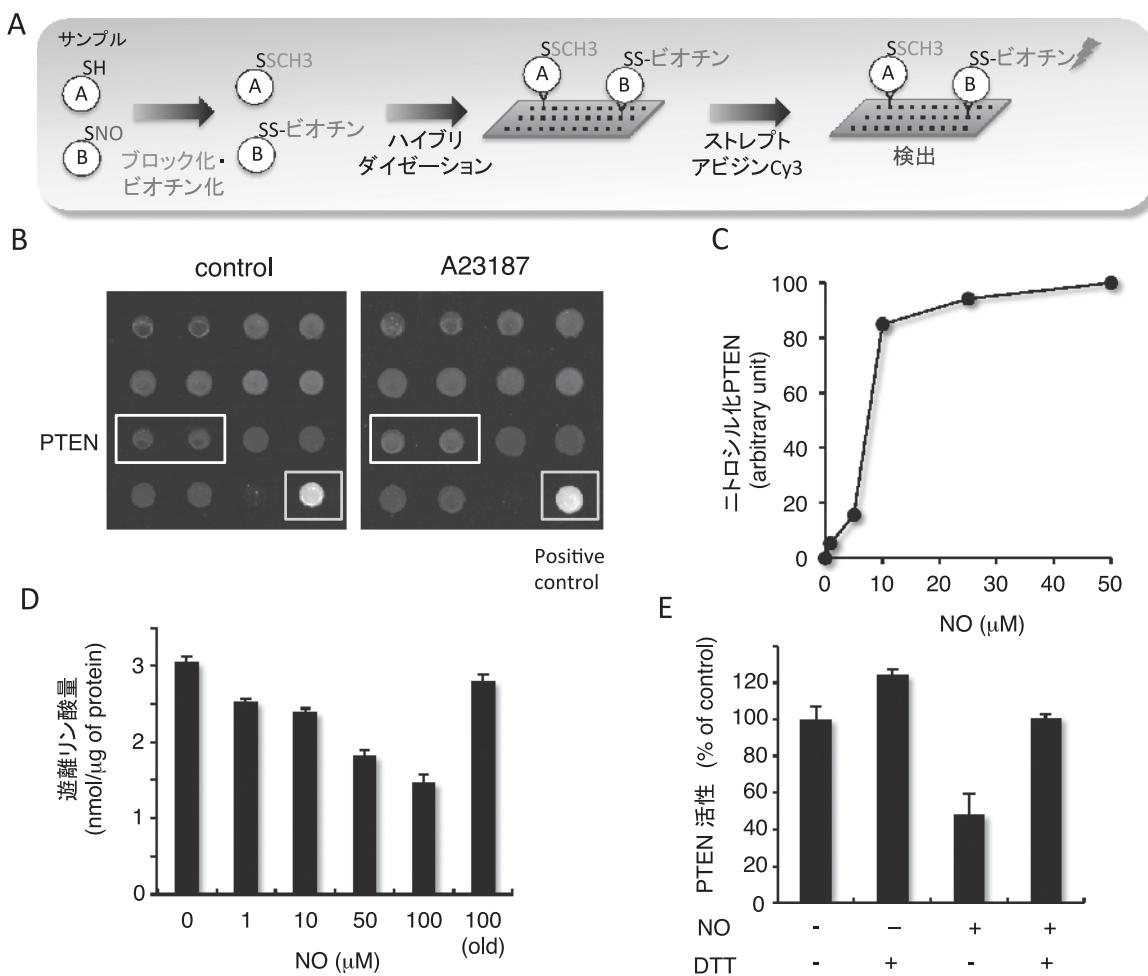


図1 PTENのSNO化

(A) ビオチンスイッチによるSNO基のビオチン修飾方法と抗体アレイへの適用。タンパク質中のSNO基を還元した後、ビオチン化試薬でラベルした。そのサンプルを抗体アレイに供し、蛍光標識したストレプトアビジンで処理後、プレートをスキャンして各スポットの蛍光強度を測定した。(B) スキャンした結果の一部。(C) NO刺激に伴うPTENのSNO化。(D, E) SNO化によるPTEN活性阻害作用。PTEN活性はNOの濃度依存的に抑制されるが、これはDTTによって解除される。

提示されているが、その一つにサンプルタンパク質中のフリーサステイン (Cys) 残基をビオチンでラベルし、アレイに供する手法がある。そこで、ビオチンスイッチ法によってサンプル中の-SNO 基を特異的にビオチン化すれば、理論上 SNO 化されたタンパク質のみが抗体アレイ上で特異的に検出されると考えた。しかもバイアスを可能な限りなくし、生体内 NO によって特異的に SNO 化されるタンパク質だけを同定するために、細胞をカルシウムイオノフォア A23187 で処理して細胞内カルシウム濃度を上昇させてカルシウム依存性 NOS を活性化し、細胞内で NO を産生させた。この細胞抽出液をサンプルとした（図 1）。

実際にこのサンプルを抗体アレイに供したところ、多くの既知 SNO 化タンパク質とともに未報告の基質も同定された（表 1）。その一つに脱リン酸化酵素である phosphatase with sequence homology to tensin (PTEN) が含まれていたが、この時点では PTEN の SNO 化による影響について詳細な解析は行われていなかったことから、この分子に着目し

表 1 ビオチンスイッチと抗体アレイをハイブリッドさせた網羅的 SNO 化タンパク質同定法の結果

| | 蛍光強度 | |
|-----------------------|------------|-----------|
| | A: control | B: A23187 |
| アクチン | 3976 | 4521 |
| アクチニン | 2679 | 2938 |
| アネキシン VII | 1441 | 1632 |
| カスパーゼ-3 | 2250 | 2634 |
| カスパーゼ-6 | 1683 | 1964 |
| カスパーゼ-7 | 1094 | 1248 |
| カスパーゼ-8 | 580 | 750 |
| カスパーゼ-9 | 332 | 438 |
| カスパーゼ-10 | 607 | 773 |
| カスパーゼ-11 | 601 | 827 |
| コフィリン 1 | 3219 | 3391 |
| eNOS | 1225 | 1433 |
| ERK1/2 | 571 | 920 |
| フィラミン | 614 | 773 |
| HDAC2 | 730 | 1039 |
| JNK | 496 | 762 |
| ミオシン | 1198 | 1377 |
| ペルオキシレドキシン | 992 | 1183 |
| PKC β | 621 | 958 |
| protein phosphatase1A | 1380 | 1573 |
| protein phosphatase2A | 1040 | 1225 |
| PTEN | 535 | 1275 |
| チュブリン α | 2193 | 2462 |
| UCH-L1 | 2377 | 2656 |
| 14-3-3 | 782 | 1011 |

てさらなる解析を試みた。

3. PTEN の SNO 化と下流シグナルへの影響

本スクリーニングは低濃度の NO によって特異的に SNO 化されるタンパク質を探索することにあった。したがって、単離されてきた PTEN が本当に低濃度 NO に対して感受性を示すかが重要である。予想通り、PTEN はわずか数～数十 μM の NO によって SNO 化されることが明らかとなり、既知タンパク質の中でも NO に対する感受性が著しく高いことがわかった（図 1）。この SNO 化は脱リン酸化酵素活性部位に存在する Cys124 ではなく、Cys83 でのみ起こっていることが変異体を用いた解析から明らかとなった。これまでに PTEN は酸化ストレスの標的分子としても知られており、高濃度（数百 μM ～mM）の過酸化水素で酸化され、分子内ジスルフィド結合を形成することで酵素活性が消失することが報告されている¹³⁾。この反応の結果生じるジスルフィド結合は活性中心の Cys124 と立体構造上近接に位置している Cys71 の間で形成され、その構造変化によって基質との結合が阻害される。これまでに NO と過酸化水素の標的 Cys は同一である（異なる報告はほとんどなかった）とされてきたことから、NO の場合も分子内でジスルフィド結合が形成される可能性が予想されていた。しかしながら、高濃度の NO でもジスルフィド結合形成はまったく認められないこと、さらには、過酸化水素刺激で反応する Cys とは異なる部位の Cys が修飾されたことが明らかとなった。このことから、“酸化ストレス”を生じる NO と過酸化水素では、同一の標的タンパク質に対して異なる作用（酸化）様式があることが示された。

次に PTEN における SNO 化の意義を明らかにするために、酵素活性への影響を検討した。大腸菌から精製したヒト PTEN タンパク質を NO で処理したところ、NO の濃度依存的にホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸 (PIP₃) から遊離されるリン酸量が抑制されることがわかった（図 1）。この活性の阻害は還元剤ジチオスレイトール (DTT) の処理で回復したことから SNO 化修飾は可逆的であることもわかった。以上より、Cys83 の SNO 化を介したアロステリックな PTEN 活性制御機構が存在することが示唆された。

4. PTEN の SNO 化の Akt 系への影響

SNO 化は PTEN の酵素活性を阻害したことから、下流への負調節が解除されて Akt シグナル系が亢進することが予想された。そこで、NO 処理による Akt の活性を調

べたところ、低濃度 ($10 \mu\text{M}$) の NO によって確かにリン酸化体 Akt が検出された(図2)。つぎに Akt 活性に対する NO の濃度依存性を検討したところ、興味深いことに低濃度側では濃度依存的な Akt の活性化が認められたのに対して、高濃度 NO では逆にリン酸化 Akt レベルは下がり、最終的に basal 以下にまで抑制されることがわかった。これまでに Akt は高濃度の NO によって SNO 化されて、酵素活性が抑制されることが報告されていた¹⁴⁾が、筆者らも本系において同様の事実を確認した。以上より、Akt シグナル系において低濃度 NO は PTEN のみに特異的に作用し

て脱リン酸化酵素活性を阻害することで Akt 活性をオンにする一方、高濃度 NO は PTEN のみならず Akt にも作用することでリン酸化酵素活性が阻害され、結果として Akt シグナルをオフにすることが明らかとなった(図2)。

次に、実際に NO の濃度変化に応じた PTEN 活性の調節機構が生理的／病態生理的現象に反映されるのかどうか、種々の細胞やモデル動物を用いて検討した。

まず内皮型 NOS (eNOS) に対する影響を調べた。eNOS は Akt によってリン酸化されて活性化することが既に報告されていることから^{15, 16)}、低濃度 NO によって Akt を介し

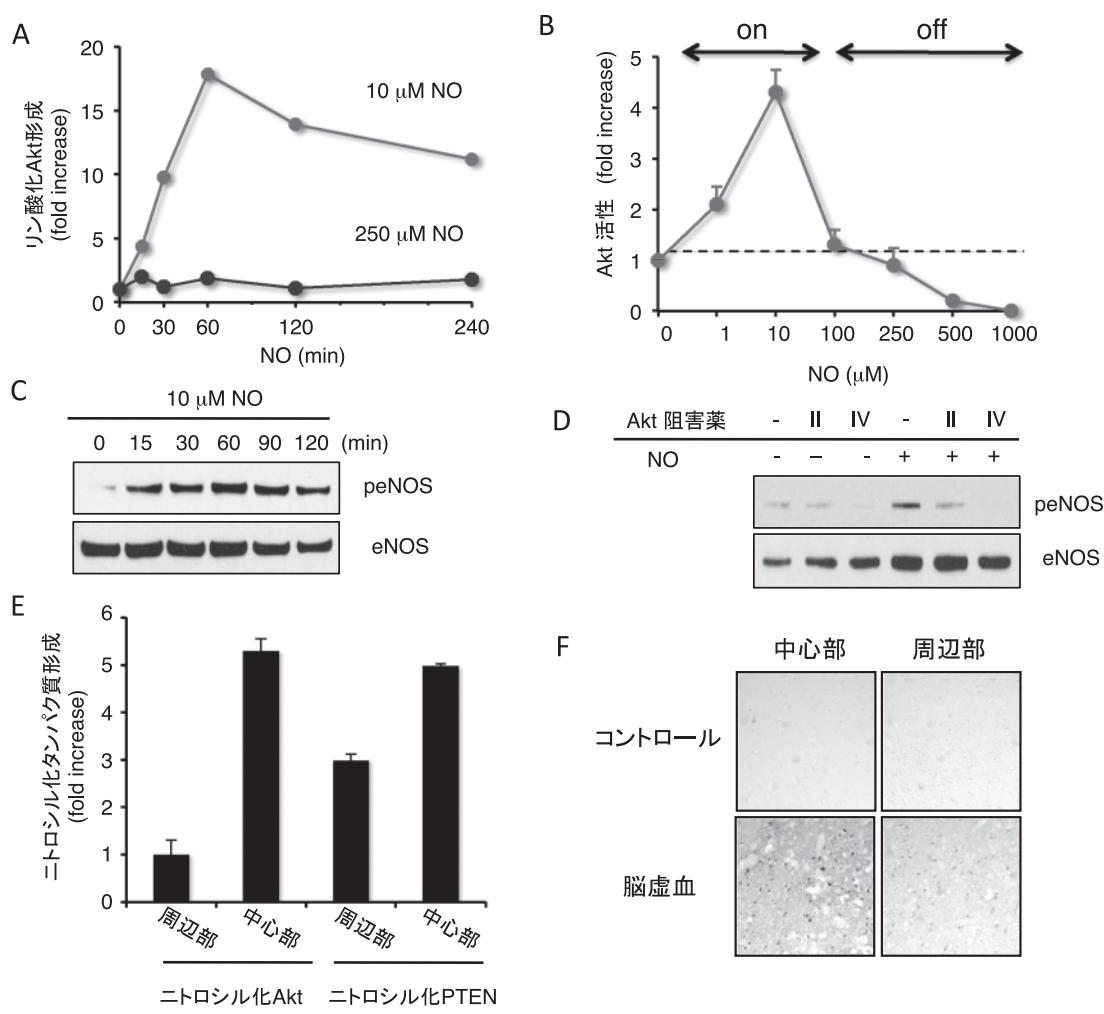


図2 PTEN の SNO 化によるシグナリングへの影響

(A, B) NO 刺激に伴うリン酸化 Akt 形成および基質リン酸化。低濃度 NO では Akt 活性の亢進が認められるが、高濃度では逆に活性は basal (点線) 以下にまで抑制される。(C, D) NO による eNOS のリン酸化。低濃度 NO で内皮細胞を刺激すると時間依存的な eNOS のリン酸化が認められるが、これは Akt 阻害薬処理によって抑制された。(E) 梗塞脳 (中心・周辺部) における PTEN および Akt の SNO 化。中大脳動脈閉塞によるマウス脳梗塞モデルにおける各領域でのニトロシル化をビオチンスイッチ法から検討した。(F) 梗塞脳における TUNEL 陽性細胞数。

たeNOSの正の調節機構が観察されると考えた。そこで、ヒト内皮細胞由来F2細胞を低濃度NOで刺激したところ、時間依存的なリン酸化eNOSが認められ、これはAkt特異的阻害薬であるAkt阻害薬IIやIVによって抑制された(図2)。さらには、NOS活性をシトルリン形成から求めたところ、10 μM NOによって活性は約3倍上昇し、これもAkt阻害薬IV処理でbasalまで抑制された。このことから、生体内において低濃度NOはPTEN活性の抑制を介してAkt経路を活性化し、これによってeNOSをリン酸化することによって持続的な生理的NO産生の維持に関わっていることが示唆された。

次に、脳梗塞による神経細胞死に対する本経路の病態生理的役割について解析した。脳梗塞によって神経細胞死が観察されるが、これは神經終末から過剰に放出されるグルタミン酸の刺激に伴うnNOS活性化を介したNOによることが報告されている^{17,18)}。このとき、脳梗塞巣中心部においては急速な、その周辺部位(ペナンブラ)では遅延性の神経細胞死が認められる。しかしながら、なぜ細胞死惹起に時間的な差異が生じるのかについては諸説あり、明確な答えは提示されてこなかった。筆者らはここで示したNO濃度の違いがこのような現象に関わっているのではないかと推定した。これまでに、梗塞巣中心では大量のNOが產生されている事実は知られてきているが、タンパク質のSNO化については明らかにされてこなかった。そこで、中大脳動脈閉塞マウス脳の梗塞巣中心部と周辺(ペナンブラ)部を分画し、SNO化された全タンパク質量を測定したところ、中心部と比較して周辺部では有意に低かった。さらに、PTENならびにAktのSNO化に着目して検討したところ、中心部では両者で、周辺部ではPTENのみにSNO化修飾が検出された(図2)。このとき、神経細胞におけるTUNEL染色を行ったところ、中心部では多くの神経細胞が陽性だったのに対して、周辺部ではその数は優位に少なかった。これらの事実から、梗塞巣周辺部では中心部から比較的距離があるためにNO濃度が低く、そのためにはNOに対して感受性の高いPTENのみがSNO化されていて、その結果、Akt系生存シグナルが亢進してアポトーシスを抑制するように作用していることが示唆された。

5. おわりに

これまで酸化ストレスは毒性を発揮する現象として捉えられてきたが、むしろ最近の研究から、生理的な非常に低濃度のNOを含めた活性酸素種(ROS)が様々なシグナル伝達系の制御や、直接・間接的なタンパク質修飾を介した

機能調節に関与していることが証明されつつある。本稿で紹介したPTENに関しても、ROS濃度によって絶妙に活性が制御されていることがわかった。とくに、低濃度NOはAktシグナルを正に、高濃度NOならびに過酸化水素は負に調節すること、これはシグナル系に存在するPTENとAktのROSに対する感受性の違いで説明し得る可能性が示された。したがって、これまでに知られていない生理・病態生理現象にもこのようなROS濃度の違いによる制御機構が深く関わっていることも十分予想され、今後、詳細な研究を進めることが必要と思われる。

謝辞

本研究は岡山大学大学院医歯薬学総合研究科と北海道大学大学院薬学研究院にて行われたものです。また、共同研究をしていただきました岐阜薬科大学の原英彰教授、田中彦孝氏ならびに米国Sanford-Burnham医学研究所のStuart A. Lipton教授、中村智尋博士、また、種々のPTEN発現ベクターを供与下さいました広島大学大学院医歯薬学総合研究科の鎌田英明先生に深謝致します。なお、本研究は文部科学省科研費新学術領域研究「活性酸素シグナル」、および基盤研究(B)の支援を受けて行われました。

- 1) Lipton, S.A., Choi, Y.-B., Pan, Z.-H., Lei, S.Z., Chen, H.-S. V., Sucher, N.J., Loscalzo, J., Singel, D.J., & Stamler, J.S. (1993) *Nature*, 364, 626–632.
- 2) Sawa, T., Zaki, M.H., Okamoto, T., Akuta, T., Tokutomi, Y., Kim-Mitsuyama, S., Ihara, H., Kobayashi, A., Yamamoto, M., Fujii, S., Arimoto, H., & Akaike, T. (2007) *Nat. Chem. Biol.*, 3, 727–735.
- 3) Liu, L., Hausladen, A., Zeng, M., Que, L., Heitman, J., & Stamler, J.S. (2001) *Nature*, 410, 490–494.
- 4) Nakamura, T., Wang, L., Wong, C.C., Scott, F.L., Eckelman, B.P., Han, X., Tzitzilonis, C., Meng, F., Gu, Z., Holland, E.A., Clemente, A.T., Okamoto, S., Salvesen, G.S., Riek, R., Yates, J.R. 3rd, & Lipton, S.A. (2010) *Mol. Cell*, 39, 184–195.
- 5) Jaffrey, S.R., Erdjument-Bromage, H., Ferris, C.D., Tempst, P., & Snyder, S.H. (2001) *Nat. Cell Biol.*, 3, 193–197.
- 6) Uehara, T., Nakamura, T., Yao, D., Shi, Z.Q., Gu, Z., Ma, Y., Masliah, E., Nomura, Y., & Lipton, S.A. (2006) *Nature*, 441, 513–517.
- 7) Whalen, E.J., Foster, M.W., Matsumoto, A., Ozawa, K., Violin, J.D., Que, L.G., Nelson, C.D., Benhar, M., Keys, J.R., Rockman, H.A., Koch, W.J., Daaka, Y., Lefkowitz, R.J., & Stamler, J.S. (2007) *Cell*, 129, 511–522.
- 8) Nishida, M., Ogushi, M., Suda, R., Toyotaka, M., Saiki, S., Kitajima, N., Nakaya, M., Kim, K.M., Ide, T., Sato, Y., Inoue, K., & Kurose, H. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 6662–6667.
- 9) Derakhshan, B., Wille, P.C., & Gross, S.S. (2007) *Nat. Pro-*

- toc.*, 2, 1685–1691.
- 10) Camerini, S., Polci, M.L., Restuccia, U., Usuelli, V., Malgaroli, A., & Bachi, A. (2007) *J. Proteome Res.*, 6, 3224–3231.
 - 11) Forrester, M.T., Thompson, J.W., Foster, M.W., Nogueira, L., Moseley, M.A., & Stamler, J.S. (2009) *Nat. Biotechnol.*, 27, 557–559.
 - 12) Numajiri, N., Takasawa, K., Nishiyama, T., Tanaka, H., Ohno, K., Hayakawa, W., Asada, M., Matsuda, H., Azumi, K., Kamata, H., Nakamura, T., Hara, H., Minami, M., Lipton, S.A., & Uehara, T. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108, 10349–10354.
 - 13) Lee, S.R., Yang, K.S., Kwon, J., Lee, C., Jeong, W., & Rhee, S.G. (2002) *J. Biol. Chem.*, 277, 20336–20342.
 - 14) Yasukawa, T., Tokunaga, E., Ota, H., Sugita, H., Martyn, J.A., & Kaneki, M. (2005) *J. Biol. Chem.*, 280, 7511–7518.
 - 15) Fulton, D., Gratton, J.P., McCabe, T.J., Fontana, J., Fujio, Y., Walsh, K., Franke, T.F., Papapetropoulos, A., & Sessa, W.C. (1999) *Nature*, 399, 597–601.
 - 16) Dimmeler, S., Fleming, I., Fisslthaler, B., Hermann, C., Busse, R., & Zeiher, A.M. (1999) *Nature*, 399, 601–605.
 - 17) Dawson, V.L., Dawson, T.M., London, E.D., Bredt, D.S., & Snyder, S.H. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 6368–6371.
 - 18) Lipton, S.A. & Rosenberg, P.A. (1994) *N. Engl. J. Med.*, 330, 613–622.

上原 孝

(岡山大学大学院医歯薬学総合研究科薬効解析学分野)

A novel screening system for S-nitrosylated proteins
Takashi Uehara (Department of Medicinal Pharmacology,
Graduate School of Medicine, Dentistry and Pharmaceutical
Sciences, Okayama University, 1-1-1, Tsushima-naka, Kitaku,
Okayama 700-8530, Japan)

ペルオキシソーム膜タンパク質の小胞体を 介した輸送

1. はじめに

ペルオキシソームは一重膜からなるオルガネラであり、極長鎖脂肪酸のβ酸化、エーテルリン脂質の代謝、胆汁酸の合成、過酸化物の除去など多彩な代謝機能を有している。ペルオキシソームの形成、分裂、継承に関与するタンパク質群はペルオキシンと呼ばれ、それらの遺伝子(*Pex*遺伝子)の変異は、Zellweger症候群を代表とする致死的疾患を引き起こす¹⁾。ペルオキシソームはDNAを持たないので、すべてのタンパク質は核DNAの情報に従って合成され、その後ペルオキシソームへと輸送される。これま

での研究から、ペルオキシソームの内腔に存在するマトリックスタンパク質と膜タンパク質は異なる装置によって局在化することが明らかとなっている²⁾。可溶性のマトリックスタンパク質は遊離リボソームで合成され、そのペルオキシソーム移行シグナルに受容体が結合し、膜透過装置との連携によってペルオキシソーム内腔へと輸送される。一方、ペルオキシソーム膜タンパク質(PMP)の局在化には、膜タンパク質であるPex3とPex16、可溶性タンパク質であるPex19が関与する。比較的最近まで、PMPもマトリックスタンパク質と同様に遊離リボソームによって合成され、その後シャベロン様タンパク質の助けを借りて、直接ペルオキシソーム膜に挿入されると考えられてきたが、最近の研究によって、少なくとも一部のPMPは合成後に一旦小胞体膜に組み込まれ、その後ペルオキシソームへと移行することが認められるようになってきた^{3~5)}。このことは、ペルオキシソームはミトコンドリアのように完全に独立したオルガネラではなく、分裂によって増加するが、同時に小胞体から新たに合成(de novo合成)されるオルガネラであることを意味する。

本稿では最初に、PMPが小胞体を経由してペルオキシソームへ輸送されることを直接的に示した研究を紹介する。次に、筆者らがごく最近見いだした、動物細胞において小胞体からペルオキシソームへのPMP輸送に関与する因子(Sec16B)について述べる。

2. ライブセルイメージングによるPMPの挙動解析

以前より、PMPが小胞体を経由してペルオキシソームに局在化することの証拠として、PMPが糖鎖修飾を受けること、またペルオキシソームが形成されていない酵母や動物細胞の変異株に野生型タンパク質を発現することにより、新たにペルオキシソームが形成されることなどが挙げられていた⁵⁾。2000年代後半から行われたライブセルイメージングによる解析は、PMPが小胞体を経由してペルオキシソームに局在することの直接的な証拠を提示した^{6~8)}。

Pex3は酵母と動物の両方においてペルオキシソーム構築に必須であることが示されている膜タンパク質である。2005年、Tabakのグループは酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を用いて、YFPタグを付加したPex3の挙動を生細胞で蛍光顕微鏡により解析した⁶⁾。その結果、GAL1プロモーターにより発現誘導されたPex3-YFPは最初小胞体に局在し、その後ペルオキシソームに移行することが示された。Pex3-YFPのペルオキシソームへの移行はPex19の欠損に