

- toc.*, 2, 1685-1691.
- 10) Camerini, S., Polci, M.L., Restuccia, U., Uselli, 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., & Stampler, 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, Kita-
ku, 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ひき起こす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、その後シャペ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、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

よって損なわれることから、小胞体からペルオキシソームへの輸送過程にはこのタンパク質が関わることを示唆された。Tabak らはその後の解析で、同様の方法を用いて、16種類のペルオキシソーム膜タンパク質が小胞体を経由してペルオキシソームに局在すること、そしてこの機構は膜タンパク質のトポロジーによらないことを示した⁷⁾。動物細胞においても、2006年 Lippincott-Schwartz のグループが同様の方法でペルオキシソーム膜タンパク質 Pex16 の局在追跡を行った⁸⁾。彼女らは photo-activatable GFP (PAGFP, 光活性化緑色蛍光タンパク質) を付加した Pex16 を COS-7 細胞に発現させ、小胞体の一部をレーザー照射することにより、小胞体に局在する Pex16-PAGFP タンパク質の蛍光を活性化し、その移動を観察した。その結果、小胞体に局在した Pex16-PAGFP がペルオキシソームへと移行することが示された。

3. 酵母を用いた輸送小胞の単離

小胞体は細胞内物質輸送において分泌輸送経路のスタート地点であり、小胞体からの分泌系タンパク質の搬出は輸送小胞である COPII 小胞が担っている⁹⁾。PMP と分泌系タンパク質はその行き先が異なっているので、PMP が小胞によりペルオキシソームへと輸送されるとすると、その輸送小胞は COPII 小胞とは異なることが予想される。このことは、Schekman のグループと Subramani のグループによって作られた *in vitro* 再構成系によって証明された^{10,11)}。Schekman らは *S. cerevisiae* を用い、小胞体を含む膜画分をドナー膜として小胞形成反応を行い、積み荷である PMP (Pex3 と Pex15) を指標として輸送小胞を含むと考えられる膜画分を分離・解析した。一方、Subramani らは *Pichia pastoris* を用い、Pex3 と Pex11 を輸送されるタンパク質の指標として解析を行った。両者の結論はほとんど同じであり、この輸送小胞の形成には ATP, Pex19, 細胞質画分、生理的な温度が必要である。そして、COPII 小胞の形成に関与する Sar1 (GTPase) の変異体の添加によっては阻害を受けないことから、COPII 小胞とは異なる輸送小胞であると考えられる。両グループの結果は、小胞体からペルオキシソームへのタンパク質輸送を担うキャリアーの実体を初めて示したという点で大変意義深いものであり、今後、この系を利用して小胞の成分や輸送装置の解明が進むことが期待される。

4. Sec16B は小胞体からペルオキシソームへのタンパク質輸送に関与する

筆者らは小胞体からの分泌経路輸送を解析する過程で、偶然 Sec16B が小胞体からペルオキシソームへのタンパク質輸送に関わる因子であることを見いだした¹²⁾。Sec16 は 240 kDa の膜表在性タンパク質であり、酵母における分泌変異株の解析から見いだされた。その後の解析より、Sec16 は COPII コートタンパク質と相互作用し、コートの尚早な乖離を防ぐことにより小胞形成を促進することが判明している⁹⁾。動物の Sec16 タンパク質は三つのグループが独立してその存在を報告した。筆者らは、COPII コートタンパク質の構成因子の一つである Sec23 の結合タンパク質として約 250 kDa のタンパク質を同定し¹³⁾、その後このタンパク質が動物 Sec16 オルソログ (Sec16A) であることを報告した¹⁴⁾。一部の酵母や動物などの後生動物では、COPII コートの会合は小胞体出芽部位 (ER exit site) あるいは transitional ER と名づけられた小胞体サブドメインで起こる。Sec16A の発現抑制は小胞体出芽部位の構築を乱し、小胞体からの分泌輸送を阻害した。他の二つのグループ (Stephens のグループと Glick のグループ) はほぼ同時期にホモロジー検索によって Sec16A を見いだした^{15,16)}。このとき Glick らは、動物に存在するもう一つの Sec16 オルソログ, Sec16B, の存在を報告した (図 1)。ヒト Sec16B は 117 kDa (1061 アミノ酸) のタンパク質であり、Sec16A (2357 アミノ酸) と比べて酵母 Sec16 との相同性も低く、Sec16A が酵母 Sec16 の主要なオルソログであると予想された。Glick らは、Sec16B が Sec16A と同様に小胞体出芽部位に局在し、小胞体からの分泌輸送に関与することを報告した¹⁶⁾。

筆者らは、Sec16A と Sec16B の機能を比較することを目的に、HeLa 細胞において両者を発現抑制してその影響を調べた。その結果、Sec16B の発現抑制が小胞体出芽部位の分散と同時にペルオキシソームの伸長を引き起こすことを見いだした。Sec16A の発現抑制においてはペルオキシソームの伸長はほとんど見られず、このことから Sec16B が特異的にペルオキシソーム形成に関わる可能性が考えられた。上述のとおり、PMP である Pex3 と Pex16 は小胞体を経由して輸送される可能性が示されていた。そこで、両者の局在に対する Sec16B の関与を調べた。HeLa 細胞に遺伝子導入により発現させた Sec16B は、その発現量が低い場合は小胞体出芽部位に局在したが、発現量が非常に高くなると小胞体全体に局在した。Sec16B 過剰発現細胞で

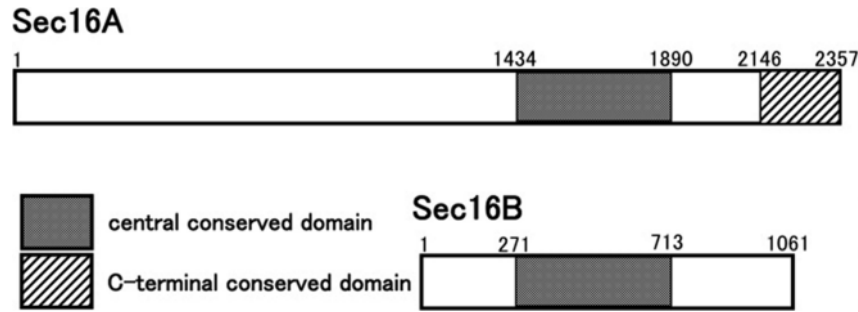


図1 ヒト Sec16A と Sec16B の構造比較

Sec16A の central conserved domain と C-terminal conserved domain は酵母 Sec16 と高い相同性を示す。Sec16B は C-terminal conserved domain を持たない。

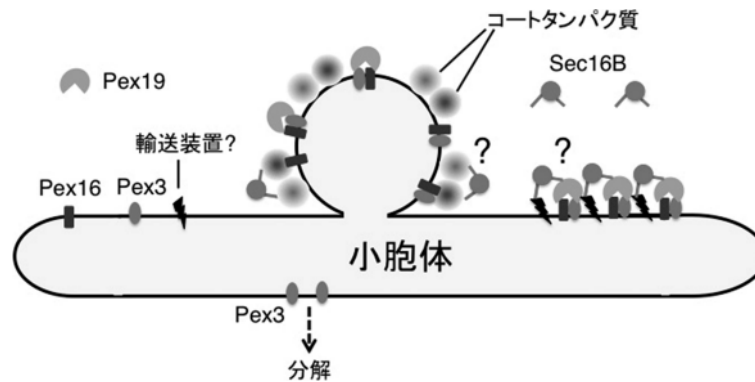


図2 小胞体からの PMP 輸送における Sec16B の役割に関する仮説

Sec16B は(1)輸送小胞のコートタンパク質と相互作用して小胞形成を助ける可能性、あるいは(2)足場タンパク質として機能して PMP と輸送装置が会合する小胞体ドメインの形成に働く可能性が考えられる。

は、通常ペルオキシソームに局在する Pex3 と Pex16 が小胞体に局在するようになり、同時にペルオキシソームの数が減少した。また Sec16B を発現抑制すると、Pex16 は小胞体に蓄積し、また Pex3 はユビキチン-プロテアソーム系による分解を受けることがわかった。これらの現象は Sec16A の発現抑制においてはほとんど見られなかった。さらに筆者らは、Kim ら⁸⁾が用いた Pex16-PAGFP を用いて、Pex16 の小胞体からペルオキシソームへの移動を調べた。その結果、Sec16B の発現抑制により、Pex16-PAGFP の小胞体からペルオキシソームへの移行が著しく阻害された。

Sec16A と Sec16B は、その中央部分に CCD (central conserved domain) を有しているが、それ以外の領域には有意な構造類似性は認められない (図1)。ペルオキシソーム形成に関わるドメインを探索するために、内在性 Sec16B を発現抑制した細胞に Sec16B の変異体を発現させた。その結果、N 末端側を欠失した Sec16B 変異体 (272~1061

アミノ酸) は小胞体出芽部位に局在できないが、ペルオキシソームへの影響を回復できること、逆に C 末端側を欠失した Sec16B 変異体 (1~713 アミノ酸) は小胞体出芽部位に局在するが、ペルオキシソームへの影響を回復できないことがわかった。この結果は、小胞体出芽部位以外の領域に存在する Sec16B がペルオキシソーム形成に関与していることを示唆する。ペルオキシソーム形成に重要と予想される Sec16B の C 末端側の領域 (348 アミノ酸) は Sec16A には存在せず、セリンとグリシンが多い特徴的なアミノ酸組成を持つ。以上の結果は Sec16B が小胞体からペルオキシソームへの Pex16 および Pex3 の輸送に関わる因子であること、そして動物における二つの Sec16 パラログが小胞体上で異なる輸送経路に働く可能性を示唆する。

Sec16B はどのようにして PMP の輸送を調節するのだろうか。現時点では二つの可能性が考えられる (図2)。酵母 Sec16 と Sec16A が COPII コート構成因子と相互作用することから類推すると、Sec16B はペルオキシソームに向

かう輸送小胞のコートタンパク質と相互作用し、小胞の形成を助けているのかもしれない。また別の可能性としては、Sec16Bが小胞体膜上で足場タンパク質として機能し、Pex3やPex16のような輸送されるタンパク質とPex19やその他の輸送装置（例えば膜分裂因子）の会合を調節していることが考えられる。小胞体膜上でPex19がペルオキシソーム膜タンパク質の会合のためのシャペロンとして機能するという説がMaらにより提示されており⁵⁾、Sec16Bはこの働きを助けるのかもしれない。

ペルオキシソームへの輸送が小胞体膜のどこで起こるのか、ゴルジ体に向かう分泌輸送との区別がどのように行われているのかという問題は大きな疑問である。酵母やマウス樹状細胞において、Pex3を含むペルオキシソーム膜タンパク質が小胞体の一部のドメインに局在することが報告されている⁵⁾。Sec16Bの欠失変異体を用いた筆者らの解析でも、ペルオキシソーム形成に関与する領域は小胞体出芽部位とは異なることが予想される。しかしながら、その領域がどこであるのか、また小胞体の他のサブドメインとどのように関わるのかは興味深い今後の課題である。さらに、ペルオキシソーム形成因子としてのSec16Bの役割が進化を通じてどのように獲得されてきたのかも疑問として残る。ペルオキシソーム合成に関わる因子は進化上あまり保存されていない。例えば、*S. cerevisiae*においてPex16は存在せず、Pex3に関しても、種によってその膜配向性は異なっている。Sec16を一つしか持たない生物においては、Sec16はペルオキシソーム形成に必要なものかもしれない。またあるいは、一つのSec16が分泌輸送とペルオキシソームへの輸送の二つの機能を持つ可能性も考えられる。

5. おわりに

最近の報告は、これまで実体が見えなかった小胞体からペルオキシソームへのタンパク質輸送の存在を明確なものとし、その機構解明に向けて新たな道筋を示した。ペルオキシソームが分裂による増加と同時に、小胞体から*de novo*合成されることは明らかであると考えられるが、これら二つの機構が同一の細胞内で並行して働くのか、あるいは細胞の種類や状況によりどちらかの機構が働くのかといった点も今後明らかにしていく必要があるだろう。小胞体はこれまで、分泌経路のスタート地点として専らゴルジ体への輸送を担うと考えられてきたが、ペルオキシソームという非分泌経路のオルガネラへの輸送も担うことが明らかとなり、これまで想定されていた以上に興味深い、多機

能なオルガネラであるといえる。

- 1) Lazarow, P.B. & Fujiki, Y. (1985) *Annu. Rev. Cell Biol.*, **1**, 489–530.
- 2) Fujiki, Y., Okumoto, K., Kinoshita, N., & Ghaedi, K. (2006) *Biochim. Biophys. Acta*, **1763**, 1374–1381.
- 3) Nagotu, S., Veenhuis, M., & van der Klei, I.J. (2010) *Traffic*, **11**, 175–184.
- 4) Rucktäschel, R., Girzalsky, W., & Erdmann, R. (2011) *Biochim. Biophys. Acta*, **1808**, 892–900.
- 5) Ma, C., Agrawal, G., & Subramani, S. (2011) *J. Cell Biol.*, **193**, 7–16.
- 6) Hoepfner, D., Schildknecht, D., Braakman, I., Philippsen, P., & Tabak, H.F. (2005) *Cell*, **122**, 85–95.
- 7) van der Zand, A., Braakman, I., & Tabak, H.F. (2011) *Mol. Biol. Cell*, **21**, 2057–2065.
- 8) Kim, P.K., Mullen, R.T., Schumann, U., & Lippincott-Schwartz, J. (2006) *J. Cell Biol.*, **173**, 521–532.
- 9) Zanetti, G., Pahuja, K.B., Studer, S., Shim, S., & Schekman, R. (2011) *Nat. Cell Biol.*, **14**, 20–28.
- 10) Lam, S.K., Yoda, N., & Schekman, R. (2010) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 21523–21528.
- 11) Agrawal, G., Joshi, S., & Subramani, S. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 9113–9118.
- 12) Yonekawa, S., Furuno, A., Baba, T., Fujiki, Y., Ogasawara, Y., Yamamoto, A., Tagaya, M., & Tani, K. (2011) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 12746–12751.
- 13) Tani, K., Mizoguchi, T., Iwamatsu, A., Hatsuzawa, K., & Tagaya, M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 20505–20512.
- 14) Iinuma, T., Shiga, A., Nakamoto, K., O'Brien, M.B., Aridor, M., Arimitsu, N., Tagaya, M., & Tani, K. (2007) *J. Biol. Chem.*, **282**, 17632–17639.
- 15) Watson, P., Townley, A.K., Koka, P., Palmer, K.J., & Stephens, D.J. (2006) *Traffic*, **7**, 1678–1687.
- 16) Bhattacharyya, D. & Glick, B.S. (2007) *Mol. Biol. Cell*, **18**, 839–849.

谷 佳津子, 米川 周佑

(東京薬科大学生命科学部細胞情報医科学研究室)

Transport of peroxisomal membrane proteins via the endoplasmic reticulum

Katsuko Tani and Shusuke Yonekawa (School of Life Sciences, Tokyo University of Pharmacy and Life Sciences, 1432-1 Horinouchi, Hachioji, Tokyo 192-0392, Japan)