的遺伝子である前立腺特異抗原がマーカーとして用いられていることから、前立腺がんにおける AR 機能の重要性がわかる。欧米人で罹患率の高い前立腺がんは、食習慣の欧米化により近年日本でも増加傾向にある。また、高齢者における発症率が高いため、高齢化の進む日本を含む先進国で深刻な問題となっている。AR の転写活性化能は AR と複合体を形成するコアクチベーターによって増強されるので、前立腺がんで特異的に発現の亢進するコアクチベーターは前立腺がん治療の分子標的として注目されており、コアクチベーターの同定とその作用機構の解明は重要な課題となっている。

GAPDH が AR の転写活性を調節するコアクチベーターであるという仮説を検証した結果、細胞内の GAPDH 発現レベルが 1.8 倍に増加するだけで AR の転写活性は約 2 倍に上昇した⁽⁵⁾。悪性度の高い前立腺がん細胞ではこのレベル以上に GAPDH が増加しており、前立腺がん細胞の GAPDH を siRNA でノックダウンすると AR の転写活性が抑制されたので、GAPDH が AR の転写活性を促進する機能は、前立腺がんのような病態生理条件で特に発揮されるようである。GAPDH-AR 複合体は細胞質と核内の両方に存在したが、細胞質において GAPDH-AR 複合体が形成されることが AR の転写活性促進に必須であった。解糖系酵素活性を欠損した GAPDH でも AR 転写活性を促進したことから、前立腺がん細胞で低酸素によって増加する脱水素酵素活性のない GAPDH の AR 機能への関与が示唆される。さらに、GAPDH は AR の転写活性を介して自己の mRNA を増幅させるポジティブフィードバック機構をもち、前立腺がんの悪性度と GAPDH 増加との関係の一端が明らかとなった。

前立腺がん細胞の GAPDH を siRNA で約 20% まで

ノックダウンしても生存に影響がなかったことから、細胞内 GAPDH レベルはエネルギー産生においてかなり余裕があり、多くの GAPDH が解糖系酵素以外の機能を発揮している可能性が高い。今回筆者らは前立腺がん細胞における AR との複合体形成を介した GAPDH の Moonlighting 機能（機能スイッチング分子機構^{③⑥}に相当）を同定したが、前立腺がん発症機構においてまだ他の機能が存在するかもしれない。

ヒトゲノムプロジェクトの結果を受け、多機能タンパク質の存在が強く認識されており、特に細胞に多量に発現するタンパク質、分子量の大きなタンパク質、多局在性をもつタンパク質は、異なった細胞環境や細胞空間でさまざまな複合体を形成し、Moonlighting な機能を発揮することが予想される。創薬の観点からも、ターゲットタンパク質の多機能性が明らかになれば、副作用の予測や、既存の製薬を別の疾患に利用することも不可能ではないだろう。わずかなアミノ酸変異によって獲得された Moonlighting 機能から進化的な位置づけも可能かもしれない。

生体はどのようにして Moonlighting タンパク質を獲得し、どのような利益を得ているのだろうか？ Moonlighting タンパク質という概念がさまざまな研究の発展につながることを期待する。

- 1) C. J. Jeffery : *Trends Biochem. Sci.*, **24**, 8 (1999).
- 2) M. A. Sirover : *Biochim. Biophys. Acta*, **1432**, 159 (1999).
- 3) R. Yamaji, E. Chatani, N. Harada, K. Sugimoto, H. Inui & Y. Nakano : *Biochim. Biophys. Acta*, **1726**, 261 (2005).
- 4) R. Yamaji *et al.* : *Biochim. Biophys. Acta*, **1593**, 269 (2003).
- 5) N. Harada, R. Yasunaga, Y. Higashimura, R. Yamaji, K. Fujimoto, J. Moss, H. Inui & Y. Nakano : *J. Biol. Chem.*, **282**, 22651 (2007).

(原田直樹, 山地亮一, 乾 博, 大阪府立大学大学院生命環境科学研究科)

質量分析法によるバクテリアの分子系統分類法の開発 ターゲットはリボソームサブユニットタンパク質のアミノ酸配列の変異

バクテリアの機能あるいは病原性などの諸性質は、バクテリアの“種”よりもさらに詳細な分類である“株”レベルの違いにより大きく異なる場合がある。そのため、バクテリアを株レベルで分類するために、DNA ジャイレースサブユニット B 遺伝子 (*gyrB*) など、比較的進化速度が速い遺伝子の DNA 塩基配列の変異に着目した

“分子系統分類”がよく利用されている。しかし、これら特定の遺伝子のみに注目した分類結果に対して、その有効性の限界が指摘され始めており⁽¹⁾、より多くの分類指標の分析結果を総合的に判断することの重要性が再認識されてきている⁽²⁾。

これに対して、マトリックス支援レーザー脱離イオン

化質量分析法 (MALDI-MS) により観測される様々なタンパク質や脂質などのマスペクトルを用いて、バクテリアを迅速簡便に分類する手法が注目されている^(3,4)。MALDI-MS は、pmol オーダー以下の極微量の様々な生体高分子のマスペクトルを高感度に観測することができる手法である⁽⁵⁾。これまでに、バクテリアの細胞構成成分の MALDI マスペクトルのパターンを指紋判定して、種の同定や株の識別を行なう方法が提案されてきた。しかし、この方法は、培養条件や測定条件などの影響を強く受けるため、分類結果の信頼性に欠け、異なる研究グループ間あるいは過去のデータとの間で解析結果を比較することが困難であるなどの問題点が指摘されている。

最近、バクテリアのゲノム解読が急速に進んだことを背景に、MALDI-MS により観測されるタンパク質の観測質量を、Swiss-Prot など公共タンパク質データベースに登録されているタンパク質の翻訳アミノ酸配列から算出した計算質量と照合することによりバクテリアを同定する手法が提案された⁽⁶⁾。筆者らは、この解析対象として、あらゆる生物細胞に多量に存在するリボソームタ

ンパク質群に注目したバクテリアの分類法の開発を行ってきた^(4,7)。図1に、リボソームの構成と、ゲノム解読されたバクテリアのリボソームタンパク質のマスペクトルの例を示す。バクテリアのリボソームは、3種類のrRNAと50種類以上のリボソームサブユニットタンパク質から構成される。この数多くのサブユニットタンパク質を、マスペクトル上でそれぞれ一本ずつのピークとして観測することができる。図1のマスペクトルで、翻訳アミノ酸配列から予測されたリボソームサブユニットタンパク質の計算質量と一致する位置に観測されたピークに、各サブユニットタンパク質の番号(L1~L36およびS1~S21)を付けて帰属結果を示した。多くのサブユニットタンパク質は翻訳後修飾を受けないために、翻訳アミノ酸配列から推測される計算質量に基づいて、ほぼすべての主要ピークを帰属することができる。しかも、リボソームタンパク質は、菌体内で最も多く存在するタンパク質である上、質量分析におけるイオン化効率が高いという特徴をもつ。そのため、簡易な菌体破碎と遠心分離で得られる菌体破碎液を試料としても、MALDI-MSにより迅速簡便にリボソームタンパク質の質量分析を行なうことができる。

筆者らは、いくつかのバクテリアについて MALDI-MS によるリボソームタンパク質のキャラクタリゼーションを通じて、リボソームタンパク質のアミノ酸配列には、菌株の違いによりある程度の割合でわずかな変異が生じており、それを MALDI マスペクトル上では明

図1 ■ バクテリアのリボソームの構成とゲノム解読株 *Pseudomonas putida* KT2440 のリボソームタンパク質の MALDI マスペクトル (寺本ら (2007)⁽⁷⁾ を一部改変)

図2 ■ *P. putida* の MALDI マスペクトルの比較⁽⁹⁾
(A) KT2440 (基準株), (B) NBRC 1414^T (biover A), および (C) ATCC 17522 (biover B). KT2440 株のリボソームサブユニットタンパク質と同じ質量のピークにアスタリスク (*) を付した。

図3 ■ *gyrB* の塩基配列 (872 bp) に基づく *P. putida* の分子系統樹 (A) と MALDI-MS で観測されたリボソームタンパク質を指標として作成した樹形図 (B) の比較⁽⁹⁾

確なピークシフトとして検出できることを実証した⁽⁷⁾。リボソームタンパク質は典型的なハウスキーピングタンパク質であり、そのアミノ酸配列の変異は分子進化を反映していると考えられている。このため、筆者らはこのタンパク質のアミノ酸配列の変異（すなわちピークシフト）に注目すれば、分子系統分類が可能になると考えた。そこで、本手法を *gyrB* の塩基配列を利用して初めて株レベルでの分子系統分類⁽⁸⁾ が行なわれた *Pseudomonas putida* の分類に適用した⁽⁹⁾。図2に、*gyrB* の塩基配列に基づく分子系統分類によりそれぞれ異なるグループに分類された *P. putida* 3 菌株について、MALDI マススペクトルを示す。分類の基準となるゲノム解読株 (KT2440, 図2-A) において、各ピークをリボソームタン

パク質として帰属した。次に、図2-B, C において、上記ピークと同じ質量に観測されたものにアスタリスク (*) を付した。このアスタリスクを付したピークの数が少ない菌株ほど、アミノ酸配列が変異したリボソームサブユニットタンパク質が多いことを示している。このようなアミノ酸配列の変異の有無をピークシフトに基づいて判定して表にまとめ、クラスター解析により樹形図を作成した。その結果、図3に示すように、リボソームタンパク質の変異に注目した MALDI-MS による分類結果は、*gyrB* の塩基配列に基づいて作成した分子系統樹による分類結果と非常によく一致し、遺伝子解析を行わずに、MALDI-MS で *P. putida* の株レベルでの分子系統分類が達成できることを示した。この他にも、本手法を低温増殖性乳酸菌 *Lactobacillus sakei*⁽¹⁰⁾ や抗菌活性を有する放線菌 *Rhodococcus erythropolis*⁽¹¹⁾ の分子系統分類に応用し、有用バクテリアのスクリーニングにも有効であることを確認した。

以上のように、MALDI-MS で観測されるリボソームタンパク質のアミノ酸配列の変異に基づく質量変化に注目すれば、遺伝子解析を行わずして非常に類縁性が高いバクテリアの分子系統分類が可能である。リボソームサブユニットタンパク質の質量は各バクテリアに固有であり、MALDI マススペクトルは言わばバーコードのようなものである。つまり、バクテリアのリボソームタンパク質の MALDI マススペクトル（あるいは、各ピークの質量リスト）をライブラリ化すれば、遺伝子塩基配列と同様にユニバーサルな情報になり得る。数十種類ものハウスキーピング遺伝子情報を反映したタンパク質群を解析対象とする本手法は、バクテリアの新しい評価手法に発展するものと期待される。

- 1) 木村 凡：モダンメディア, **52**, 209 (2006).
- 2) 河村好章：感染症学会誌, **75**, 1003 (2001).
- 3) 石田康行：J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., **51**, 108 (2003).
- 4) 寺本華奈江ら：J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., **56**, 83 (2008).
- 5) J. H. Gross：“マスペクトロメトリー”，日本質量分析学会出版委員会（平山賢三，中村健道，内藤康秀，佐藤浩昭）訳，シュプリンガー・ジャパン（株），2007, p. 451.
- 6) P. A. Demirev et al. : Anal. Chem., **71**, 2732 (1999).
- 7) 寺本華奈江ら：J. Mass Spectrom. Soc. Jpn., **55**, 209 (2007).
- 8) S. Yamamoto et al. : Int. J. Syst. Bacteriol., **48**, 813 (1998).
- 9) K. Teramoto et al. : Anal. Chem., **79**, 8712 (2007).
- 10) 寺本華奈江ら：分析化学, **56**, 1063 (2007).
- 11) 寺本華奈江ら：第27回日本微生物系統分類研究会年次大会講演要旨集, p. 52 (2007).

(寺本華奈江^{*1}, 佐藤浩昭^{*2}, ^{*1}日本電子株式会社, ^{*2}独立行政法人産業技術総合研究所)