ノ ー ト

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による乳酸菌の迅速識別

孫 麗 偉¹, 佐藤 浩昭^{®1}, 鳥村 政基¹, 田尾 博明¹, 新谷 智吉²

Rapid discrimination of lactic acid bacteria by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry

Liwei SUN¹, Hiroaki SATO¹, Masaki TORIMURA¹, Hiroaki TAO¹, Tomoyoshi SHINTANI²

¹ Institute for Environmental Management Technology, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), 16-1, Onogawa, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8569

² Industrial Research Center of Ehime Prefecture, 487-2, Kumekubota, Matsuyama-shi, Ehime 791-1101

(Received 21 January 2004, Accepted 18 March 2004)

Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) was applied to the rapid discrimination of four lactic acid bacteria (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *hordniae*, and two strains of *Lc. lactis* subsp. *lactis*). Specific biomarker peaks generated from intact bacteria cell were observed on the mass spectra over the range m/z 4000~12000. High reproducibility for the relative peak intensities between three culture plates under the same experimental conditions was confirmed by analysis of variance (ANOVA). The growth temperature strongly affected the peak distribution of the biomarkers, whereas the difference in the culture media (MRS and LB media) gave similar mass spectra. Under the optimized conditions, four lactic acid bacteria with different genus, species, or strains could be discriminated.

Keywords : MALDI-MS; lactic acid bacteria; rapid discrimination.

1 緒 言

乳酸菌は、糖を分解（発酵）して多量の乳酸を産生する微生物の総称であり、食品工業、醸造業、医薬品工業、農業、畜産業など幅広い分野において有用微生物として利用されている¹⁾。乳酸菌は分類学的に系統分類された微生物の一群ではなく、生物学的に様々な性状や形態を有する12属200種以上の微生物が該当する。乳酸菌を利用する分野では、優れた特性をもつ菌株を選抜して利用することが多いため、乳酸菌を属や種のみならず菌株レベルで迅速かつ正確に同定あるいは識別するための手法の開発が求められている。

最近、乳酸菌の同定では16SリボゾームRNA (rRNA) 又はその遺伝子 (16S rDNA) の塩基配列に基づいた相同性解析がしばしば用いられている¹⁾²⁾。しかしながら、この方法は煩雑な前処理や数日程度の解析時間が必要である上、菌株レベルでの識別は容易ではない。一方、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) を用い、菌体を構成するタンパク質や脂質などの「バイオマーカー」を測定して観測されるマススペクトルのパターンから微生物を識別あるいは同定する方法が、最近注目されている³⁾⁴⁾。菌体そのものをMALDI-MSの測定試料とする「intact cell MALDI-MS法」あるいは「on-probe MALDI-MS法」と呼ばれる簡便な測定法⁵⁾⁶⁾を用いれば、前処理を含め、わずか数分程度で菌体のマススペクトルを得ることができる。タンパク質をバイオマーカーとした場合、遺伝子情報の微妙な差異によるタンパク質の分子量や発現量の違いが、しばしばマススペクトルの違いとして明

¹ 独立行政法人産業技術総合研究所環境管理研究部門: 305-8569 茨城県つくば市小野川16-1

² 愛媛県工業技術センター: 791-1101 愛媛県松山市久米窪田町487-2

確に観測されるため、微生物を属や種レベルのみならず菌株レベルで識別あるいは同定した例が報告されている⁷⁾⁸⁾。乳酸菌については、発酵乳の製造に用いられる2種類の乳酸菌 (*Lactobacillus delbrueckii* subspecies *bulgaricus* 及び *Streptococcus thermophilus*) 各3菌株を、MALDI-MSにより菌株レベルで識別した例が報告されている⁹⁾。このように、本法は、従来行われてきた生化学的あるいは遺伝子学的な解析手法と比べて非常に簡便かつ迅速に菌株レベルでの識別あるいは同定を行うことができる手法になり得るものとして期待されている。しかしながら、微生物のMALDIマスペクトルの再現性は、培養条件や測定条件の影響を大きく受けることも知られている^{10)~14)}。そこで本研究では、乳酸菌の培養条件の違いが菌体のMALDIマスペクトルに与える影響を主として検討し、規格化した実験条件下でMALDI-MSによる乳酸菌4菌株の識別を試みた。

2 実 験

2・1 乳酸菌の培養

2・1・1 使用菌株 乳酸菌試料は、*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* JCM-1158 株及び JCM-5805 株、*Lactococcus lactis* subsp. *hordniae* JCM-1180 株 (以上、理化学研究所より入手)、及び *Lactobacillus acidophilus* L-54 株 (日本乳業技術協会より入手) の計4菌株を用いた。以下、*Lactococcus* 属及び *Lactobacillus* 属をそれぞれ *Lc.* 及び *Lb.* と略記する。

2・1・2 培地及び培養方法 乳酸菌の培養は、乳酸菌の培養に適した de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 培地及び比較のため微生物一般の培養に用いられる Luria-Bertani (LB) 培地を用いて、37℃ で、24時間、寒天プレート培養により行った。各培地成分の組成及び入手先を Table 1 に示す。ただし、培養条件の検討を行うために、上記に加えて、25、30 及び 42℃ の各温度でも培養を行った。

2・2 MALDI-MS 測定

2・2・1 試料調製 MALDI-MS による微生物の解析において用いられるバイオマーカーには、タンパク質、脂質、糖質、DNA あるいは RNA などがあり、それぞれ MALDI-MS 測定に適した試料スポットの調製方法が異なる。グラム陰性菌の解析には細胞表面のリン脂質を指標にした方法が有効であることが報告されている¹⁵⁾。しかし、乳酸菌はすべてグラム陽性菌であるので、ここでは菌体内での発現量が多いタンパク質を主たるバイオマーカーとして想定した試料調製法及び測定条件を検討した。

マトリックス剤には、低分子量タンパク質の分析に適した α -シアノヒドロキシ桂皮酸 (CHCA, シグマ製) を用い、その 15 mg を 0.1% トリフルオロ酢酸 (TFA, 和光純薬製) を含む 50% アセトニトリル溶液 1 ml に溶解してマトリックス溶液を調製した。次に、寒天培地上の乳酸菌コ

Table 1 Culture media

LB medium	
Bacto tryptone ^{a)}	10 g
Bacto yeast extract ^{a)}	5 g
NaCl ^{b)}	10 g
Agar ^{b)}	20 g
Distilled water (pH 7.2)	1000 ml
MRS medium	
Casein hydrolysate ^{c)}	10 g
Bacto meat extract ^{a)}	10 g
Bacto yeast extract ^{a)}	5 g
Glucose ^{b)}	20 g
Tween 80 ^{d)}	1 g
K ₂ HPO ₄ ^{b)}	2 g
Sodium acetate ^{b)}	5 g
Ammonium citrate ^{b)}	2 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O ^{b)}	200 mg
MnSO ₄ ·nH ₂ O ^{b)}	50 mg
Agar ^{b)}	20 g
Distilled water (pH 6.0~6.5)	1000 ml

a) from Becton, Dickinson and Company; b) from Wako Pure Chemical; c) from Sigma-Aldrich Chemical; d) from ICN Biochemicals

ロニー (1 白金耳量) を容積 0.5 ml のプラスチックチューブに取り、そこへマトリックス溶液 10 μ l を加え、十分振とうして、試料/マトリックス混合溶液を得た。

測定試料スポットは、タンパク質のマスペクトルを高感度かつ高い再現性で観測することができる薄膜法¹⁶⁾によって調製した。すなわち、まず CHCA のアセトン溶液 (50 mg ml⁻¹) を調製し、その 1 μ l をステンレス鋼製の試料プレートに滴下して、マトリックス剤の薄膜を形成してから、その上に上記の試料/マトリックス混合溶液を 1 μ l 滴下して風乾した。更に乾燥した試料スポット表面に 0.1% TFA を含む蒸留水を 5 μ l 滴下し、直ちに除去する操作を3回繰り返すことによって、試料スポットのオンプレート脱塩処理を行った。なお、薄膜法で調製した試料スポットを MALDI-MS 測定すると、1 価の [M+H]⁺ イオンだけではなく、2 価以上の多価イオンも比較的高強度で観測されやすいことが経験的に知られている。

2・2・2 測定条件 MALDI-MS 測定は、N₂ レーザー (波長 337 nm, 周波数 3 Hz, パルス幅 3 ns) を備えた飛行時間型質量分析計 (Voyager-DE PRO, Applied Biosystems 製) を用いて行った。ここでは、イオン化のしきい値よりもやや強い強度でレーザー光を試料表面に 200~1000 回パルス照射し、生じたイオンを 20 kV の電圧で加速した後、リニアモード (飛行長 1.4 m) を用いて MALDI マスペクトルを観測した。マスペクトルの質量数校正は、ミオグロビンの [M+H]⁺ (m/z 16952), [M+2H]²⁺ (m/z 8477), [M+3H]³⁺ (m/z 5652), 及び [M+4H]⁴⁺ (m/z 4239) の各ピークを用いて内標準法により行った。

Fig. 1 MALDI mass spectrum of *Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM-1158 strain cultured by MRS medium at 37°C, 24 h

IS corresponds to internal calibration standard peaks.

3 結果及び考察

3.1 培養法によるマスペクトルへの影響

3.1.1 培養プレート間の MALDI マスペクトルの再現性 MALDI マスペクトルの再現性を確認するために, JCM-1158 株を被検菌体とし, 3 枚の MRS 寒天培地プレート上で, 37°C で 24 時間培養した後, 各培地プレート上の任意の 3 か所から採取されたコロニーをそれぞれ 3 回ずつ MALDI-MS 測定した (計 27 回測定). Fig. 1 に, JCM-1158 株について観測された m/z 4000~12000 の範囲の MALDI マスペクトルを示す. また, Table 2 に, ピーク強度が上位 20 本のピークの m/z 値及び相対ピーク強度を示す. ここで, 相対ピーク強度は, 各ピーク面積を全 20 ピークの合計面積で規格化した値について, 計 27 回繰り返し測定を行った結果の平均値であり, 誤差範囲はその標準偏差である. 表に示した 20 ピークのうち, ①, ③, ⑤~⑧ は, ⑮~⑳ のピーク成分の 2 価イオン $[M+2H]^{2+}$ であると考えられるので, 実際には 14 種のバイオマーカー成分が選択されていることになる. なお, m/z 4000 以下の領域では, 培地由来のピークが多く観測され, 一方, m/z 12000 以上の領域では, 内標準ピーク以外のピークはほとんど観測されなかった. 選択した 20 本のピーク強度の変動係数は 25% 以内であり, MALDI-MS によりバイオマーカー成分のピークが十分良好な再現性で観測されていることが分かった. 更に, 一元配置分散分析 (ANOVA) 法により, 異なるコロニー間及び培養プレート間の再現性を評価したところ, すべてのピークについてコロニー間及び培養プレート間での有意差 ($p < 0.05$) は認められな

Table 2 Normalized peak intensity and standard deviation of major 20 peaks observed for *Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM-1158 strain by MALDI-MS

Peak	Observed m/z values	Normalized intensity, % ^{a)}	Comment
①	4111	3.9 ± 0.6	⑮ ^{++b)}
②	4422	13.1 ± 1.1	
③	4542	1.9 ± 0.4	⑯ ⁺⁺
④	4567	1.9 ± 0.2	
⑤	4669	1.4 ± 0.2	⑰ ⁺⁺
⑥	4773	10.9 ± 1.5	⑱ ⁺⁺
⑦	5075	2.3 ± 0.5	⑲ ⁺⁺
⑧	5438	2.1 ± 0.5	⑳ ⁺⁺
⑨	6062	10.8 ± 1.5	
⑩	6119	1.0 ± 0.2	
⑪	7001	5.0 ± 1.2	
⑫	7041	8.0 ± 1.0	
⑬	7748	1.6 ± 0.4	
⑭	7858	7.1 ± 0.9	
⑮	8220	5.1 ± 0.7	
⑯	9084	1.7 ± 0.3	
⑰	9335	1.4 ± 0.3	
⑱	9543	13.3 ± 0.9	
⑲	10148	1.8 ± 0.4	
⑳	10877	1.6 ± 0.3	

a) Each peak intensity was normalized by the sum of 20 peak intensities; b) Doubly charged ion

った. 現在, 各ピークの帰属を行っており, 菌体中で最も発現量が多いタンパク質であるリボソームタンパク質のサブユニット成分が主として観測されていることが示唆されている.

3.1.2 培養温度の影響 培養温度は, 乳酸菌の増殖

Fig. 2 Changes in relative peak intensities of *Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM-1158 strain cultured by MRS medium at different temperature

Fig. 3 MALDI mass spectrum of *Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM-1158 cultured by LB medium
IS corresponds to internal calibration peaks.

度のみならず、タンパク質の発現量にも大きく影響する。そこで、25、30、37及び42℃で、24時間MRS寒天培地で培養し、培養温度の違いによる乳酸菌の増殖度を調べたところ、37℃以下で培養した場合には良好な増殖が観察されたが、42℃で培養した場合では、培養プレート上のコロニーの数及び大きさが他と比べて著しく減少した。次に、各温度で培養して得られたコロニーをMALDI-MS測定し、マススペクトルのピークパターンの変化を調べた。Fig. 2に、前項で選択した20ピークの相対ピーク面積を比較した結果を示す。選択した20本のピークの相対強度は、培養温度の違いによってかなり変化している。例えば、

⑥及び⑱の相対ピーク強度は、培養温度の上昇とともに増加している。これらは熱ストレスによって多量に発現するタンパク質に由来するものではないかと考えられる。このように、乳酸菌を識別するためのマススペクトルを得るためには、培養温度を固定することが重要であることが確認された。乳酸菌の推奨培養温度は、30あるいは37℃であるものが多いので、以降の実験では微生物の培養で一般に用いられる37℃で培養を行った。

3・1・3 異なる培地の比較 菌体中のタンパク質の発現量は、培地成分の違いによってある程度影響を受けることが予想される。そこで、乳酸菌の培養に適したMRS培

Fig. 4 MALDI mass spectra of various lactic acid bacteria cultured by MRS medium
(a) *Lb. acidophilus* L-54, (b) *Lc. lactis* subsp. *hordniae* JCM-1180, (c) *Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM-1158, (d) *Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM-5805; IS corresponds to internal calibration standard peaks.

地と、微生物の培養に一般に用いられる LB 培地を用いて JCM-1158 株を培養し、観測される MALDI マススペクトルを比較した。Fig. 3 に、LB 培地で培養された JCM-1158 株のマススペクトルを示す。観測されたマススペクトルは、MRS 培地で培養した場合 (Fig. 1) とほぼ同様であるが、詳細に検討すると、LB 培地により培養した場合では ⑬ 及びその 2 価イオンである ⑥ のピーク強度が比較的強く観測されており、更に m/z 5440 及び 6800 付近にマで示した新しいピークが観測されている。以上のように、MRS 培地と LB 培地を用いて培養した場合では、マススペクト

ルのパターンに大きな変化はないが、幾つかのピークでは若干の差異が観測されるため、培地を固定する必要があることが確認された。そこで本研究では、MRS 培地で 37℃、24 時間の培養を行うことを規格化した。

3・2 各種乳酸菌の MALDI-MS 測定

Fig. 4 に、*Lb. acidophilus* L-54 株 (a)、*Lc. lactis* subsp. *hordniae* JCM-1180 株 (b)、*Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM-1158 株 (c)、及び *Lc. lactis* subsp. *lactis* JCM-5805 株 (d) について観測された MALDI マススペクトルを示す。なお、

Fig. 4(c) のマスペクトルは, Fig. 1 と同じものである. まず, *Lactobacillus* 属である L-54 株と, *Lactococcus* 属である他の 3 菌株のマスペクトルを比較すると, m/z 4400~4800 付近, m/z 5880~6250 付近及び m/z 9390~9550 付近などで比較的高強度のピークが観測されているという大まかな傾向は類似しているが, いずれのピークについても観測される m/z 値は異なっている. すなわち, MALDI-MS により, 異属の関係にある乳酸菌を比較的容易に識別することが可能であることが分かった. 次に, 同属であるが亜種 (subsp.) が異なる JCM-1180 株 (b) と JCM-1158 株 (c) を比較すると, やはり同一の m/z 値をもつピークは認められなかった. これは, 亜種レベルでも, 同じ種類のタンパク質をコードする遺伝子情報に微妙な差異があることを反映している.

最後に, 亜種まで同一であるが, 菌株が異なる JCM-1158 株 (c) と JCM-5805 株 (d) のマスペクトルを比較すると, 観測される各ピークの m/z 値はほぼ同一であり, それらのピーク強度も比較的良好に一致している. しかしながら, 詳細に調べると, JCM-1158 株では m/z 4422 が主ピークであるのに対し, JCM-5805 株ではそのピーク強度はかなり微小であり, m/z 9543 及びその 2 価イオンである m/z 4773 のピーク強度が相対的に強く観測されている. 既に 3・1 で述べたように, 各マスペクトルは高い再現性があり, これらのピーク強度の差は十分に有意であった. また, m/z 7000 付近のピーク群を見ると, JCM-1158 株では m/z 7001 及び 7041 にピークが観測されているが, JCM-5805 株では m/z 7001 のピークはほとんど観測されず m/z 6993 及び 7093 に新たなピークが観測されている. これは, 菌株の違いによって, 遺伝子の発現レベルや塩基配列が微妙に異なるタンパク質が存在することを示している. 今後, 同種の菌株に共通して発現するタンパク質と, 菌株の違いにより質量数や発現量が異なるタンパク

質を区別してデータベース化すれば, 乳酸菌を菌株レベルで迅速かつ正確に識別あるいは同定することが可能になるであろう. こうしたバイオマーカータンパク質を特定するために, 現在, 国内外の菌株保存機関より入手した 6 属 12 種 40 株以上の各種乳酸菌の MALDI-MS 測定を進めている.

文 献

- 1) 乳酸菌研究集談会編: “乳酸菌の科学と技術”, (1996), (学会出版センター).
- 2) 森 勝美: 日本醸造協会誌, **92**, 188 (1997).
- 3) J. O. Lay Jr.: *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 172 (2001).
- 4) 石田康行: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 108 (2003).
- 5) M. A. Claydon, S. N. Davey, V. Edwards-Jones, D. B. Gordon: *Nature Biotechnology*, **14**, 1584 (1996).
- 6) R. D. Holland, J. G. Wilkes, F. Rafii, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees, J. O. Lay, Jr.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **10**, 1227 (1996).
- 7) R. J. Arnold, J. P. Reilly: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 630 (1998).
- 8) C. L. Nilsson: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 1067 (1999).
- 9) L. Fedele, R. Seraglia, B. Battistotti, C. Pinelli, P. Traldi: *J. Mass Spectrom.*, **34**, 1385 (1999).
- 10) Z. Wang, L. Russon, L. Li, D. C. Roser, S. R. Long: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **12**, 456 (1998).
- 11) M. A. Domin, K. J. Welham, D. S. Ashton: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 222 (1999).
- 12) A. J. Saenz, C. E. Petersen, N. B. Valentine, S. L. Gantt, K. H. Jarman, M. T. Kingsley, K. L. Wahl: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 1580 (1999).
- 13) R. J. Arnold, J. A. Karty, A. D. Ellington, J. P. Reilly: *Anal. Chem.*, **71**, 1990 (1999).
- 14) D. J. Evason, M. A. Claydon, D. B. Gordon: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **14**, 669 (2000).
- 15) Y. Ishida, A. J. Madonna, J. C. Rees, M. A. Meetani, K. J. Voorhees: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1877 (2002).
- 16) O. Vorm, P. Roepstorff, M. Mann: *Anal. Chem.*, **66**, 3281 (1994).