実験技術講座

質量分析法の最新技術 新しい応用 (3)

MALDI-TOF MSによる細菌の迅速識別

田村 廣人*

名城大学大学院農学研究科環境微生物学研究室

(2016年11月27日受理)

Rapid bacterial discrimination by MALDI-TOF MS

Hiroto TAMURA

*Laboratory of Environmental Microbiology, Graduate School of Agriculture, Meijo University,
1-501 Shiogamaguchi, Tenpaku-ku, Nagoya, Aichi 468-8502, Japan*

Keywords: MALDI-TOF MS, bacteria, identification, ribosomal protein, proteotyping, S10-GERMS.

はじめに

農薬は、農耕地で使用されている限りは、作物保護に必須の有用資材である。しかし、農耕地は、土圏、水圏および大気と通じている開放系であるため、農薬は、農耕地から流出した途端に環境負荷物質となる。さらに、農薬は、環境微生物による分解・無機化の過程で、多様な化合物に変化し、特に、これらの化合物が河川や地下水を経由して水循環系に入り込んだ場合、安全な飲料水の確保や河川・海洋の生態系の保護等の観点から懸念を与える可能性もある。著者らの研究により、無毒な農薬補助剤が環境微生物による代謝・分解を経て、環境毒性を示す化合物へと変化すること（代謝・毒性化）が判明し、環境微生物による化学物質の分解がむしろ環境への負荷増大に繋がっていることが明らかになった¹⁾。我国での農薬登録申請には、農薬取締法の規定に基づき、毒性に関する試験成績として、「土壤中動態に関する試験成績」（好氣的湛水土壤中動態試験，好氣的土壤中動態試験および嫌氣的土壤中動態試験）の実施が義務づけられてい

る。本試験は、農薬の主要な代謝経路および代謝により生成される物質（分解物）の種類ならびに収支等に関する科学的知見を得ることを目的としている。つまり、農薬の土壤中動態には、環境微生物が重要な役割を果たしており、農薬の環境動態の詳細な解明・解析には、分解菌の単離・同定が必要である。また、我国で確認されたキウイフルーツかいよう病のPsa3系統のように、国内での蔓延を防ぐために、病原型（pathovar）レベルでの簡便・迅速な識別法も発生調査やその防除措置等の観点から求められている。

単離した細菌の同定と系統学的位置の推定には、細菌のリボソームを構成する16S rRNA遺伝子の塩基配列データが広く使用されている。The Clinical and Laboratory Standards Instituteのガイドラインによれば、16S rRNA塩基配列による細菌同定は、属レベルでは97%以上、また、種レベルでは99%以上の相同性が求められている²⁾。しかし、16S rRNA遺伝子の塩基配列が100%一致しても、DNA-DNA相同性分析の結果が70%以下である例も報告されており、16S rRNA遺伝子の塩基配列だけを指標として細菌を同定することは、必ずしも適切ではないとの指摘もある³⁾。さらに、16S rRNA塩基配列による細菌同定法は、次のような課題を抱えている；1) DNAの抽出や増幅、その後のDNA塩基配列の解析という操作に時間と手間がかかり、迅速・簡便性

* 〒468-8502 愛知県名古屋市天白区塩釜口1-501
E-mail: hiroto@meijo-u.ac.jp
© 日本農薬学会

Fig. 1. Advantage of using ribosomal proteins in comparison with 16S rRNA.

にける、2) 進化速度が遅いため、近縁な菌種間での比較が困難であること、つまり、株レベルでの識別が難しい。近年、マトリックス支援レーザー脱離イオン飛行時間型質量分析計 (MALDI-TOF MS) を用いて観測したマススペクトルパターンを参照データベースと比較して細菌を同定する指紋判定法 (フィンガープリント法) が迅速・簡便かつ経済的な分析法として広く使用されるようになってきた⁴⁻⁶⁾。しかしながら、MALDI-TOF MSによるフィンガープリント法も、16S rRNA塩基配列による細菌同定法と同様に細菌の株レベルでの識別が難しい。

そこで、著者らは、細菌を株レベルで識別するために、細菌に共通に存在する *S10-spc-alpha* オペロンにコードされるリボソームサブユニットタンパク質 (以後リボソームタンパク質と略) をバイオマーカーとした MALDI-TOF MSによる細菌同定・識別法 (*S10*-GERMS法: *S10-spc-alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum) を確立した^{7,8)}。本稿では、*S10*-GERMS法の原理と事例を紹介する。また、本稿では、種レベルまでを同定、亜種、株および血清型・病原型のような分類学的により詳細なレベルを識別と表現した。MALDI-TOF MSの原理については、本誌の実験技術講座「質量分析法の最新技術」(前編)(41巻2号)に詳細

に紹介されているので、参照されたい。

1. MALDI-TOF MSによる細菌同定法

1.1. フィンガープリント法と課題

MALDI-TOF MSによる細菌同定法は、寒天培養したコロニーまたは液体培養で得られた菌体を直接マトリックス剤と混合するのみで無傷細菌 (Whole Cell: WC) 由来のスペクトルデータを取得・解析する迅速・簡便な分析法である。現在の主要なデータ解析法は、何らかの手法で同定されている細菌株のスペクトルパターンを参照データベースとして構築し、供試細菌株を測定して得られたスペクトルパターンを参照データベースと比較し、その類似度 (一致度) より供試細菌株を同定するパターン認識によるフィンガープリント法である。しかし、このフィンガープリント法を基にした微生物同定は、培地や培養条件および測定の実験条件により影響を受けやすい⁸⁻¹⁰⁾。そこで、培養条件が異なる場合でも、その再現性があるといわれている Bio typerTM および SARAMISTM のようなソフトウェアが開発され、特に、迅速・簡便な細菌同定法として医療分野で普及し数多くの報告がある¹¹⁻¹⁴⁾。しかし、フィンガープリント法で観測される各スペクトルの質量電荷比 (m/z) は、それらに対応する生体内物質に帰属されてい

Step 1 : Measurement of samples by MALDI-TOF MS (WC)**Step 2 : Design of primers to sequence the genes encoded in *S10-spc-alpha* operon**Point: Consensus DNA sequences encoded in *S10-spc-alpha* operon of genome read type strains.**Step3 : Calculation of the theoretical ionized mass (m/z) of respective ribosomal protein and construction of *in silico*-calculated m/z database**

S17	MAEAEKTVRT.....RAVEV
S19	MPRSLKKGPF.....KKAQR
L23	MNQERVFKVL.....SSSAE
S14	MAKKSMMKNRE.....VKASW
L24	MQKIRRDDEI.....KAVDA
S10	MQNQIRIRL.....QISLG
L22	MEVAAKLSGA.....KVADK
L18	MTDKKVIRLR.....GGLEF
S13	MARIAGVNIP.....KPIRK
S11	MAKPAARPRK.....KKRRV
S08	MSMQDPLADM.....LCTVF

↓ Translation respective ribosomal proteins

	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. azotof ormans</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. fulva</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. straminea</i>	<i>P. stutzeri</i>
	14164	14160	14159	12689	12693	3904	16637	14162	16665	14165
<i>S10</i>	11912.0	11912.0	11893.9	11912.0	11912.0	11912.0	11912.0	11912.0	11912.0	11897.9
	10900.7	10945.7	10955.6	10950.7	10945.7	10900.7	11015.7	11015.7	11085.8	10920.6
	7173.3	7173.3	7215.4	7202.4	7173.3	7173.3	7173.3	7205.4	7215.4	7274.4
	11753.6	11753.6	11783.6	11767.6	11753.6	11753.6	11753.6	11783.6	11755.6	11753.6
	9902.5	9966.6	9957.6	9955.6	9966.6	9984.6	9902.5	9974.6	10014.7	9973.6
<i>spc</i>	10218.1	10246.1	10186.0	10227.1	10189.1	10204.0	10218.1	10176.0	10190.0	10163.0
	13410.9	13410.9	13396.8	13412.9	13410.9	13410.9	13410.9	13396.8	13410.9	13436.9
	12497.4	12556.4	12561.4	12531.4	12512.4	12512.4	12485.4	12413.3	12457.3	12477.3
	11330.2	11336.3	11340.3	11471.5	11336.3	11345.3	11330.2	11344.3	11344.3	11413.4
	6334.5	6395.6	6278.3	6347.4	6395.6	6395.6	6292.5	6363.5	6448.5	6463.6
<i>alpha</i>	4435.4	4435.4	4407.3	4435.4	4435.4	4435.4	4435.4	4435.4	4435.4	4421.4
	13845.1	13962.3	13951.3	14040.4	13920.2	13973.3	13861.1	13928.2	13914.2	13869.1
	11259.3	11304.3	11394.3	11435.3	11304.3	11274.2	11288.3	11359.2	11385.3	11326.2
	13529.5	13485.4	13517.5	13513.5	13499.4	13513.5	13543.5	13531.5	13493.4	13527.5
	13126.3	13210.4	13177.4	13135.2	13164.5	13239.4	13140.3	13118.3	13058.3	13176.4

Fig. 2. Construction procedures of the working database for MALDI-TOF MS analysis based on the *S10*-GERMS method.

いため科学的根拠に乏しく、原理的には、供試細菌株のスペクトルパターンが市販の参照データベースに存在しない場合、供試菌株を同定できない。また、一般的に、フィンガープリン法では、細菌の株レベルでの識別は難しいと言われている。

そこで、MALDI-TOF MSで観測されるスペクトルを、遺伝子の塩基配列情報を翻訳したアミノ酸配列から推測される理論値で帰属する、理論的根拠を有するバイオインフォマティクスに基づく方法が提案されている¹⁵⁻¹⁹⁾。

1.2. リボソームタンパク質をバイオマーカーとしたバイオインフォマティックな細菌同定

リボソームは、生物の細胞に普遍的に存在し、細菌の構成成分 [ラージサブユニット (50S), スモールサブユニット (30S), 23S rRNA, 16S rRNA, 5S rRNA] の組成 (L1~L36およびS1~S21) と構造は、培養条件や増殖段階が異なっても基本的に変化しない。さらに、リボソームタンパク質は、細胞分裂が活発な対数増殖期には、菌体重量の約

20%を占める^{20,21)}。このリボソームタンパク質は、MALDI-TOF MSでは主要なピークとして観測され、アミノ酸配列の保存性が高いが、株間で僅かに異なるため^{22,23)}、細菌の同定および系統解析におけるバイオマーカーとして有用である。そこで、リボソームタンパク質をバイオマーカーとして使用する手法と16S rRNA遺伝子塩基配列法との違いをFig. 1に示した。また、リボソームタンパク質が、MALDI-TOF MSによる細菌同定・識別においてバイオマーカーとして優れている点を以下に示した。

リボソームタンパク質の利点

- 1) タンパク質としての発現量が非常に多い。
- 2) アミノ酸配列の保存性が高いが、株間で僅かに異なる。
- 3) N-末端メチオニン切断以外の翻訳後修飾が少なく理論値を算出しやすい。
- 4) MALDI-TOF MS測定に適切な m/z (4–30 kDa) であり、主要なピークとして観察される。
- 5) 等電点が高く、ポジティブイオン $[M+H]^+$ として検出

Step 4 : Construction of accurate database by comparison of theoretical vs. observed data

In silico-calculated m/z data from step 3

	<i>P. putida</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. alcaligenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. azotoformans</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. fulva</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. straminea</i>	<i>P. stutzeri</i>
	14164	14160	14159	12693	3904	16637	14162	16665	14165	
L22	11912.0	11912.0	11893.9	11912.0	11912.0	11912.0	11912.0	11912.0	11897.9	
L23	10900.7	10945.7	10955.6	10950.7	10945.7	10945.7	10900.7	11015.7	11085.8	10920.6
L29	7173.3	7173.3	7215.4	7202.4	7173.3	7173.3	7205.4	7215.4	7274.4	
S10	11753.6	11753.6	11783.6	11767.6	11753.6	11753.6	11753.6	11755.6	11753.6	
S17	9902.5	9966.6	9957.6	9955.6	9966.6	9984.6	9902.5	9974.6	10014.7	9973.6
S19	10218.1	10246.1	10186.0	10227.1	10189.1	10204.0	10218.1	10176.0	10190.0	10163.0
L14	13410.9	13410.9	13396.8	13412.9	13410.9	13410.9	13410.9	13396.8	13410.9	13436.9
L18	12497.4	12556.4	12561.4	12531.4	12512.4	12512.4	12485.4	12413.3	12457.3	12477.3
L24	11330.2	11336.3	11340.3	11471.5	11336.3	11345.3	11330.2	11344.3	11344.3	11413.4
L30	6334.5	6395.6	6278.3	6347.4	6395.6	6395.6	6292.5	6363.5	6448.5	6463.6
L36	4435.4	4435.4	4407.3	4435.4	4435.4	4435.4	4435.4	4435.4	4435.4	4421.4
S08	13845.1	13962.3	13951.3	14040.4	13920.2	13973.3	13861.1	13928.2	13914.2	13869.1
S14	11259.3	11304.3	11394.3	11435.3	11304.3	11274.2	11288.3	11359.2	11385.3	11326.2
S11	13529.5	13485.4	13517.5	13813.5	13499.4	13513.5	13543.5	13531.5	13493.4	13527.5
S13	13126.3	13210.4	13177.4	13135.2	13164.5	13239.4	13140.3	13118.3	13058.3	13176.4

Observed m/z data from step 1

Construction of biomarkers list with accurate m/z (working database)

	<i>P. putida</i>	<i>P. fulva</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. azotoformans</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. straminea</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. alcaligenes</i>
	NBRC 14164	NBRC 16637	NBRC 14160	NBRC 12693	NBRC 3904	NBRC 12689	NBRC 14162	NBRC 16665	NBRC 14165	NBRC 14159
L22	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11897.92	11893.91
L23	10900.65	10900.65	10945.74	10945.74	10945.74	10950.71	11015.74	11085.83	10920.64	10955.60
L29	7173.31	7173.31	7173.31	7173.31	7173.31	7202.35	7205.35	7215.39	7274.42	7215.44
S10	11753.58	11753.58	11753.58	11753.58	11753.58	11767.61	11783.61	11755.55	11753.58	11783.61
S17	9902.53	9902.53	9966.58	9966.58	9984.61	9955.60	9974.55	10014.66	9973.57	9957.61
S19	10218.07	10218.07	10246.12	10189.07	10204.04	10227.08	10175.98	10190.01	10162.99	10186.01
L18	12497.41	12485.36	12556.43	12512.38	12512.38	12531.43	12413.29	12457.30	12477.34	12561.35
L24	11330.24	11330.24	11336.25	11336.25	11345.26	11471.46	11344.27	11344.27	11413.37	11340.32
L30	6334.54	6292.46	6395.60	6395.60	6395.60	6347.44	6363.48	6448.54	6463.62	6278.33
L36	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4421.36	4407.34
S08	13845.12	13861.12	13962.26	13920.23	13973.29	14040.42	13928.16	13914.18	13869.10	13951.25
S14	11259.27	11288.27	11304.32	11304.32	11274.24	11435.25	11359.15	11385.32	11326.23	11394.33
S11	13529.50	13529.50	13485.44	13485.44	13499.47	13499.47	13517.48	13479.39	13513.50	13503.46
S13	13126.31	13140.34	13210.43	13164.45	13239.43	13135.23	13118.33	13058.28	13176.42	13177.40

Step 5: Typing of isolates based on the selected biomarkers.

Working database

	<i>P. putida</i>	<i>P. fulva</i>	<i>P. fluorescens</i>	<i>P. azotoformans</i>	<i>P. chlororaphis</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>P. mendocina</i>	<i>P. straminea</i>	<i>P. stutzeri</i>	<i>P. alcaligenes</i>
	NBRC 14164	NBRC 16637	NBRC 14160	NBRC 12693	NBRC 3904	NBRC 12689	NBRC 14162	NBRC 16665	NBRC 14165	NBRC 14159
L22	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11911.95	11897.92	11893.91
L23	10900.65	10900.65	10945.74	10945.74	10945.74	10950.71	11015.74	11085.83	10920.64	10955.60
L29	7173.31	7173.31	7173.31	7173.31	7173.31	7202.35	7205.35	7215.39	7274.42	7215.44
S10	11753.58	11753.58	11753.58	11753.58	11753.58	11767.61	11783.61	11755.55	11753.58	11783.61
S17	9902.53	9902.53	9966.58	9966.58	9984.61	9955.60	9974.55	10014.66	9973.57	9957.61
S19	10218.07	10218.07	10246.12	10189.07	10204.04	10227.08	10175.98	10190.01	10162.99	10186.01
L18	12497.41	12485.36	12556.43	12512.38	12512.38	12531.43	12413.29	12457.30	12477.34	12561.35
L24	11330.24	11330.24	11336.25	11336.25	11345.26	11471.46	11344.27	11344.27	11413.37	11340.32
L30	6334.54	6292.46	6395.60	6395.60	6395.60	6347.44	6363.48	6448.54	6463.62	6278.33
L36	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4435.39	4421.36	4407.34
S08	13845.12	13861.12	13962.26	13920.23	13973.29	14040.42	13928.16	13914.18	13869.10	13951.25
S14	11259.27	11288.27	11304.32	11304.32	11274.24	11435.25	11359.15	11385.32	11326.23	11394.33
S11	13529.50	13529.50	13485.44	13485.44	13499.47	13499.47	13517.48	13479.39	13513.50	13503.46
S13	13126.31	13140.34	13210.43	13164.45	13239.43	13135.23	13118.33	13058.28	13176.42	13177.40

Fig. 2. Continued.

1) Get amino acids sequence by translation of gene sequence encoded in the operon.

<example> Bacterium: *Pseudomonas putida* KT2440 strain
 Protein: 50S ribosomal protein L35
 Amino acid sequence:
MPKMKTKSGAAKRFLKTASGFKHKHAFKSHILTKMSTKRKRQLRGASLLHPSDVAKVERMLRVR

2) Calculate theoretical mass of target proteins based on the obtained sequence.

Free software is available to calculate m/z . i.e. Compute pI/Mw tool in ExPASy proteomics server
 = The obtained theoretical m/z of L35 is suspected to m/z **7344.88**.

3) Check modification after translation, like methionine loss.

N-terminal end rule: N-terminal methionine is selectively cleaved by amino peptidase when the size of branch of neighbor amino acid is less than 1.29 Å.

<example>

Fig. 3. Calculation procedure of theoretical masses of ribosomal protein processed by N-terminal methionine loss.

しやすい。

6) ゲノム解読株由来のリボソームタンパク質情報を入手できる。

しかし、リボソームタンパク質をバイオマーカーとしたバイオインフォマティクスにもとづく細菌同定法は、分子系統学を反映した有望な手法であるが、そもそも、ゲノムが未解読の場合、また、塩基配列登録時のアノテーションミスや翻訳後修飾の場合には、MALDI-TOF MS測定にて得られた実測値を帰属することができないという課題が残る。

2. S10-GERMS法

2.1. S10-GERMS法の原理

著者らは、これらの課題を解決するため、*S10-spc-alpha* オペロンに着目した。本オペロンは、細菌に共通に存在し、約半数に相当する25種類以上のリボソームタンパク質と数種のハウスキーピング遺伝子をコードしている^{24,25)}。本オペロンのゲノムサイズは、15kbp程度であり、通常のDNAシーケンサーで解読可能である。つまり、本オペロンのDNA塩基配列の解読により、細菌の約50%のリボソームタンパク質の質量に関する情報を得ることができる。この*S10-spc-alpha* オペロンにコードされたリボソームタンパク質をバイオマーカーとして利活用するMALDI-TOF MSによる細菌識別法をS10-GERMS法として確立した (Fig. 2)^{7,8)}。

本S10-GERMS法によるリボソームタンパク質データベース構築の手順を以下に記した。

手順1: 寒天培地上のシングルコロニーまたは液体培養液を遠心分離して得られたゲノム解読株をMALDI-TOF MSにて測定する (Whole Cell MALDI-TOF MS: WC-MS)。S10-GERMS法では、観測される質量電荷比 (m/z) が31000をはるかに超えるピークもバイオマーカーとして使用するため、測定にはマトリックス剤としてシナピン酸を使用した。なお、ゲノム解読株は、基準株であることが望ましい。

手順2: *S10-spc-alpha* オペロンの塩基配列を解読するため、ゲノム解読株の*S10-spc-alpha* オペロンの共通塩基配列をもとにプライマーを設計する。この場合、属レベルでゲノム解読株が得られれば、その共通塩基配列よりプライマーを設計する。

手順3: 塩基配列を解読した各リボソームタンパク質のDNA塩基配列をアミノ酸配列へ変換する。なお、解読した塩基配列からアミノ酸配列への翻訳は、EMBOSS Transeq (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/transeq/index.html>) を使用できる。

手順4: 各リボソームタンパク質のアミノ酸配列情報をもとに計算した理論質量値 (理論値) のデータベースを構築する。アミノ酸配列情報に基づく理論値は、ExPASy proteomics server中のCompute pI/Mw tool (http://au.expasy.org/tools/pi_tool.html) を用いて算出することができる。なお、すでに全ゲノムが解読されている菌株の場合、各リボソームタンパク質のアミノ酸配列情報は、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) より入手できる。

手順5: 各リボソームタンパク質の理論値をもとにWC-MSの実測値を帰属する。実測値と理論値が異なる場合、1) N-末端側として経験的に知られているN-末端メチオニン残基の切断やメチル化等の翻訳後修飾、2) アノテーションミスによる誤解読が考えられるため、実測値と一致するようにFig. 3を再検討する。N-末端側による翻訳後修飾の例を図に示した。N-末端側とは、N末端のメチオニンの隣に位置するアミノ酸の側鎖のサイズが1.29 Å未満のアミノ酸 (A, C, G, P, S, T, V) の場合、アミノペプチダーゼの作用により、N末端のメチオニンが削除される^{26,27)}。例えば、*Pseudomonas putida* KT 2440株のリボソームタンパク質L35の理論質量は、アミノ酸配列より7344.88であるが、N末端のメチオニンの隣のアミノ酸はプロリンである。したがって、L35の場合、N-末端側によりN末端のメチオニンが削除され理論質量は、メチオニンの質量131.19を差し引いた

Table 1. Comparison of the similarities of *Pseudomonas putida* at strain level

<i>P. putida</i> strains	NBRC 14671	NBRC 15366	NBRC 100988	JCM 13061
NBRC 14671	—	99.5 ^a	99.6	99.5
NBRC 15366	9/14 ^b	—	99.7	99.0
NBRC 100988	11/14	10/14	—	99.2
JCM 13061	11/14	8/14	10/14	—

^a Values obtained by 16S rRNA sequencing similarities. ^b The top and bottom of fractions show the number of identical biomarkers and the number of total biomarkers, respectively.

Fig. 4. Phylogenetic analysis of 12 strains of *P. putida*; a) phylogenetic analysis of *gyrB* sequences; b) phylogenetic analysis based upon the *S10-GERMS* method. Reprinted from Classification of genus *Pseudomonas* by MALDI-TOF MS based on ribosomal protein coding in *S10-spc-alpha* operon at strain level²⁸⁾ with permission. Copyright (2016) American Chemical Society.

7213.69 (7344.88–131.19) となり、L35の実測値 (M+H)⁺ は、 $m/z=7214.7$ のピークとして帰属される (Fig. 3)。

手順6：帰属が完了した各リボソームタンパク質の中から、ピーク検出感度や再現性をも考慮した上で、識別用のバイオマーカーを選択し、質量値データベース (BM データベース) を構築する。

手順7：供試菌のWC-MS観測値は、BM データベースとのマッチングにより、例えば、1 (一致した場合)、0 (一致しなかった場合) 等のバイナリー識別表として作成し、プロトタイピングする。系統解析等は、作成したバイナリー表をもとに、PAST software (<http://folk.uio.no/ohammer/past/>) や FigTree software (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>) を使用して行うことができる。

*S10-GERMS*法を用いた細菌識別の具体例を以下に記した。

2.2. *S10-GERMS*法による *Pseudomonas* 属細菌の株および病原型識別^{28,29)}

農業補助剤として広く使用されていた非イオン系界面活性剤オクチルフェノールポリエトキシシレート (OPEO_n) の分解菌を水田土壌より単離し、16S rRNA 遺伝子塩基配列の相同性より、*Pseudomonas putida* と同定した。しかし、本菌によ

る OPEO_n 分解は、カルシウム (Ca²⁺) およびマグネシウムイオン (Mg²⁺) のような環境中の無機イオンに依存して変化することが示されたため³⁰⁾、*S10-GERMS*法により詳細に識別した。ゲノム解読が完了していた17株の *Pseudomonas* 属細菌を用いて検証した結果、開始コドンのアノテーションミス、あるいは未登録のリボソームタンパク質が、17存在した。これらは、WC-MSの実測値をもとに、前述の手順5により校正した。

S10-spc-alpha オペロンに含まれる26種類のリボソームタンパク質からMALDI-TOF MS分析の結果より、*S10-GERMS*法における識別用のバイオマーカーとして、理論質量と実測値とが一致し、高い再現性を示す m/z が15,000以下の14種のリボソームタンパク質 (*S10*: L22, L23, L29, S10, S17, S19; *spc*: L18, L24, L30, L36, S08, S14; *alpha*: S11, S13) を選択した。そこで、これら14種のバイオマーカーを用いて *P. putida* の株レベルでの識別を実施した結果、特に供試したそれぞれの菌株によって異なる質量を示したL24, S13およびS14が、*P. putida* 株間の識別に重要なバイオマーカーであることが判明し、16S rRNA塩基配列による細菌同定法では識別できなかった株レベルの迅速な識別が可能であることが示された (Table 1, Fig. 4)²⁸⁾。

Pseudomonas 属細菌には、多様な作物に危害をおよぼす

Fig. 5. Phylogenetic trees of APEO_n-degrading bacteria and type strain of genus *Sphingomonas* based on 16S rRNA gene sequences (a) and on the S10-GERMS method (b), and MALDI mass spectra of ribosomal subunit S14 of *Sphingopyxis terrae* (c).

植物病原菌 *P. syringae* が属し、これらは病原型 (pathovar) により分類されている。近年、我国でもキウイフルーツかいう病の Ps3 系統 (*Pseudomonas syringae* pv. *actinidiae* Ps3) による病害が確認された。本菌は、重要病害虫発生時対応基本指針 (平成24年5月17日付け24消安第650号消費・安全局長通知) 第2に定める重要病害虫に該当することから、S10-GERMS法による *P. syringae* の病原型 (pathovar) レベルでの識別を試みた。その結果、野外株での検証が必要であるが、選択した8種のバイオマーカー (L24, L30, S10, S12, S14, S16, S17およびS19) を用いることにより、*P. syringae* の病原型を識別できることが示唆された²⁹⁾。

2.3. S10-GERMS法による *Sphingomonas* 属細菌の識別³¹⁾

著者らがOPEOn分解菌として畑作地より単離した *Sphingomonas* 属細菌は、環境中に広く存在するグラム陰性細菌

であり、現在では、*Sphingomonas* 属、*Sphingobium* 属、*Novosphingobium* 属および *Sphingopyxis* 属の4属に再分類されている³²⁾。単離したBSN20株は、16S rRNAの塩基配列解析より、基準株の *Sphingopyxis terrae* NBRC 15098^T と1塩基異なる99.9%の相同性を示したが、BSN20株は、環境中のFe³⁺イオンの影響を受け、オクチルフェノールまでの分解を著しく促進することが判明した³³⁾。

そこで、ゲノム解読された7株のS10-*spc-alpha* オペロンを解析した結果、本菌は、*alpha* オペロンを構成していなかったため、S10-*spc* オペロンにコードされたリボソームタンパク質より、9つのリボソームタンパク質 (L18, L22, L24, L29, L30, S08, S14, S17およびS19) をバイオマーカーとして選択し、株識別を行った。MALDI-TOF MSで測定した結果、バイオマーカーであるS14の *m/z* が14異なるため、S10-GERMS法では、1塩基異なる菌株を識別することができた (Fig. 5)。

さらに、単離したBSN20株のバイオマーカーのプロファイルは、*Sphingopyxis macrogoltabidus*として登録されている非イオン系界面活性剤の分解菌NBRC15593株と同一であった。そこで、*Sphingopyxis macrogoltabidus*の基準株であるNBRC15033^Tのバイオマーカーのプロファイルと比較した。その結果、NBRC15593株のプロファイルは、NBRC15033^Tのそれと異なっていた。このことより、NBRC15593株は、*Sphingopyxis macrogoltabidus*ではなく、*Sphingopyxis terrae*として修正する必要があることが判明した（なお、現在、すでに修正されている）。S10-GERMS法は、カルチャーコレクションの維持管理にも有効であることが示唆された。

2.4. S10-GERMS法による *Bacillus* 属細菌の同定と亜種識別³⁴⁾

グラム陽性菌である *Bacillus* 属細菌の代表的な菌種である *B. subtilis* は、その近縁種も含め、アジアおよび西アフリカ地域で発酵食品の製造に使用されるなど、有用微生物として幅広く使用されている^{35,36)}。さらに、昆虫病原菌の *B. thuringiensis* は、殺虫性タンパク質を産生する能力を有するため、生物防除のために広く利用されている³⁷⁾。一方、*Bacillus* 属細菌は、ヒトの健康に直接的に関係する細菌を含んでおり、*B. anthracis* は、炭疽病を、*B. cereus* は、食中毒を引き起こす^{38,39)}。しかし、これら3菌種（*B. anthracis*, *B. cereus*, *B. thuringiensis*）は、系統学的に近縁な関係であるため、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析で識別することが難しい^{40,41)}。

そこで、ゲノム解読されていた6菌株の Type strain（*B. cereus* NBRC 15305^T, *B. licheniformis* NBRC 12200^T, *B. mycoides* NBRC 101228^T, *B. pumilus* NBRC 12092^T, *B. subtilis* ssp. *subtilis* NBRC 13719^T および *B. thuringiensis* NBRC 101235^T）のリボソームタンパク質データベースを構築し、S10-*spc* オペロンにコードされている8種類のリボソームタンパク質

（L18, L22, L24, L29, L30, S10, S14, S19）をバイオマーカーとして選択した。選択した8種類のバイオマーカーを用いて *Bacillus* 属細菌の同定と *B. subtilis* の亜種レベルでの識別ならびに系統樹を作成した結果、*B. subtilis* グループの *B. amyloliquefaciens* NBRC 15535^T および *B. subtilis* ssp. *subtilis* NBRC 13719^T、また、*B. cereus* グループの *B. cereus* NBRC 15305^T および *B. thuringiensis* NBRC 101235^T はそれぞれ系統学的に近縁であった。しかし、MALDI マススペクトルには、次のような違いが確認された；1) *B. amyloliquefaciens* NBRC 15535^T および *B. subtilis* ssp. *subtilis* NBRC 13719^T では、L22 および L24 の *m/z* が相違した；2) *B. cereus* NBRC 15305^T および *B. thuringiensis* NBRC 101235^T では、L22, L30 および S10 の *m/z* が相違した。したがって、これらのバイオマーカーの *m/z* 相違を活用した S10-GERMS 法は、16S rRNA 遺伝子塩基配列では系統学的分類が困難であったこれらの細菌を明確に識別できる可能性を示唆していた。

B. subtilis には、*B. subtilis* ssp. *subtilis*, *Bacillus subtilis* ssp. *spizizenii* および *B. subtilis* ssp. *inaquosorum* の3つの亜種が存在する⁶²⁾。なかでも、67%のDNA-DNA相同性を示す *B. subtilis* ssp. *subtilis* NBRC 13719^T および *B. subtilis* ssp. *spizizenii* NBRC 101239^T の16S rRNA 遺伝子の相同性は、1473/1475 (99.9%) であるため、16S rRNA 遺伝子による亜種レベルの識別は、困難である⁴²⁾。そこで、選択した8種のバイオマーカーを用いたプロテオタイピングによる系統解析を行った。その結果、これらの株は、バイオマーカー L29, L22 および L18 の *m/z* の違いにより亜種レベルでの識別が可能であることが示された（Table 2）。このように、DNA-DNA 相同性分析の結果が70%に近く、16S rRNA 遺伝子が2塩基異なる場合でも、適切なバイオマーカーを用いた MALDI-TOF MS 測定は、亜種間の簡便・迅速な識別に有効であることが示された。

Table 2. Binary peak matching profile of *B. subtilis* strains. Reprinted from Classification of genus *Bacillus* based on MALDI-TOF MS analysis of ribosomal protein coded in *S10* and *spc* operons³⁴⁾ with permission. Copyright (2016) American Chemical Society

Strains NBRC No.	Reference peaks																			
	L36	L34	L30	L32	L28	S14	L35	L29	S18	S20	S16	S15	S19	L24	S10	L22	L18	L20	S09	S12
13719 ^T	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14415	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14474	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
101588	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
101246	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0
13722	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1
101239	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
104440	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0

^a Present peaks are indicated as 1 and absent peaks as 0. Bold: 8 ribosomal subunit proteins selected for non-genome-sequenced genus *Bacillus*.

お わ り に

これまでの細菌の分類・同定における考え方は、広く利用されている16S rRNA遺伝子塩基配列、さらに、MALDI-TOF MSのフィンガープリント法のように、「細菌の共通の情報（相同性・一致度）」をもとに分類・同定してきた。しかし、その適応範囲は科以上から属および種の推定までであり、株レベルの識別は困難であった。MALDI-TOF MSを用いた微生物同定は、測定の手軽さから、迅速な手法として注目されているが、バイオインフォマティクスに基づくアプローチの主要な課題は、本アプローチに必要なデータベース情報の充実と情報の正確さであった。そこで、データベースの量と質の課題を克服する迅速・簡便な細菌識別手法確立のため、全リボソームタンパク質の約半数の情報を有し、細菌において共通に存在する*S10-spc-alpha* オペロンに着目し、データベースの構築・校正および最適なバイオマーカーを用いた「異なる情報」に基づく株レベルでの識別を可能にした*S10-GERMS*法を確立した（Fig. 6）。*S10-GERMS*法の特徴は、菌株間で「異なる情報」を提供するバイオマーカーの選抜であるため、可能な限りバイオマーカー数を減らす方向で研究してきた。一方、全ゲノムが解読された菌株数の増加に伴い、全リボソームタンパク質の情報を利用する同定手法が報告されたり⁴³⁾、また、米国では、商業化されつつある。

*S10-GERMS*法は、グラム陰性菌およびグラム陽性菌にお

いて、それぞれ使用可能なバイオマーカーを選択しデータベースを構築しなければならないが、本法は、研究者が対象とする細菌の属レベルでのゲノム解読情報があれば、プライマーを設計し、自らデータベースを構築することができる。そこで、*S10-GERMS*法のバイオマーカー構築を支援するソフト「Strain Solution」が開発された⁴⁴⁾。「Strain Solution」と市販の細菌同定ソフトとを組合せたシステムの構築は、食中毒原因細菌、炭疽菌などの病原細菌や医療現場で問題となる病原細菌の迅速、簡便、かつ信頼性の高い細菌の識別法として有効であるのみならず^{45,46)}、環境微生物や有用微生物のスクリーニングでも求められる数多くの菌株の迅速、簡便な分類・同定にも役立つことが期待される⁴⁷⁾（Fig. 7）。

MALDI-TOF MSは、ウイルス、細菌、真菌の同定のみならず昆虫の分類にも用いられるようになり⁴⁸⁻⁵⁰⁾、迅速・簡便かつ経済的な同定法として位置づけられるようになってきた²⁰⁻²⁶⁾。さらに、農薬科学分野では、土壌微生物が殺虫剤耐性に関与していることが明らかになり^{51,52)}、そのメカニズムの解明のための細菌同定・識別を目的としたMALDI-TOF MSの重要性も増して来ると思われる。

さらに、微生物同定のために、MALDI-TOF MSによる脂肪酸の分析⁵³⁾やMALDI-TOF-TOF-MS/MSを用いた同定・識別手法も報告され⁵⁴⁾、質量分析を活用した生物同定・識別の益々の発展が期待される。

Fig. 6. The main differences between the *S10-GERMS* method and other conventional methods.

Fig. 7. Concept of the automatic proteotyping system in combination of the conventional MALDI-TOF MS fingerprinting with the SIO-GERMS method.

謝 辞

本研究の遂行に共同研究者として数多くの御助言と御支援を賜りました，産業技術総合研究所環境管理技術研究部門の佐藤浩昭博士に厚く御礼申し上げます。本研究は，文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業，科学技術振興財団（JST）シーズ探索，愛知県「知の拠点あいち」重点プロジェクト「食の安心安全デバイスの開発」ならびに日本学術振興財団から資金的援助を受けました。

Copyright acknowledgement:

- All figures and tables were reproduced with permission from H. Tamura, “MALDI-TOF-MS based upon the Ribosomal Proteins Coding in S10 for Proteotyping”, in *MALDI-TOF and Tandem MS for Clinical Microbiology*, H. Shah and S. Gharbia (Eds), John Wiley & Sons, © 2017.
- 本稿の実施例は，島津評論（Vol. 70, 2013）に寄稿した内容に著作権者の許可を得て修正した。

引 用 文 献

- H. Sato, A. Shibata, Y. Wang, H. Yoshikawa and H. Tamura: *Biomacromolecules* **4**, 46–51 (2003).
- Clinical and Laboratory Standards Institute: Approved Standard MM18-A (2008).
- E. Stackebrandt and B. M. Goebel: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**, 846–849 (1994).
- R. D. Holland, J. G. Wilkes, F. Rafi, J. B. Sutherland, C. C. Persons, K. J. Voorhees and J. O. Lay Jr.: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **10**, 1227–1232 (1996).
- C. Fenselau and P. A. Demirev: *Mass Spectrom. Rev.* **20**, 157–171 (2001).
- R. Branquinho, C. Sousa, J. Lopes, M. E. Pintado, L. V. Peixe and H. Osório: *PLoS ONE* **9**, e110127 (2014).
- Y. Hotta, K. Teramoto, H. Sato, H. Yoshikawa, A. Hosoda and H. Tamura: *J. Proteome Res.* **9**, 6722–6728 (2010).
- H. Tamura, Y. Hotta and H. Sato: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **24**, 1185–1193 (2013).
- N. Valentine, S. Wunschel, D. Wunschel, C. Petersen and K. Wahl: *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 58–64 (2005).
- R. A. Momo, J. F. Povey, C. M. Smales, C. J. O'Malley, G. A. Montague and E. B. Martin: *Anal. Bioanal. Chem.* **405**, 8251–8265 (2013).
- M. Erhard, U. C. Hipler, A. Burmester, A. A. Brakhage and J. Wostemeyer: *Exp. Dermatol.* **17**, 356–361 (2008).
- A. Grosse-Herrenthey, T. Maier, F. Gessler, R. Schaumann, H. Böhnelt, M. Kostrzewa and M. Krüger: *Anaerobe* **14**, 242–249 (2008).
- E. Nagy, T. Maier, E. Urban, G. Terhes and M. Kostrzewa: *Clin. Microbiol. Infect.* **15**, 796–802 (2009).
- A. Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois and J. Schrenzel: *J. Clin. Microbiol.* **48**, 1169–117 (2010).
- P. A. Demirev, Y. P. Ho, V. Ryzhov and C. Fenselau: *Anal. Chem.* **71**, 2732–2738 (1999).
- P. A. Demirev, J. S. Lin, F. J. Peneda and C. Fenselau: *Anal. Chem.* **73**, 4566–4573 (2001).
- F. J. Pineda, M. D. Antoine, P. A. Demirev, A. B. Feldman, J. Jackman, M. Longenecker and J. S. Lin: *Anal. Chem.* **75**, 3817–3822 (2003).
- L. Sun, K. Teramoto, H. Sato, M. Torimura, H. Tao and T. Shintani: *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **20**, 3789–3798 (2006).
- K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, H. Yoshikawa, Y. Hotta, A. Hosoda and H. Tamura: *Anal. Chem.* **79**, 8712–8719 (2007).
- H. G. Wittmann: *Annu. Rev. Biochem.* **51**, 155–183 (1982).
- R. J. Arnold and J. P. Reilly: *Anal. Biochem.* **269**, 105–112 (1999).
- K. Ochi: *J. Gen. Microbiol.* **135**, 2635–2642 (1989).
- K. Ochiai, K. Uchida and I. Kawamoto: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **43**, 69–76 (1993).
- T. Coenye and P. Vandamme: *FEMS Microbiol. Lett.* **242**, 117–126 (2005).
- B. Victoria, A. Ahmed, R. L. Zuerner, N. Ahmed, D. M. Bulach, J. Quinteiro and R. A. Hartskeerl: *PLoS ONE* **3**, e2752 (2008).
- F. Sherman, J. W. Stewart and S. Tsunasawa: *BioEssays* **3**, 27–31 (1985).
- R. P. Moerschell, Y. Hosokawa, S. Tsunasawa and F. Sherman: *J. Biol. Chem.* **265**, 19638–19643 (1990).
- Y. Hotta, K. Teramoto, H. Sato, H. Yoshikawa, A. Hosoda and H. Tamura: *J. Proteome Res.* **9**, 6722–6728 (2010).
- H. Tamura, Y. Hotta and H. Sato: *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **24**, 1185–1193 (2013).
- A. Shibata, Y. Ishimoto, Y. Nishizaki, A. Hosoda, H. Yoshikawa and H. Tamura: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**, 195–201 (2007).
- Y. Hotta, H. Sato, A. Hosoda and H. Tamura: *FEMS Microbiol. Lett.* **330**, 23–29 (2012).
- E. Yabuuchi, I. Yano, H. Oyaizu, Y. Hashimoto, T. Ezaki and H. Yamamoto: *Microbiol. Immunol.* **34**, 99–119 (1990).
- Y. Hotta, A. Hosoda, F. Sano, M. Wakayama, K. Niwa, H. Yoshikawa and H. Tamura: *J. Agric. Food Chem.* **58**, 1062–1067 (2010).
- Y. Hotta, J. Sato, H. Sato, A. Hosoda and H. Tamura: *J. Agric. Food Chem.* **59**, 5222–5230 (2011).
- J. Meerak, H. Iida, Y. Watanabe, M. Miyashita, H. Sato, Y. Nakagawa and Y. Tahara: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **53**, 315–323 (2007).
- J. Meerak, P. Yukphan, M. Miyashita, H. Sato, Y. Nakagawa and Y. Tahara: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **54**, 159–166 (2008).
- E. Schnepf, N. Crickmore, J. Van Rie, D. Lereclus, J. Baum, J. Feitelson, D. R. Zeigler and D. H. Dean: *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 775–806 (1998).
- P. E. Granum and T. Lund: *FEMS Microbiol. Lett.* **157**, 223–228 (1997).
- F. G. Priest, M. Barker, L. W. Baillie, E. C. Holmes and M. C. Maiden: *J. Bacteriol.* **186**, 7959–7970 (2004).
- S. Yamada, E. Ohashi, N. Agata and K. Venkateswaran: *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 1483–1490 (1999).
- M. T. La Duc, M. Satomi, N. Agata and K. Venkateswaran: *J. Microbiol. Methods* **56**, 383–394 (2004).

- 42) L. K. Nakamura, M. S. Roberts and F. M. Cohan: *Int. J. Syst. Bacteriol.* **49**, 1211–1215 (1999).
- 43) A. E. Zautner, W. O. Masanta, M. Weig, U. Groß and O. Bader: *Sci. Rep.* **5**, 13431 (2015).
- 44) T. Ojima-Kato, N. Yamamoto, Y. Iijima and H. Tamura: *J. Microbiol. Methods* **119**, 233–238 (2015).
- 45) T. Ojima-Kato, N. Yamamoto, M. Suzuki, T. Fukunaga and H. Tamura: *PLoS One* **9**, e1134458 (2014).
- 46) T. Ojima-Kato, N. Yamamoto, H. Takahashi and H. Tamura: *PLoS ONE* **11**, e0159730 (2016).
- 47) H. Sato, M. Torimura, M. Kitahara, M. Ohkuma, Y. Hotta and H. Tamura: *Syst. Appl. Microbiol.* **35**, 447–454 (2012).
- 48) N. Singhal, M. Kumar, P. K. Kanaujia and J. S. Viridi: *Front. Microbiol.* **6**, 791 (2015).
- 49) P. Muller, V. Pfluger, M. Wittwer, D. Ziegler, F. Chandre, F. Simard and C. Lengeler: *PLoS ONE* **8**, e57486 (2013).
- 50) A. Yssouf, P. Parola, A. Lindström, T. Lilja, G. L'Ambert, U. Bondesson, J. M. Berenger, D. Raoult and L. Almeras: *Parasitol. Res.* **113**, 2375–2378 (2014).
- 51) Y. Kikuchi, M. Hayatsu, T. Hosokawa, A. Nagayama, K. Tago and T. Fukatsu: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **109**, 8618–8622 (2012).
- 52) K. Tago, Y. Kikuchi, S. Nakaoka, C. Katsuyama and M. Hayatsu: *Mol. Ecol.* **24**, 3766–3778 (2015).
- 53) C. R. Cox, K. R. Jensen, N. R. Saichek and K. J. Voorhees: *Sci. Rep.* **5**, 10470 (2015).
- 54) C. K. Fagerquist, B. R. Garbus, W. G. Miller, K. E. Williams, E. Yee, A. H. Bates, S. Boyle, L. A. Harden, M. B. Cooley and R. E. Mandrell: *Anal. Chem.* **82**, 2717–2725 (2010).

略 歴

田村廣人（たむら ひろと）

生年月日：1955年4月21日

最終学歴：九州大学大学院農学研究科修士課程修了

研究テーマまたは主な職歴：塩野義製薬(株)を経て名城大学
農学部生物環境科学科環境微生物学研究室（現在
に至る）