INTEGRATED PAPER

リボソームタンパク質をバイオマーカーとした 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 バクテリアの分類・同定法の開発

Classification and Identification of Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Mass Spectrometry Using Ribosomal Protein as Biomarkers

寺本華奈江

Kanae TERAMOTO

日本電子株式会社開発部 *Advanced Technology Division, JEOL Ltd., Akishima, TOKYO, JAPAN*

A rapid and reliable method for the identification and phylogenetic classification of bacteria is described. In recent years, a method for the rapid identification of bacteria at the “species level” using matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry (MALDI-MS) were proposed. In this method, observed mass spectral peaks, which are used as biomarkers, are assigned using the calculated masses of ribosomal subunit proteins based on amino acid sequences registered in protein databases. We applied the proposed method to a variety of samples, including genome sequenced bacteria, and found that the method is reliable and practical for rapidly identifying bacteria at the “species level.” In addition, minor sequence variations in ribosomal subunit proteins at the “strain level” can be clearly detected as mass differences on MALDI mass spectra. Using the mass differences, it was possible to implement a method for the rapid and reliable phylogenetic classification of bacteria at the “strain level.” The method was also compared with analogous classifications using gene analysis. DOI: 10.5702/massspec.11-24

(Received June 3, 2011; accepted July 8, 2011)

1. はじめに

バクテリアは、食品や抗生物質の製造、あるいは環境浄化など、さまざまな分野で利用されている。また、バクテリアには食中毒菌や食品の劣化を引き起こすものなど、われわれにとっては有害なものも少なくない。これらのバクテリアを活用し、かつ共存していくためには、バクテリアを分類・同定することが重要である。

バクテリアの分類・同定手法は、形態、生理・生化学的な特徴、細胞構成成分（細胞壁組成、脂質、タンパク質、キノン分子種など）の組成のような表現型 (phenotype) を解析する手法と、デオキシリボ核酸 (Deoxyribonucleic acid: DNA) の塩基配列、DNA-DNA の相同性、およびグアニン-シトシン含有量のような遺伝子型 (genotype) を解析する手法に大別される。最近では、遺伝子解析技術の進

歩とデータベースの充実を背景に、バクテリアの属から種レベルの解析には、16S リボソームリボ核酸 (ribosomal ribonucleic acid: rRNA) 遺伝子の塩基配列解析が用いられる場合が多い。しかしながら、バクテリアの発酵特性や毒性などは、種が同じでもそれより詳細な単位である株レベルで異なる場合があるため、株レベルの解析も重要である。遺伝子解析による株レベルの分類法も提案されているが、解析に用いる遺伝子の種類が定まっていないなどの課題が残されている。また、遺伝子の塩基配列解析法は、コストとスループットの観点から、食品や医療分野の細菌検査現場のように、迅速な多検体処理が要求される分野への導入は容易ではない。さらに、遺伝子の塩基配列解析では、遺伝子増幅時における実験環境からの DNA 侵入や、配列解析を誤る可能性も指摘されている¹⁾。

このようななか、Pineda ら²⁾ はマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (matrix-assisted laser desorption/ionization-mass spectrometry: MALDI-MS) を用いたバクテリアの同定手法を提案した。ここでは、リボソームタンパク質がバイオマーカーとして用いられている。これらリボソームタンパク質の観測ピークを、翻訳アミノ酸配列に基づき算出した計算質量を用いて帰属するこ

Correspondence to: Kanae TERAMOTO, JEOL Ltd., 3-1-2 Musashino, Akishima, Tokyo 196-8558, JAPAN, e-mail: kteramot@jeol.co.jp

寺本華奈江, 日本電子株式会社, 〒196-8558 東京都昭島市武蔵野 3-1-2

本研究は 2010 年度日本質量分析学会奨励賞を受賞した。

とにより、バクテリアの種を同定する。筆者らは、本提案手法の信頼性を検証するとともに^{3), 4)}、各種バクテリアの種を同定可能であることを実証してきた^{3), 5), 6)}。さらに、リボソームタンパク質のピーク群の中に、株レベルのわずかなアミノ酸配列の変異を反映したピークシフトが見られることに着目した^{7), 8)}。そして、このピークシフトを解析に用いることにより、このバクテリアの同定法を、迅速簡便かつ信頼性の高い株レベルでの系統分類法へと発展させた^{9)~11)}。

本稿では、筆者が多くの共同研究者と一緒にやってきた、リボソームタンパク質をバイオマーカーとしたMALDI-MSによるバクテリアの解析手法開発について説明するとともに、遺伝子を用いる方法と比較する。筆者は、これまでも研究成果に関する解説⁷⁾と総説¹²⁾を本誌にて発表してきたため、重複する部分は概要のみにとどめた。

2. MALDI-MSによる従来のバクテリア同定・分類手法

質量分析法 (mass spectrometry: MS) は、微量の菌体構成成分を分析できるため、1970年代からバクテリアの解析法として盛んに検討されてきた。当初は、熱分解質量分析法により、脂質の熱分解生成物が解析されていた。そして、種々のソフトイオン化法が開発された現在では、脂質、菌体内毒素、タンパク質、糖質、およびオリゴヌクレオチドなど、解析対象はさまざまな菌体構成成分へと拡大している。特に最近では、試料調製の迅速簡便性と感度の高さから、MALDI-MSがよく用いられる。ここでは、MALDI-MSを用いた手法に注目して、指紋判定法を用いる手法と、バイオインフォマティクスを利用する方法を紹介する。なお、質量分析によるバクテリアの分類・同定法については、筆者の総説¹²⁾のほか、優れた総説^{13), 14)}があるため参照されたい。

2.1 MALDI マススペクトルのパターンを指紋判定する方法

MALDI-MSを用いた菌体の直接分析により、脂質やタンパク質のマススペクトルが得られる。そこで、これら菌体構成成分を測定して得られたマススペクトルと、ライブラリに登録されているマススペクトルの類似性を指紋判定 (fingerprinting) する手法が検討されてきた。この指紋判定法は迅速簡便性に長けた手法である。しかしながら、菌体構成成分のマススペクトルパターンは、培養条件、試料調製法、および測定装置の機種など、実験条件の影響を受けやすいため、再現性を得るためには特別な配慮が必要である。しかも、観測しているピークの成分が明らかではないため、判定の根拠は明確でない。特定のバクテリアを解析する場合であれば、実験条件の規格化により一定の再現性は確保できるが、培養条件は菌種によっても異なるため、あらゆるバクテリアを解析して比較する手段としては適当ではない。

2.2 バイオインフォマティクスを利用する方法

観測ピークの帰属を行わない指紋判定法に対して、MALDI-MSにより観測されるタンパク質の観測質量を、

Swiss-Prot/TrEMBLなどのタンパク質データベースに登録されている翻訳アミノ酸配列から算出した計算質量と比較してピークを帰属することで、バクテリアの種を迅速同定する“bioinformatics based approach”¹⁵⁾が提案された^{16), 17)}。そして、菌体をMALDI-MSにより測定して観測されるピークの多くがリボソームタンパク質であることが明らかになると^{18)~20)}、これをバイオマーカーとしたバクテリアの迅速同定法がPinedaら²⁾により提案された。ここでバイオマーカーとして提案されたリボソームタンパク質は、タンパク質を合成する生命維持に必須のハウスキーピングタンパク質であり、生物の細胞に大量かつ普遍的に含有されている。このため、本手法はあらゆるバクテリアに適用できる可能性がある。この手法では、遺伝子ではなく発現タンパク質を測定するが、遺伝子情報を用いて観測ピークを帰属するため、遺伝子型の解析手法であるといえる。リボソームタンパク質をバイオマーカーにするメリットや、計算質量の算出法は筆者らの解説⁷⁾を参照されたい。

3. リボソームタンパク質をバイオマーカーとしたMALDI-MSによるバクテリアの迅速同定法の開発

3.1 ゲノム解読された乳酸菌 *Lactobacillus plantarum* のリボソームタンパク質のキャラクタリゼーション³⁾

Pinedaら²⁾が提案したリボソームタンパク質をバイオマーカーとしたバクテリアの同定手法が実際に使えるのかを検証するために、ゲノム解読された *Lactobacillus (Lb.) plantarum* NCIMB 8826 の発現リボソームタンパク質のキャラクタリゼーションを行った。まず、試料菌株から調製した精製リボソームタンパク質をペプチドマスフィンガープリント (peptide mass fingerprinting: PMF) 法により解析して、合計42種類のリボソームサブユニットタンパク質が含まれていることを確認した。次に、この精製リボソームタンパク質をMALDI-MSにより測定して、ピークの観測質量と計算質量を比較した。その結果、40本のピークがリボソームサブユニットタンパク質として帰属された。また、試料前処理の迅速・簡便化を検討するために、精製を行わず菌体をビーズにより破碎した“菌体破碎液”の測定を行った。この場合でも38種類のピークをリボソームサブユニットタンパク質として帰属できた。このように大部分のリボソームサブユニットタンパク質をマススペクトル上に観測できたことから、リボソームタンパク質をバイオマーカーとする手法が、迅速簡便なバクテリア解析手法になりうると考えられた。さらに、解析結果の信頼性を向上するために、菌体破碎液で観測されたリボソームサブユニットタンパク質の中から、正確な質量を求めることが困難な分子量20,000以上のものと、ピークが近接しているものを除外した34種類を実用的なバイオマーカーとして選択した。そして、これらのバイオマーカーを利用して、*Lb. plantarum*の同定を試みた。市販の *Lb. plantarum* を用いて製造したヨーグルトと、同菌KT株のスターカルチャー（発酵食品製造に用いる種菌）をMALDI-

MSで測定して、マスペクトル上の観測ピークとバイオマーカーを比較した。その結果、過半数のピークが一致したことから、これら市販製品中のバクテリアを *Lb. plantarum* として迅速簡便に同定できることがわかった。このように、Pineda ら²⁾により提案されたりボソームタンパク質をバイオマーカーとするバクテリアの同定手法が、実用性の高い手法であることを示した。

3.2 乳酸菌ゲノム解読株のリボソームタンパク質の比較解析⁴⁾

上記したように、計算質量と観測質量を比較することにより、マスペクトル上の観測ピークをリボソームサブユニットタンパク質として帰属できる。しかしながら、全ゲノム解読株を用いても、すべてのリボソームサブユニットタンパク質について計算質量と観測質量が一致するわけではない。そこで、その要因を調べるとともに、信頼できる結果が得られるバイオマーカーを選択するための指針を検討した。本研究では、全ゲノム解読された8種の乳酸菌 *Lb. brevis*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, *Lb. gasseri*, *Lb. plantarum*, *Lactococcus* (*Lc.*) *lactis* subsp. *cremoris*, *Leuconostoc* (*Lu.*) *mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Pediococcus* (*Pe.*) *pentosaceus*, および *Streptococcus* (*St.*) *thermophilus* の菌体破砕液をMALDI-MSで測定して、観測されるリボソームタンパク質のキャラクタリゼーションを行った。その結果、53種類のリボソームサブユニットタンパク質のうち、33~45種類を計算質量で帰属できた。

その中で、確実に観測できるバイオマーカーを選択するために、リボソームサブユニットタンパク質として帰属されたピークの相対強度比を調べた。その結果、分子量が20,000以上のピークについては、装置の検出器の応答感度が m/z 値に依存して低下するマスマスクリミネーション効果により、著しく強度が弱くなることがわかった。これは信頼性を低下させる要因となるため、分子量が20,000以上のピークについてはバイオマーカーから除外すべきと判断した。

次に、できるだけ多くのリボソームサブユニットタンパク質をバイオマーカー候補とするために、計算質量と観測質量が異なる要因を明らかにすることを試みた。その要因として、翻訳後修飾の多様性とタンパク質データベースに登録されている翻訳アミノ酸配列情報の誤りが考えられた。前者については、リボソームタンパク質の場合、主にN末端メチオニン残基の切断が起こることが知られているが、グラム陰性菌を用いた研究ではメチル化やアセチル化などの翻訳後修飾も報告されている。本研究に用いた乳酸菌では、N末端メチオニン残基切断以外はグラム陰性菌で報告された結果をそのまま適用できなかった。このため、N末端メチオニン残基切断以外の翻訳後修飾が起こりやすいリボソームサブユニットタンパク質は、バイオマーカーから除外すべきであると判断した。

また、一部の試料菌株でのみ、帰属されないリボソームサブユニットタンパク質があった。その要因を詳細に解析した結果、タンパク質データベースに登録されている情報

が誤っていることがわかった。具体的には、9種類のリボソームサブユニットタンパク質で、翻訳開始領域の誤判定に基づくN末端アミノ酸配列情報の誤りが見いだされた。このほかに、C末端アミノ酸配列、内部アミノ酸配列にも誤りがあることを指摘した。観測質量と計算質量が一致しなかったピークについても、これらの誤りを修正することにより帰属できることがわかった。これらの修正により、分子量20,000以上のものを含めると、39~45種類のリボソームサブユニットタンパク質を計算質量により帰属できた。このように、本手法はタンパク質データベースに登録されている翻訳アミノ酸配列情報の誤りの修正にも用いることができる。信頼性の高い解析をするためには、遺伝子の塩基配列だけでなく多面的な解析が有効といわれているが、その良い例と思われる。

以上のように、マスマスクリミネーション効果の影響を受け微弱なピークでしか観測できない分子量20,000以上のリボソームサブユニットタンパク質と、N末端メチオニン残基切断以外の翻訳後修飾を受けやすいリボソームサブユニットタンパク質をバイオマーカーから除外した。さらに、翻訳アミノ酸配列情報を修正して、本研究に用いた8種の乳酸菌の同定に適したバイオマーカー27種類を提案した (Table 1)。

3.3 保存菌株管理への応用⁵⁾

保存菌株の維持管理を行う際には、コンタミネーション (雑菌汚染) の有無を確認する必要がある。筆者らは、新しい菌株を入手した際に、そのリボソームタンパク質をMALDI-MSにより測定して、マスペクトルをリファレンスデータとして記録している。そして、実験に用いる前に、培養した菌株を測定してリファレンスデータと比較している。実際に、このようにして、*Lc. lactis* として保存していたものに *Lb. plantarum* が混入していることがわかった。

MALDI-MSを用いた同定手法では、迅速・簡便にコンタミネーションの有無や、その原因菌の特定、および菌株の取り違えの検証が可能になると考えられる。本手法は、バクテリア管理や有害菌発生源の特定に有効と考えられた。

3.4 MALDI-MSによる火落ち菌の迅速同定⁶⁾

これまで基礎検討を行ってきたバクテリアの同定手法を、清酒の汚染源として知られている“火落ち菌”の迅速同定に応用した。火落ち菌は乳酸菌の一種で、醸造現場では *Lb. fructivorans*, *Lb. hilgardii*, *Lb. paracasei*, および *Lb. rhamnosus* がよく検出される。本研究では、実際に清酒醸造所で発生した火落ち菌のMALDI-MSによる同定を試みた。しかし、これらの火落ち菌は、いずれもゲノム解読情報が公開されていない。そのため、清酒製造現場でしばしば検出される代表的な火落ち菌5種について、精製したリボソームタンパク質と菌体破砕液に共通して観測されるMALDIマスペクトル上のピークを調べて、各火落ち菌に特有な観測ピークのデータベースを作成した。このように、精製したリボソームタンパク質のマスペクトルを

Table 1. Calculated Mass of $[M+H]^+$ Ions of Ribosomal Subunit Proteins Used as Reliable Biomarkers for the Identification of Lactic Acid Bacteria [Reprinted from Ref. 4 with copy right permission from the Mass Spectrometry Society of Japan.]

	<i>Lb. brevis</i>	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	<i>Lb. gasserii</i>	<i>Lb. plantarum</i>	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	<i>Lu. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	<i>Pe. pentosaceus</i>	<i>St. thermophilus</i>
Large subunit proteins								
L9	17161.9	—	16904.6	16470.2	16351.3	16488.0	16510.3	17100.0
L13	16214.5	16392.0	16369.9	16169.7	16195.8	16325.8	16428.0	16172.9
L14	13296.4	—	—	13149.2	12923.1	13125.2	13206.4	13080.2
L15	15281.6	15635.0	15858.4	15345.6	15349.5	15440.8	15444.9	15531.9
L17	14097.2	14272.6	14392.8	14036.1	14125.3	14176.2	14109.2	14330.4
L18	13066.0	12926.8	13118.0	13041.8	12405.2	12720.5	12959.8	12924.9
L19	13655.9	—	—	13610.7	13102.3	13557.8	13650.9	13147.4
L20	13210.7	13323.7	13317.7	13459.9	13563.1	15824.4	13243.7	13502.9
L21	10969.7	—	11452.3	11049.6	—	10867.5	11130.8	—
L22	12580.4	12612.6	12640.6	12351.3	12339.3	12977.9	12741.7	12286.3
L23	11051.9	11259.0	11349.1	11152.9	10698.4	10961.7	10959.8	10790.7
L24	11195.0	8184.4	8438.8	11381.1	10877.8	10992.7	11230.1	10841.8
L28	6883.1	6726.9	6800.1	6871.0	7043.2	7133.3	6879.0	6782.1
L29	7581.8	7681.8	7738.0	7538.8	7860.2	7626.8	7579.8	7901.2
L30	6565.7	6543.7	6497.8	6550.8	6063.2	6411.6	6511.6	6268.3
L31	9389.2	9407.6	9364.6	9136.2	9353.5	9910.0	9071.2	9326.4
L32	<u>6692.9</u>	7025.9	7110.0	6504.6	6532.4	6241.0	6533.6	6650.6
L34	5336.3	5295.3	5336.4	4745.4	5183.1	5321.3	5377.4	5346.4
L35	7318.6	—	7647.0	7288.7	7688.1	7300.6	7367.6	7690.1
L36	4518.6	4409.4	4413.4	4560.6	4422.4	4442.4	4564.6	4452.4
Small subunit proteins								
S5	17341.1	17875.5	18586.5	17130.8	17422.1	17399.1	17421.1	16920.6
S6	11381.9	—	11425.9	11297.6	—	11190.6	10687.1	10980.4
S7	17895.6	17820.3	17651.3	17711.2	17684.4	17934.5	17742.5	17633.3
S8	14655.1	14322.5	14510.7	14644.0	14539.9	14557.8	14692.1	14656.0
S9	14195.4	14193.5	14266.5	14464.6	13968.1	14130.3	14236.4	14109.2
S10	11561.5	11447.2	11341.1	11605.6	11611.5	11632.6	11519.5	11425.3
S11	13518.5	13540.5	13489.5	13647.7	13157.1	13321.3	13553.5	13255.2
S12	14960.4	14797.1	14797.2	15059.5	14993.6	14969.5	15046.5	14926.4
S13	13485.5	13040.9	12999.9	13507.6	13361.4	13460.5	13621.7	13290.4
S14	6974.3	6987.2	—	7030.3	7004.4	9871.5	7006.2	6966.3
S15	10308.9	10341.7	10271.8	10405.9	10212.8	10307.8	10289.8	10387.0
S16	10267.8	10377.0	10455.1	10077.7	10135.7	15037.3	10185.8	10267.9
S17	9998.5	10380.0	10383.9	10217.0	10163.8	10051.6	10087.7	10027.7
S18	9016.5	8798.3	8795.3	8972.4	9240.9	10904.5	9030.6	9137.6
S19	10232.8	10152.7	10496.1	10160.6	10442.0	10357.0	10355.9	10420.0
S20	9060.4	8832.3	9174.6	8954.4	8236.5	9158.5	9151.7	8290.5
S21	7392.7	6965.9	6937.9	7429.7	6888.0	7080.2	—	6779.9

Underlined entries indicate corrected masses.

用いてデータベースを構築することにより、リボソームタンパク質に起因するピークをバイオマーカーとして確実に選択することができる。このデータベースを用いて、実際に清酒醸造所で発生した火落ち菌の同定に成功した。本手法は、菌体破碎液の測定を行うことから迅速・簡便であり、品質管理や汚染源の特定への適用が期待される。

4. MALDI-MS による株レベルの識別および分類手法の開発と応用

分類学上の最小単位は種であるが、バクテリアを分類する最も基本的な単位は株 (strain) である。例えば大腸菌 *Escherichia coli* に食中毒菌である O157 株や O111 株、あるいは実験に用いる安全な K12 株などがあるように、

株レベルで特徴が大きく異なる場合が少なくない。このため、バクテリアを株レベルで分類することは、極めて重要である。

4.1 リボソームサブユニットタンパク質のピークシフトから見える株レベルの違い^(7), 8)

本研究では、リボソームタンパク質のマススペクトルに見られる株レベルの違いを明らかにするために、全ゲノム解読された乳酸菌 *St. thermophilus* 2 株および *Lb. bulgaricus* 2 株の菌体破碎液を測定して、リボソームタンパク質のキャラクタリゼーションを行った。上記したように翻訳アミノ酸配列情報を修正したうえで解析した結果、帰属されたリボソームサブユニットタンパク質は *St. thermophilus* 2 株ではともに 42 種類、*Lb. bulgaricus* では 39 種

Fig. 1. MALDI mass spectra of proteins from *St. thermophilus* ATCC BAA-250 (a), ATCC BAA-491 (b), and NBRC 13957 (c).

類であった。帰属されたリボソームサブユニットタンパク質のアミノ酸配列を調べたところ、2株の間に配列の変異があるものは *St. thermophilus* で10種類、*Lb. bulgaricus* で2種類であった。そして、これらの株レベルのアミノ酸配列の変異は、わずか1~2カ所であった。

リボソームサブユニットタンパク質に見られるバクテリアの株レベルの違いは、翻訳アミノ酸配列の変異としてはわずか1~2カ所であった。しかしながら、分子量としては多くの場合10~72 Daもの差となるため、マスマススペクトル上では明らかなピークシフトとして認められた。しかも、発現タンパク質を解析しながら、翻訳アミノ酸配列情報の修正を行うことにより、株レベルの違いを高い信頼性で示すことができた。この結果から、Pineda ら²⁾により提案されたリボソームタンパク質をバイオマーカーとした手法は、バクテリアの種の同定だけでなく、株レベルの識別にも適用できることがわかった。

さらに、筆者はリボソームサブユニットタンパク質に見られる株レベルの違いを利用して、株レベルの分類に適用できるのではないかと考えた。そこで、前述の全ゲノム解読された *St. thermophilus* 2株と、全ゲノム解読されていない *St. thermophilus* NBRC 13957 の合計3株のMALDIマスマススペクトルを比較した。Fig. 1に、*St. thermophilus* ATCC BAA-250 (a)とATCC BAA-491 (b)、およびNBRC 13957 (c)のMALDIマスマススペクトルを示す。ここに示す範囲には、4種類のリボソームサブユニットタンパク質が観測されている。各リボソームタンパク質のピークは、 m/z 値が3株すべてで一致するもの、2株で一致するもの、および3株すべてで異なるものがあることが確認された。このようにMALDI-MSによるリボソームタンパク質の解析から、株レベルの微妙なアミノ酸配列の変異を質量差として検出できること、ピークシフトの有無が株により異なることがわかった。そして、リボソームタンパク質のマスマススペクトル上には、変異のしやすさ、すなわち進化速度が異なる多数のタンパク質が観測されていると解釈できた。このことから、本手法が異なる進化速度をもつ多数の

Fig. 2. Procedure for classifying bacteria at the strain level using ribosomal subunit proteins as biomarkers.

ハウスキーピングタンパク質を解析対象とした、新しい系統分類手法になると考えた。次に、マスマススペクトル上に現れるピークシフトに着目した、株レベルの系統分類について述べる。

4.2 系統分類への適用の検討⁹⁾

筆者らは、リボソームタンパク質をバイオマーカーとする解析手法を系統分類に展開できるか検討するため、ゲノム解読株を分類の基準として、*Pseudomonas (Ps.) putida* 合計16株の解析を行った。ゲノム解読株を分類の指標として用いた分類法の流れをFig. 2に示す。

- 1) バイオマーカーの選択を行う。分類の基準となる全ゲノム解読株のリボソームサブユニットタンパク質について、翻訳アミノ酸配列から計算質量を求めてリスト化する。そして、全ゲノム解読株のリボソームタンパク質を測定して、観測ピークを帰属する。なお、試料菌株についてリボソームタンパク質を精製しない場合は、破碎液で観測されたものからバイオマーカーを選択する。
- 2) 試料菌株の破碎液を測定する。そして、観測ピークとバイオマーカーの m/z 値を比較して、一致する場合は「1」、一致しない場合は「0」として表にまとめる。
- 3) 上記の表をクラスター解析することにより、樹形図を作成する。

本研究では、分類の基準には全ゲノム解読株 KT2440 株を用いて、43種類のリボソームサブユニットタンパク質をバイオマーカーとした。そして、上記のようにして得た分類結果とDNAジャイレースBサブユニット遺伝子 (*gyrB*) の塩基配列解析に基づく系統分類結果に高い相関があることを示した。このようにして、MALDI-MSにより株レベルの系統分類ができることを実証した。

4.3 低温増殖性乳酸菌の分類・同定への応用¹⁰⁾

乳酸菌は、さまざまな発酵食品の製造に使われている。食品の品質を維持・管理し、かつ、新たな菌を探索して食品の製造プロセスに用いるためには、これらの乳酸菌の種や株を迅速・簡便に同定・分類することが有効である。さまざまな乳酸菌の種を簡易同定するためには、グラム染色した菌体の観察や、グルコースから精製した乳酸の分析が行われている。また、株レベルの詳細な分類には、発酵特性試験など生化学的試験が行われる。しかし、一般的に生化学試験は、培養条件や実験条件の影響を受けやすいため再現性に乏しく、試験の手順が煩雑で、かつ数日オーダーの時間を要するという課題がある。そこで、迅速・簡便な本研究の手法を、食品の発酵に用いられる菌、および、その類縁菌の解析に適用することを検討した。

スターターカルチャー D-1001 株は、日本国内で唯一販売されている食肉用低温発酵性乳酸菌であり、*Lb. sakei* と考えられているがその詳細は不明であった。そこで、市販のスターターカルチャー D-1001 株の菌体破砕液を、MALDI-MS により測定した。ここで観測されたピークを、全ゲノム解読株 *Lb. sakei* 23K の翻訳アミノ酸配列から算出した計算質量と比較した。その結果、33 種類のリボソームサブユニットタンパク質が帰属されたため、D-1001 株は確かに *Lb. sakei* であると考えられた。なお、D-1001 株の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析も行ったが、全ゲノム解読株 *Lb. sakei* 23K と完全に一致した。この結果からも、D-1001 株が *Lb. sakei* であると考えられた。

次に、D-1001 株とその類縁菌として単離された低温増殖能をもつ 15 株について MALDI-MS により解析を行った。D-1001 株でリボソームサブユニットタンパク質として帰属されたピークから、比較的強いピーク強度で観測された 16 種類をバイオマーカーとして選択した。15 株の菌体破砕液を測定して観測ピークがバイオマーカーと一致するかを調べて、前述の *Ps. putida* と同様に分類を行ったところ、四つのグループに分かれた。また、この分類結果から、スターターカルチャー D-1001 と最も系統が離れていると判断された株について、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析を行った。その結果、その菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列は、D-1001 と完全に一致した。これにより、生化学的特徴から *Lb. sakei* であると予測されていた低温増殖性の単離株 15 株がすべて *Lb. sakei* であることが示された。また、リボソームタンパク質をバイオマーカーとした系統分類法の分類解像度は 16S rRNA 遺伝子を用いる配列解析よりも高いことがわかった。

リボソームタンパク質を指標としたバクテリアの分類・同定手法は、迅速簡便な解析が可能であるため、食品開発の現場において、有用バクテリアのスクリーニングに有効な手段になりうると考えられた。

4.4 ゲノム情報を使わない株レベルでの系統分類への応用¹¹⁾

これまで述べてきたように、全ゲノム解読された菌株では、翻訳アミノ酸配列情報に基づきタンパク質の計算質量

Fig. 3. Phylogenetic trees of *Rh. erythropolis* strains based on ribosomal protein matching profiling by MALDI-MS (a) and *gyrB* sequences (b).

を算出できる。この計算質量を用いてマスペクトル上のピークを帰属することにより、信頼性の高いバクテリアの分類・同定ができる。しかしながら 2011 年 2 月 3 日の時点で、全ゲノムが解読されて GenBank などの DNA 塩基配列データベースに登録されている全ゲノム解読結果は、ドラフトを含めても 2508 株にすぎない²¹⁾。この数は、われわれが認識できているバクテリアのごく一部である。また、各バクテリア種について分類学的な基準株 (type strain) が定められているが、必ずしも基準株の全ゲノム解読が行われているとは限らない。そこで筆者らは、翻訳アミノ酸配列情報を一切使わず、基準株の精製リボソームタンパク質を MALDI-MS により測定して、その観測ピー

クからバイオマーカーを選択する方法により、抗菌活性に特徴がある *Rh. erythropolis* の系統分類を試みた。

抗菌活性の特徴から三つのグループに分類される 15 株と、抗菌活性をもたない分類学的基準株を含む 6 株から構成される合計 21 株の *Rh. erythropolis* を分類した。本研究では、分類対象の全バクテリア試料についてリボソームタンパク質の精製を行うのは煩雑であるため、基準株 *Rhodococcus (Rh.) erythropolis* JCM 3201^T について精製リボソームタンパク質と菌体破砕液のマススペクトルを比較して、両者で明瞭に観測されているピーク 30 本をバイオマーカーとして選択した。そして、各試料の菌体破砕液のマススペクトルにおいて、バイオマーカーピークと同じ m/z 値にピークが観測されているかどうかを調べて前述と同様な手法で樹形図を作成した。このようにして得られた分類結果 (a) と、*gyrB* に基づく系統分類結果 (b) を Fig. 3 に示す。このように分類した結果、抗菌活性をもつ 15 株は三つのグループに分けられた。そして、これらのグループは抗菌活性の特徴に基づく分類に一致した。さらに、抗菌活性をもたない 6 株は、抗菌活性をもつ菌群と比較的に近いグループと、これらと離れた基準株を含むグループの 2 グループに分けられた。この分類構造は、*gyrB* の塩基配列解析による系統分類結果と類似していた。これらの結果から、本手法を用いて株レベルの系統分類をできることが示された。また、各グループを識別する解像度は、*gyrB* の塩基配列解析法よりも MALDI-MS を用いたほうが高いことがわかった。ここでは、遺伝子情報を一切使わずに分類を行ったが、精製リボソームタンパク質の観測ピークからバイオマーカーを選択した。このため、単なる指紋判定法とは大きく異なる分類手法であるといえる。

なお、これらの試料に対し 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析に基づく分類も試みたが、抗菌活性を示す 15 株間の塩基配列は完全に一致し、株の違いを識別することができなかった。また、*gyrB* の塩基配列解析では、菌株間の塩基配列では 99.5% 一致した。このため、ポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) や塩基配列解析の小さなミスが、大きく分類結果を左右するリスクがある。これに対し、本手法ではスペクトルに明確な違いが得られており、解析結果の信頼性が高いと考えられる。

5. 遺伝子を用いる方法との比較

ここでは、遺伝子を用いたバクテリアの解析手法として、主に種レベルの分類・同定に用いられている 16S rRNA 遺伝子解析法、株レベルの分類手法として電気泳動ゲル上で遺伝子断片の数や移動度を解析する制限酵素断片多型 (restriction fragment length polymorphism: RFLP) 法²²⁾、複数遺伝子の差異をパターン化する方法 (multilocus sequence typing: MLST)²³⁾、および分子進化速度が速い特定の遺伝子の塩基配列を解析する方法²⁴⁾について、簡単に説明するとともに MALDI-MS による方法との比較を行う。

5.1 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析による種レベルでの解析方法

多様性に富むバクテリア菌体の構成成分を分析する化学分類法は、1970 年代後半に発展した。この化学分類法では、細胞壁を構成するペプチドグリカンの組成、呼吸鎖酵素キノンの分子種、細胞壁の脂質の種類、および DNA のグアニン・シトシンの含量などを分類指標としている。しかし、どの方法にも分類適用範囲があるため、すべてのバクテリアを完全に分類することはできない²⁵⁾。これに対し、分子進化学的な立場で分類する系統分類法が必要となるなか、Wose²⁶⁾ は 1980 年代から 16S rRNA 遺伝子の塩基配列に基づく系統的な分類体系を構築した。この手法は、バクテリアの分類に広く用いられるようになった。

16S rRNA 遺伝子の進化速度は比較的遅く、高等生物の 18S rRNA 遺伝子と 2 次構造が似ている。このため、16S rRNA 遺伝子の塩基配列を用いて系統解析を行えば、生物全体の進化距離を比較できる。また 16S rRNA 遺伝子には保存性の高い保存領域と比較的変化に富んだ可変領域がほどよく混在しているため、PCR 法で DNA を増幅する際に、保存領域を標的としたプライマー設計を行えば菌種にかかわらず全領域の増幅が可能である。このため、遺伝子配列解析技術の進歩と相まって、低コストかつ高いスループットで比較的簡単に配列解析ができる。このようなことを背景に、現在は約 7,000 種のバクテリアについて、16S rRNA 遺伝子の塩基配列がデータベースに登録されている。これらの結果、分類・同定したい菌株の 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定して系統解析を行えば、その菌体がどの属に所属して、どの種と類縁関係にあるのかを容易に推定できるようになった。ただし、16S rRNA 遺伝子は、同種内の類縁性を比較できる分類解像度はないため、株レベルでの分類には適用できない²⁷⁾。

5.2 遺伝子を用いた株レベルでの分類方法

5.2.1 RFLP 法

制限酵素によって切断した DNA 断片 (フラグメント) をゲル電気泳動で分離し、その泳動パターンから菌株を識別する手法である。巨大な DNA 断片をゲル電気泳動により分離するために、パルスフィールド電気泳動法 (pulsed-field gel electrophoresis: PFGE)²⁸⁾ がよく利用される。PFGE では、2 方向からのパルス電圧印加により、巨大な DNA 分子の三次構造がほぐされるとともに、方向転換されながら移動する。このため、通常のゲル電気泳動では分離ができないような 2 万塩基を超える大きな DNA 断片であっても解析できる。PFGE 法は、食中毒の集団感染が発生した場合の疫学的解析にも用いられており、分類のゴールドスタンダードといわれている。しかし、操作が煩雑であるうえ、解析に長時間を要するという課題がある。また、解析対象となるフラグメントについて、バンドの濃さの閾値や移動度のわずかな違いを判断する際に個人差が生じるため、再現性を確保することが容易でない²⁹⁾。そのため、遺伝子塩基配列とは異なり、国際的な情報共有が困難という課題がある。さらに、フラグメントのサイズが同一でも遺伝子が

同一とは限らないために、本質的に株間の進化的距離は解析できない。このため、系統分類には向いていない²⁹⁾。

5.2.2 MLST 法

MLST 法では、解析対象である試料菌株について、それぞれ通常 7 以上のハウスキーピング遺伝子において、多様性が見られる決まった範囲 400~600 塩基の配列解析を行う。この塩基配列と、登録されている配列パターンを比較して、試料菌株の塩基配列をパターンに基づき数値化する。MLST 法では、数値化した配列パターンから系統樹を作成するために、配列そのものから系統樹を作成する従来の系統分類法とは異なる。ここで、塩基配列の差異を評価する際に、配列の違いが多いか少ないかは問わないことが特徴である。たとえば、A 株、B 株、C 株の間で、ある遺伝子配列が A 株と B 株間で 1 塩基、A 株と C 株で 10 塩基の差異があった場合、A、B、C 株の差異は均等に取り扱われる³⁰⁾。これは、バクテリアの遺伝子に、点変異だけではなく、大きな遺伝子断片の相同組み換えも起きることを考慮したものである^{31)~33)}。複数の遺伝子領域について、各塩基配列が全く同じであるかに基づき分類することで、進化的時間軸を正しく反映した系統分類結果が得られると考えられる³⁰⁾。

MLST 法は、配列データを世界中で共有して比較できることが大きなメリットである。一方、本法では基本的にハウスキーピング遺伝子が用いられるが、これらの遺伝子の進化速度は比較的遅いため、類縁性が高い菌株の識別解像度が低くなるという課題がある³⁴⁾。そのため、病原菌などの類縁性が高い株の識別を目的とする場合には、ハウスキーピング遺伝子ではなく、変異の多い病原遺伝子を用いる場合もある³⁵⁾。なお、塩基配列決定の自動化が進んでいるとはいえ、塩基配列の解読には相当な手間、時間、そしてコストがかかる¹⁾。

5.2.3 進化速度の速い遺伝子の塩基配列解析に基づく分類法

バクテリアを亜種あるいは株レベルで分子系統分類するために、進化速度が 16S rRNA 遺伝子よりも速いハウスキーピング遺伝子の塩基配列を解析する方法が提案されている。遺伝子としては、*gyrB*^{36), 37)}、RNA ポリメラーゼ σ^{70} 因子遺伝子 (*rpoD*)³⁸⁾、シャペロンタンパク質 DnaJ 遺伝子 (*dnaJ*)³⁹⁾ などが用いられている。本研究においても、MALDI-MS を用いた解析結果を *gyrB* の塩基配列を用いた結果と比較してきたように、近年よく用いられる手法になっている。しかし現時点では、これらがすべてのバクテリアの系統分類に適用できるかどうかについては明らかになっていない。今後の実用化に向けて、データの蓄積、遺伝子配列の比較、あるいは保有する遺伝子群により菌種を決定するための信頼度の高い分類体系の構築などが期待されている⁴⁰⁾。

5.3 MALDI-MS を用いる解析手法と遺伝子を用いる解析手法の比較

すでに述べたように、遺伝子解析により株レベルの分類をすることも可能となってきた。しかしながら、さまざま

な課題が存在している。RFLP 法では、世界的な情報共有が困難である。MLST 法や遺伝子の塩基配列に基づく分類法では、世界中で共有できるデータベースを構築できるが、すべてのバクテリアの系統分類に用いられる統一的な指針がない。また、これらの手法においては、解析に時間や手間がかかる。このため、遺伝子を用いる株レベルの解析は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析とは異なり、誰にでも低コストで簡便かつ短時間でできるわけではない。

また、16S rRNA 遺伝子を含めて遺伝子の塩基配列解析を行うすべての手法では、配列解析の前に PCR 法により DNA を数万倍に増幅する。ここでは、汚染された試薬や実験環境からの DNA 混入、および試料間での DNA 混入などによるクロスコンタミネーションの可能性がある¹⁾。また、塩基配列解析の精度は非常に高いものの、配列解析を誤る可能性は残る。このような原理的な課題の解決は容易でない。

これに対して、リボソームタンパク質をバイオマーカーとした MALDI-MS によるバクテリアの解析には下記のメリットがある。

- 1) バクテリアが生合成したタンパク質を直接分析するため、遺伝子の塩基配列解析法のように PCR 法による分析対象物の増幅や配列解析を行う必要がない。このため、本稿でこれまで述べてきたように、信頼性が高い解析結果が得られる。
- 2) 測定結果は、遺伝子の塩基配列解析の場合と同様にデータベース化することが可能であり、国際的に情報を共有できる。
- 3) 前処理に特別な装置や試薬を使わず、簡単に高いスループットで解析できる。
- 4) 筆者らが開発した手法により、株レベルの系統分類にも適用できる。
- 5) 常にリボソームタンパク質を解析対象とするため、使用する試薬の種類や試料調製法が共通である。このため、菌種にかかわらず、基本的に同じ条件で解析が行える。これは、菌種の同定を行う場合も、株レベルの系統分類を行う場合も同じである。

このようなメリットがある一方で、株が異なっているもリボソームサブユニットタンパク質のアミノ酸配列が全く同じこともあると予測される。この場合、異なる株を識別することは原理的に不可能である。このようなデメリットも存在するため、本手法が遺伝子の塩基配列解析法に取って代わることはないであろう。しかしながら、前述したさまざまなメリットがあるために、今後の研究により分類できる適用範囲を明らかにし、かつ、データベースを整備することにより、遺伝子解析法と相補的に用いられる優れた手法になりうると考えられる。

6. 展 望

バクテリアの分類・同定を行う解析手法全般に求められる要件として、①解析対象が生物全体に共通で適用範囲が広いこと ②試料に含有するすべてのバクテリアを解析で

きてそれぞれの数を把握できること ③新種や類縁性の高いものを検出できること ④スループットが良いこと ⑤安価に解析できること ⑥解析結果を迅速に処理できること、および⑦定期的に更新される共有データベースに解析結果を登録できることなどが挙げられる¹⁴⁾。リボソームタンパク質をバイオマーカーとする本手法は、リボソームタンパク質という生物に普遍的に存在する成分が解析対象であり、あらゆるバクテリアの系統分類に適用できる可能性がある。また、これまで述べてきたように、本手法はバクテリアを株レベルで系統分類できる解像度を有しており、類縁性の高い菌の識別も可能であろう。さらに、進化速度が異なる複数のリボソームタンパク質をバイオマーカーとして同時に用いることから、1回の測定で属や種レベルから株レベルまでの分類を行うことができるようになるものと期待される。質量分析装置本体は数千万円オーダーと高価であるが、スループットは非常に高く、試薬は安価であるため、総合的には安価な解析手法といえる。また、リボソームタンパク質のマスマスペクトルにおいて、ピークの強度情報は使わず位置情報(観測質量)のみを使うために、基本的に解析は容易である。

今後、本稿で紹介したような信頼性が高い株レベルの系統分類に適用できるデータベースを作成することにより、現在の16S rRNA 遺伝子を用いる方法と同様に、誰もが利用できる非常に便利な分類・同定法になると予測される。データベースには、翻訳アミノ酸配列から予測されるリボソームサブユニットタンパク質の計算質量、観測質量、あるいはマスマスペクトルなどを蓄積する。このようなデータベースが構築されれば、新種であるかどうか也容易に判定できるであろう。以上のように、リボソームタンパク質をバイオマーカーとしたMALDI-MSによるバクテリアの解析法は、潜在的に非常に優れた分類手法であると考えられる。

7. おわりに

本稿では、筆者らが取り組んできたMALDI-MSによるバクテリアの分類・同定法開発について、遺伝子の解析を行う方法と比較しながら述べた。リボソームタンパク質をバイオマーカーとして用いることにより、信頼性の高い解析結果が得られる。現在、バクテリア種の決定や種レベルでの分類は、16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析により、比較的容易にしかも低コストで行える。しかし、同種のバクテリアを識別して株レベルで系統分類することは、現在においても容易とはいえない。今後も、遺伝子解析技術は発展を続け、高速化とコストダウンは進むと期待できる。しかし、遺伝子解析と並行して、MALDI-MSにより観測されるリボソームタンパク質を解析すれば、より信頼性の高い分類結果が得られる。これに加え、形態観察や生理・生化学的特性の分析を行うことで、バクテリアをより深く理解できるようになるのではないだろうか。

謝 辞 本稿は、筆者が(独)産業技術総合研究所および(財)日本産業技術振興協会の専門技術者育成事業の一環で行ってきたMALDI-MSによる細菌の迅速同定および分類手法の開発に関する研究を中心にまとめたものです。熱心に研究指導してくださいました先生方ならびに共同研究者各位に感謝いたします。こうした一連の研究成果に対し、2010年度の日本質量分析学会奨励賞に推薦してくださいました理化学研究所の中村健道先生に、深く感謝申し上げます。

文 献

- 1) 大楠清文, 江崎孝行, 臨床と微生物, **31**, 610 (2004).
- 2) F. J. Pineda, M. D. Antoine, P. A. Demirev, A. B. Feldman, J. Jackman, M. Longenecker, and J. S. Lin, *Anal. Chem.*, **75**, 3817 (2003).
- 3) L. Sun, K. Teramoto, H. Sato, M. Torimura, H. Tao, and T. Shintani, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3789 (2006).
- 4) 寺本華奈江, 孫 麗偉, 佐藤浩昭, 鳥村政基, 田尾博明, 新谷智吉, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **56**, 1 (2008).
- 5) 寺本華奈江, 佐藤浩昭, 孫 麗偉, 鳥村政基, 田尾博明, 分析化学, **55**, 987 (2006).
- 6) 孫 麗偉, 寺本華奈江, 鳥村政基, 佐藤浩昭, 田尾博明, 分析化学, **56**, 1071 (2007).
- 7) 寺本華奈江, 佐藤浩昭, 孫 麗偉, 鳥村政基, 田尾博明, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **55**, 209 (2007).
- 8) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, and H. Tao, *J. Proteome Res.*, **6**, 3899 (2007).
- 9) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, H. Yoshikawa, Y. Hotta, A. Hosoda, and H. Tamura, *Anal. Chem.*, **79**, 8712 (2007).
- 10) 寺本華奈江, 佐藤浩昭, 孫 麗偉, 鳥村政基, 田尾博明, 和栗伸伍, 林 利哉, 芳賀聖一, 分析化学, **56**, 1063 (2007).
- 11) K. Teramoto, W. Kitagawa, H. Sati, M. Torimura, T. Tamura, and H. Tao, *J. Biosci. Bioeng.*, **108**, 348 (2009).
- 12) 寺本華奈江, 佐藤浩昭, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **56**, 83 (2008).
- 13) 石田康行, *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 108 (2003).
- 14) S. Sauer and M. Kliem, *Nature Rev. Microbiol.*, **8**, 74 (2010).
- 15) C. Fenselau and P. A. Demirev, *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 157 (2001).
- 16) P. A. Demirev, Y. P. Ho, V. Ryzhov, and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **71**, 2732 (1999).
- 17) P. A. Demirev, J. S. Lin, F. J. Pineda, and C. Fenselau, *Anal. Chem.*, **73**, 4566 (2001).
- 18) Y. Q. Dai, L. Li, D. C. Roser, and S. R. Long, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **13**, 73 (1999).
- 19) R. D. Holland, C. R. Duffy, F. Rafii, J. B. Sutherland, T. M. Heinze, C. L. Holder, K. J. Voorhees, and J. O. Lay, *Anal. Chem.*, **71**, 3226 (1999).
- 20) D. B. Wall, D. M. Lubman, and S. J. Flynn, *Anal. Chem.*, **71**, 3894 (1999).
- 21) <http://img.jgi.doe.gov/cgi-bin/pub/main.cgi>
- 22) M. Vaneechoutte, *Mol. Biotechnol.*, **6**, 115 (1996).
- 23) M. C. J. Maiden, J. A. Bygraves, E. Feil, G. Morelli, J. E. Russell, R. Urwin, Q. Zhang, J. Zhou, K. Zurth, D. A. Caugant, I. M. Feavers, M. Achtman, and B. G. Spratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **95**, 3140 (1998).
- 24) D. M. Olive and P. Bean, *J. Clin. Microbiol.*, **37**, 1661 (1999).
- 25) 大楠清文, 江崎孝行, *Sysmex Journal Web*, **10**, 1 (2009).
- 26) C. R. Wose, *Microbiol. Rev.*, **51**, 221 (1987).
- 27) K. H. Schleifer, *Syst. Appl. Microbiol.*, **32**, 533 (2009).

- 28) M. V. Olson, *J. Chromatogr.*, **470**, 377 (1989).
- 29) 大楠清文, 江崎孝行, 医学のあゆみ, **231**, 63 (2009).
- 30) 木村 凡, モダンメディア, **52**, 209 (2006).
- 31) R. Urwin and M. C. Maiden, *Trends Microbiol.*, **11**, 479 (2003).
- 32) J. M. Smith, C. G. Dowson, and B. G. Spratt, *Nature*, **349**, 29 (1991).
- 33) J. M. Smith, N. H. Smith, M. O'Rourke, and B. G. Spratt, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **90**, 4384 (1993).
- 34) A. C. Noller, M. C. McEllistrem, O. C. Stine, J. G. Morris, D. J. Boxrud, B. Dixon, and L. H. Harrison, *J. Clin. Microbiol.*, **41**, 675 (2003).
- 35) W. Zhang, B. M. Jayarao, and S. J. Knabel, *Appl. Environ. Microbiol.*, **70**, 913 (2004).
- 36) S. Yamamoto and S. Harayama, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 1104 (1995).
- 37) S. Yamamoto and S. Harayama, *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **48**, 813 (1998).
- 38) M. Lonetto, M. Gribskov, and C. A. Gross, *J. Bacteriol.*, **174**, 3843 (1992).
- 39) H. S. Liu, Y. Li, X. X. Huang, Y. Kawamura, and T. Ezaki, *Microbiol. Immunol.*, **47**, 859 (2003).
- 40) 大楠清文, 河村好章, 江崎孝行, 化学療法の領域, **21**, 323 (2005).

Keywords: MALDI-MS, Bacteria, Ribosomal protein, Phylogenetic classification, Housekeeping protein