

報 文

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
低温増殖性乳酸菌の迅速同定及び分類寺本華奈江¹, 佐藤 浩昭^{®1}, 孫 麗 偉¹, 鳥村 政基¹,
田尾 博明¹, 和栗 伸伍², 林 利 哉², 芳賀 聖一²

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) により観測されるリボソームタンパク質をバイオマーカーとした迅速分析法を用いて, *Lactobacillus sakei* であると考えられている市販の低温発酵乳酸菌スターター D-1001 株, 及び生化学的な特性が類似している低温下でも増殖可能な乳酸菌 15 菌株の同定・分類を試みた. 本研究に用いた 16 菌株の乳酸菌は, MALDI マススペクトルで観測されたりボソームタンパク質の観測質量から, いずれも *L. sakei* であることが示され, 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析の結果を支持した. 更にバイオマーカーとして選択したピークを用いて, 単離菌株の株レベルでの分類を試みた. バイオマーカーピークと同じ m/z 値に観測されているピークの有無を調べてクラスター解析を行った結果, 16 種類の乳酸菌を 4 つのグループに分類することができた.

1 緒 言

発酵ソーセージなどの発酵食肉製品は, 一般的に, スターターカルチャーが増殖しやすい 20~37℃ 前後で食肉を発酵させることによって製造されている¹⁾. しかし, この温度領域は, スターターカルチャーだけではなく, 他の有害微生物が繁殖しやすい温度でもある. そこで, 安全な発酵食肉食品を製造するために, 5℃ 程度の低温でも増殖できる乳酸菌をスターターカルチャーとして利用する発酵食品の研究開発が行われている¹⁾²⁾. このような研究では, 低温で増殖可能な微生物を単離培養し, それらの中から優れた菌株を選抜するとともに, それらの菌株の生化学的及び遺伝学的な特性を明らかにすることが重要である.

乳酸菌を簡易同定するために, 一般的にグラム染色, 形態観察, グルコースから生成した乳酸の旋光性試験などが行われている³⁾⁴⁾. また, 現在では 16S rRNA 遺伝子の塩基配列解析が, 「属 (genus)」や「種 (species)」の位置づけには非常に有効な手法として一般的に行われるようになっている⁵⁾. 乳酸菌を種レベルよりも更に下位階層の「株 (strain)」レベルで簡易に識別するために, 糖類発酵性試験やリトマスミルク試験などの生化学的試験が主に行われている⁶⁾. しかし, 一般的に生化学試験は, 培養条件や菌株の状態の影響を強く受けやすく, しかも試験結果の判定

が測定者に依存しがちであるため, 再現性に乏しいという問題も指摘されている. 以上のように, 現状では日常的な作業として迅速かつ正確に微生物を株レベルで識別・分類できる手法は, 確立されているとは言い難い.

最近, 菌体の主要な構成タンパク質であるリボソームタンパク質群を, 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) により測定し, その発現タンパク質群の観測質量を手掛かりにして微生物を迅速に同定する手法が提案されている⁷⁾. リボソームタンパク質は, 約 50 種類のサブユニットタンパク質群から構成されており, あらゆる生物に存在する典型的なハウスキーピングタンパク質である. 現在, ゲノム解読された約 600 株以上の微生物について, リボソームタンパク質のアミノ酸配列情報が Swiss-Prot などのタンパク質データベースに収録されており, そのアミノ酸配列情報から, それぞれのリボソームサブユニットタンパク質の質量を計算により推測することができる⁸⁾. そこで, MALDI-MS で観測されるリボソームタンパク質の質量を, アミノ酸配列から計算される質量と比較することにより, 微生物の「種 (species)」を同定することが可能となる⁷⁾. その質量は, 基本的には培養条件や菌株の状態の影響を受けて変化することがなく, MALDI-MS により数 Da 以内の高い精度で測定することができるため, この方法による同定結果には高い信頼性が期待できる. 実際には翻訳後修飾などのためにすべてのリボソームサブユニットタンパク質の観測質量が計算質量と一致するわけではない. そこで著者らは, ゲノム解読された微生物のリボソームタンパク質の発現分子量に関するキャラクタ

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

² 名城大学農学部応用生物化学化食品機能学研究室: 468-8502 愛知県名古屋市中天白区塩釜口 1-501

リゼーションを行い、リボソームサブユニットタンパク質群の中で、微生物種の同定に適したバイオマーカーを選択する指針を提案した⁹⁾。更に、約 50 種類のリボソームサブユニットタンパク質には、種レベルでアミノ酸配列が保存されているものと、株レベルでアミノ酸配列に変異が生じやすいものが混在していることに注目し、各サブユニットタンパク質の発現質量の差異に基づいて微生物を株レベルで系統分類する手法を提案した¹⁰⁾。

本研究では、*Lactobacillus sakei* と考えられ、日本国内で唯一市販されている食肉用低温発酵乳酸菌スターチャー¹⁾、及び低温の食肉中でも増殖能を有する類縁の 15 種類の単離菌株について、リボソームタンパク質をバイオマーカーとした MALDI-MS による種レベルでの同定及び株レベルでの分類を試みた。

2 実 験

2.1 微生物試料

試料には、サンエイ糖化(株)より提供された、低温下の食肉中で良好な増殖性と抗菌性を示す市販の乳酸菌スターチャー D-1001 株¹⁾と、生化学的な特性が D-1001 株と類似している 5℃ で増殖可能な 15 種類の単離菌株 (PCT-1~15, 清酒醸造工程より単離) を使用した。これらの菌株は、既報¹¹⁾¹²⁾と同様に、乳酸菌の培養に適した de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 液体培地を用いて 30℃ で 18 時間培養した。これら 16 菌株の簡易同定試験は、乳酸菌実験マニュアル³⁾に従った。乳酸旋光性試験は、大塚らの方法⁴⁾に準じて行った。更に、16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列約 500bp を(株)テクノスルガ・ラボ¹³⁾に依頼して解読した。

2.2 菌体破碎液の調製

培養した各菌株は、既報⁹⁾¹²⁾と同様に、TMA-I 緩衝液 {10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 30 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, 6 mM 2-メルカプトエタノール} を用いて遠心洗浄した後、ジルコニアシリカビーズを用いて破碎し、ビーズと細胞断片を遠心分離した上澄みを菌体破碎液とした。

2.3 MALDI-MS による単離菌株の分析

マトリックス剤にはシナピン酸を用い、その 10 mg を 1% (v/v) トリフルオロ酢酸 (TFA) を含む 50% (v/v) 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。容量 0.5 mL のプラスチックチューブに、マトリックス溶液 7 µL, 内部標準試薬及び菌体破碎液それぞれ 1 µL を加え、よく攪拌した後に、その 1.0 µL (菌体数として約 1×10^7 個に相当) をステンレス鋼製の試料プレートに滴下して風乾した。

MALDI-MS 測定は、N₂ レーザー (波長 337 nm, 周波数 10 Hz, パルス幅 3 ns) を備えた飛行時間型質量分析装置

(AXIMA-CFR plus, 島津製) を用いて行った。マスペクトルは、正イオンリニアモード (飛行長 1.2 m) を用いて観測した。マスペクトルの質量校正は、ミオグロビンの [M+H]⁺ (m/z 16952.6) 及び [M+2H]²⁺ (m/z 8476.8), 及び副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 断片 18-39 の [M+H]⁺ (m/z 2465.7) の各ピークを用いて内部標準法により行った。

各ピークの m/z 値は、3 回の繰り返し測定によって求めた。

2.4 デンドログラムの作成

MALDI マスペクトルに基づく分子系統解析は、BioNumerics ソフトウェア (ver. 3.5, Applied Maths) を用い、非加重結合法 (UPGMA) 法によるクラスター解析によってデンドログラムを作成した。

3 結果と考察

3.1 簡易同定試験

本研究で使用した 16 菌株が、スターチャーとして用いることができる乳酸菌であるか調べるために、生化学的な簡易同定試験を行った。Table 1 に、生化学的な簡易同定試験の結果をまとめて示す。今回解析した 16 菌株は、すべて通性嫌気性のグラム陽性桿菌で、長さ約 2 µm で単独もしくは短連鎖を形成し、運動性を有さず、芽胞を形成せず、グルコースから多量の乳酸を生成し、カタラーゼ陰性であることから、少なくとも *Lactobacillus* 属の乳酸菌であると判断された。

3.2 市販スターチャーカルチャー D-1001 株のキャラクタリゼーション

本研究で用いた市販の食肉発酵用スターチャーカルチャー D-1001 株は、簡易同定試験の結果から *L. sakei* である可能性が高いと報告されている¹⁾。更に、本研究で 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列 (560 bp) を解読し、相同性解析を行った結果、解読できた塩基配列はゲノム解読株 *L. sakei* 23K と完全に一致したことから、D-1001 株は *L. sakei* であると考えられた。

リボソームタンパク質をバイオマーカーとする MALDI-MS を用いた同定法が、簡易同定試験¹⁾及び 16S rRNA 遺伝子の相同性解析による同定結果を支持するか検証を試みた。同定の基準となるゲノム解読株 *L. sakei* 23K¹⁴⁾の各リボソームサブユニットタンパク質の翻訳アミノ酸配列を、タンパク質データベースである Swiss-Prot¹⁵⁾より入手し、N 末端メチオニン切断 (基本的に 2 番目のアミノ酸残基が A, C, G, P, S, T, 及び V のときに起こる) を考慮して、MALDI マスペクトル上で観測されるプロトン化分子 ([M+H]⁺) の計算質量を求めた⁸⁾。そして、各計算質量を、D-1001 株の菌体破碎液を MALDI-MS により測定

Table 1 Morphology and biochemical properties of psychrotrophic bacteria samples

	D-1001	PCT-1	PCT-2	PCT-3	PCT-4	PCT-5	PCT-6	PCT-7	PCT-8	PCT-9	PCT-10	PCT-11	PCT-12	PCT-13	PCT-14	PCT-15
Cell form	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
Cell size/ μm	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5	1.8~2.5
Gram staining	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mobility	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Optical form	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL	DL
Glucose assimilation	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

して求められた観測ピークの質量と比較して、各観測ピークを帰属した。Fig. 1 に D-1001 株の菌体破砕液の MALDI マススペクトルと各ピークの帰属結果を示す。また、Table 2 に、D-1001 株で帰属されたりボソームサブユニットタンパク質について、アクセッション番号、計算質量、平均観測質量、誤差、N 末端側の 2 番目のアミノ酸残基、及び N 末端メチオニン切断の有無をまとめて示す。その結果、D-1001 株では 33 種類のリボソームサブユニットタンパク質の質量が、ゲノム解読株 *L. sakei* 23K のものと一致した。

著者らはこれまでに、ゲノム解読された乳酸菌 *L. plantarum* NCIMB 8826 や *S. thermophilus* ATCC BAA-250 及び BAA-491 などの精製リボソームタンパク質を MALDI-MS を用いて解析し、発現タンパク質の観測質量に基づいておよそ 40 種類のリボソームサブユニットタンパク質が帰属されることを報告した⁹⁾¹⁶⁾。株レベルでのアミノ酸配列の変異がある程度起こりうることを考慮すると、33 種類ものリボソームサブユニットタンパク質の観測質量がゲノム解読株 *L. sakei* 23K のものと一致した結果は、D-1001 株が *L. sakei* あるいはそれと遺伝学的に極めて近縁の乳酸菌であることを示している。しかも、相同性解析を行った結果、いずれのリボソームサブユニットタンパク質についても、アミノ酸配列が完全に一致する他の菌株のデータは登録されていなかった。この結果は、生化学的な簡易同定試験¹⁾及び 16S rRNA 遺伝子の塩基配列の相同性解析により *L. sakei* であると考えられた結果を支持している。

3.3 単離菌株の分類

D-1001 株と生化学的な特性が類似していることを基準として単離された 15 菌株についても、同様に MALDI-MS により測定した結果、少なくとも 20 本以上のピークの m/z 値がゲノム解読株 *L. sakei* 23K のものと一致した。そのため、これらすべての試験菌株が *L. sakei* あるいはそれに極めて近縁の乳酸菌であると判断された。しかしながら、観測質量と計算質量が一致したりボソームサブユニットタンパク質の種類及び数は、菌株によって若干異なっており、株レベルでバリエーションがあることが示唆された。

そこで、これらの菌株について、リボソームサブユニットタンパク質の質量変異を指標とした分類を試みた。分類の基準となるバイオマーカーは、菌体破砕液であっても確実に高強度でピークが観測できるものを選択する必要がある。そのバイオマーカーには、D-1001 株の菌体破砕液を直接 MALDI-MS により測定し、 m/z 5000~20000 の範囲で観測されるリボソームサブユニットタンパク質の中から、比較的高強度で他のピークと重複していない 16 種類を選択した。Table 3 にバイオマーカーとして選択した

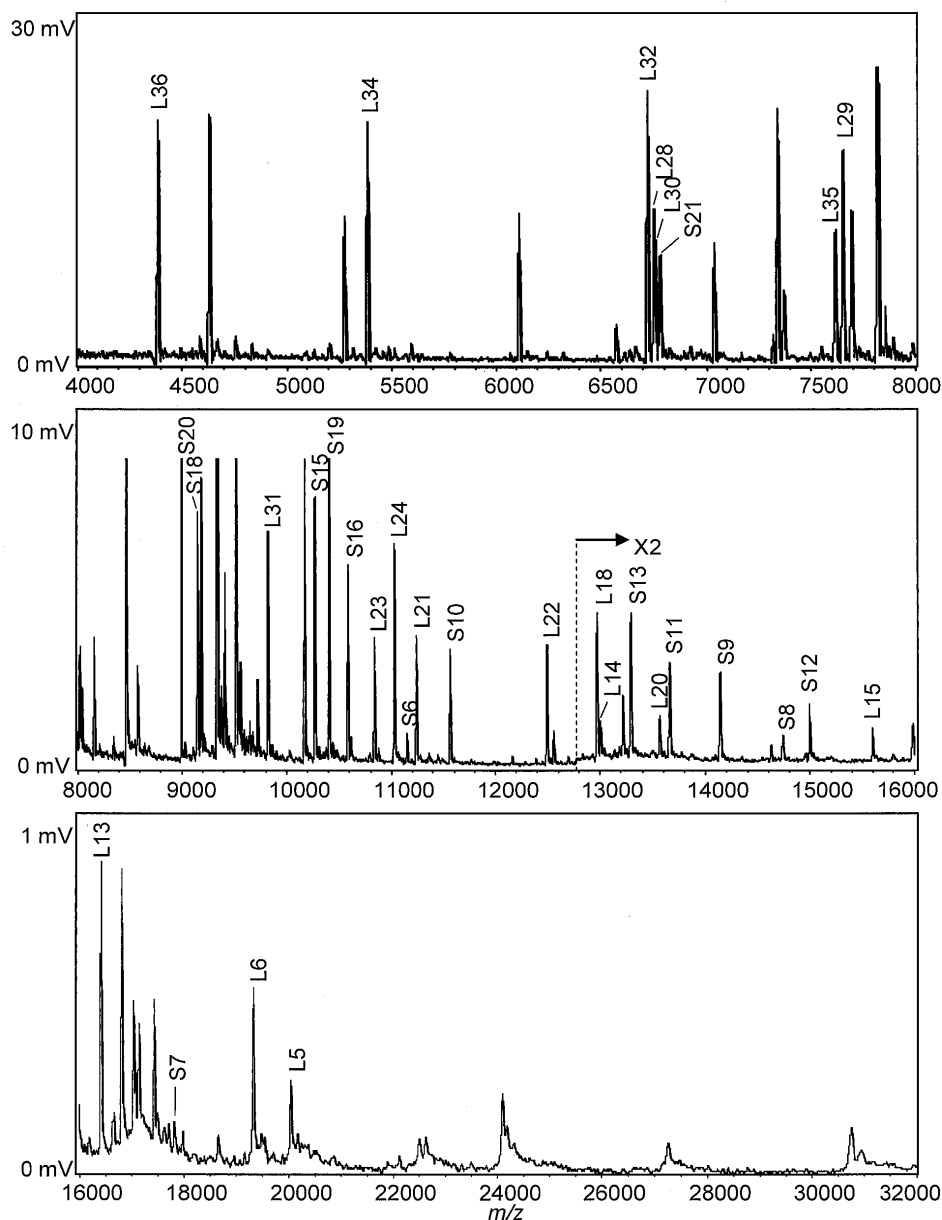


Fig. 1 MALDI mass spectrum and peak assignments of cell lysate of D-1001 strain

The mass spectrum is duplicated into three sets. The labels indicate the name of ribosomal subunit proteins.

16 種類のリボソームタンパク質の名称と、それらのアミノ酸配列の相同性が *L. sakei* 23K の次に高い微生物種の名称及びアミノ酸配列の相同性を示す。上述したように、これらのバイオマーカータンパク質について、アミノ酸配列の相同性解析を行い、いずれも 100% の相同性を示す菌株は *L. sakei* 23K のみであることを確認した。Table 3 に示した 16 種類のバイオマーカータンパク質の翻訳アミノ酸配列と相同性が 2 番目に高いものは、*Lactobacillus* 属、*Pediococcus* 属及び *Enterococcus* 属の 3 属 6 種にわたっており、相同性にも幅があった (64~96%)。このような相同性解析の結果は、アミノ酸配列の保存性がサブユニットタンパク質の種類の違いによって異なっていることを示している。これらのバイオマーカータンパク質を用いて *L.*

sakei と考えられる 16 菌株の株レベルでの分類を試みた。

Table 4 に、本研究に用いた 16 菌株について、16 種類のバイオマーカータンパク質と同じ m/z 値に観測されるピークの有無をまとめて示す。ここで、バイオマーカータンパク質とピークが一致したものを 1、ピークシフトが観測されたものを 0 で表記した。ピーク一致の有無を比較すると、12 種類のバイオマーカータンパク質 (L6, L13, L18, L22, L23, L24, L29, L31, S10, S11, S16 及び S19) は 16 菌株すべてで一致している。Table 3 に示すように、他の微生物では、これらのバイオマーカータンパク質と同一のアミノ酸配列を有するものは報告されておらず、この結果は、本研究に用いた 16 菌株がすべて *L. sakei* あるいは極めて近縁の乳酸菌であることを裏付けている。

Table 2 Assigned ribosomal subunit proteins for the cell lysate of D-1001 strain

Protein name	Accession number	Calculated mass		Observed mass	Error		2nd residue	Met. loss
		as molecule	as [M + H] ⁺		in Da	in ppm		
Large subunit proteins								
L5	Q38US4	20067.3	20068.3	20069.2	0.9	45	A	Yes
L6	Q38US6	19347.2	19348.2	19349.5	1.4	70	P	Yes
L13	Q38UV4	16442.9	16443.9	16443.2	−0.7	−42	V	Yes
L14	Q38US2	13020.1	13021.1	13020.3	−0.8	−62	A	Yes
L15	Q38UT0	15608.0	15609.0	15609.9	0.9	55	T	Yes
L18	Q38US7	12975.9	12976.9	12977.7	0.8	63	K	
L20	Q38VT4	13569.0	13570.0	13570.0	−0.1	−5	T	Yes
L21	Q38XV5	11249.0	11250.0	11250.0	0.0	3	L	
L22	Q38UR7	12498.5	12499.5	12499.0	−0.5	−39	K	
L23	Q38UR4	10843.6	10844.6	10844.3	−0.3	−24	A	Yes
L24	Q38US3	11033.8	11034.8	11034.7	−0.1	−6	E	
L28	Q38XS9	6755.0	6756.0	6755.8	−0.2	−28	S	Yes
L29	Q38US0	7656.9	7657.9	7658.3	0.5	61	A	Yes
L30	Q38US9	6768.0	6769.0	6769.5	0.5	69	A	Yes
L31	Q38V50	9827.9	9828.9	9829.2	0.3	28	K	
L32	Q38WU0	6724.7	6725.7	6725.7	0.0	1	T	Yes
L34	Q38UE3	5390.5	5391.5	5391.4	−0.1	−13	G	Yes
L35	Q38VT3	7623.9	7624.9	7624.6	−0.4	−48	S	Yes
L36	Q38UT4	4387.4	4388.4	4388.2	−0.3	−57	A	Yes
Small subunit proteins								
S6	Q38ZR8	11150.5	11151.5	11151.4	0.0	−2	F	
S7	Q38UQ8	17845.5	17846.5	17848.0	1.5	83	A	Yes
S8	Q38US5	14741.1	14742.1	14742.4	0.3	20	G	Yes
S9	Q38UV5	14140.4	14141.4	14140.8	−0.5	−39	K	
S10	Q38UR1	11564.5	11565.5	11565.5	0.0	−3	A	Yes
S11	Q38UT6	13663.6	13664.6	13665.4	0.8	57	P	Yes
S12	Q38UQ7	15004.4	15005.4	15005.9	0.5	31	S	Yes
S13	Q38UT5	13301.4	13302.4	13302.3	−0.2	−12	R	
S15	Q38WR4	10273.6	10274.6	10274.6	−0.1	−7	S	Yes
S16	Q38XR0	10584.3	10585.3	10585.4	0.1	6	Y	
S18	Q38ZR6	9152.7	9153.7	9153.3	−0.3	−37	I	
S19	Q38UR6	10411.9	10412.9	10411.4	−1.5	−142	P	Yes
S20	Q38WR3	8997.5	8998.5	8998.6	0.1	9	R	
S21	Q38XA7	6788.9	6789.9	6790.0	0.1	19	K	

Table 3 Selected biomarkers for classification of *L. sakei* strains and the bacteria names having 2nd homology of their amino acid sequences

Ribosomal protein name	Bacteria name	Homology, %
L6	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	79
L13	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	79
L18	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	80
L22	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	82
L23	<i>Lactobacillus reuteri</i> F275	78
L24	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745	75
L29	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	87
L31	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC118	87
S6	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC118	71
S9	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	83
S10	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	96
S11	<i>Enterococcus faecium</i> DO	85
S13	<i>Lactobacillus brevis</i> ATCC 367	83
S16	<i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334	84
S19	<i>Lactobacillus salivarius</i> subsp. <i>salivarius</i> UCC118	87
S20	<i>Lactobacillus reuteri</i> 100-23 and F275	64

Table 4 Binary biomarker matching table of *L. sakei* strains

Biomarkers	D-1001	PCT-1	PCT-2	PCT-3	PCT-4	PCT-5	PCT-6	PCT-7	PCT-8	PCT-9	PCT-10	PCT-11	PCT-12	PCT-13	PCT-14	PCT-15
L6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L13	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L18	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L22	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L23	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L24	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L29	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
L31	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 ^{b)}	0 ^{b)}	0 ^{b)}	0 ^{b)}	1	1	1
S9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 ^{c)}	0 ^{c)}	1	1	1
S10	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S11	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S13	1	1	1	1	1	1	1	0 ^{a)}	0 ^{a)}	1	1	1	1	1	0 ^{a)}	0 ^{a)}
S16	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
S20	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0 ^{d)}	0 ^{d)}

Approximate mass differences of observed peaks were a) + 14 Da, b) + 14 Da, c) + 14 Da, and d) + 16 Da.

一方, S6, S9, S13, 及び S20 は, 一部の菌株でアミノ酸配列の変異に基づくと考えられるピークシフトが観測された。更に, これらのうち S6 と S20 は, Table 3 に示すように, アミノ酸配列の保存性が特に低いサブユニットタンパク質であった。ピークシフトが観測された例として, D-1001, PCT-7, 及び PCT-15 の S20 及び S13 付近のマスペクトルを Fig. 2 に, D-1001, PCT-11, 及び PCT-13 の S6 及び S9 付近のマスペクトルを Fig. 3 に, それぞれ拡大して示す。興味深いことに, シフトしたピークの m/z 値は菌株が異なっても共通していた。この結果は, リボソームサブユニットタンパク質におけるアミノ酸残基の変異は任意に起こるのではなく, リボソームの機能を損なわない限定された変異のみが起こり得ることを示唆している。

次に, 各菌株間で一致したバイオマーカーを比較すると, *L. sakei* D1001 及び PCT-1~6 は, すべてのバイオマーカーが一致している。それ以外の 8 菌株 (PCT-7~15) では, 上記 4 種類のバイオマーカー (S6, S9, S13 及び S20) が 6 通りの組み合わせで異なっている。そこで, このようなプロファイルをクラスター解析により処理すれば, デンドログラムを作成することができる。

本研究では, クラスター解析でよく用いられる UPGMA 法, 完全連結 (complete-linkage) 法及び Ward 法により, Table 4 に示したバイナリ形式のデータを処理してデンドログラムを作成した。その結果, いずれの方法でも同様のグループが形成された。本研究でバイオマーカーとして用いた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, その変異は生物の進化系統を反映していると考えられている。そのため, ここでは進化系統を反映した有根系統樹を作成する場合に一般的に用いられる UPGMA 法を用いて得られたデンドログラムを Fig. 4 に示す。本研究に用いた *L. sakei* と考えられる 16 菌株は, 96% の類似性を境界とすると, 4 つのグループに分類することができた。Fig. 4 のデンドログラムで *L. sakei* D-1001 と最も遠い関係に分類されたグループ 4 の PCT-15 について, 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列 560 bp の解析を行ったところ, その塩基配列は D-1001 株と完全に一致した。この結果は, PCT-15 も *L. sakei* であることを支持しており, しかも 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列解析では *L. sakei* の株レベルでの分類は極めて困難であることを示している。すなわち, リボソームタンパク質を指標とする MALDI-MS による微生物分析法は, 種の同定のみならず株レベルでの分類にも有効な手法であることが示された。

4 結 言

本研究では, リボソームタンパク質をバイオマーカーと

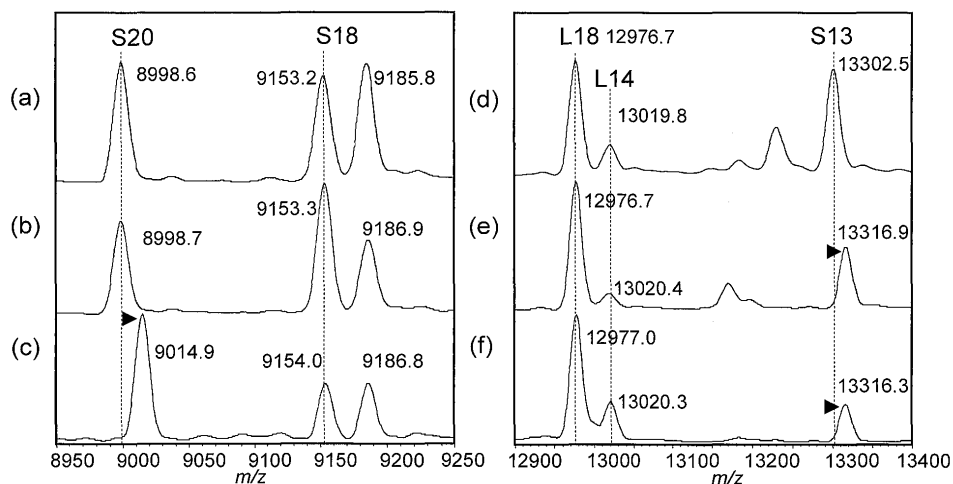


Fig. 2 Partial MALDI mass spectra of the cell lysate around S20 (left) and S13 (right) of *L. sakei* D-1001 (a) and (d), PCT-7 (b) and (e), and PCT-15 (c) and (f)

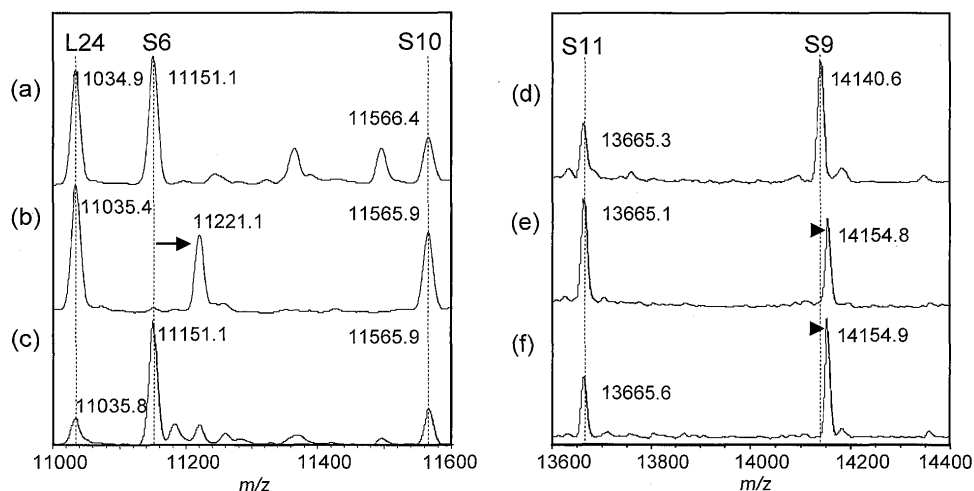


Fig. 3 Partial MALDI mass spectra of the cell lysate around S6 (left) and S9 (right) of *L. sakei* D-1001 (a) and (d), PCT-11 (b) and (e), and PCT-13 (c) and (f)

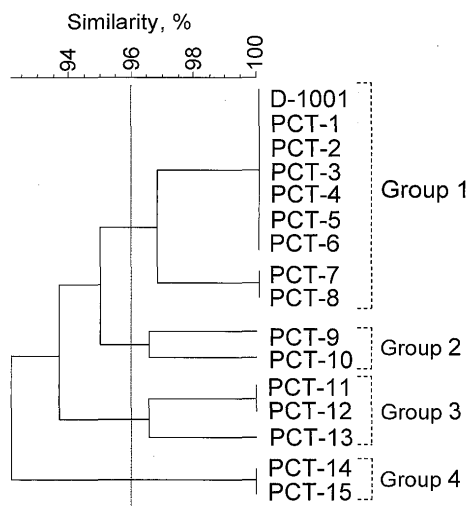


Fig. 4 Dendrogram of *L. sakei* strains based on the ribosomal protein profiling by MALDI-MS

して MALDI-MS を用いた菌体破碎液の直接分析により, 市販の *L. sakei* であると考えられているスターターカルチャー及び 15 菌株の低温増殖性微生物を種レベルで同定した. その同定結果は, 生化学的な簡易同定法や 16S rRNA 遺伝子の塩基配列による結果を強く支持した. 更にこれらの菌株を 4 グループに分類することができ, 株レベルでの特性化を行うことができた.

リボソームタンパク質をバイオマーカーにした MALDI-MS による微生物分析法は, ハウスキーピングタンパク質の質量の差異 (すなわちアミノ酸配列の変異) を手掛かりとした遺伝学的な根拠に基づく同定・分類結果を迅速に与えるため, 食品開発の現場などで優れた有用微生物のスクリーニングに有効な手段になり得るものと考えられる.

微生物菌株を提供してくださいました, サンエイ糖化糊に感謝します.

文 献

- 1) 加藤丈雄, 土井梅幸, 米山由紀子, 杉本勝之, 中村 良: 日本食品工業学会誌, **41**, 108 (1994).
- 2) 芳賀聖一: ミートジャーナル, **36**, 107 (1999).
- 3) 内村 泰, 岡田早苗: “乳酸菌実験マニュアル”, p. 34 (1992), (朝倉書店).
- 4) 大塚正盛, 岡田早苗, 内村 泰, 駒形和男: 生物工学学会誌, **72**, 81 (1994).
- 5) 河村好章: 感染症学会誌, **75**, 1003 (2001).
- 6) 柳田藤寿: “乳酸菌の科学と技術”, 乳酸菌研究集談会編, p. 16 (1996), (学会出版センター).
- 7) F. J. Pineda, M. D. Antoine, P. A. Demirev, A. B. Feldman, J. Jackman, M. Longenecker, J. S. Lin: *Anal. Chem.*, **75**, 3817 (2003).
- 8) 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 (2006).
- 9) L. Sun, K. Teramoto, H. Sato, M. Torimura, H. Tao, T. Shintani: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3738 (2006).
- 10) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, H. Yoshikawa, Y. Hotta, A. Hosoda, H. Tamura: *Anal. Chem.*, in press.
- 11) 孫 麗偉, 佐藤浩昭, 鳥村政基, 田尾博明, 新谷智吉: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **53**, 6 (2004).
- 12) 寺本華奈江, 佐藤浩昭, 孫 麗偉, 鳥村政基, 田尾博明: 分析化学 (*Bunseki Kagaku*), **55**, 305 (2006).
- 13) < <http://www.tecsrg-lab.jp/news/index.html> >.
- 14) S. Chaillou, M. C. Champomier-Vergès, M. Cornet, A. M. Crutz-Le Coq, A. M. Dudez, V. Martin, S. Beaufls, E. Darbon-Rongère, R. Bossy, V. Loux, M. Zagorec: *Nat. Biotechnol.*, **23**, 1527 (2005).
- 15) < <http://us.expasy.org/sprot/> >.
- 16) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao: *J. Proteome Res.*, **6**, 3899 (2007).

Rapid Identification and Classification of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

Kanae TERAMOTO¹, Hiroaki SATO¹, Liwei SUN¹, Masaki TORIMURA¹,
Hiroaki TAO¹, Shingo WAGURI², Toshiya HAYASHI² and Seiichi HAGA²

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

² Department of Applied Biological Chemistry, Faculty of Agriculture, Meijo University, 1-501, Shiogamaguchi, Tempaku-ku, Nagoya-shi, Aichi 468-8502

(Received 19 July 2007, Accepted 19 October 2007)

Psychrotrophic lactic acid bacteria strains potentially used for the fermentation of meat were characterized by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) using ribosomal proteins as biomarkers. The sample strains of a commercial starter culture (strain D-1001) and 15 similar strains were thought to be *Lactobacillus sakei*, based on their biochemical properties and the 16S rRNA partial gene sequence. By comparing the mass spectra of cell lysates to the calculated masses of ribosomal proteins of genome-sequenced *Lactobacillus sakei* 23K, all sample strains were definitely identified as *L. sakei*. Sample strains were further classified into 4 groups based on the mass differences of the 16 biomarkers selected from ribosomal subunit proteins, which could not be discriminated using the 16S rRNA partial gene sequence analysis.

Keywords : MALDI-MS; *Lactobacillus sakei*; psychrotrophic lactic acid bacteria; ribosomal protein; identification and classification of bacteria.