

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
火落ち菌の迅速同定孫 麗 偉¹, 寺本華奈江¹, 鳥村 政基¹, 佐藤 浩昭^{®1}, 田尾 博明¹

リボソームタンパク質をバイオマーカーとして利用する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) を用いた, 清酒を変敗させる微生物 (火落ち菌) の迅速同定法を開発した. 代表的な5種の火落ち菌 (*Lactobacillus fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans* 及び *L. rhamnosus*) から精製したリボソームサブユニットタンパク質群の MALDI-MS 測定を行い, m/z 6000~12000 の範囲で高強度に観測された 15 本のバイオマーカーピークを選択し, データベース化した. バイオマーカーピークの m/z 値には, それぞれの火落ち菌に固有であるものが含まれているため, それらに注目すれば, 各火落ち菌を迅速に同定することが可能になる. そこで, 実際に清酒醸造所で発生した火落ち菌の迅速同定に本法を適用した結果, MALDI マススペクトル上のピーク群の m/z 値から *L. paracasei* subsp. *paracasei* あるいは近縁の微生物であることが示唆された.

1 緒 言

乳酸菌の中には 12~16% のエタノールに耐性を有するものがあり, それらが清酒の貯蔵中で増殖すると清酒が白濁するとともに香りが損なわれ, 製品としての価値が失われる¹⁾. このような乳酸菌を「火落ち菌」と言い, 基本的に *Lactobacillus* 属の乳酸菌であり, 醸造現場でよく検出されるものとして *L. fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. paracasei* 及び *L. rhamnosus* が挙げられる. 清酒の品質管理及び汚染源の特定のために, 火落ち菌を迅速・簡便に識別あるいは同定して検出する手法の開発が望まれる.

火落ち菌の同定には, 火落ち菌抗体に対する抗原遺伝子²⁾や 16S rRNA 遺伝子と 23S rRNA 遺伝子のスペーサー領域³⁾の塩基配列に基づいた相同性解析が報告されている. 現在, 後者の技術を利用した火落ち菌検出キットも市販されている. しかしながら, 遺伝子解析に基づく方法は, 煩雑な前処理や数日程度の解析時間が必要である.

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) を用いて, あらゆる微生物菌体中に多量に存在するリボソームタンパク質のマススペクトルを観測し, その観測質量を元に微生物の種類を判定する方法が提案されている⁴⁾. リボソームタンパク質は, 50 種類程度のサブユニットタンパク質から構成され, 各サブユニットタンパク質は微生物の種類によってそれぞれ固有の質量を有している. 最近, 微生物のゲノム解読が急速に進んだこ

とから, 様々な微生物のリボソームサブユニットタンパク質群の翻訳アミノ酸配列情報をインターネットを通じて入手することができるようになってきた. そのため, 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)」の同定⁵⁾のみならず「株 (strain)」を迅速に識別することが可能となる^{5)~9)}. 著者らは, 全ゲノム解読された乳酸菌 *L. plantarum*⁵⁾, *L. bulgaricus* 及び *Streptococcus thermophilus*⁶⁾ を用いて, 微生物菌体からリボソームタンパク質群のピークを観測する条件を検討し, ピーズ破碎と遠心分離により得られる菌体破碎液でも, 各サブユニットタンパク質を主ピークとして観測できることを報告した. そして, この方法は, 保存菌株の雑菌汚染 (コンタミネーション) を判定する手法になり得ることを示した⁸⁾.

本研究では, 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を, 火落ち菌の迅速同定に応用することを試みた. 火落ち菌として知られる乳酸菌はゲノム解読情報が公開されていないため, これまでの研究のようにバイオマーカーとして用いるリボソームサブユニットタンパク質群の質量をアミノ酸配列から計算により推測することができない. そこで, 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碎液に共通して観測される MALDI マススペクトルのピークを調べ, 各火落ち菌に特有の m/z 値をまとめたデータベースを作成した. 更に, 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

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

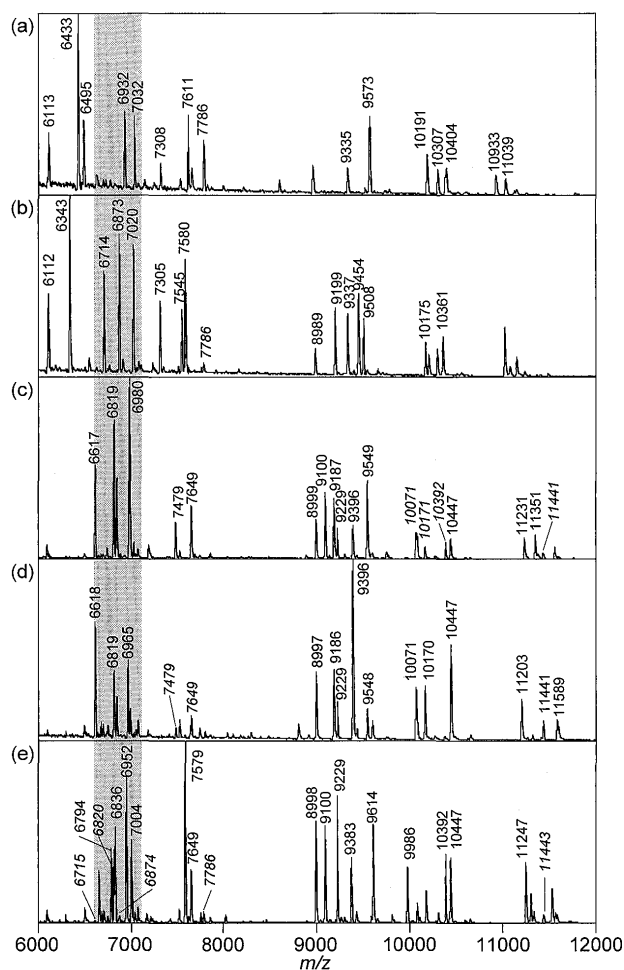


Fig. 1 MALDI mass spectra of isolated ribosomal proteins of hiochi bacteria

(a) *L. fructivorans* JCM 1117, (b) *L. hilgardii* JCM 1155, (c) *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1053, (d) *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171, and (e) *L. rhamnosus* JCM 1136

落ち菌の同定を試みた。

2 実験

2.1 火落ち菌試料

代表的な火落ち菌として知られる *Lactobacillus* 属の乳酸菌 5 種 (*L. fructivorans* JCM 1117, *L. hilgardii* JCM 1155, *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1053, *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171 及び *L. rhamnosus* JCM 1136) を理化学研究所から購入し、データベース作成用の参照試料とした。醸造現場では、貯蔵した清酒をフィルター沓過し、そのフィルターを培養に供することによって生菌増殖の有無を確認している。本研究では、国内酒造メーカーより提供された、メンブレンフィルター (直径 37 mm, ポアサイズ 0.45 μm , ADVANTEC) 上に捕集された火落ち菌を実試料として用いた。この火落ち菌の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列約 500 bp を (株) テクノスルガ・ラボ¹⁰⁾ に依頼し

て解読した。

購入した各火落ち菌の培養は、既報⁸⁾¹¹⁾と同様に乳酸菌の培養に適した de Man-Rogosa-Sharpe (MRS) 培地を用いて、37°C で 24 時間、液体培養により行った。メンブレンフィルター上に捕集された火落ち菌は、37°C で 72 時間、MRS 液体培地を用いて再培養した。

2.2 試料調製

培養した各火落ち菌は、既報⁵⁾⁶⁾⁸⁾と同様に、TMA-I 緩衝液 {10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 30 mM NH_4Cl , 10 mM MgCl_2 , 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。この菌体破碎液から、既報¹²⁾に従って超遠心法により、リボソームタンパク質を精製した。著者らはこれまでの研究^{5)~8)}で、この方法で精製された乳酸菌のリボソームタンパク質を MALDI-MS で測定し、マススペクトル上で観測されるピークのはほぼすべてがリボソームサブユニットタンパク質であることを確認している。

2.3 MALDI-MS 測定

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剤溶液とした。容量 0.5 mL のプラスチックチューブに、マトリックス剤溶液 7 μL と、内部標準試薬及び精製リボソームタンパク質もしくは菌体破碎液 2 μL を加えてよく攪拌した後に、約 1 μL (菌体数として約 1×10^6 個に相当) を試料プレートに滴下して風乾した。

MALDI-MS 測定は、 N_2 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。マススペクトルの質量校正は、ミオグロビンの $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 16952.6) 及び $[\text{M}+2\text{H}]^{2+}$ (m/z 8476.8), 及び副腎皮質刺激ホルモン (ACTH) 断片 18-39 の $[\text{M}+\text{H}]^+$ (m/z 2465.7) の各ピークを用いて内部標準法により行った。各観測ピークの m/z 値は、3 回の繰り返し測定による平均値を用いた。

3 結果と考察

3.1 火落ち菌同定用バイオマーカーの選択

Fig. 1 に、本研究で用いた 5 種類の火落ち菌の精製リボソームタンパク質の MALDI マススペクトルを比較して示す。ここでは、ピークが比較的高強度で観測された m/z 6000~12000 の範囲に注目した。これまでの研究において、シナピン酸をマトリックス剤として用い、比較的高濃

度 (1% 以上) のトリフルオロ酢酸を加えた溶媒を用いて測定用の結晶を調製した場合, リボソームサブユニットタンパク質は主として 1 価のプロトン化分子 ($[M+H]^+$) として観測されることを確認しており^{5)~9)}, Fig. 1 中の観測ピークも同様であると考えられる。

Table 1 に, バイオマーカーの候補として選択したピークの m/z 値をまとめて示す。まず初めに, それぞれの火落ち菌について, 図示した範囲でピーク強度が高い順に 15 本のピークをバイオマーカーの候補として選択した。これらは, Fig. 1 及び Table 1 において太字で示した。更に, 上位 15 本に含まれなかったピークについても, 他の火落ち菌で選択されたピークと 2 Da 以内で m/z 値が一致する場合, 同一の質量をもつ成分であると判断して各火落ち菌のリストに追加した。これらは, Fig. 1 及び Table 1 においてイタリック体で示した。なお, 選択した各ピークは, これまでの報告^{5)~9)}と同様に, 菌体破碎液の MALDI マススペクトルでも観測されることを確認した。

Table 1 に示すように, 選択した各ピークの m/z 値は, 火落ち菌の種類の違いによって共通するものと異なるものが混在している。各火落ち菌に対して観測されたピークをより詳細に比較するために, Fig. 2 に m/z 6600~7100 の範囲 (Fig. 1 のグレー部分) を拡大して示す。この範囲では, *L. fructivorans* 及び *L. hilgardii* に対して観測されたピークの m/z 値は, それぞれの火落ち菌に固有のものであることが分かる。この傾向は, Table 1 に示すように, 今回解析対象とした m/z 6000~12000 の範囲で同様に観測され, わずかに *L. fructivorans* の m/z 6113 及び 9335 の各ピークが *L. hilgardii* のものと共通していること, *L. hilgardii* の m/z 6714, 6873, 及び 7580 が *L. rhamnosus* のものと共通していること, 及び m/z 7786 のピークが上記 3 種で共通している程度であった。

一方, *L. paracasei* で亜種 (subsp.) が異なる 2 株のマススペクトル (Fig. 2c 及び d) を比較すると, m/z 6618, 6819 及び 6848 付近のピークは測定誤差範囲内で一致している。著者らは, *Lactococcus lactis* に属するが亜種が異なる 2 株の乳酸菌 (*L. lactis* subsp. *lactis* 及び subsp. *cremoris*) について, MALDI-MS で高強度で観測された 30 本のサブユニットタンパク質のピークのうち, 18 本が亜種間で同一の m/z 値に観測され, これは各サブユニットタンパク質のアミノ酸配列が共通しているためであることを報告した⁸⁾。同様に, *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM1053 と *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM1171 に共通して観測されるピーク成分は, 偶然に m/z 値が一致したのではなく, 亜種間で同一のアミノ酸配列を有している可能性が高い。すなわち, 同一の m/z 値に観測されるピーク成分は *L. paracasei* の種レベルでの同定に, また, 異なる m/z 値に観測されるピーク成分は亜種レベルでの同定に, それぞれ有用

なバイオマーカーになり得ると考えられる。

興味深いことに, m/z 6819 付近のピークは, *L. paracasei* だけではなく *L. rhamnosus* JCM1136 でも観測されている。そのほかにも, *L. rhamnosus* JCM1136 で観測された m/z 6820, 7649, 8998, 9229, 10392, 10447 及び 11443 の各ピークが, *L. paracasei* の 2 株あるいは一方と共通して観測された。*L. rhamnosus* は *L. paracasei* と遺伝学的に近縁の種であり, かつては *L. paracasei* の 2 亜種とともに *L. casei* に分類され, 亜種が異なる (それぞれ *L. casei* subsp. *casei*, subsp. *tolerans* 及び subsp. *rhamnosus*) とされていた¹³⁾。そのため, 上記の各ピーク成分は, *L. paracasei* と同一のアミノ酸配列を有するリボソームサブユニットタンパク質である可能性が十分に考えられる。

以上のようにして, 5 種類の火落ち菌参照試料から, m/z 値が重複するものを含めて, 58 本のピークをバイオマーカーとして選択し, 火落ち菌同定用のデータベースを作成した。

3・2 *L. paracasei* のバイオマーカーピークの帰属

上述のように, *L. paracasei* はかつて *L. casei* から独立して新たな種として分類されたが, 最近, 両者の様々な特性が明らかになるにつれ, *L. casei* と *L. paracasei* を再度統合する提案がなされている¹⁴⁾。その根拠として, 全ゲノム解読された *L. casei* ATCC 334¹⁵⁾ は, *L. paracasei* と遺伝学的な特性がほぼ同一であることが挙げられている¹⁴⁾。著者らはこれまでに, ゲノム解読された乳酸菌について, 翻訳アミノ酸配列から計算される質量と, MALDI マススペクトル上で観測されるピークの質量を比較することによって, 多くのリボソームサブユニットタンパク質を帰属することができることを報告した⁵⁾⁶⁾。そこで, ゲノム解読株である *L. casei* ATCC 334 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から計算される質量を元に, バイオマーカーとして選択した *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1053 及び subsp. *tolerans* JCM 1171 のリボソームサブユニットタンパク質の帰属を試みた。ここでは, 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-Prot¹⁶⁾ より入手し, N 末端メチオンin切断を考慮して, MALDI マス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⁷⁾。Table 2 に, 各バイオマーカーとして選択したピークに対して帰属された *L. casei* ATCC 334 のリボソームサブユニットタンパク質の名称, $[M+H]^+$ の計算質量, 及び翻訳アミノ酸配列情報が登録されている Swiss-Prot のアクセッション番号を示す。*L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1053 及び subsp. *tolerans* JCM 1171 に対して最終的にバイオマーカーとして選択したピークのうち, それぞれ 15 本及び 13 本が *L. casei* ATCC 334 の翻訳アミノ酸配列

Table 1 The m/z values of biomarkers peaks selected from isolated ribosomal proteins of five reference hiochi bacteria

<i>L. fructivorans</i> JCM1117	<i>L. hilgardii</i> JCM1155	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM1053	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM1171	<i>L. rhamnosus</i> JCM1136
6113	6112	—	—	—
—	6343	—	—	—
6433	—	—	—	—
6495	—	—	—	—
—	—	6618	6617	—
—	6714	—	—	<i>6715</i>
—	—	—	—	6794
—	—	6819	6819	<i>6820</i>
—	—	—	—	6836
—	—	6848	6847	—
—	6873	—	—	<i>6874</i>
6932	—	—	—	—
—	—	—	—	6952
—	—	—	6965	—
—	—	6980	—	—
—	—	—	—	7004
—	7020	—	—	—
7032	—	—	—	—
—	7305	—	—	—
7308	—	—	—	—
—	—	7479	<i>7479</i>	—
—	7545	—	—	—
—	7580	—	—	7579
7611	—	—	—	—
—	—	7649	<i>7648</i>	7649
7786	<i>7786</i>	—	—	<i>7786</i>
—	8989	—	—	—
—	—	8999	8997	8998
—	—	9100	—	9100
—	—	9187	9186	—
—	9199	—	—	—
—	—	9229	9229	9229
9335	9337	—	—	—
—	—	—	—	9383
—	—	9396	9396	—
—	9454	—	—	—
—	9508	—	—	—
—	—	9549	9548	—
9573	—	—	—	—
—	—	—	—	9614
—	—	—	—	9986
—	—	<i>10071</i>	10071	—
—	—	<i>10171</i>	10170	—
—	10175	—	—	—
10191	—	—	—	—
10307	—	—	—	—
—	10361	—	—	—
—	—	<i>10392</i>	—	10392
10404	—	—	—	—
—	—	10447	10447	10447
10933	—	—	—	—
11039	—	—	—	—
—	—	—	11203	—
—	—	11231	—	—
—	—	—	—	11247
—	—	11351	—	—
—	—	<i>11441</i>	11441	<i>11443</i>
—	—	—	11589	—

The bold types correspond to the 15 strongest biomarkers for each reference hiochi bacteria. The italic types are additional biomarkers whose m/z values are common to the selected biomarkers of other bacteria within error (2 Da).

から計算されるリボソームサブユニットタンパク質の $[M+H]^+$ の計算質量と一致した. これまでにゲノム解読された様々な微生物のリボソームタンパク質についてアミノ酸配列の相同性検索を行うと, 種を超えてアミノ酸配列

が同一 (すなわちタンパク質の質量が同一) であることは, まれであることが分かる. このことから, Table 2 に示した結果は, *L. paracasei* が *L. casei* と極めて近縁 (あるいは同種) であることを強く支持するとともに, *L. paracasei* に対してバイオマーカーとして選択されたピークが主としてリボソームサブユニットタンパク質であることを裏付けている. なお, *L. casei* のリボソームタンパク質と質量が一致しなかったピークについては, *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1053 及び subsp. *tolerans* JCM 1171 に固有の質量をもつリボソームサブユニットタンパク質である可能性が考えられる.

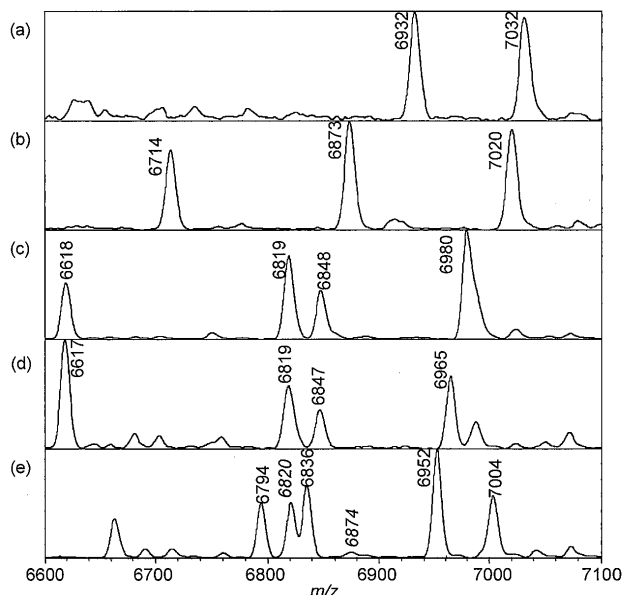


Fig. 2 Expanded MALDI mass spectra of Fig. 1

(a) *L. fructivorans* JCM 1117, (b) *L. hilgardii* JCM 1155, (c) *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1053, (d) *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171, and (e) *L. rhamnosus* JCM 1136

3.3 醸造所で発生した火落ち菌の同定への応用

清酒醸造所では, 清酒を出荷する前に, 貯蔵タンクから清酒を抜き取ってメンブレンフィルターで汙過し, そのフィルターを培地に加えて培養することによって, 清酒に火落ち菌が発生していないか確認する作業が日常的に行われている. この工程で検出された火落ち菌について, リボソームタンパク質を指標とする MALDI-MS による同定を試みた.

Fig. 3 に, 醸造所で発生した火落ち菌の菌体破碎液の MALDI マススペクトルを示す. 観測された各ピークの m/z 値を, データベース (Table 1) にまとめたバイオマーカーの m/z 値と比較し, それらと一致したピークを Table 3 に示す. なお, 一致したピークについては, Fig.

Table 2 Identification of biomarker peaks of two *L. paracasei* subspecies by comparing to the calculated masses of ribosomal proteins of genome-sequenced *L. casei* ATCC 334

m/z values of biomarkers		<i>L. casei</i> ATCC334		
<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 1053	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 11171	Ribosomal protein name	Calculated mass as $[M+H]^+$	Swiss-prot accession number
6618	6617	L30	6619	Q035A1
6819	6819	S21	6818	Q038S6
6848	6847	L28	6847	Q038I0
—	6965	L32	6965	Q039I6
6980	—	—	—	—
7479	7974	L29	7480	Q034Z1
7649	7648	L35	7648	Q038A1
8999	8997	S18	8997	Q03D45
9100	—	—	—	—
9187	9186	S20	9187	Q039L4
9229	9229	—	—	—
9396	9396	—	—	—
9549	9548	L31	9549	Q034T0
10071	10071	S17	10072	Q034Z2
10171	10170	S15	10170	Q039L3
10392	—	S16	10391	Q038J7
10447	10447	S19	10447	Q034Y7
—	11203	—	—	—
11231	—	L24	11231	Q034Z4
11351	—	L21	11351	Q038F2
11441	11441	S6	11442	Q03D47
—	11589	—	—	—

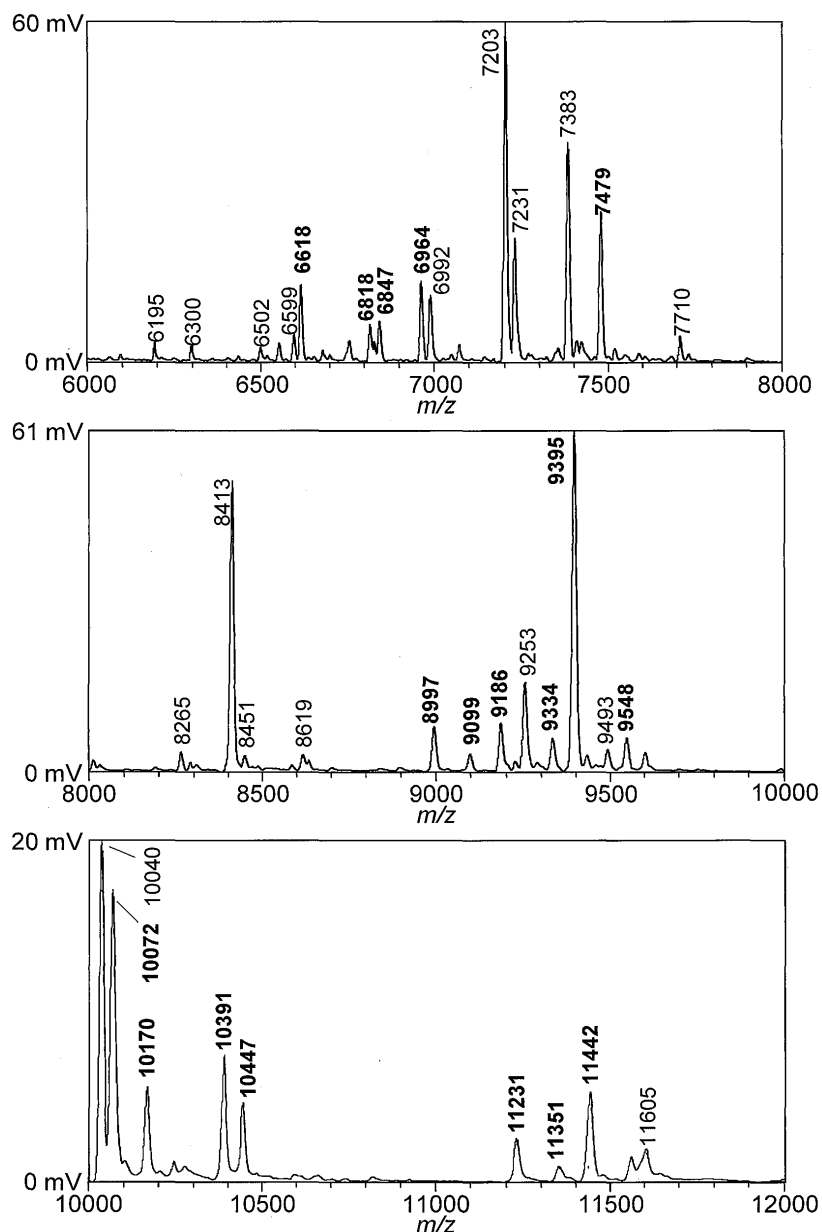


Fig. 3 MALDI mass spectra of cell lysate of hiochi bacteria generated in a sake brewery

Bold types indicate the peaks commonly observed for biomarker peaks selected from five reference hiochi bacteria.

3のマススペクトル中に太字で示した。ここでは、比較的高強度で観測された19本のピークが、データベースに登録したバイオマーカーピークと一致した。その内訳は、*L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM1053について17本、*L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM1053について14本、*L. rhamnosus* JCM1136について7本であった。これらの大半は、*L. casei* ATCC334のリボソームサブユニットタンパク質の計算質量 (Table 2) と一致した。一方、*L. fructivorans* JCM 1117については m/z 9334のピークが一致しただけであり、*L. hilgardii* JCM 1155については、2 Da以内で一致するバイオマーカーはなかった。すなわ

ち、醸造所で発生した火落ち菌は、*L. fructivorans* 及び *L. hilgardii* ではないと判断することができる。

醸造所で発生した火落ち菌は、*L. paracasei* subsp. *paracasei*、*L. paracasei* subsp. *tolerans* 及び *L. rhamnosus* のいずれと近縁であるか、MALDIマススペクトルを詳細に調べた。Fig. 4に、観測されたピークが異なっていた m/z 11100~11700の領域について、各火落ち菌のMALDIマススペクトルを比較して示す。この範囲では、醸造所で発生した火落ち菌の m/z 11442のピークが、*L. paracasei* subsp. *paracasei*、*L. paracasei* subsp. *tolerans* 及び *L. rhamnosus* に共通するバイオマーカーピークと一致して観測され

Table 3 Matched biomarkers of hiochi bacteria detected in a sake brewery

Observed peaks (m/z) of hiochi bacteria sample	Matched biomarkers (m/z) for each reference hiochi bacteria				
	<i>L. fructivorans</i> JCM1117	<i>L. hilgardii</i> JCM1155	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM1053	<i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM1171	<i>L. rhamnosus</i> JCM1136
6618	—	—	6618	6617	—
6818	—	—	6819	6819	6820
6847	—	—	6848	6847	—
6964	—	—	—	6965	—
7479	—	—	7479	7479	—
8997	—	—	8999	8997	8998
9099	—	—	9100	—	9100
9186	—	—	9187	9186	—
9229	—	—	9229	9229	9229
9334	9335	—	—	—	—
9395	—	—	9396	9396	—
9548	—	—	9549	9548	—
10072	—	—	10071	10071	—
10170	—	—	10171	10170	—
10391	—	—	10392	—	10392
10447	—	—	10447	10447	10447
11231	—	—	11231	—	—
11351	—	—	11351	—	—
11442	—	—	11441	11441	11443
Numbers of matched biomarkers	1	0	17	14	7

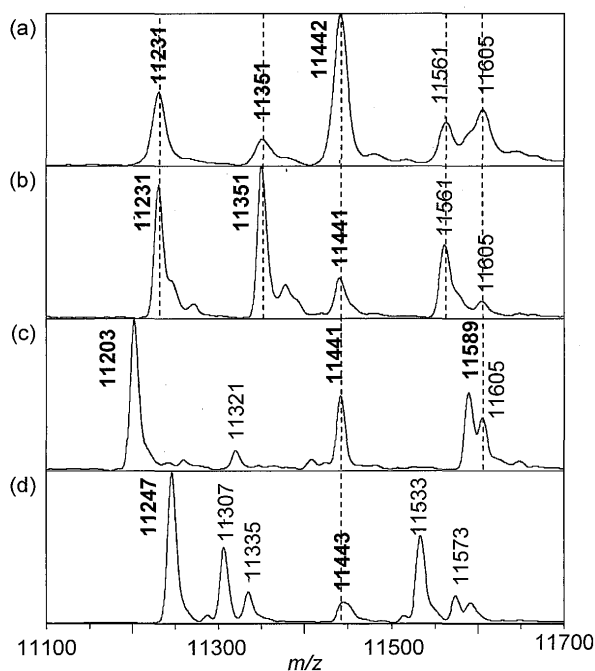


Fig. 4 Comparison of MALDI mass spectra (m/z 11100~11700) of cell lysate of hiochi bacteria generated in a sake brewery (a) and isolated ribosomal proteins of *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 1053 (b), *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171 (c), and *L. rhamnosus* JCM 1136 (d) as references

ている。一方, m/z 11231 及び 11351 のピークは, *L. paracasei* subsp. *paracasei* のバイオマーカーピークとのみ一致した。その上, ピーク強度が上位 15 本に入らなかったためバイオマーカーから除外した m/z 11561 及び 11605 の各ピークも, 前者は *L. paracasei* subsp. *paracasei* にのみ, 後者は 2 亜種の *L. paracasei* で観測されており, いずれも *L. rhamnosus* では観測されていない。以上のようにして, MALDI マススペクトルの観測範囲全体にわたって共通するピークを精査したところ, 醸造所で発生した火落ち菌は, *L. rhamnosus* に特徴的なバイオマーカーピークは全く観測されず, *L. paracasei* subsp. *paracasei* のバイオマーカーピークと共通するピークが多く観測された。すなわち, この火落ち菌は, 少なくとも *L. paracasei* (あるいは *L. casei*) であり, 特に subsp. *paracasei* あるいはそれと遺伝学的に近縁の微生物であることが強く示唆された。そこで, この火落ち菌の 16S rRNA 遺伝子の部分塩基配列 (552 bp) を解読したところ, *L. paracasei* の各 subsp. 及び *L. casei* と 100% の相同性が得られた一方で, *L. fructivorans* では 78%, *L. hilgardii* では 81%, *L. rhamnosus* では 88% の相同性であり, 醸造所で発生した火落ち菌が *L. paracasei* あるいは *L. casei* であるという MALDI-MS による同定結果が支持された。

5 結 言

本研究では, 代表的な 5 種の火落ち菌のリボソームタ

ンパク質のマスペクトルを測定し、それぞれの火落ち菌に固有の m/z 値をもつリボソームタンパク質が存在することを確認した。それらの中から比較的高強度で観測されるピークをバイオマーカーとして選択し、それらの m/z 値をデータベースにまとめた。そのデータベースと、実際に清酒醸造所で発生した火落ち菌について MALDI-MS で観測されたピークの m/z 値を比較することにより、それが *L. paracasei* あるいはそれと遺伝学的に近縁の微生物であると同定することができた。その結果は、従来法である 16S rRNA 遺伝子解析により支持され、本法の有用性を検証することができた。本法は、従来の遺伝子解析法と比較して迅速であり、清酒の品質管理や汚染源の特定などに有効な手段として、検査機関等での実用分析法への発展が望まれる。

火落ち菌試料の提供及び有用な助言を頂きました月桂冠㈱に感謝します。

文 献

- 1) 岡田早苗: “乳酸菌の科学と技術”, 乳酸菌研究集談会編, p. 281 (1996), (学会出版センター).
- 2) J. Nakamura, D. Ito, K. Nagai, Y. Umehara, M. Hamachi, C. Kumagai: *J. Ferment. Bioeng.*, **83**, 161 (1997).
- 3) T. Nakagawa, M. Shimada, H. Mukai, K. Asada, I. Kato, K. Fujino, T. Sato: *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, 637 (1994).
- 4) F. J. Pineda, M. D. Antoine, P. A. Demirev, A. B. Feldman, J. Jackman, M. Longenecker, J. S. Lin: *Anal. Chem.*, **75**, 3817 (2003).
- 5) L. Sun, K. Teramoto, H. Sato, M. Torimura, H. Tao, T. Shintani: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **20**, 3789 (2006).
- 6) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao: *J. Proteome Res.*, **6**, 3899 (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) 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**, 987 (2006).
- 9) K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, H. Yoshikawa, Y. Hotta, A. Hosoda, H. Tamura: *Anal. Chem.*, in press.
- 10) < <http://www.tecsrg-lab.jp/news/index.html> >.
- 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) 水野 猛: “微生物学実験法”, 杉山純多, 渡辺 信, 大和田紘一, 黒岩常祥, 高橋秀夫, 徳田元編, p. 117 (1999), (講談社).
- 13) M. D. Collins, B. A. Phillips, P. Zanoni: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **39**, 105 (1989).
- 14) F. Dellaglio, G. E. Felis, S. Torriani: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **52**, 285 (2002).
- 15) K. Makarova, A. Slesarev, Y. Wolf, A. Sorokin, B. Mirkin, E. Koonin, A. Pavlov, N. Pavlova, V. Karamychev, N. Polouchine, V. Shakhova, I. Grigoriev, Y. Lou, D. Rohksar, S. Lucas, K. Huang, D. M. Goldstein, T. Hawkins, V. Plengvidhya, D. Welker, J. Hughes, Y. Goh, A. Benson, K. Baldwin, J. H. Lee, I. Diaz-Muniz, B. Dosti, V. Smeianov, W. Wechter, R. Barabote, G. Lorca, E. Altermann, R. Barrangou, B. Ganesan, Y. Xie, H. Rawsthorne, D. Tamir, C. Parker, F. Breidt, J. Broadbent, R. Hutkins, D. O'Sullivan, J. Steele, G. Unlu, M. Saier, T. Klaenhammer, P. Richardson, S. Kozyavkin, B. Weimer, D. Mills: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 15611 (2006).
- 16) < <http://us.expasy.org/sprot/> >.

Rapid Identification of Hiochi Bacteria by Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry

Liwei SUN¹, Kanae TERAMOTO¹, Masaki TORIMURA¹, Hiroaki SATO¹ and Hiroaki TAO¹

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

(Received 19 July 2007, Accepted 19 October 2007)

The rapid identification of the sake spoilage microorganisms (hiochi bacteria) by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry (MALDI-MS) using ribosomal proteins as biomarkers was developed. Ribosomal proteins isolated and purified from five representative hiochi bacteria (*Lactobacillus fructivorans*, *L. hilgardii*, *L. paracasei* subsp. *paracasei*, *L. paracasei* subsp. *tolerans*, and *L. rhamnosus*) as references were characterized by MALDI-MS. Among the peaks observed both from purified ribosomal protein samples and cell lysates in the range of m/z 6000~12000, the 15 strongest peaks were selected for each reference hiochi bacteria to make a biomarker peak database. Since the m/z values of several biomarker peaks were identical to each bacteria, rapid discrimination and identification of hiochi bacteria could be performed at the species as well as the subspecies level. This method was then applied for the rapid identification of hiochi bacteria generated in a sake brewery. The m/z values of MALDI mass spectra of the hiochi bacteria sample suggested that this bacteria could be identified as *L. paracasei* subsp. *paracasei* or closely-related species.

Keywords : MALDI-MS; hiochi bacteria; ribosomal protein; rapid identification; *Lactobacillus paracasei*.