

## Application Note

No.34

ライフサイエンス

## MALDI-TOF MS による亜種・株レベルでの細菌識別の試み —S10-GERMS 法の利用による—

Classification of bacteria by MALDI-TOF MS Based on Ribosomal Protein Coding in *S10-spc-alpha* Operon at Strain Level.

田村 廣人<sup>\*1</sup> 島 圭介<sup>\*2</sup>



LifeScience

### 1. はじめに

細菌の同定には、主に形態観察や生理・生化学性状試験、DNA 塩基配列解析の手法が、食品・製菓分野での環境管理や臨床微生物検査など、多くの分野において用いられています。属から種レベルでの（簡易）同定には、DNA 塩基配列解析の手法、なかでも 16S rRNA 遺伝子配列解析による手法が近年多く用いられるようになってきています。しかしながら、この手法にも以下の課題があり、これらの課題を克服した新しい微生物同定法の登場も必要とされていました。

- 1) サンプルからの DNA 抽出や DNA 塩基配列の決定などにある程度の手間と時間を要する。
- 2) DNA シーケンスや PCR 法など遺伝子の取り扱いに精通している必要がある。
- 3) 亜種・株レベルでの識別は一般に困難であり、菌種によっては種レベルでの識別もできない場合もある（例：*Bacillus cereus*（セレウス菌）と *Bacillus thuringiensis*）。

\*1 学校法人名城大学 農学部 環境微生物学研究室

\*2 (株)島津製作所 分析計測事業部 グローバルアプリケーション開発センター

そこで、近年ではMALDI-TOF MS（マトリックス支援レーザー脱離イオン化・飛行時間型質量分析計）により微生物（細菌・酵母・カビ）の同定・分類を行う手法が注目を集めつつあります。MALDI-TOF MSのサンプル調製は簡便で、基本的には、シングルコロニー程度の微生物試料をごく少量のマトリックス溶液（イオン化補助剤）と混合するだけで分析を行います。微生物の同定は、分析によって得られた微生物試料のマススペクトル<sup>※1</sup>を、あらかじめデータベースに収録された各菌種のマススペクトル情報と照合する（フィンガープリント法<sup>※2</sup>）ことにより行います。MALDI-TOF MSは多検体の迅速な分析も可能である等の特長を持つため、従来の微生物同定法の課題を克服した新しい手法として期待されています。

現在、MALDI-TOF MSは主に種レベルでの微生物の同定を目的として用いられています。しかし、微生物の食品への混入経路の解明や発酵食品の付加価値創造のために、タイピング等を目的とした亜種・株レベルまでの簡易迅速識別への応用など、更なる展開が求められています。ここでは、その期待に応えるべく学校法人名城大学 農学部 環境微生物学研究室（以下、名城大学）と独立行政法人 産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門 計測技術研究グループ（以下、産業技術総合研究所）によって開発された、*S10*-GERMS法（*S10*-*spc*-*alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum）による理論的根拠に基づいた高精度の微生物識別法について、実施例をまじえながら解説していきます。

※1 横軸に質量（正しくは  $m/z$  という値）、縦軸に信号強度をとったスペクトル。

※2 あらかじめ既知の試料を用いて各試料固有の情報（この場合はマススペクトルから得られる情報）をフィンガープリント（指紋）としてデータベースに登録しておき、未知の試料の情報（マススペクトル）と照合することによって同定する方法。

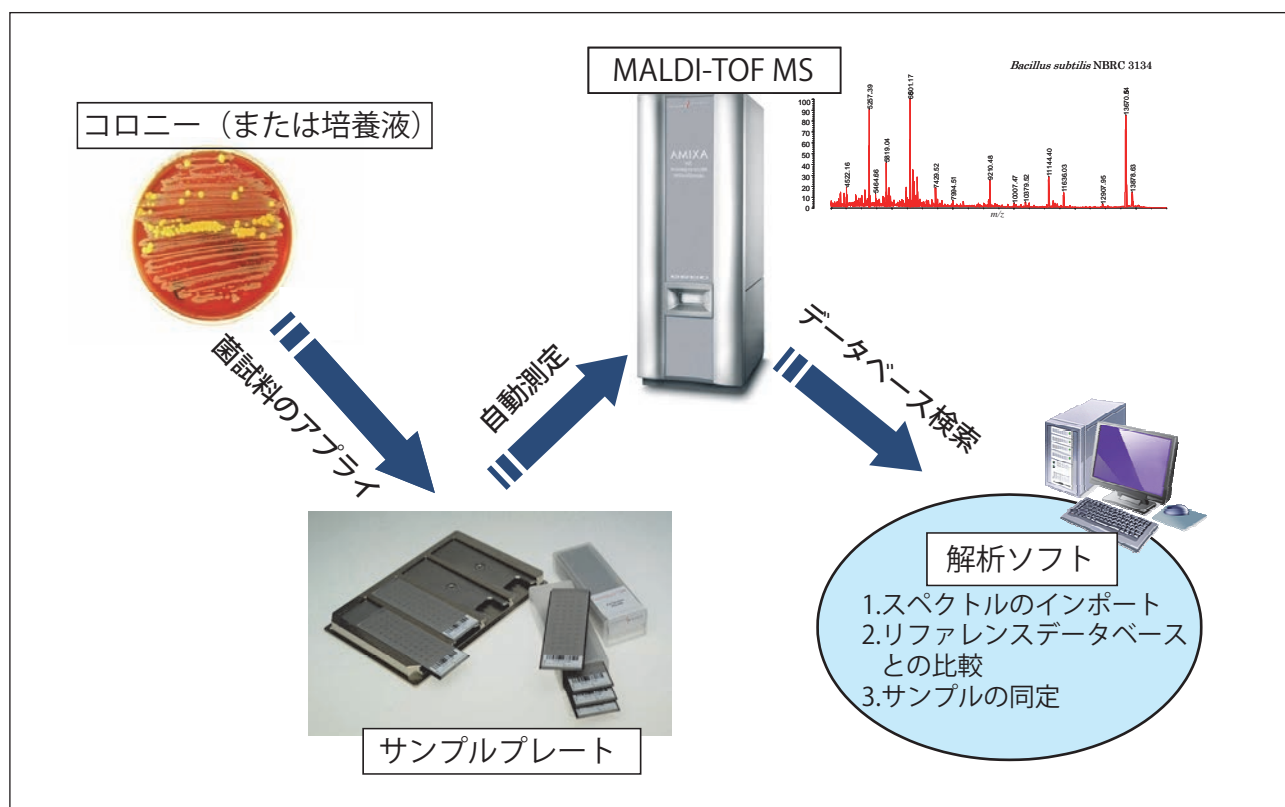


図1 MALDI-TOF MSによる微生物同定法の一般的なスキーム

## 2. MALDI-TOFMS による微生物同定について

MALDI-TOFMS による微生物同定において最も多くとられる手法が、フィンガープリント法による方法です。試料調製から微生物同定に至るまでの一般的なスキームを図1に示します。

サンプル調製が非常に簡便なのが MALDI-TOF MS の大きな特長の一つです。報告により調製方法は若干異なりますが、基本的な流れは同一です。調製方法の一例を以下に述べます。

ステップ1) 寒天培地上のシングルコロニーから掻き取った菌を MALDI-TOF MS の試料プレートに塗布する。

ステップ2) 試料プレートに塗布した菌に、マイクロピペットでシナピン酸<sup>\*1</sup> や CHCA<sup>\*2</sup> などのマトリックス溶液を添加。マイクロピペットで菌とマトリックス溶液を混合する。試料溶液乾燥後測定に供する。

この工程のみでサンプル調製は終了し、MALDI-TOF MS の測定に供することが出来ます (Whole Cell MALDI-TOF MS : WC-MS)。

このようにして調製した試料から得られるマスペクトルの典型例 (大腸菌と枯草菌) を図2に示します。測定に必要な試料量は  $\mu\text{g}$  程度で、菌数で考えると例えば大腸菌で  $10^5$  個程度もあればこのように菌の種類毎に固有のマスペクトルを得ることが出来ます。

一般的な方法でサンプル調製を行った場合、マスペクトル中には百数十本程度のピークが観測され、それらのピークの一つ一つがその菌を構成するタンパク質に由来します。同じ種類のタンパク質でも、菌種が違とそのアミノ酸配列が異なることが良くあり、その違いが分子量の違い、すなわち検出されるピークの横軸の値 ( $m/z$ ) の違いにつながります。実際、図2にも示されているように微生物の種類によってマスペクトルのパターンは相当異なっており、フィンガープリント法による微生物の同定が有効であることが分かります。

菌種ごとのマスペクトルをデータベース化しフィンガープリント法による同定を行うソフトウェアと島津製作所の MALDI-TOF MS ラインナップである AXIMA シリーズを組み合わせた応用システムは、AXIMA 微生物同定システムという製品名称でリリースされており、国内でも導入がすすんでいます。

※1 3,5-ジメトキシ-4-ヒドロキシケイ皮酸

※2  $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸

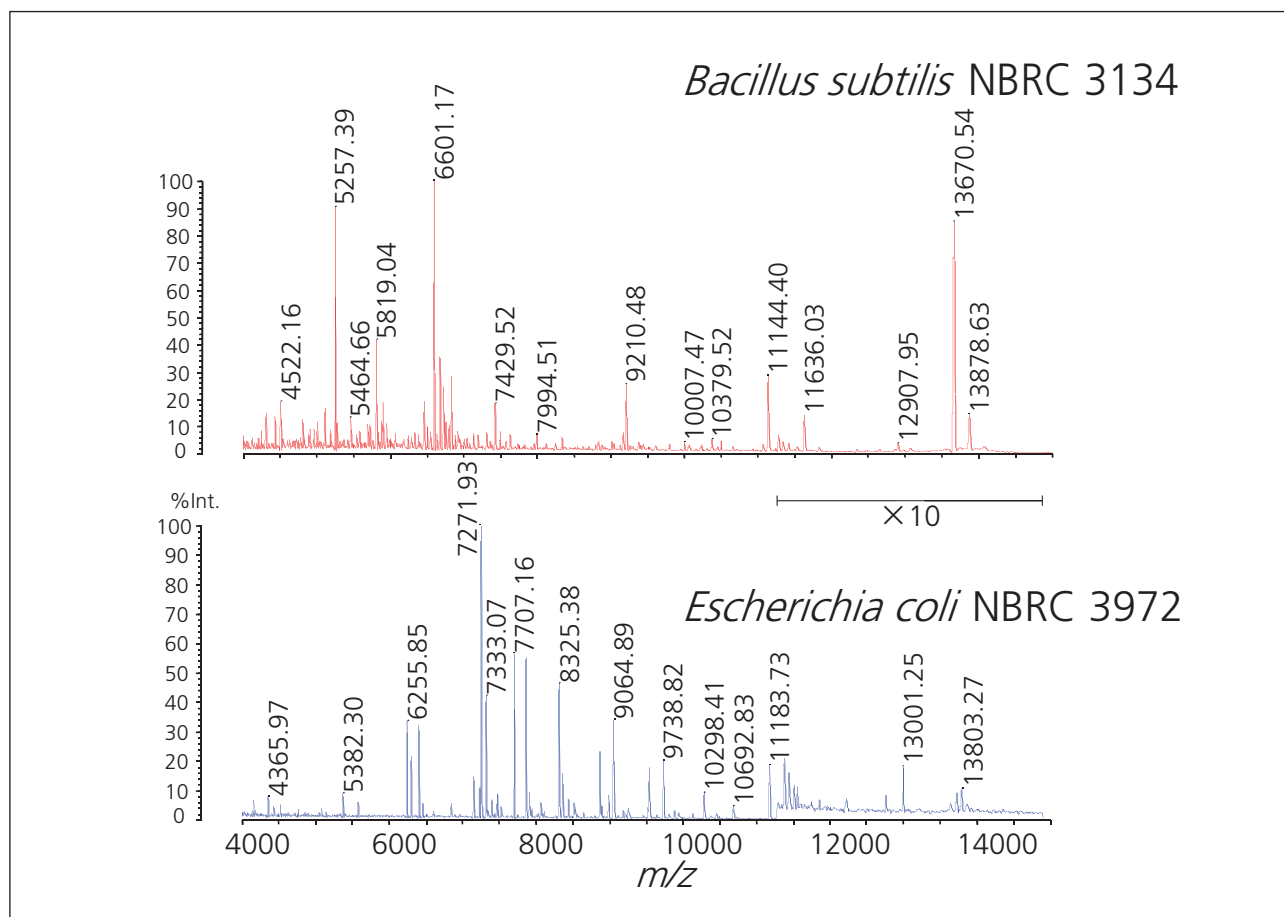


図2 大腸菌と枯草菌のマスペクトル

### 3. リボソームタンパク質をバイオマーカーとして用いる MALDI-TOF MS による微生物同定について

MALDI-TOF MS フィンガープリント法による微生物同定法では、観測しているピーク成分の一つ一つが何のタンパク質に由来するかは特定していませんが、フィンガープリント法による微生物同定においては特に問題なることはありません。その一方で、

- 1) 分子系統解析へ応用するにあたっての理論的根拠が必要
- 2) 科、属、種、亜種・・・と分類レベルごとに質量の違いが出てくるピークは異なるので(図3)、亜種・株レベルでの識別を再現性良く行なうには、由来のはっきりした、“亜種・株レベルでの識別に使える”マーカーピークを選択することが必要

という指摘もあり、観測しているピーク成分を特定したうえでより下位分類の識別へ応用を拡げることが、MALDI-TOF MS に対する更なる期待の一つとして挙げられています。

WC-MS において観測されるピーク成分が何のタンパク質に由来するかを特定するにあたっては、リボソームタンパク質\*1に着目した取り組みがなされています。リボソームタンパク質は、発現量(対数増殖期には全タンパク質発現量の20%程度を占める)・等電点(塩基性のものが多く、イオン

化し易い)・分子量範囲(分子量がおおよそ4000-15000Daの範囲に収まっており、MALDI-TOF MS で検出し易い)などの点から、WC-MS における主な成分として観測され、検出されるピークの50%以上はリボソームタンパク質由来であるといわれています。リボソームタンパク質に着目しそれに由来するピークを特定することによって、理論的根拠に基づく分子系統解析や亜種・株レベルでの再現性良い識別への展望が開けることが期待されますが、この手法においても下記の課題が指摘されています。

- 1) リボソームタンパク質のデータベース情報が少ない。  
WC-MS で観測されるピークの特定にはリボソームタンパク質の遺伝子配列すなわちアミノ酸配列の情報が必要だが、ゲノム解読されておりこれらの情報を入手できる菌株はまだそれ程多くない。
- 2) ピーク検出感度の低いリボソームタンパク質が存在する。

上記の課題を克服するために新たに開発された手法がS10-GERMS法で、次の項では、この手法の詳細について説明します。

\*1 リボソームは、遺伝子配列に基づいて蛋白質の合成を行なう細胞中の成分。リボソームタンパク質は、リボソームを構成するタンパク質の複合体。合計54種類のサブユニットタンパク質から構成されている。

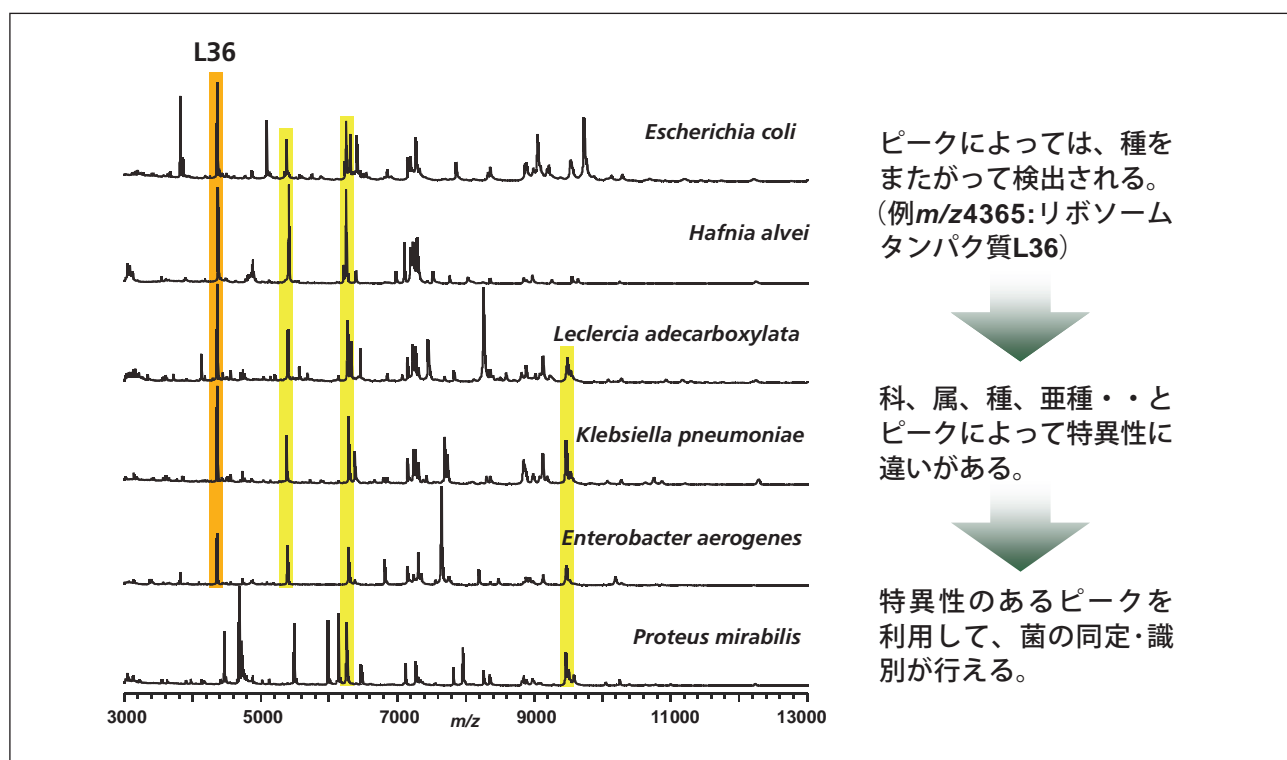


図3 ピークごとの特異性の違い

## 4. S10-GERMS 法による微生物同定について

実測値を理論的根拠に基づいて解析するために、細菌のリボソームタンパク質をコードする *S10-spc-alpha* オペロン<sup>※1</sup> に着目しました。このオペロンは、25 種以上のリボソームサブユニットタンパク質情報を含み、細菌に共通に存在します (図4)。このオペロンの DNA 塩基配列を決定すればそこにコードされているリボソームタンパク質の質量を決定することが出来、その情報により、WC-MS で得られるピークをもとにした理論的根拠に基づいた細菌の識別につながります。この、WC-MS で得られた情報を *S10-spc-alpha* オペロンの遺伝子情報とつぎあわせ理論的根拠に基づき細菌を同定・識別する手法が、名城大学と産業技術総合研究所により、*S10-GERMS* 法 (*S10-spc-alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum) として確立されました。<sup>※1</sup>

*S10-GERMS* 法を行なうにあたってのリボソームタンパク質データベースの構築ワークフローは以下ようになります (図5)。

ステップ1：MALDI-TOF MS による測定 (実測値)

データベース構築する菌株のマススペクトルを WC-MS により取得します。これを実測値とします。

ステップ2：*S10-spc-alpha* オペロンの配列決定のためのプライマー設計  
ゲノム解読基準株の *S10-spc-alpha* オペロンの共通塩基配列をもとにプライマーの設計を行ないます。

ステップ3：*S10-spc-alpha* オペロンの DNA 塩基配列決定 & アミノ酸配列への変換

データベース構築する菌株の *S10-spc-alpha* オペロンの DNA 塩基配列を決定し、アミノ酸配列へ変換します。

ステップ4：リボソームタンパク質の理論値データベースの構築  
リボソームタンパク質のアミノ酸配列から理論質量値を計算します。データベースはコンピュータにより包括的に作成します。

ステップ5：理論値、実測値および解読した配列による正確なデータベースの構築

ステップ4 で計算した理論質量値とステップ1 で取得した MALDI-TOF MS の実測値を比較し、ピーク検出感度の低いリボソームタンパク質は理論質量値のリストから除外します。このステップにより、正確なデータベースの構築が可能となります。

このようにして構築したデータベースを供試菌試料のマススペクトルと照合することにより、菌試料の識別を行ないます。次の項では、*S10-GERMS* 法で *Bacillus subtilis* (枯草菌) を亜種・株レベルで識別することができた実施例を紹介し

※1 同時に発現が制御される複数の遺伝子がまとまって存在するゲノム上の領域

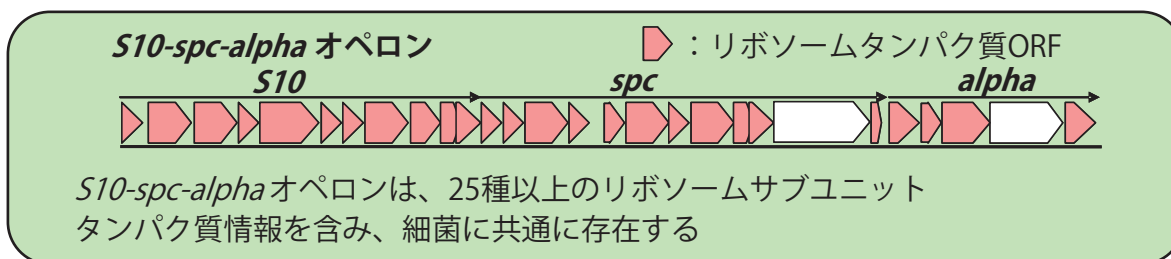
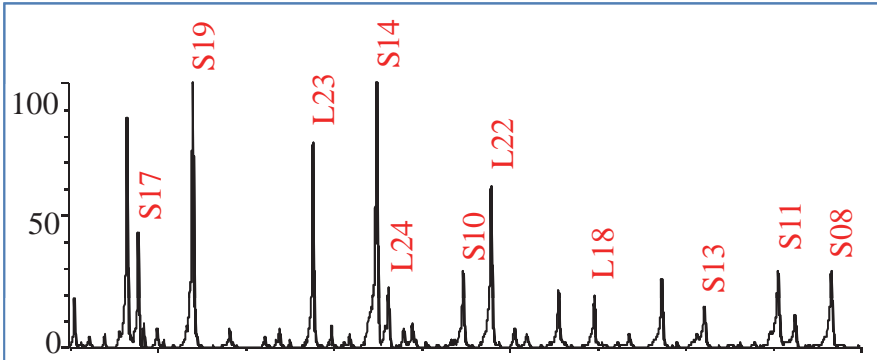


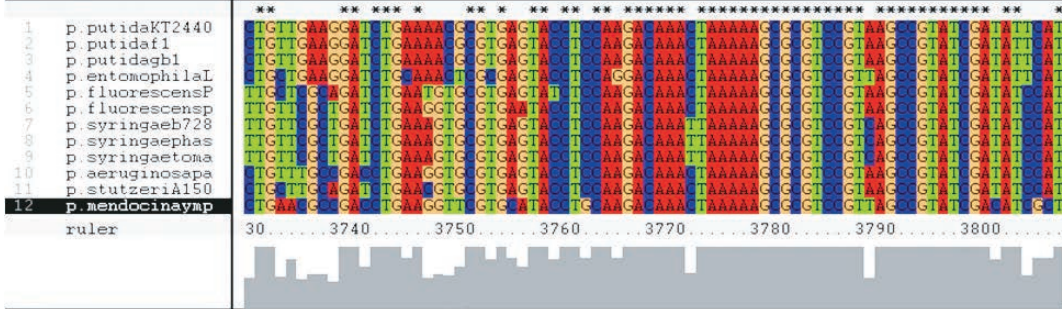
図4 *S10-spc-alpha* オペロンとは

ステップ1：MALDI-TOF MSによる測定（実測値）



ステップ2：S10-*spc-alpha* オペロンの配列決定のためのプライマー設計

ゲノム解読基準株の S10-*spc-alpha* オペロンの塩基配列



プライマーの設計

Primer	Sequence (5'-3')
-220f	TTCTTCAARGGCTACCGTCC
119f	CTTTTARCGGGCGTAKTSCG
615f	TTCACCGAAGAAGGTGTCTC
635r	GAGACACCTTCTTCGGTGAA
1505f	AACAAGAAGATGTAYCGCGC
1525r	GCGCGRTACATCTTCTTGTT
2310f	AAGCAGCATTACCGTCTGGT
2330r	ACCAGACGGTAATGCTGCTT
3265f	GAAGTAGCCGCTAAGTTGTC

<ポイント>

ゲノム解読基準株の S10-*spc-alpha* オペロンの共通配列をもとにプライマーを設計

ステップ3：S10-*spc-alpha* オペロンの解読& アミノ酸への変換

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

図5 リボソームタンパク質データベースの構築：ワークフロー

### ステップ4：リボソームタンパク質の理論値データベースの構築

	<i>P. putida</i>	<i>F. 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	12689	12693	3904	16637	14162	16665	14165
L22	<b>11912.0</b>	<b>11912.0</b>	11893.9	<b>11912.0</b>	<b>11912.0</b>	<b>11912.0</b>	<b>11912.0</b>	<b>11912.0</b>	<b>11912.0</b>	11897.9
L23	10900.7	<b>10945.7</b>	10955.6	10950.7	<b>10945.7</b>	<b>10945.7</b>	10900.7	11015.7	11085.8	10920.6
L29	<b>7173.3</b>	<b>7173.3</b>	7215.4	7202.4	<b>7173.3</b>	<b>7173.3</b>	<b>7173.3</b>	7205.4	7215.4	7274.4
S10	<b>11753.6</b>	<b>11753.6</b>	11783.6	11767.6	<b>11753.6</b>	<b>11753.6</b>	<b>11753.6</b>	11783.6	11755.6	<b>11753.6</b>
S17	<b>9902.5</b>	9966.6	9957.6	9955.6	9966.6	9984.6	<b>9902.5</b>	9974.6	10014.7	9973.6
S19	<b>10218.1</b>	10246.1	10186.0	10227.1	10189.1	10204.0	<b>10218.1</b>	10176.0	10190.0	10163.0
L14	<b>13410.9</b>	<b>13410.9</b>	13396.8	13412.9	<b>13410.9</b>	<b>13410.9</b>	<b>13410.9</b>	13396.8	<b>13410.9</b>	13436.9
L18	12497.4	12556.4	12561.4	12531.4	<b>12512.4</b>	<b>12512.4</b>	12485.4	12413.3	12457.3	12477.3
L24	<b>11330.2</b>	11336.3	11340.3	11471.5	11336.3	11345.3	<b>11330.2</b>	<b>11344.3</b>	<b>11344.3</b>	11413.4
L30	6334.5	<b>6395.6</b>	6278.3	6347.4	<b>6395.6</b>	<b>6395.6</b>	6292.5	6363.5	6448.5	6463.6
L36	<b>4435.4</b>	<b>4435.4</b>	4407.3	<b>4435.4</b>	<b>4435.4</b>	<b>4435.4</b>	<b>4435.4</b>	<b>4435.4</b>	<b>4435.4</b>	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	<b>11304.3</b>	11394.3	11435.3	<b>11304.3</b>	11274.2	11288.3	11359.2	11385.3	11326.2
S11	13529.5	13485.4	13517.5	<b>13513.5</b>	13499.4	<b>13513.5</b>	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

### ステップ5：理論値、実測値および解釈した配列による正確なデータベースの構築

	<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

図5（続き） リボソームタンパク質データベースの構築：ワークフロー

## 5. S10-GERMS 法による株レベルの識別と系統解析：実施例

*B. subtilis* は土壌中や空気中など自然環境中に広く存在する常在菌の一種です。高い耐熱性を持つため、食品工場等における細菌汚染の原因菌の一つとして知られています。図6に *Bacillus* 属基準株のマススペクトル例を示します。リボソームタンパク質データベースとの比較の結果、リボソームタンパク質が、*Bacillus* 属細菌において再現性良く共通に検出されていることが確認できました。次に、16S rRNA 遺伝子の相同性が99.9% (1475塩基中1473塩基が一致) である、*B. subtilis* subsp. *subtilis* NBRC 13719T, *B. subtilis* subsp. *spizizenii* NBRC 101239T と、*B. subtilis* NBRC 104440 のマススペクトル

の比較例を図7に示します。*B. subtilis* 各株のリボソームサブユニットタンパク質 L29, L22 および L18 のピークの質量の違いによりこれらの菌株は株レベルの識別が可能であることが示唆されています。*S10-spc-alpha* オペロンがコードするリボソームタンパク質のなかから、バイオマーカーとして8種類のリボソームタンパク質を選び出し、この情報に基づき *B. subtilis* の各株に対しクラスター解析<sup>\*1</sup>を行った結果を図8に示します。8種のバイオマーカーに基づく S10-GERMS 法は、これらの *B. subtilis* 各株の亜種および株レベルの識別を行うことが可能であることが示されています。

\*1 複数のデータの中から互いに似ているもの同士をまとめることによって分類する手法。

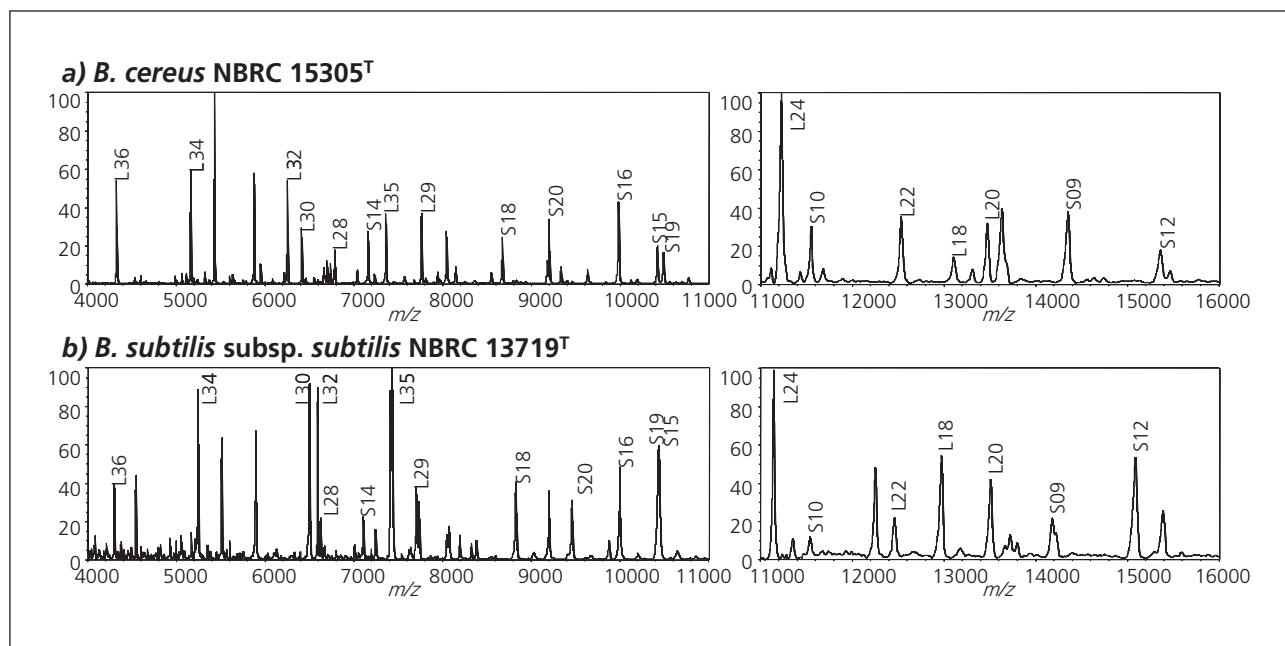


図6 *Bacillus* 属基準株の MALDI マススペクトル



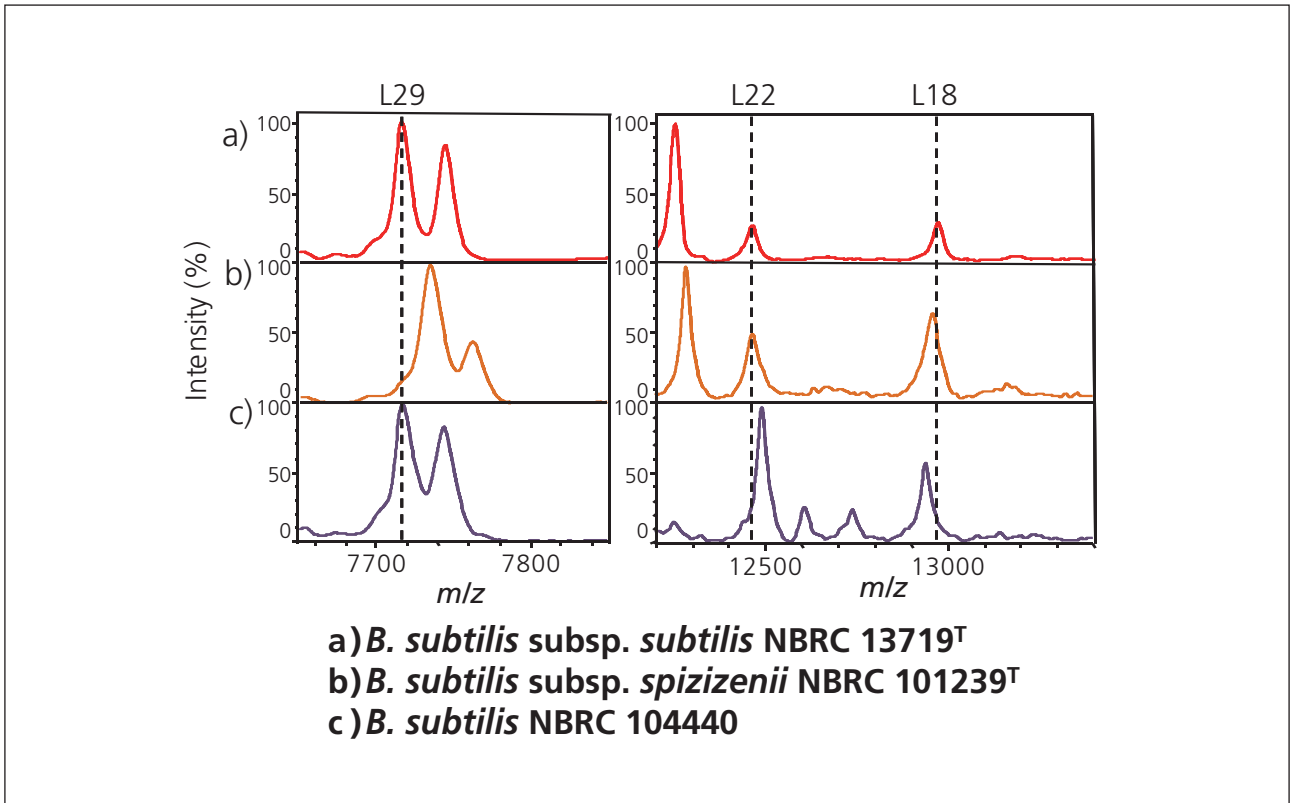


図7 *B. subtilis* 各菌株のマススペクトル比較 (拡大図)

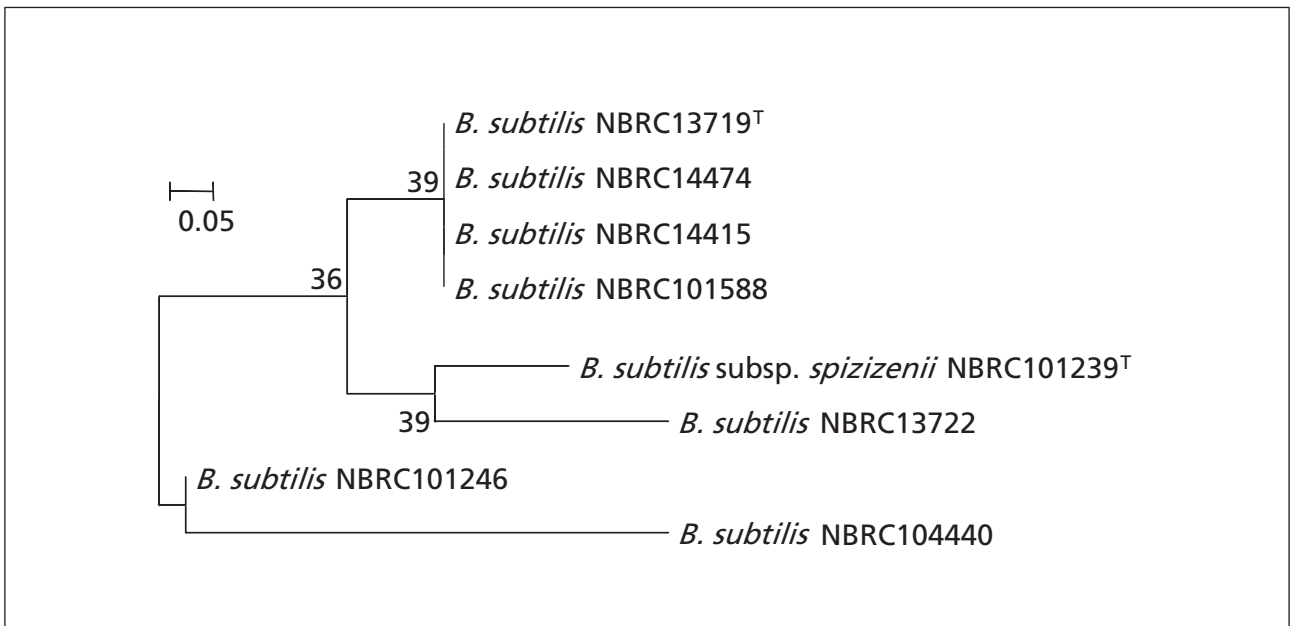


図8 *B. subtilis* のクラスター解析結果 (近隣結合法による)

## 6. おわりに

MALDI-TOF MS による微生物同定は, 主に 1) 簡便, 2) 迅速, 3) ランニングコストが安いという長所から, これまでの形態学的, 生理・生化学的手法にかわる手段として期待されており, 特に臨床微生物検査の分野では従来法からの移行がすすみつつあります。その一方で, MALDI-TOF MS に対する更なる期待として, 微生物の単なる同定に加え, タイピング等を目的

とした亜種・株レベルでの識別があげられています。MALDI-TOF MS を用いた菌の識別法は, まだ従来 of タイピング法と比べて確固たる位置を占めるまでには至っていませんが, 理論的根拠に基づいた *S10*-GERMS 法の登場をきっかけに, 今後有力な菌株タイピング方法の一つとしての地位を占めることが期待されます。

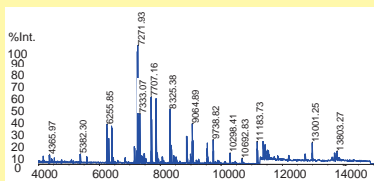
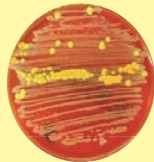
～関連製品のご紹介～

## 質量分析計 MALDI-TOF MS 微生物同定分類装置 AXIMA 微生物同定システム

— 迅速・簡便・安定に微生物を同定

AXIMA 微生物同定システムは、質量分析計 MALDI-TOF MS を用いて微生物（細菌・真菌類）を直接測定することによって得られたマススペクトルデータをデータベース検索することにより、微生物の同定を行うシステムです。

- 1) サンプル調製、2) MALDI-TOF MS 測定、3) データベース検索による同定、のわずか3ステップ。各ステップは簡便かつ迅速です。
- 測定開始からわずか2分で分析作業が完了します。
- 細菌・カビ・酵母の同定・分類が可能です。
- 必要な試薬はごくわずか、低ランニングコスト分析を実現します。



AXIMA 微生物同定システム対応 高精度細菌識別ソフトウェア

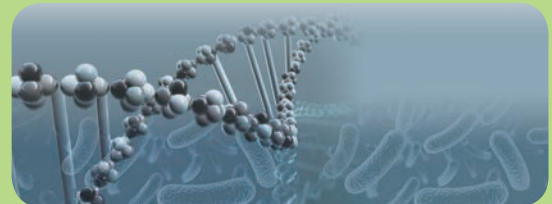
## Strain Solution

— さらなる高精度・高信頼度の細菌識別

Strain Solution は、S10-GERMS 法に基づき、質量分析計 MALDI-TOF MS を用いて細菌を亜種・株レベルで識別するためのソフトウェアです。

亜種・株レベルでの識別が行なえるマーカーをあらかじめ登録しておき、対象菌株の MALDI-TOF MS 測定データとの一致/不一致を判定することにより識別を行ないます。

- AXIMA 微生物同定システムと組み合わせることで、従来の MALDI-TOFMS フィンガープリント法による微生物識別法と比べ、より精度・信頼度の高い識別結果が得られます。
- 遺伝子の塩基配列の違いに基づく細菌の識別が、MALDI-TOF MS で迅速・簡便に行なえるようになります。
- 菌株データのデータベースが構築できます。
- 外部ソフトウェアにより分子系統分類を行うことも可能です。



## AXIMA 微生物同定システム



コロニー  
(または培養液)

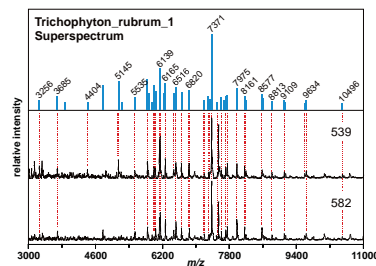


サンプルプレート



データベース  
検索

ピークリストの  
エクスポート



比較

### AXIMA 微生物 同定システム解析ソフト

リファレンスデータベース (SuperSpectra) との MS フィンガープリンティング

- ✓ 菌種同定
- ✓ フィンガープリント法による識別

MALDI-MS  
フィンガー  
プリント法

## Strain Solution

Query	Pseudomonas putida 120088	Pseudomonas putida 101019	Pseudomonas putida 143847
10915	11811.95	11811.95	11811.95
10900.85	10900.85	10900.85	10900.85
7170.21	7170.21	7170.21	7170.21
11761.50	11761.50	11761.50	11761.50
9802.50	9802.50	9802.50	9802.50
12471.00	12467.41	12467.41	12467.41
11080.24	11051.24	11051.24	11051.24
6202.15	6211.5	6211.5	6204.54
4435.29	4435.29	4435.29	4435.29
10845.29	10845.12	10845.12	10845.12
11289.29	11279.29	11279.29	11289.27

### Strain Solution

リボソームタンパク質をマーカーとしたデータベースとのマッチング、外部ソフトの利用によるクラスター解析

- ✓ 理論的根拠に基づいた更に精度の高い識別
- ✓ 分子系統分類

S10-GERMS 法

目的サンプルの菌種名

[注意事項]

- Strain Solution にはテストサンプル以外のマーカーピークは登録されていません。目的菌種の菌株マーカーピークリストは、あらかじめ登録しておく必要があります。
- 本製品は薬事法に基づく医療機器として承認・認証を受けた機器ではありません。診断目的およびその手続き上での使用はできません。

Strain Solution は、学校法人名城大学と独立行政法人産業技術総合研究所のシーズをもとに、愛知県「知の拠点」重点研究プロジェクト食の安心・安全技術開発プロジェクト (グループリーダー: 名城大学 農学部環境微生物学研究室 田村 廣人教授) によって得られた成果をもとに作成しています。

## [謝辞]

このアプリケーションノートの成果の一部は、愛知県「知の拠点」重点研究プロジェクト食の安心・安全技術開発プロジェクトの支援によるものです。

## [参考文献]

- Yudai Hotta, Kanae Teramoto, Hiroaki Sato, Hiromichi Yoshikawa, Akifumi Hosoda, and Hiroto Tamura: Classification of Genus *Pseudomonas* by MALDI-TOF MS Based on Ribosomal Protein Coding in *S10*-*spc*- $\alpha$  Operon at Strain Level. *J. Proteome Res.*, 2010, 9 (12) , 6722–6728.
- Yudai Hotta, Hiroaki Sato, Akifumi Hosoda, and Hiroto Tamura: MALDI-TOF MS analysis of ribosomal proteins coded in *S10* and *spc* operons rapidly classified the Sphingomonadaceae as alkylphenol polyethoxylate-degrading bacteria from the environment. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2012, 330, 23-29
- Yudai Hotta, Jun Sato, Hiroaki Sato, Akifumi Hosoda, and Hiroto Tamura: Classification of the Genus *Bacillus* Based on MALDI-TOF MS Analysis of Ribosomal Proteins Coded in *S10* and *spc* Operons. *J. Agric. Food Chem.*, 2011, 59 (10) , 5222–5230.