

Technical Report

MALDI-TOF MSによるリボソームタンパク質のプロファイリングに基づいた乳酸菌の分類 -S10-GERMS法の利用による*L. casei*グループの分類-

Characterization of the *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in *S10-spc-alpha* operons as observed by MALDI-TOF MS

島 圭介¹、佐藤 浩昭²、大熊 盛也³、田村 廣人⁴

Abstract:

*Lactobacillus casei*グループの分類は、その系統的類似性や、命名法に関する議論が継続中であることから、複雑です。MALDI-TOF MSにより細菌を測定した際に検出されるリボソームタンパク質をマーカーとして用いることにより*L. casei*グループの迅速で正確な識別を行うことができました。この手法は、従来のMALDI-TOF MSフィンガープリンティングによる細菌識別法ではなし得ない、理論的根拠に基づいた分子系統分類法として、保有菌株の管理などへの適用が考えられます。

Keywords: 乳酸菌、分子系統解析、リボソームタンパク質、MALDI-TOF MS、S10-GERMS

1. はじめに

乳酸菌は自然界に広く分布し、動物の体内や、食品中、植物の表面などに生息しています。乳酸菌は、ヨーグルトやチーズ、漬物などの発酵食品の加工・製造に用いられている代表的な有用細菌である一方で、食品・飲料の変敗にも関わっていることが知られています。

乳酸菌の中でも、*Lactobacillus casei*および関連の菌種 (*L. casei* グループ) は、乳酸菌飲料の種菌 (スターター) などの用途で広く使われている典型的な有用細菌です。しかしながら、*L. casei* グループは、その有用性から広く用いられているにもかかわらず、その分類学的位置づけと命名法についての議論が分かれている状態にあります。

L. casei グループ内の菌種は互いに遺伝学的に近縁であることから、16S rRNA遺伝子配列に基づく識別は難しく、それ以外のハウスキーピング遺伝子の配列に基づいた手法に加え、MLST (Multilocus sequence typing) などの手法がグループ内の識別に用いられています。しかし、これらの遺伝学的手法は、DNAの抽出や増幅、DNAシーケンシングに時間と手間がかかるという問題点がありました。

近年注目を集めている、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) により微生物の同定・分類を行う手法は、その迅速・簡便性によりこれまでの遺伝学的手法に基づく分類・識別法の欠点を補う手法となる可能性を有しています。しかし、これまでの市販のMALDIによる微生物同定システムで用いられているフィンガープリント法*では、観測しているピーク成分が不明であるため、*L. casei* グループのような互いにごく近縁な種間の識別における理論的根拠、信頼性において課題があり、分子系統分類に適用することは実質的には困難でした。

フィンガープリント法のこの課題を克服する手法として、細菌の菌体をMALDI-TOF MSにより測定して観測されるピークの約半分がリボソームタンパク質であることを利用し、MALDI-TOF MSにて観測されるピークの質量を、リボソームタンパク質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計算質量と関連付けてそのピークの由来となるタンパク質の種類を帰属することによって、その情報を与える菌種を同定する方法が挙げられます。この手法に基づいて選択した、由来となるタンパク質が帰属されているマーカーピークを用いれば、*L. casei* グループのような互いにごく近縁な種においても、理論的根拠に基づいた信頼性の高い分子系統分類が可能となります。

しかし、この、リボソームタンパク質のプロファイリングに基づいた手法で分子系統分類を行うには、対象となる菌種のリボソームタンパク質の遺伝子情報を必要とするため、基準株のゲノム配列が解読されている必要があります。ゲノム配列が解読されている *L. casei* グループの基準株は殆ど無かったため、この手法をそのまま適用するのは困難でしたが、おおよそ半分のリボソームタンパク質遺伝子がまとまってコードされている *S10-spc-alpha* オペロンに着目し、このオペロンの塩基配列を解読することにより、基準株がゲノム解読されていない菌種のMALDI-TOF MSによるリボソームタンパク質のプロファイリング、ひいては、分子系統分類が可能となりました。

本テクニカルレポートでは、この学校法人 名城大学農学部環境微生物学研究室と独立行政法人 産業技術総合研究所によって開発された手法、S10-GERMS法 (*S10-spc-alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum) によって *L. casei* グループの分類を行った文献¹の成果を、同じく S10-GERMS 法に基づいて開発した、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のStrain Solutionに適用した結果についてご紹介します。

1 島津製作所 分析計測事業部
2 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
3 独立行政法人 理化学研究所バイオリソースセンター 微生物材料開発室
4 学校法人 名城大学 農学部 環境微生物学研究室

Table 1 供試菌株の一覧

| Species name | Strains | Ribotype ² |
|---|---|-----------------------|
| <i>L. casei</i> | NBRC 15883 ^T (=JCM 1134 ^T) | C5 |
| | JCM 8129 | C5 |
| | JCM 11302 | C4 |
| <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> | JCM 1053 | C1 |
| | JCM 1109 | C1 |
| | JCM 1111 | C1 |
| | JCM 1133 | C1 |
| | JCM 1161 | C1 |
| | JCM 1163 | C1 |
| | JCM 1181 | C1 |
| | JCM 1556 | C1 |
| | JCM 2123 | |
| | JCM 2769 | C1 |
| | JCM 8130 ^T | C1 |
| | JCM 8131 | C1 |
| | JCM 8132 | C1 |
| JCM 8133 | C1 | |
| <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> | JCM 1171 ^T | C3 |
| <i>L. rhamnosus</i> | JCM 1136 ^T | C2 |
| | JCM 1165 | C2 |
| | JCM 1553 | C2 |
| | JCM 1561 | C2 |
| | JCM 1563 | C2 |
| | JCM 2771 | C2 |
| | JCM 2772 | C2 |
| | JCM 8134 | C2 |
| | JCM 8135 | C2 |
| | JCM 8136 | C2 |

2. 方法

2-1. 供試菌株および培養条件

*L. casei*グループの菌株は独立行政法人理化学研究所バイオリソースセンター微生物材料開発室 (JCM) および独立行政法人製品評価技術基盤機構生物遺伝資源部門 (NBRC) より入手しました (Table 1)。培養は分譲機関指定の条件に従って行いました。

2-2. 基準株の*S10-spc-alpha* operonのDNAシーケンスおよびリボソームタンパク質のデータベース構築

*L. casei*グループの基準株4株 (*L. casei* NBRC 15883^T, *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^T, *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171^T, *L. rhamnosus* JCM 1136^T) および過去に*L. zeae*の基準株として提案された*L. casei* JCM 11302の*S10-spc-alpha*オペロンの塩基配列を、ゲノム解読株の塩基配列に基づき設計したプライマーセットを使用し、供試菌から調製したゲノムDNAを鋳型としたオペロンのPCR産物をDNAシーケンスすることにより決定しました。リボソームタンパク質サブユニットのORFは、決定した塩基配列からゲノム解読株の情報に基づいて決定し、その後、アミノ酸配列に置き換えました。それらのアミノ酸配列の理論分子量は、N-末端メチオニン残基の切断を翻訳後修飾として考慮して算出し、さらに、MALDI-TOF MSで実際に観測されるのはプロトンが付加した

分子のため、そのプロトンの分も加味してリボソームタンパク質の理論質量のリストを構築しました。最終的には、作成した理論質量のリストと、MALDI-TOF MSにより実測した基準株のマススペクトルを比較することによりリストの確定を行いました。

作成したリストは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にあらかじめ登録し、上述の*L. casei*グループ5株のリボソームタンパク質データベースを構築しました。加えて、JCM 8129以外の*L. casei*グループの株のリボソームタンパク質データについても、MALDI-TOF MSの実測値と基準株のデータを基にStrain Solutionにあらかじめデータベース登録しておきました。

2-3. MALDI-TOF MSによる測定

測定モード: Linear positive

マトリックス溶液: シナピン酸 10 mg/mL (50 % アセトニトリル 1% TFA) サンプル調製: TMA-緩衝液 (10 mM Tris-HCl (pH 7.8), 30 mM NH₄Cl, 10 mM MgCl₂, and 6 mM 2- mercaptoethanol) に懸濁した菌体をビーズ破砕し、菌体破砕液を調製しました。調製した菌体破砕液とマトリックス溶液を1:4の割合で混合し、おおよそ2 μLをサンプルプレートに搭載し、自然乾燥ののち、測定に供しました。

※フィンガープリント法: 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。

2-4. Strain Solutionによるリボソームタンパク質ピークのマッチングと外部ソフトウェアによる分子系統分類

Strain Solutionを用いて、MALDI-TOF MS測定により得られた *L. casei* JCM 8129のピークリストのマッチングを行い、JCM 8129が *L. casei* グループのどの種に属するか解析しました。マッチングは、あらかじめStrain Solutionに登録しておいた *L. casei* グループのリボソームタンパク質データベースを対象に行いました。

マッチングの結果、データベース登録されている *L. casei* グループ

のピークがJCM 8129のピークと一致した場合は1、一致しなかった場合は0としてバイナリ(1/0)形式のプロファイルが作成されます。このプロファイルをBionumerics (Applied Maths、国内取扱い：(株)インフォコム)によりクラスター解析することにより、JCM 8129が *L. casei* グループ基準株のどの株に近縁かを解析しました。クラスター解析のアルゴリズムはUPGMA法を用いました。

Table 2 *L. casei* グループ基準株と *L. casei* JCM 11302のリボソームタンパク質のリスト

| Protein name | Coded operon | Theoretical masses as [M+H] ⁺ | | | | |
|--------------|--------------|--|---|--|---|---------------------------|
| | | <i>L. casei</i> NBRC 15883 ^T | <i>L. paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> JCM 8130 ^T | <i>L. paracasei</i> subsp. <i>tolerans</i> JCM 1171 ^T | <i>L. rhamnosus</i> JCM 1136 ^T | <i>L. casei</i> JCM 11302 |
| L22 | <i>S10</i> | 12599.5 | 12599.5 | 12599.5 | 12599.5 | 12599.5 |
| L23 | <i>S10</i> | 11564.4 | 11561.4 | 11589.5 | 11533.4 | 11564.4 |
| L29 | <i>S10</i> | 7578.9 | 7479.7 | 7479.7 | 7578.9 | 7578.9 |
| S17 | <i>S10</i> | 9985.5 | 10071.7 | 10071.7 | 9985.5 | 9985.5 |
| S19 | <i>S10</i> | 10447.0 | 10447.0 | 10447.0 | 10447.0 | 10447.0 |
| L14 | <i>spc</i> | 13031.2 | 13036.2 | 13036.2 | 13036.2 | 13031.2 |
| L18 | <i>spc</i> | 13015.8 | 13001.8 | 13001.8 | 13015.8 | 13015.8 |
| L24 | <i>spc</i> | 11231.1 | 11231.1 | 11203.0 | 11247.1 | 11231.1 |
| L30 | <i>spc</i> | 6661.8 | 6618.8 | 6618.8 | 6661.8 | 6661.8 |
| S08 | <i>spc</i> | 14676.1 | 14644.0 | 14644.0 | 14644.0 | 14676.1 |
| S14 | <i>spc</i> | 6992.3 | 6992.3 | 7006.4 | 7006.4 | 6992.3 |
| L36 | <i>alpha</i> | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 |
| S11 | <i>alpha</i> | 13641.6 | 13641.6 | 13641.6 | 13641.6 | 13641.6 |
| S13 | <i>alpha</i> | 13426.6 | 13360.5 | 13360.5 | 13426.6 | 13412.6 |

3. 結果

3-1. *L. casei* グループのリボソームタンパク質データベース

Table 2に、*S10-spc-alpha* オペロンの塩基配列とMALDI-TOF MSの実測値に基づいて構築した、*L. casei* グループ基準株と *L. casei* JCM 11302のリボソームタンパク質の理論質量一覧を示します。

各株間で理論質量が共通しているリボソームタンパク質は4つ(L36、S19、L22、S11)あり、これらのピークは *L. casei* グループとそれ以外の菌種を区別するためのグループ特異的なマーカーとして使える可能性が示唆されます。

それ以外のリボソームタンパク質の理論質量はいくつかの株毎、あるいは株特異的な値を有しているため、これらのピークは各基準株を特徴づけるマーカーとして利用できることがこの表からも示唆されます。

3-2. MALDI-TOF MSによる測定データ

L. casei グループのマスペクトルのパターンは、グループ内の遺伝学的特性の類似性から推測されるように、互いに類似しています。

特に、*L. casei* NBRC 15883^Tと *L. casei* JCM 11302、あるいは *L. paracasei* subsp. *paracasei* JCM 8130^Tと *L. paracasei* subsp. *tolerans* JCM 1171^Tの識別を再現性良くかつ理論的根拠に基づいて行うのは、既存のMALDI-TOF MSフィンガープリンティングでは困難であることが予想されます。

しかし、多くのピークが互いに一致している中でも、Table 2から示唆され、また、Fig. 1のMALDI-TOF MSの実測データにも示されているように、例えば、リボソームタンパク質ラージサブユニットのL23、L24およびスモールサブユニットのS13に由来するピークの質量は基準株ごとに異なっています。従って、これらのマーカーピークに着目すれば、例えば、保有している *L. casei* グループの株がどの基準株に近いのか、理論的根拠に基づいて決定することができると考えられます。

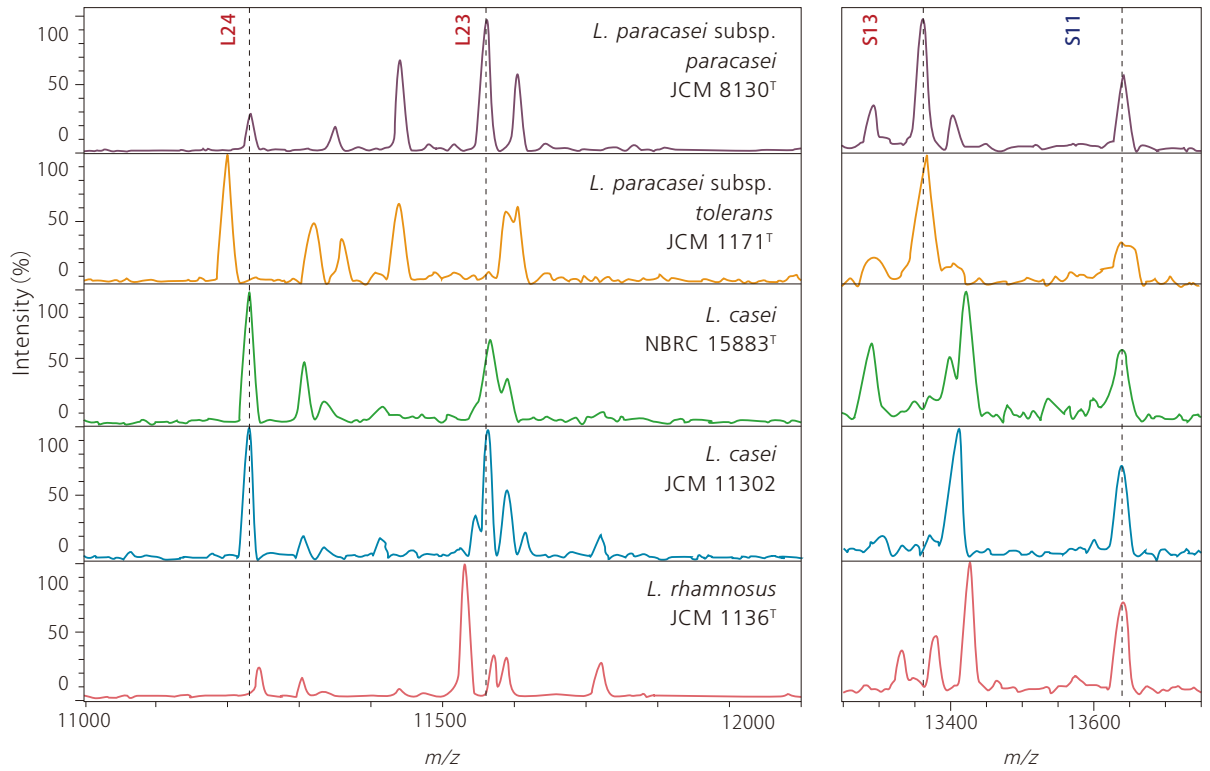


Fig. 1 *L. casei*グループ基準株と*L. casei* JCM 11302のマススペクトル(拡大図)

Figure 2 shows the matching results from Strain Solution. The table lists protein names, query scores, and scores for various reference strains.

| Protein name | Query | Lactobacillus casei NBRC 15883 ^T | Lactobacillus casei JCM 11302 | Lactobacillus rhamnosus JCM 1136 ^T | Lactobacillus rhamnosus JCM 1165 | Lactobacillus rhamnosus JCM 1553 | Lactobacillus rhamnosus JCM 1561 | Lactobacillus rhamnosus JCM 1563 |
|--------------|----------|---|-------------------------------|---|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| | Score | 14 | 13 | 9 | 9 | 9 | 9 | 9 |
| L36 | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 | 4449.5 |
| L30 | 6663.02 | 6661.8 | 6661.8 | 6661.8 | 6661.8 | 6661.8 | 6661.8 | 6661.8 |
| S14 | 6993.43 | 6992.3 | 6992.3 | 7006.4 | 7006.4 | 7006.4 | 7006.4 | 7006.4 |
| L29 | 7579.36 | 7579.9 | 7579.9 | 7579.9 | 7579.9 | 7579.9 | 7579.9 | 7579.9 |
| S17 | 9987.17 | 9985.5 | 9985.5 | 9985.5 | 9985.5 | 9985.5 | 9985.5 | 9985.5 |
| S19 | 10447.11 | 10447 | 10447 | 10447 | 10447 | 10447 | 10447 | 10447 |
| L24 | 11231.75 | 11231.1 | 11231.1 | 11247.1 | 11247.1 | 11247.1 | 11247.1 | 11247.1 |
| L23 | 11563.62 | 11564.4 | 11564.4 | 11533.4 | 11533.4 | 11533.4 | 11533.4 | 11533.4 |
| L22 | 12599.21 | 12599.5 | 12599.5 | 12599.5 | 12599.5 | 12599.5 | 12599.5 | 12599.5 |
| L18 | 13014.14 | 13015.8 | 13015.8 | 13015.8 | 13015.8 | 13015.8 | 13015.8 | 13015.8 |
| L14 | 13031.25 | 13031.2 | 13031.2 | 13036.2 | 13036.2 | 13036.2 | 13036.2 | 13036.2 |
| S13 | 13427.25 | 13426.6 | 13412.6 | 13426.6 | 13426.6 | 13426.6 | 13426.6 | 13426.6 |
| S11 | 13641.79 | 13641.6 | 13641.6 | 13641.6 | 13641.6 | 13641.6 | 13641.6 | 13641.6 |
| S08 | 14674.72 | 14676.1 | 14676.1 | 14644 | | 14644 | 14644 | 14644 |
| | 1865.89 | | | | | | | |
| | 1972.91 | | | | | | | |
| | 1977.8 | | | | | | | |
| | 1990.61 | | | | | | | |
| | 2000.37 | | | | | | | |
| | 2011.23 | | | | | | | |
| | 2025.85 | | | | | | | |
| | 2035.15 | | | | | | | |
| | 2141.13 | | | | | | | |

Fig. 2 Strain Solutionによるマッチング結果

3-3. Strain Solutionによるマッチング

MALDI-TOF MS測定により得られたJCM 8129のピークリストのマッチングをStrain Solutionにより行った結果をFig. 2に示します。マッチングの結果、ピークの質量が一致した数が最も多い株は*L. casei* NBRC 15883^T(=JCM 1134^T)でした。JCM 8129とNBRC 15883^Tは14本のリボソームタンパク質マーカーピーク全てが一致していました。この結果から、JCM 8129は、登録した*L. casei*グループのうちNBRC 15883^Tに最も近縁であると推定されました。なお、今回の結果は、過去に遺伝学的手法のリボタイピングで行われた結果²と一致していました。

3-4. 外部ソフトウェアによる分子系統分類

マッチングにより得られたバイナリ(1/0)形式のプロファイルをもとにクラスター解析を行い、分子系統分類を試みた結果をFig. 3に示します。

各基準株は独立したクラスターを形成しました(カットオフ値85%)。基準株以外の株については、それぞれの種・亜種名に該当する基準株と同一のクラスターに属しました。この結果は、過去の遺伝学的手法による分類結果²とほぼ一致していました。

上述の結果に加え、参考文献1では、*S10*-GERMS法を用いて、本レポートで紹介した以外のいくつかの*L. casei*グループの菌株について菌種名の再定義が必要であることを指摘しています。現在商業利用されている乳酸菌の菌種名には間違っているものがあるという報告³もあります。この問題を解決するために、本手法が、*L. casei*グループの迅速で正確な識別を行ううえで有力なツールとなることが期待されます。

4. 結論

- リボソームタンパク質遺伝子の塩基配列情報とMALDI-TOF MSを組み合わせた*S10*-GERMS法は、これまでのMALDI-TOF MSフィンガープリンティング法では難しかった*L. casei*グループの亜種レベルでの正確な識別を、迅速・正確に行うことができました。
- S10*-GERMS法ひいてはその原理に基づいて開発したソフトウェアStrain Solutionは、保有菌株の管理など迅速で正確な識別を必要とする様々なフィールドへの適用が考えられます。

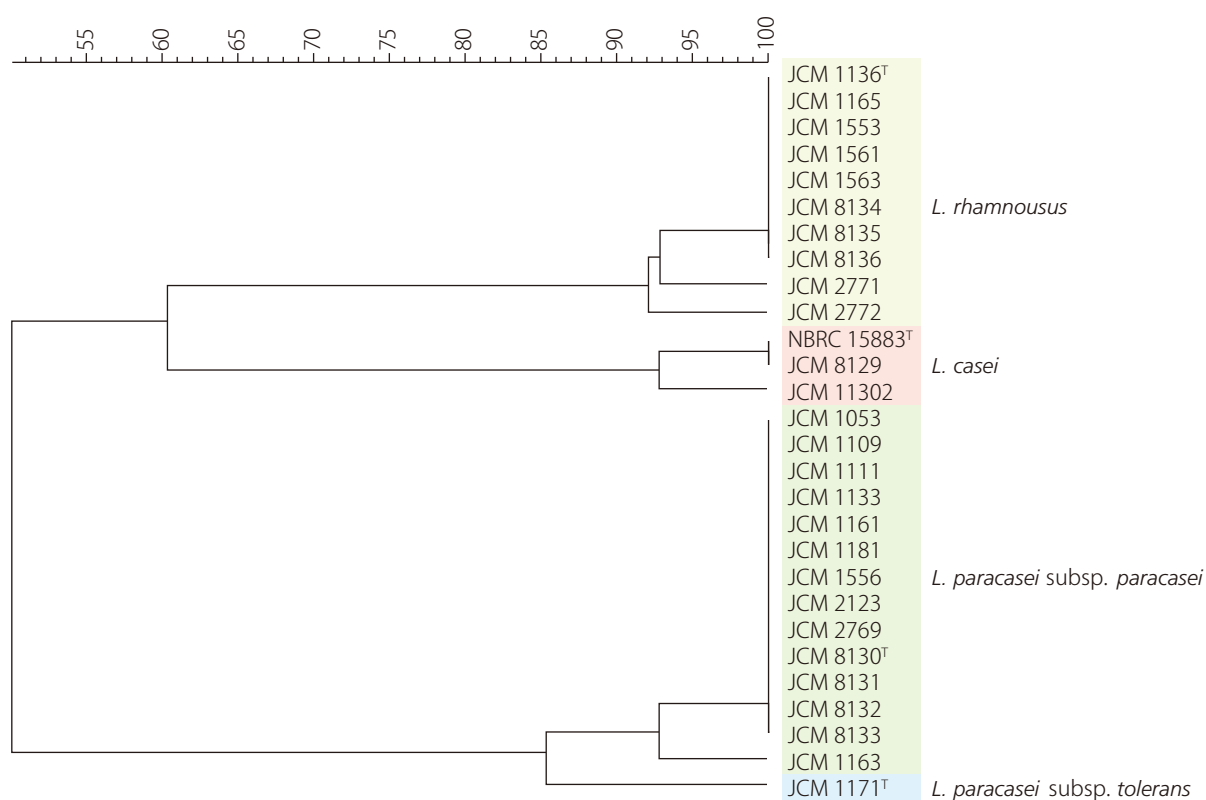


Fig. 3 *S10*-GERMSによるリボソームタンパク質のプロファイリングに基づき*L. casei*グループのクラスター解析(アルゴリズム:UPGMA)を行った結果

参考文献：

1. Sato, H., Torimura, M., Kitahara, M., Ohkuma, M., Hotta, Y., Tamura, H. (2012) Characterization of the *Lactobacillus casei* group based on the profiling of ribosomal proteins coded in *S10-spc-alpha* operons as observed by MALDI-TOF MS. *Syst. Appl. Microbiol.* 35, 447–454.
2. Ryu, C.S., Czajka, J.W., Sakamoto, M., Benno, Y. (2001) Characterization of the *Lactobacillus casei* group and the *Lactobacillus acidophilus* group by automated ribotyping. *Microbiol. Immunol.* 45, 271–275.
3. Huys, G., Vancanneyt, M., D'Haene, K., Vankerckhoven, V., Goossens, H., Swings, J. (2006) Accuracy of species identity of commercial bacterial cultures intended for probiotic or nutritional use. *Res. Microbiol.* 157, 803–810.

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。