

MALDI-MS プロテオタイピングによる アクネ菌の分類

■はじめに

Cutibacterium acnes (通称アクネ菌) は、ヒトの主要な皮膚常在菌の一種で、2016 年に *Propionibacterium* 属から新属として独立して、現在は *C. acnes* subsp. *Acnes*、*C. acnes* subsp. *Defendens*、および *C. acnes* subsp. *elongatum* から構成される 3 亜種に分類されています。*C. acnes* は、皮脂から脂肪酸を産生して皮膚を弱酸性に保つことで、病原菌から皮膚を守る重要な役割を担っている一方、ニキビや人工関節感染症の起炎菌としても知られています。このように、同じ種でも特徴が異なるため、*C. acnes* を種より細かく分類する必要があります。*C. acnes* は、複数のハウスキーピング遺伝子の配列解析を行う multilocus sequence typing (MLST) 法により細分されており、*C. acnes* subsp. *acnes* を細分したサブタイプ IA₁、IA₂、IB、および IC、*C. acnes* subsp. *defendens* により構成されるサブタイプ II、および *C. acnes* subsp. *elongatum* により構成されるサブタイプ III に分類されています。しかし、この方法では手間も時間も掛かるという課題があります。これに対して、MALDI-TOFMS で *C. acnes* を分析し、検出される数本のピークを利用するフィンガープリント法による分類法も提案されています。しかし、フィンガープリント法ではサブタイプ IA₁、IA₂、および IB のうち識別できないものがあるうえ、分析に利用されるピークが帰属されていません。このため、バイオマーカータンパク質の観測質量の理論値をアミノ酸組成から計算することができず、分析に用いるピークの観測質量も研究者により異なっており、分析結果の理論的な根拠や信頼性において課題がありました。

上記の通り、MALDI-TOFMS 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、ピークの帰属は行われません。これに対して、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計算により求める『観測質量の理論値』によりタンパク質のピークを帰属して、微生物を同定あるいは分類する『MALDI-MS プロテオタイピング』と称する方法があります¹⁾。この MALDI-MS プロテオタイピングでは、間接的に遺伝子情報を利用することで、類縁性の高い菌群でも、理論的根拠に基づいた信頼性の高い分類が可能となります。

本アプリケーションニュースでは、バイオマーカー探索にも利用できる統計解析ソフト eMSTAT Solution™や 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™を用いて *C. acnes* を MALDI-MS プロテオタイピングによりサブタイプレベルで分類した成果をご紹介します¹⁾。

■実験

供試菌株および培養条件

合計 24 株の *C. acnes* の菌株は、国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター微生物材料開発室 (JCM) より入手しました (表 1)。培養は分譲機関指定の条件に準拠して行いました。

表 1 供試菌株の一覧

Sample name	Strains	Subtype *1
<i>C. acnes</i> subsp. <i>acnes</i> (type I)	JCM 6425 ^T	IA ₁
	JCM 6495	IA ₁
	JCM 18916	IA ₁
	JCM 18922	IA ₁
	JCM 18924	IA ₁
	JCM 18907	IA ₂
	JCM 18908	IA ₂
	JCM 18910	IA ₂
	JCM 18912	IA ₂
	JCM 18917	IB
	JCM 18918	IB
<i>C. acnes</i> subsp. <i>defendens</i> (type II)	JCM 18923	IB
	JCM 18927	IB
	JCM 6473 ^T	II
	JCM 18911	II
	JCM 18913	II
	JCM 18914	II
	JCM 18915	II
JCM 18920	II	
<i>C. acnes</i> subsp. <i>elongatum</i> (type III)	JCM 18921	II
	JCM 18926	II
	JCM 18909	III
	JCM 18919 ^T	III
JCM 18925	III	

*1 Dekio, I et al., Journal of medical microbiology 2012, 61, 622-630.

リボソームタンパク質のデータベース構築

バクテリアの細胞質成分を MALDI-MS で測定すると、リボソームタンパク質が主として検出されることが知られています。*C. acnes* については多数の菌株でゲノム解析が行われており、今回用いた *C. acnes* のうち JCM 6425^T、JCM 18916、JCM 18918、JCM 6473^T、JCM 18920、および 18909 がゲノム解読株でした。タンパク質 DB に登録されている 6 株のゲノム解読株を対象にリボソームタンパク質のアミノ酸配列を入手して、観測質量の理論値を計算しました。翻訳後修飾としては、アミノ酸配列から予測できる N-末端メチオニン残基の切断を考慮しました。

MALDI-TOFMS 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 15 mg/mL (50 %アセトニトリル 1 %トリフルオロ酢酸)
MALDI-TOFMS: AXIMA Performance™
サンプル調製: Milli-Q®水に懸濁した菌体をビーズ破碎し、遠心分離によりデブリを除去したものを限外ろ過してリボソーム画分を調製しました。リボソーム画分とマトリックス溶液を 1:10 の割合で混合し、1 μL を試料プレートに滴下して乾燥させたのち、*m/z* 2000-30000 の範囲を測定しました。

MALDI マススペクトルの解析

本研究で用いた 6 株のゲノム解読株 (JCM 6425^T、JCM 18916、JCM 18918、JCM 7473^T、JCM 18920、および JCM 18909) のリボソームタンパク質のアミノ酸配列をタンパク質 DB から入手し、観測質量の理論値を計算しました。リボソームタンパク質の計算質量を Strain Solution のデータベースに登録して、試料菌株 24 株の MALDI マススペクトルを対象にピークマッチングを行い、繰り返し再現性よく検出されるリボソームタンパク質をバイオマーカータンパク質として選抜しました。試料菌株 24 株を対象にバイオマーカータンパク質のマッチングを行ってバイオマーカープロファイルを作成し、クラスター解析によりデンドログラムを作成しました (アルゴリズム: UPGMA)。サブタイプ IA₁ と IA₂ の識別に寄与するバイオマーカーピークの探索は、eMSTAT Solution を用いて行いました。

結果

C. acnes subsp. *acnes* JCM 6425^T の MALDI マススペクトルを図 1 に示します。リボソームタンパク質として帰属されたピークをアスタリスク (*) で示しています。*C. acnes* subsp. *acnes* JCM 6425^T では、31 種類のリボソームタンパク質が検出されていることを確認できました (図 1)。

Strain Solution を用いて、24 株の *C. acnes* のマススペクトルの解析を行いました。Strain Solution では、データベース登録されたバイオマーカーピークと試料菌株のピークが一致した場合は 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。このバイオマーカープロファイルを用いてクラスター解析を行い、デンドログラムを作成しました。

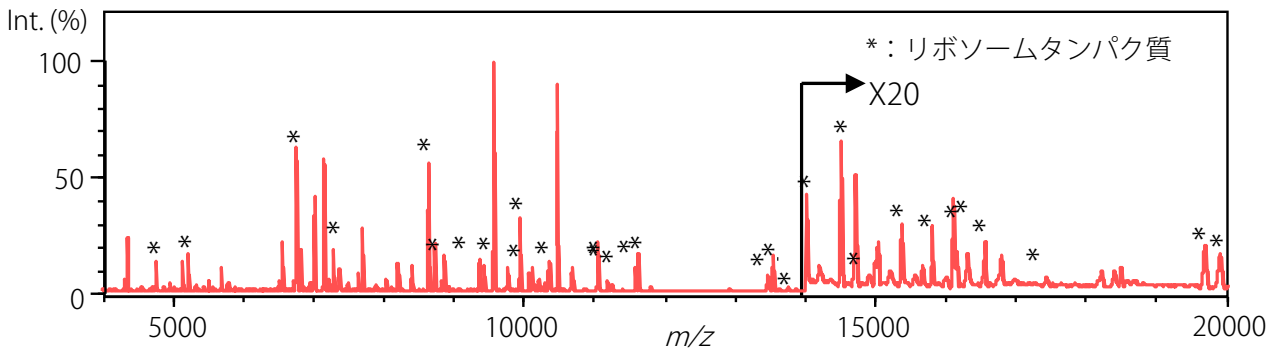


図 1 *C. acnes* subsp. *acnes* JCM 6425^T の MALDI マススペクトル

本研究に用いた全ての試料菌株で他のピークとの重複がなく、再現性良く検出できる 10 種類のタンパク質をバイオマーカータンパク質として選抜しました。これらのうち、全株で同じ m/z 値に観測されたものは L9、L29、L30、S8、S15、および S19 で、*C. acnes* の種の同定に寄与するバイオマーカータンパク質であると考えられました。一方、L6、L13、L15、および L23 は同種でもアミノ酸配列の変異を反映した観測質量の違いが認められ、亜種やサブタイプの識別に寄与すると考えられました。これら 10 種類のリボソームタンパク質の計算質量を Strain Solution のデータベースに登録して、24 株の *C. acnes* のピークマッチングしてバイオマーカープロファイルを作成しました。その結果、亜種レベルでは *C. acnes* を分類できましたが、*C. acnes* subsp. *acnes* のサブタイプ IA₁ と IA₂ を識別することができませんでした。

そこで、eMSTAT Solution を用いて、サブタイプ IA₁ と IA₂ との識別に寄与するバイオマーカータンパク質を探索しました。その結果、 m/z 7035 に検出されるピークが、サブタイプ IA₁ に特異的で、これにより IA₁ と IA₂ を識別できることが示されました (表 2)。

表 2 ピークマトリックス

<input checked="" type="checkbox"/>	m/z	IA1(15)	IA2(12)	IB(12)	II(24)	III(9)
<input checked="" type="checkbox"/>	7004.92	0	11	12	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	7019.87	13	6	7	24	9
<input checked="" type="checkbox"/>	7034.53	15	0	0	0	0
<input checked="" type="checkbox"/>	7046.91	0	0	0	2	0
<input checked="" type="checkbox"/>	7049.97	0	3	0	7	0
<input checked="" type="checkbox"/>	7062.00	0	0	0	0	9

eMSTAT Solution で作成されるピークマトリックスでは、各試料の繰り返し測定において、特定の m/z 値のピークが検出された回数が表示されます。

繰り返し測定回数に対する割合はセルの色で示されます。

緑色：全ての繰り返し測定において、設定した条件ではピークが検出されなかった。

濃いピンク色：全ての繰り返し測定において、設定した条件でピークが検出された。

m/z 7035 に検出されたピークは、先行研究者らも *C. acnes* のタイピングに利用しているものと考えられました。しかし、先行研究者らが利用しているバイオマーカーピークの観測質量には研究者によって差があるうえ、同じバイオマーカータンパク質で識別できるサブタイプが異なっていました。例えば、Nagy ら²⁾ は m/z 7035 のピークは IA₁ と IA₂ に共通であることを報告していますが、Dekio ら³⁾ は m/z 7035 が IA₁ に特異的であることを報告しており、本研究結果を支持するものでした。そこで、 m/z 7035 に観測されるピークに関連するタンパク質をペプチドマスフィンガープリント法により分析しました。その結果、 m/z 7035 のピークは、当時 hypoxetrical protein として登録されており、その後“antitoxin”としてアノテーションされたタンパク質に由来することが分かりました。IA₁ 以外のサブタイプに対して登録されている antitoxin のアミノ酸配列を調べると、サブタイプの違いを反映したアミノ酸残基の変異が確認されました。アミノ酸配列から予測された計算質量にピークが観測されていることも確認されました。なお、先行研究者がバイオマーカーに用いている m/z 7200 付近に検出されるもう一つのピークは CsbD-like protein として同定されました。このタンパク質にもサブタイプを反映したアミノ酸残基の変異があり、それを反映したピークも実際に確認されました (図 2)。

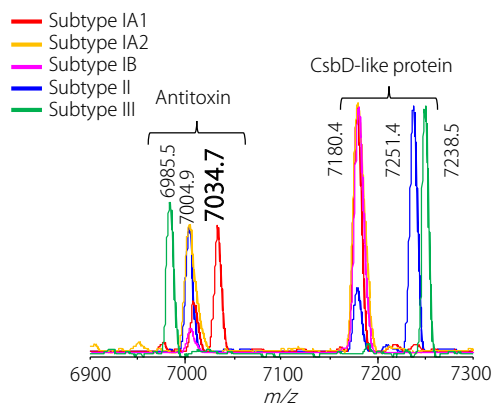


図 2 *C. acnes* の m/z 6900–7300 における MALDI マススペクトル

表 3 *C. acnes* の antitoxin および CsbD-like protein の観測質量の理論値とアミノ酸配列

Antitoxin (66 aa)
Calculated mass: m/z 7034.6 (IA ₁)
MGLFDKAKDAISRQDDIKNQASQHSQEQGIDKAGNTVDDKTGGKFSQIDKQDALKDKLGDLD
Calculated mass: m/z 7004.5 (IA ₂ , IB, IC, and III)
MGLFDKAKDAISRQDDIKNQASQHSQEQGIDKAGNAVDDKTGGKFSQIDKQDALKDKLGDLD
Calculated mass: m/z 6985.5 (II)
MGLFDKAKDAISDHQDDIKNQASQHSQEQGIDKAGNAVDDKTGGKFSQIDKQDALKDKLGDLD
CsbD-like protein (71 aa)
Calculated mass: m/z 7179.9 (IA ₁ , IA ₂ , IB, IC and III)
MGLSDKINSKSDEAVGAAKEKIGGLTDDSDLKSEGADQKASGKVAQKVEDVKDKANDLKHNVAADKLLKG
Calculated mass: m/z 7238.0 (III)
MGLSDKINSKSDEAVGAAKEKIGGLTDDSDLKSEGADQKASGKVAQKVEDVKDKANDLKHNVAADKLLKG
Calculated mass: m/z 7251.0 (II, ST 42 and 46)
MGLSDKINSKSDEAVGAAKEKIGGLTDDSDLKSEGANQKASGKVAQKVEDVKDKANDLKHNVAADKLLKG
Calculated mass: m/z 7265.0 (II, ST 43)
MGLSDKINSKSDEAVGAAKEKIGGLTDDSDLKSEGANQKASGKVAQKVEDVKDKANDLKHNVAADKLLKG

表4 バイオマーカープロファイル

Strains		Biomarker proteins															
subtype	JCM	L9	L29	L30	S8	S15	S19	Antitoxin	L6		L13		L15		L23		
		16119	8755	6787	14526	10081	10380	7035	19679	19707	16154	16168	16182	15358	15385	11181	11200
IA ₁	6425 ^T	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
	6495	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
	18916	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
	18922	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
	18924	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1
IA ₂	18907	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
	18908	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
	18910	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
	18912	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1
IB	18917	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
	18918	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
	18923	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
	18927	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1
II	6473 ^T	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
	18911	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
	18914	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
	18915	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
	18920	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
	18921	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1
	18913	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
	18926	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1
III	18909	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
	18919 ^T	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0
	18925	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0

eMSTAT Solution を用いた解析によりサブタイプ IA₁ と IA₂ の識別に寄与する antitoxin を新たにバイオマーカータンパク質に加えて Strain Solution で分子系統解析を行いました。Strain Solution で作成したバイオマーカープロファイルをもとめて表4に示しました。このピークプロファイルに基づき、Strain Solution でクラスター解析を行い、デンドログラムを作成した結果を図3に示します。

リボソームタンパク質に本研究で帰属された antitoxin 由来のピークをバイオマーカーピークに加えることにより、*C. acnes* のサブタイプを正しく分類することができました。

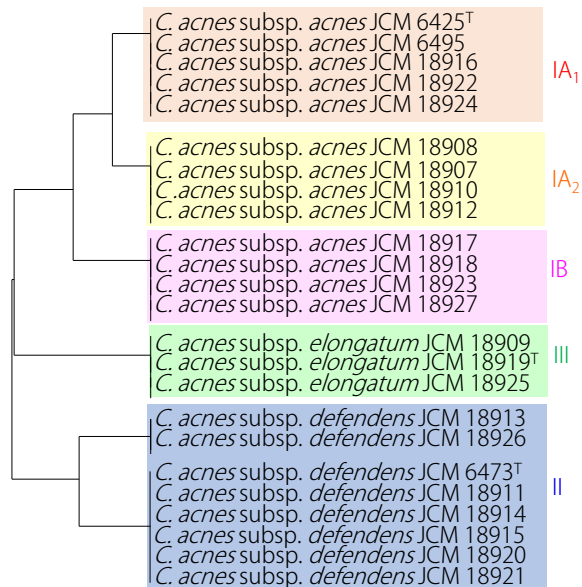


図3 10種類のリボソームタンパク質と antitoxin のプロファイリングに基づく *C. acnes* のクラスター解析結果

まとめ

一般に複数のハウスキーピング遺伝子の塩基配列解析によるタイピング (MLST 法) によりサブタイプレベルの分類が行われる *C. acnes* を MALDI-MS プロテオタイピングにより分類できました。ここでは微生物分析を支援する2つのソフトウェアの応用を紹介しました。Strain Solution はマスペクトル解析とクラスター解析に、eMSTAT Solution は多検体の観測ピークの解析によるバイオマーカー探索に有効です。

<参考文献>

- 1) Teramoto, K. et al., Proc. Jpn. Acad., Ser. B 2019, **95**, 612-623.
- 2) Nagy, E. et al., Anaerobe 2013, **20**, 20-26.
- 3) Dekio, I. et al., Journal of medical microbiology 2012, **61**, 622-630.

AXIMA、AXIMA Performance、Strain Solution、および eMSTAT Solution は、株式会社 島津製作所の日本およびその他の国における商標です。Milli-Q は、Merck KGaA の商標です。

株式会社 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

初版発行：2020年8月

島津コールセンター ☎0120-131691
(075) 813-1691

※本資料は発行時の情報に基づいて作成されており、予告なく改訂することがあります。
改訂版は下記の会員制 Web Solutions Navigator で閲覧できます。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/solnavi/solnavi.htm>

会員制情報サービス「Shim-Solutions Club」にご登録ください。

<https://solutions.shimadzu.co.jp/>

会員制 Web の閲覧だけでなく、いろいろな情報サービスが受けられます。