

## 菌体培養時間による 組成タンパク質の挙動解析

阪下七海

### ユーザーベネフィット

- ◆ eMSTAT Solutionの多変量解析機能により、見た目や菌体数では分からない差異を明らかにすることができます。
- ◆ アノテーション機能を用いることで、サンプル中に含まれる組成タンパク質を推定することができます。
- ◆ MALDI-8020/30は分析速度が速く、多量のサンプルを短時間で分析することができます。

### ■はじめに

微生物は培養時間や培養する培地の種類、温度等によって、分析した際に検出される物質に変化が生じます。これは環境ストレスや、培養フェーズによって、菌体内の産生物質に変化が生じる為です。このことから、微生物の解析や識別をする場合には、未知菌体の培養・分析を行う前に標準的な菌体を用いて目的物質が産生される培養条件や前処理方法を最適化する必要があります。これらの条件検討では複数の要因を検討する必要があり、分析・解析するサンプル数が多量になることは少なくありません。

本アプリケーションニュースでは、菌体分析の条件検討例として、微生物同定の際に校正試料として使用する大腸菌 DH5α株を培養し、時間の経過によって検出される組成タンパク質の変化をMALDI-8030およびeMSTAT Solutionを用いて解析しました。



図1 MALDI-8030

### ■菌体培養と前処理条件

培地には市販の液体LB培地を使用しました。37℃で振盪培養し、4、8、16、24、32、52、56時間培養した7種類の培養液を作成しました。培養液を3,200 gで5分間遠心分離して上清をデカント後、再度蒸留水で懸濁し、3,200 gで5分間遠心分離して上清をデカント後、蒸留水で懸濁しました。懸濁液のOD600値を吸光度計で測定し、菌体数を算出しました。(OD600=1の場合 $1 \times 10^8$  cfu/mLとして計算。)

続いて、懸濁液をMALDI-8030(図1)のサンプルプレートにアプライした際の菌体数が $10^5$ 個になるように、 $\alpha$ -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸(CHCA)溶液で希釈しました。それぞれの希釈溶液を1  $\mu$ Lずつサンプルプレートにアプライした後、乾固させ、MALDI-8030で分析しました。分析条件を表1に示します。菌体数算出後の前処理および分析時間は約1時間程度で実施できました。

表1 MALDI-8030の分析条件

質量範囲	: 2,000-20,000
検出モード	: Positive
マトリックス	: 10 mg/mL CHCA
遅延引き出し条件	: $m/z \geq 12,000$

### ■DH5α株の増殖数

培養したDH5α株の増殖曲線を図2に示します。4時間経過時点で対数増殖期に入っており、8時間経過時点から菌体増加数と死滅する菌体数の均衡が保たれる静止期に入りました。

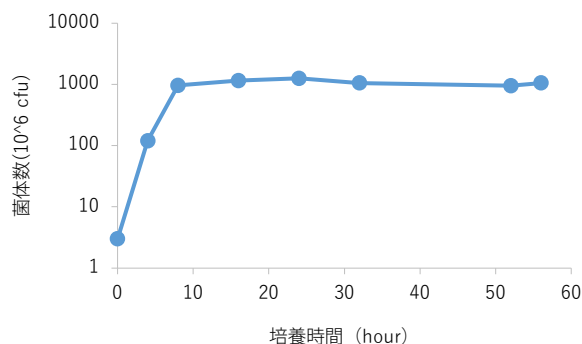


図2 培養サンプルの増殖曲線

### ■eMSTAT Solutionによる多変量解析

各培養条件について6個ずつ、計42データを取得しました。測定データをeMSTAT Solutionを用いて多変量解析した結果を図3に示します。Score Plotは各MSスペクトルを比較し、特徴の類似度に基づいてプロットしています。Loading Plotは各データの分離に寄与する $m/z$ を点で示しています。図2の増殖曲線では対数増殖期と静止期の2つのグループに分かれていましたが、多変量解析では大きく3つのグループに分かれました。Loading Plotを確認すると各グループがプロットされている方向に向かって、複数の特徴的なピークが存在することが分かりました。

## ■ アノテーションによるタンパク質の推定

これらの特徴的なピークについて、タンパク質を推定するために、遺伝子情報を用いてアノテーションを行いました。DH5α株の遺伝子情報を National Center for Biotechnology Information (NCBI: アメリカ国立生物工学情報センター) のデータベースから目的の遺伝子情報を取得し、タンパク質の一次配列情報に翻訳することで、検出されるタンパク質の理論分子量を算出し、また一部のタンパク質については参考文献を基に翻訳語修飾後の質量値を用いました。この情報をeMSTAT Solutionに取り込んだPeak Matrixが図4になります。Loading Plotと照らし合わせると、矢印で示した7本のピークについてタンパク質を推定することができました。HdeBはS16と重複してアノテーションされていますが、質量値がHdeBは9068、S16は9060.36であることから、数値の近いHdeBであると推定しました。

これらのピークについて、各グループでの検出頻度を確認すると、HdeA/HdeB以外の5つのタンパク質はリボソームタンパク質で全グループで検出されていました。これは培養開始時から産生されていると考えられることから、これらのタンパク質による差異はピークの有無ではなく、検出強度の違いとして現れたと推察されます。一方でHdeA/HdeBは増殖が一定となった8時間後から検出されています。HdeA/HdeBはシャペロンの一つであり、培養飽和後のストレス環境下で活性化しているためと推察されます。

## ■ まとめ

eMSTAT Solutionを用いて菌体の培養時間経過による組成タンパク質の変化を解析しました。菌体のような多数のピークが得られるサンプルであっても、遺伝子情報とアノテーション機能を活用することで、グループ間の特徴の違いを、推定されたタンパク質の情報を基に考察することができました。

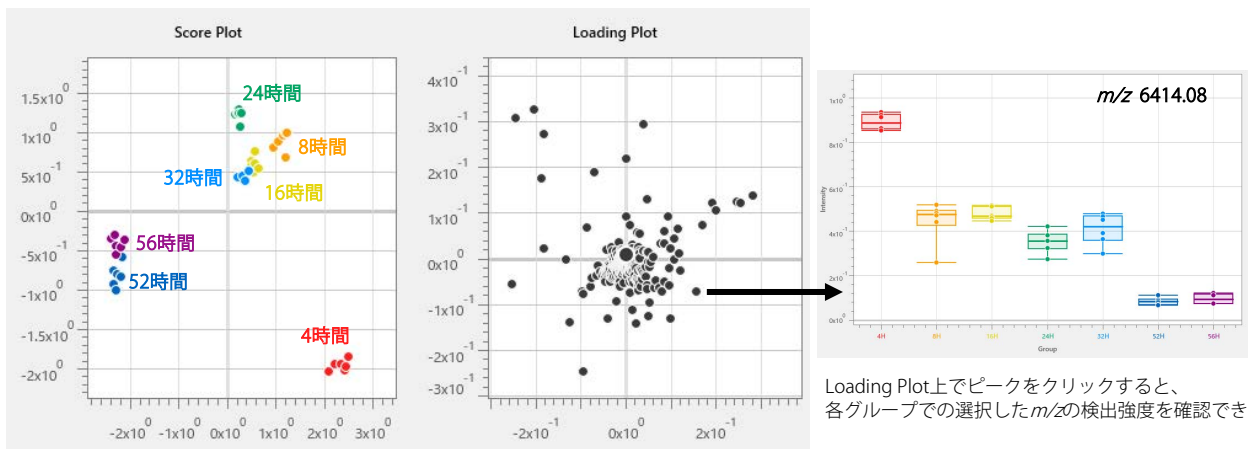


図3 eMSTAT Solutionでの多変量解析の結果

m/z	Annotation	ANOVA	4H(6)	8H(6)	16H(6)	24H(6)	32H(6)	52H(6)	56H(6)
9743.1615	HdeA	1.0728E-34	0	6	6	6	6	6	6
4366.4949	S0S_L36	2.149E-22	6	6	6	6	6	6	6
5464.8250	S0S_L36	1	0	1	0	0	0	0	0
7155.4187	S0S_L35	1	1	0	3	1	2	4	4
5383.3315	S0S_L34	1.7554E-33	6	6	6	6	6	6	6
6240.7242	S0S_L33	0.52413	5	2	3	1	2	0	0
6318.5068	S0S_L32	2.192E-33	6	6	6	6	6	5	4
7874.4455	S0S_L31	3.3942E-17	6	6	6	6	6	5	4
6414.0821	S0S_L30	1.044E-20	6	6	6	6	6	6	4
7276.6734	S0S_L29	0.015685	6	6	6	6	6	6	6
8878.4124	S0S_L28	8.8827E-22	6	6	6	6	6	1	3
8996.4393	S0S_L27	3.9232E-23	6	6	6	6	6	1	0
10701.2731	S0S_L25	0.73419	3	0	0	0	0	0	0
11202.7791	S0S_L23	1	3	0	0	0	0	0	0
9556.3687	S0S_S5_partial	1.1443E-14	6	6	0	1	0	0	0
8372.1134	S0S_S21	6.4416E-20	6	6	6	6	6	0	0
9547.3077	S0S_S20	1	0	0	1	1	0	0	0
10303.0261	S0S_S19	2.5899E-06	6	4	5	1	3	0	0
9067.5841	S0S_S16.HdeB	1.6776E-28	0	6	6	6	6	6	6
10141.574	S0S_S15	1	4	0	3	1	3	0	0

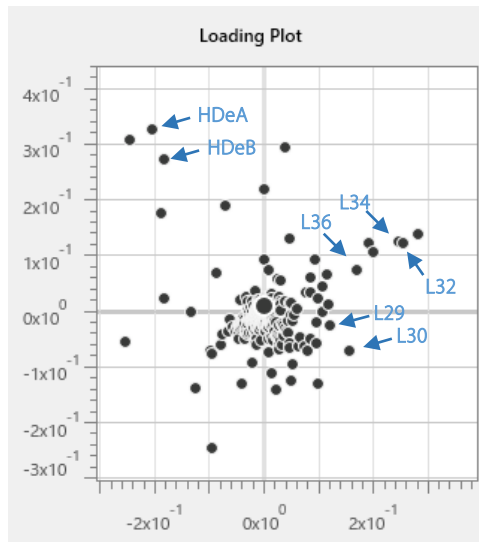


図4 アノテーションの結果 左図: Peak Matrix、右図: Loading Plot

<参考文献>Michelle Q. Carter, Jacqueline W. Louie, Clifton K. Fagerquist, Omar Sultan, William G. Miller, Robert E. Mandrell Evolutionary Silence of the Acid Chaperone Protein HdeB in Enterohemorrhagic Escherichia coli O157:H7 Applied and Environmental Microbiology p. 1004-1014

eMSTAT Solutionは、株式会社島津製作所またはその関係会社の日本およびその他の国における商標です。

**株式会社 島津製作所** 分析計測事業部  
<https://www.an.shimadzu.co.jp/>

初版発行: 2023年 9月  
 01-00627A-JP A改訂版発行: 2024年 3月  
 島津コールセンター ☎ 0120-131691

本書に記載されている製品は、医薬品医療機器等法に基づく医療機器として承認・認証等を受けた機器ではありません。  
 本書に記載されている分析手法を診断目的で使用することはできません。

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。  
 本文中に記載されている会社名および製品名は、各社の商標および登録商標です。  
 本文中では「TM」、「®」を明記していない場合があります。