

## 主成分分析によるバクテリアの

### プロテオーム解析

岡本陽<sup>†</sup> 田口善弘<sup>††</sup>

プロテオーム解析による表現形の理解のために、膨大なデータを生物学的な解釈に導く為の解析法が重要である。我々は主成分分析(PCA)を用いて、セレウス菌の増殖に伴うプロファイル変化の解釈を試みた。PCAの結果、合計10個のタンパク質が意味のある形で結合しており、生物学的に意味のある形で抽出された。以上の結果から、主成分分析がプロテオーム解析の解釈に有効であることが示唆された。

## Principal Component Analysis for Bacterial Proteomic Analysis

AKIRA OKAMOTO<sup>†</sup> YOSHIHIRO TAGUCHI<sup>††</sup>

Data-mining technique is important for understanding biological phenotype with a large-scale dataset derived from comprehensive analysis such as shotgun proteomics. We attempted to illustrate differences of proteomic profiles among growth phase and cellular fractionation in *Bacillus cereus* by principal component analysis (PCA). Total 10 proteins that of significance for biological phenotypes were picked by PCA analysis. These results suggested that the PCA is useful tool for understanding proteomic analysis.

### 1. はじめに

古典的な細菌学はこれまで、下痢原性大腸菌や赤痢菌による下痢症におけるペロ毒素や、コレラ菌によるコレラ症におけるコレラ毒素などのように、その毒素タンパク質や内毒素といったそれ単体で一定の病態を説明できるような生体分子を解析対象として、病態の解明や感染制御などに役立ててきた。しかしながら、黄色ブドウ球菌や *Bacillus cereus* (セレウス菌) など、環境の汚染を契機とする日和見感染的な侵襲性重症感染症のように、病原性を説明できる決定的な毒素分子が病原体の側に見当たらないような場合は、主に侵襲をうける宿主側の因子が大きく関与するとされるのみであり、生物が環境中でどのような振る舞いをとっているのかについてはこれまでほとんど注目されていなかった。日和見感染的な微生物が環境中でどのような表現形を示しているのかについて記述するために、網羅的解析、およびその解釈が必要であると思われる。

セレウス菌は芽胞形成性の通性嫌気性グラム陽性桿菌である。臨床的には嘔吐、あるいは下痢を引き起こす食中毒原因菌として知られている他、輸血用保存血液の汚染や、易感染宿主に対して侵襲的な血流感染などを引き起こす<sup>(1-3)</sup>。侵襲的な患者への感染については、環境中から偶発的に感染を引き起こすと言うよりも、おそらく輸血用血液や医療器具などの汚染を足がかりとした間接的な感染であると考えられている。したがって、セレウス菌が環境中でどのような挙動を示しているのか、その表現形を分子生物学的に明らかにする必要がある。

生物の表現形を定性・定量的に評価する為には、生体分子の網羅的解析手法が必要不可欠である。静的とされるゲノム解析の情報を基本的な情報として、そこから転写された RNA 分子を網羅的に評価するトランスクリプトーム解析、その翻訳産物であるタンパク質を網羅的に評価するプロテオーム解析、また代謝産物を網羅的に検出するメタボローム解析などに代表される。その中でも、生物が行う代謝活動の多くをタンパク質が担っていることから、プロテオーム解析による評価はその生物の表現形をもっともよく反映していると考えられる。プロテオーム解析においては液体クロマトグラフィ(LC)、質量分析に関するハード面での技術は飛躍的に進歩してきているが、そこから出力される膨大なデータから生物学的な意味を見いだすための技術はまだ模索されている段階であり、これまでのショットガンプロテオームを用いた研究では主に階層的クラスタ解析により関連性のあるタンパク質を見い

<sup>†</sup>名古屋大学大学院医学系研究科

Nagoya University Graduate School of Medicine

<sup>††</sup>中央大学理工学部

Chuo University Faculty of Science and Technology

だしている<sup>4)</sup>。

我々はセレウス菌の環境中における表現形を解釈するために、室温付近 (25°C) での増殖中期から後期にかけて発現しているタンパク質の網羅解析を行い、主成分分析によりそれぞれの培養段階において主成分を構成したタンパク質を探索した。それらタンパク質の分子生物学的な特徴から、それぞれの増殖段階と局在を特徴付ける解釈を検討した。

## 2. 方法

### 2.1 プロテオーム解析

本研究では、ヒト臨床由来株の *B. cereus* NC7401 株を用いた。25°Cで2.5時間培養したものを中期対数増殖期 (OD<sub>660</sub>=0.6), 及び5時間培養したものを後期対数増殖期 (OD<sub>660</sub>=2.0) とした。培養後の菌体を遠心分離で上清分画と菌体分画に分離した。菌体分画はPBSで懸濁し、フレンチプレスにより細胞を破碎した後、細胞溶液を遠心分離により分離し、上清分画を可溶性分画、ペレットを難溶性分画とした。それぞれの分画に含まれるタンパク質をTCA-アセトン沈殿により粗精製した。粗精製したタンパク質は還元アルキル化処理を行った後、Lysyl Endopeptidase, 及びTrypsinを用いて断片化し、質量分析に供する検体とした。断片化したペプチドの検出には、Paradigm MS4 LC system (Michrom BioResources 社) を接続したLTQ-Orbitrap XL (ThermoFisher Scientific 社) を用いた。LTQを用いて得られたスペクトラムは、*B. cereus* NC7401 株のゲノム解析より構築したタンパク質のアミノ酸配列リストをデータベースとしたMASCOTプログラムにより同定を行った。タンパク質の同定については、あるタンパク質のアミノ酸配列に対応するユニークな2箇所以上の配列が検出されていることを基準とした。これと同じく、データベースとしたアミノ酸配列をランダム化したdecoyデータベースを参照した解析を行い、False discovery rateを算出し妥当性を評価した(表1)。対数増殖期中期と対数増殖期後期のそれぞれにおける上清分画, 可溶性分画, 不溶性分画の各実験系はそれぞれ3回測定した。

主成分分析の要素として、%emPAIを用いた<sup>5, 6)</sup>。emPAIはタンパク質の存在量を表す数値であり、%emPAIはあるタンパク質のemPAIをその検体において検出した全てのemPAIの合計値で除した数値である。

### 2.2 主成分分析

主成分分析はいわゆる「次元の縮約」を行う多変量解析の手法である。今の場合を例にとって説明する。 $x_{sp}$ を実験  $s(=1, \dots, S)$  におけるタンパク質  $p(=1, \dots, P)$  の「量」であるとすると、これは

1) 「P種類の蛋白質の存在量がS種類の実験を特徴付けた=P次元ベクトルがS本

ある」

と解釈することも可能であるし、

2) 「S種類の実験における存在量がP種類のタンパク質を特徴付けた=S次元ベクトルがP本ある」

と解釈することも可能である。いずれの場合も、ベクトルの各成分が完全に独立であるとは限らない。例えば1)の場合、タンパク質  $p_1$  と  $p_2$  の存在量がS種類の実験に渡ってほぼ同じであるとしよう。この場合、 $p_1$  と  $p_2$  を別々に考えるより  $x_{sp12} \equiv (x_{sp1} + x_{sp2}) / 2$  という新しい「量」を考えようが合理的であろう。この結果個々の実験を特徴付ける「状態ベクトル」である「P種類のタンパク質の存在量」たるP次元のベクトルは、(P-1)次元で実はじゅうぶんであることがわかる。この様に「状態ベクトル」の冗長性を排除し、なるべく少ない次元数の「状態ベクトル」でS種類の実験を説明しようというのがPCAの精神である(全く同じことが2)の場合にも可能であることは容易に想像できるだろう)。本研究ではこれら1)と2)のPCAを縦横無尽に使い分けて段階的に自由度を低減していくことを目指す。

具体的にD次元に縮約する場合、1)の場合には実験sの状態ベクトル  $x_s$  は

$$x_s = (y_s^1, y_s^2, \dots, y_s^D), y_s^i = \sum_p a_{ip} x_{sp}$$

と表現され2)の場合にはタンパク質pの状態ベクトル  $x_p$  は

$$x_p = (y_p^1, y_p^2, \dots, y_p^D), y_p^i = \sum_s a_{is} x_{sp}$$

で表現される。 $a_{ip}$  や  $a_{is}$  をどう求めるか、Dをどう決めるかなどは文献に譲る。

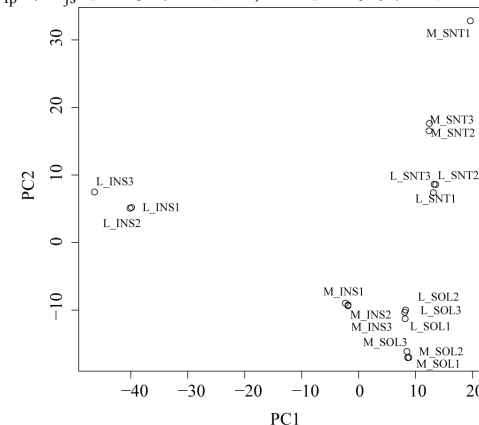


図1. 主成分分析. 全てのタンパク質を要素とするPCAプロット図.

Fig. 1. Principal component analysis. PCA with all identified proteins.

表 1. プロテオーム解析概要.  
Table 1. Result overview of shotgun proteomic analysis.

growth phase	cell fraction	experiment name	number of queries	identified peptide number in real DB	identified peptide number in decoy DB	False Discovery Ratio	Identified Protein Number
mid-log	supernatant	M_SNT1	5,845	140	21	13.0%	37
		M_SNT2	5,940	115	20	14.8%	39
		M_SNT3	5,626	99	22	18.2%	38
	insoluble	M_INS1	7,892	2,468	91	3.6%	388
		M_INS2	8,035	2,481	90	3.5%	388
		M_INS3	7,847	2,429	93	3.7%	393
	soluble	M_SOL1	8,433	3,265	103	3.1%	415
		M_SOL2	8,301	3,212	107	3.2%	506
		M_SOL3	8,332	3,179	102	3.1%	497
late-log	supernatant	L_SNT1	8,321	2,988	91	3.0%	229
		L_SNT2	8,380	2,996	98	3.2%	227
		L_SNT3	8,546	3,013	94	3.0%	229
	insoluble	L_INS1	9,888	3,898	132	3.3%	183
		L_INS2	9,845	3,693	119	3.1%	182
		L_INS3	9,112	2,705	120	4.2%	153
	soluble	L_SOL1	10,253	5,036	150	2.9%	387
		L_SOL2	10,434	5,050	146	2.8%	389
		L_SOL3	10,473	5,067	162	3.1%	388

### 3. 結果

プロテオーム解析により得られた結果の概要を表 1 に示す. ゲノム解析により予測されている 5,682CDS (染色体 5,415 CDS, プラスミド DNA 267 CDS) のうち, 635 CDS (染色体 DNA 621 CDS, プラスミド DNA 14 CDS) に由来するタンパク質を同定した.

方法 1) の PCA を行い,  $D=2$  で平面に  $S (=18)$  種類の実験を埋め込んだところ, 対数増殖期中期と対数増殖期後期のそれぞれにおける上清, 可溶性画分, 不溶性画分の各実験系はそれぞれがクラスタを形成した (図 1). このことから個々の実験群はお互いに共通で特徴的なタンパク質の存在量を持ち, 他の実験群と峻別可能になっていることが予想される. 実際方法 2) の PCA を行い,  $a_{js}(j=1, 2)$  を計算し,  $j$  ごとに大きさ順に並べてみると図 2a と b の様に, 実験群ごとに同じくらいの大きさの  $a_{js}$  を持っていることがわかる. このことは  $x_{sp}$  の大きさが各実験群ごとに共通であることを示唆している. 具体的にどの様に共通であるかを見るために方法 2) の PCA を行ったところ, ごく少数のタンパク質 (具体的には 4 つ) が他のタンパク質の集

団から大きく離れていることがわかった (図 3a). そこでこの 4 つだけを考慮して再度方法 1) の PCA を行ってみた (図 3b) とところ, 実験の位置関係が図 1 とほとんど変わらないことを見出した.

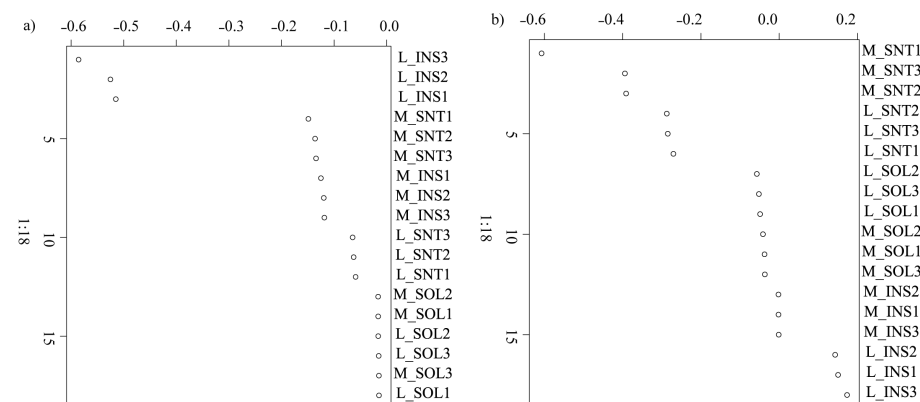


図 2. PCA における  $a_{js}$  のプロット図.  $j=1$  (a) および  $j=2$  (b)

Fig 2. Plot of  $a_{js}$  plot in PCA.  $j=1$  (a), and  $j=2$  (b).

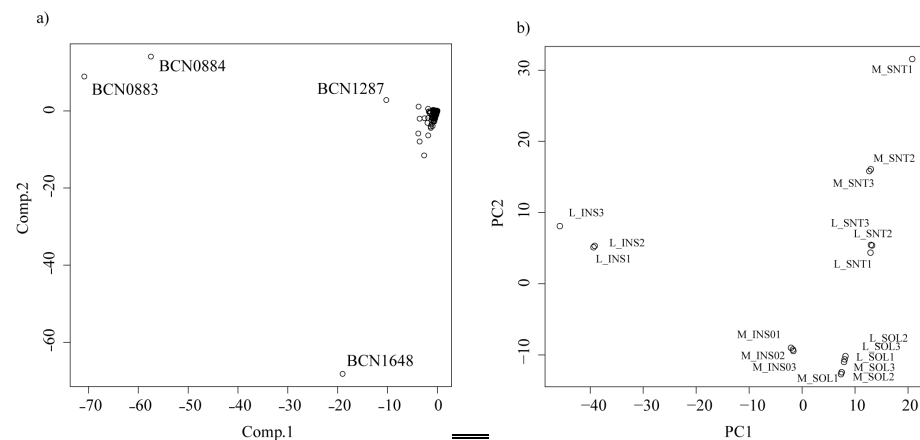


図 3. 各実験群の峻別に寄与したタンパク質の抽出. PCA によるタンパク質の抽出 (a), およびそれにより抽出した 4 つのタンパク質のみを考慮した PCA プロット (b).

Fig. 3. Picked-up proteins with PCA analysis. Proteins plot in PCA (a) and PCA plot with four selected proteins (b).

このことは図1に見られたような実験条件ごとの特徴がこの4つのタンパク質の存在量でほぼ決まっていることを意味している。図4aにこの4つのタンパク質の存在量を実験条件ごとに示した。予想通り、この4つのタンパク質の存在が実験群ごとに共通でかつ他の実験群とは対照的であった。具体的には、BCN0883, BCN0884, BCN1287 が不溶性画分, BCN1648 は上清画分の峻別に大きく寄与している因子として抽出された(表2)。これに対して、可溶性画分はこの4つのいずれも顕著に検出されないという意味で他の2つの実験条件群とは峻別される特徴的なタンパク質の発現パターンを持っていることがわかった。

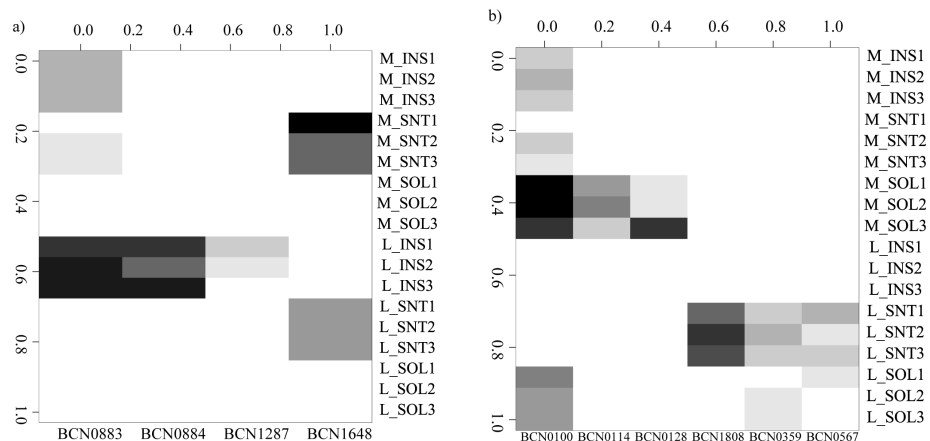


図4. PCA解析により選択されたタンパク質の存在量(%emPAI)のヒートマップ図。最初のPCAにより抽出された4個のタンパク質(a), および2回目のPCAにより抽出された6種のタンパク質。

Fig. 4 Heatmap of the abundance (%emPAI) of four selected proteins in primary PCA (a), and six selected proteins in secondary PCA (b).

それでは、可溶性画分に特徴的なタンパクはなんであろうか。このことを確認するため前述の4つのタンパク質を除いて再び主成分分析を行った(図5a)。同様の解析を繰り返した結果、BCN0359, BCN0567, BCN1808 が培養後期の上清画分, BCN0100, BCN0114, BCN0128 が培養中期の可溶性画分の峻別に寄与する因子として抽出され(表2)、この6つだけを考慮しても方法1)のPCAの結果は変わらないことがわかった(図5b)。実際、全ての実験系におけるこの6つのタンパク質の存在量(%emPAI)を図4bに示したが、これらは実験群を峻別する特徴的なタンパクであることが明らかである。

表2. 主成分分析により抽出された各実験系に特異的なタンパク質

Table 2. Proteins that extracted as a main determinant in each experiment with PCA analysis. Tag number; gene tag in genome analysis, SNT; supernatant fraction, INS; insoluble fraction, and SOL; soluble fraction. ND, Not Detected.

tag number	CDS information	average %emPAI					
		mid-log			late-log		
		SNT	INS	SOL	SNT	INS	SOL
BCN0883	S-layer protein sap precursor	6.21	13.60	0.17	1.10	38.80	0.22
BCN0884	S-layer protein EA1	0.99	0.09	ND	0.95	34.72	0.07
BCN1287	phaP protein	ND	0.63	ND	ND	6.34	0.47
BCN1648	flagellin	35.18	0.65	0.82	19.25	0.08	2.86
BCN0359	alkyl hydroperoxide reductase, subunit C	ND	0.58	0.95	4.84	0.09	1.76
BCN0567	alanine dehydrogenase	ND	0.13	0.29	4.39	0.03	1.42
BCN1808	enterotoxin	0.81	ND	ND	12.42	0.01	0.05
BCN0100	ribosomal protein L7/L12	3.54	4.09	16.00	0.21	0.17	7.27
BCN0114	ribosomal protein S19	ND	0.35	6.80	ND	ND	0.42
BCN0128	ribosomal protein L30	ND	0.90	6.25	ND	ND	ND

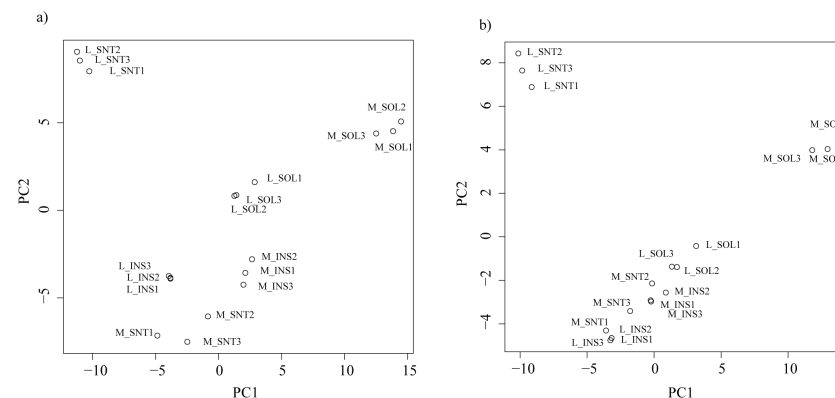


図5. 2回目のPCAプロット図。1回目のPCAにより選択された4種のタンパク質を除いたPCA結果のプロット(a), およびここで抽出された6種のタンパク質のみを用いて構成したPCAプロット図。

Fig. 5a. Secondary PCA analysis. PCA plot without four selected protein in primary PCA analysis (a), and PCA plot with six selected proteins in secondary PCA (b).

#### 4. 考察

主成分分析により、セレウス菌の対数増殖期中期、及び対数増殖期後期のそれぞれの増殖段階における、上清画分（分泌タンパク質）、可溶性画分（細胞質タンパク質）、及び不溶性画分（細胞膜・壁タンパク質、および巨大タンパク質複合体など）を特徴付ける主成分が抽出された。

はじめに、上清画分と不溶性画分をそれぞれ他の画分と峻別する特徴的なタンパク質として抽出された4つのタンパク質についての生物学的な意義は以下のように考えられる。

BCN0883, BCN0884 は莢膜の最外層に存在する S-layer protein である。固形寒天培地上で発育した際に発現が亢進し、感染症においては宿主の多形核白血球細胞による貪食からの回避や細胞接着への関与、またセレウス菌の放射線耐性に関与していることが示唆されている<sup>7, 8</sup>。本研究において BCN0883 は培養中期から多量に見られるものの、特に培養後期の不溶性画分で大量に存在していた。

BCN1648 は鞭毛タンパク質である。鞭毛は細菌細胞の運動性に寄与しており、古くからセレウス菌と炭疽菌 (*B. anthracis*) の鑑別にも用いられている重要な表現形である<sup>9</sup>。本研究では培養中期から後期にかけて上清中に見られ、その他の細胞画分との峻別に寄与していた。鞭毛タンパク質は菌体に付属しているタンパク質であると考えられるが、多くの細菌における鞭毛タンパク質と同様、実験操作中の簡単な機械的刺激により菌体から脱落し、培養上清中に放出されたと考えられる。

BCN1284 はポリヒドロキシアルカン酸の合成に関わる遺伝子領域にコードされるタンパク質の一つである<sup>10</sup>。ポリヒドロキシアルカン酸の合成は、セレウス菌をはじめとする数種の原核生物において報告されており、栄養枯渇状態に備えて炭素源の貯蔵としての役割を担っているとされている。対数増殖期後期の栄養枯渇状態に対する生体の反応として、極めて妥当であると考えられる。

次に、可溶性画分を特徴付けるタンパク質を抽出するため、上記の4つのタンパク質を除く他のタンパク質因子の抽出を試みた。その結果抽出された6つのタンパク質の微生物学的な意義は、以下のように考えられる。

BCN0100, BCN0114, 及び BCN0128 はそれぞれリボソームのサブユニットタンパク質である。これらのタンパク質は主に培養中期における可溶性画分を特徴付ける因子として抽出されてきた。培養中期のように活発に増殖している細胞では、培養後期のように増殖が終息しつつ細胞と比較してタンパク質の生産量（タンパク質の総量ではない）が増大していることは妥当であり、そのためにリボソームサブユニットのタンパク質群が細胞全体のタンパク質量に占める割合が多くなると考えられる。他のリボソームサブユニットタンパク質の多くも、培養後期と比較して全タンパク質に対する割合は培養中期の方が高くなっている。本研究の指標として用い

た emPAI の特性上、小さなタンパク質の方が高く評価される傾向にあるため、多くのリボソームタンパク質の中でもこの3つが特に抽出されたと考えられる。

セレウス菌は複数のエンテロトキシンを保有しており、下痢を主症状とする食中毒ではこれらの毒素が関与しているとされているとされるが、BCN1808 はその中のひとつである non-hemolytic enterotoxin lytic component L2 と高い相同性を示す遺伝子にコードされている<sup>11</sup>。対数増殖期後期から定常期にかけてこの遺伝子の発現が誘導されることが報告されており、この遺伝子の誘導発現は異化代謝産物抑制 (catabolite repression) を制御するレギュレータータンパク質 CcpA によって直接的に制御されているという報告がある<sup>12</sup>。

BCN0359 及び BCN0567 はそれぞれ alkyl hydroperoxide reductase (EC:1.11.1.15) 及び alanine dehydrogenase (EC: 1.4.1.1) であり、ともに代謝に関わるタンパク質である。これらのタンパク質は対数増殖期後期の培養上清画分、及び可溶性画分を峻別する因子として抽出された。代謝に関わるタンパク質であるため、細胞の増殖に伴う培地中の栄養成分の変化に対応して発現が誘導された可能性が考えられる。細胞質のタンパク質が増殖後期の培養上清に見られる現象は、グラム陽性菌において広く観察されている<sup>13</sup>。この理由としては、細胞分裂に伴う菌体からの流出や、死細胞の溶菌によるものであると考えられているが、細胞質内で量（比率）の多いタンパク質が一樣に上清中に放出されているわけではないなど、詳細は明らかになっていない。

上記のように、それぞれの実験群を特徴付ける因子として抽出された10個のタンパク質について、生化学的機能や局在などのような生物学的に妥当な説明をつけることができた。これら10個のタンパク質は、本研究において発現量が上位のタンパク質であった。それぞれの実験群を特徴付ける上で、発現量の多いタンパク質の比重が高いことは自明であるといえる。しかしながら、同じく本実験を通して発現量の多いタンパク質である BCN0108 (elongation factor Tu), BCN4565 (ribosomal protein S4), BCN0099 (ribosomal protein S4), BCN1870 (NLP/P60 family protein) などは、PCA により実験群を峻別する因子としては抽出されなかった。以上のことから、ショットガンプロテオーム解析結果の解釈における PCA の有効性が示唆された。今後の課題として、さらに実験群が増えた場合にも PCA が有効に機能しうるかどうかを検証する必要がある。

少なくともバクテリアにおいては、mRNA とタンパク質の存在量は1対1に対応しているわけではない、ということが明らかになってきた<sup>14</sup>。個々のタンパク質の寿命が異なることから、分裂前から持ち越した古いタンパク質分子と、分裂後に産生された新たなタンパク質分子が混在していることなどが原因として考えられている。また RNA に関しては、例えば 37°C の好適な培養条件下において活発に増殖している大腸菌の mRNA の半減期は、わずか1分に満たないと言われている<sup>15</sup>。さらに、対数増殖期から定常期に入ったバクテリアの細胞は mRNA の産生量を減少させ

るが、細胞は（ときには死滅していることもあるが）生命活動を低下させて、再び増殖する機会をうかがっていると思われる。このような、mRNA がほとんど産生されていない細胞の状態を記述するためには、タンパク質の網羅解析が必要不可欠である。網羅解析によりもたらされる膨大なデータに対して、PCA のような解析手法を駆使したデータマイニングを行って、有用な重要な情報を抽出する事が必要である。

### 参考文献

- 1) Vassileva M, Torii K, Oshimoto M, Okamoto A, Agata N, Yamada K, Hasegawa T, Ohta M. "Phylogenetic Analysis of *Bacillus cereus* Isolates from Severe Systemic Infections Using Multilocus Sequence Typing Scheme." *Microbiol.Immunol.*Vol.50, No.9, pp.743-749 (2009)
- 2) Kiyomizu K, Yagi T, Yoshida H, Minami R, Tanimura A, Karasuno T, Hiraoka A. "Fulminant septicemia of *Bacillus cereus* resistant to carbapenem in a patient with biphenotypic acute leukemia." *J Infect Chemother.*Vol.14, No.5.pp.361-367 (2008)
- 3) Lee YL, Shih SD, Weng YJ, Chen C, Liu CE. "Fatal spontaneous bacterial peritonitis and necrotizing fasciitis with bacteraemia caused by *Bacillus cereus* in a patient with cirrhosis." *J Med Microbiol.*Vol.59, No.2.pp.242-244 (2010)
- 4) Ishii N, Nakahigashi K, Baba T, Robert M, Soga T, Kanai A, Hirasawa T, Naba M, Hirai K, Hoque A, Ho PY, Kakazu Y, Sugawara K, Igarashi S, Harada S, Masuda T, Sugiyama N, Togashi T, Hasegawa M, Takai Y, Yugi K, Arakawa K, Iwata N, Toya Y, Nakayama Y, Nishioka T, Shimizu K, Mori H, Tomita M. "Multiple high-throughput analyses monitor the response of *E.coli* to perturbations." *Science.* Vol.316, No.5824.pp.593-597 (2007)
- 5) Ishihama Y, Oda Y, Tabata T, Sato T, Nagasu T, Rappsilber J, Mann M. "Exponentially modified protein abundance index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein." *Mol Cell Proteomics.*Vol.4, No.9.pp.1265-1272 (2005)
- 6) Shinoda K, Tomita M, Ishihama Y. "emPAI Calc--for the estimation of protein abundance from large-scale identification data by liquid chromatography-tandem mass spectrometry." *Bioinformatics.*Vol.26, No.4.pp.576-577 (2010)
- 7) Kotiranta A, Haapasalo M, Kari K, Kerosuo E, Olsen I, Sorsa T, Meurman JH, Lounatmaa K. "Surface structure, hydrophobicity, phagocytosis, and adherence to matrix proteins of *Bacillus cereus* cells with and without the crystalline surface protein layer." *Infect Immun.* Vol.66, No.10.pp.4895-4902 (1998)
- 8) Kotiranta AK, Ito H, Haapasalo MP, Lounatmaa K. "Radiation sensitivity of *Bacillus cereus* with and without a crystalline surface protein layer." *FEMS Microbiol Lett.*Vol.179, No.2.pp.275-280 (1999)
- 9) Bergey's manual of systemic bacteriology, second edition, Vol.3 (2009)
- 10) Ramsay BA, Lomaliza K, Chavarie C, Dubé B, Bataille P, Ramsay JA. "Production of poly-(beta-hydroxybutyric-co-beta-hydroxyvaleric) acids." *Appl Environ Microbiol.*Vol.26, No.7.pp.2093-2098 (1990)
- 11) Lindbäck T, Fagerlund A, Rødland MS, Granum PE. "Characterization of the *Bacillus cereus* Nhe enterotoxin." *Microbiology.*Vol.150, No.12. pp.3959-3967 (2004)
- 12) van der Voort M, Kuipers OP, Buist G, de Vos WM, Abee T. "Assessment of CcpA-mediated catabolite control of gene expression in *Bacillus cereus* ATCC 14579." *BMC Microbiol.*Vol.8.No.62. (2008)
- 13) Gohar M, Gilois N, Graveline R, Garreau C, Sanchis V, Lereclus D. "A comparative study of *Bacillus cereus*, *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus anthracis* extracellular proteomes." *Proteomics.*Vol.5, No.14. pp.3696-3711 (2005)
- 14) Taniguchi Y, Choi PJ, Li GW, Chen H, Babu M, Hearn J, Emili A, Xie XS. "Quantifying *E.coli* proteome and transcriptome with single-molecule sensitivity in single cells." *Science.*Vol.329, No.5991.pp.533-538 (2010)
- 15) Schaechter M, Ingraham JL, Neidhardt FC., et.al. *microbe.* ASM Press. (2006)