

第63回日本電気泳動学会シンポジウム

電気泳動と質量分析による 微生物の分析

主催：日本電気泳動学会・農業生物資源研究所

2013年6月21日（金）10:00～17:00
日東紡ビル 4F ホール

プログラム

10:00 開会 農業生物資源研究所理事 長峰司

日本電気泳動学会会長（浜松医科大学） 前川真人

座長 農業生物資源研究所農業生物ゲノム研究センター 梶原英之

10:10 植物病原菌研究に対する新技術への期待（農業生物資源研究所）梶原英之

10:30 PCR-DGGE による土壌微生物の分析（農業環境技術研究所）對馬誠也

座長 横浜市立大学先端医科学研究センター 平野久

11:10 2D-DIGE 解析を用いた *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄取り込み機構に關与するタンパク質群の網羅的解析（大阪薬科大学）宮本勝城

11:50 新技術セミナー・GE ヘルスケア

12:05 昼休み

座長 麻布大学生命・環境科学部食品生化学研究室 曾川一幸

13:30 質量分析法を用いた細菌同定の原理と今後の展望（岐阜大学）大楠清文

14:10 微生物検査室における質量分析計(MALDI-biotyper)の応用（千葉大学）渡邊正治

14:50 新技術セミナー・ブルカーダルトニクス

15:05 休憩

座長 横浜市立大学先端医科学研究センター 戸田年総

15:30 MALDI/TOF MS を用いた酵母菌の識別と品質管理の現状（製品評価技術基盤機構）川崎浩子

16:10 HPCE による微生物の迅速分離とその応用（産業技術総合研究所）鳥村政基

16:50 閉会

植物病原菌研究に対する新技術への期待

梶原英之(独立行政法人農業生物資源研究所)

【緒言】

農作物にはさまざまな植物病があり、その多くは植物病原菌の感染によるものである。病害の防除には農薬等を散布することによって行われるが、「沈黙の春」で指摘されるような多くの懸念があることも事実である。

植物病原菌の感染を目視で確認できた時点では既に遅く、収量や品質等に影響してしまうことも多い。できるだけ早期に植物病原菌の有無を見出し、それを鑑別し、その病原菌に応じた対応することが重要である。これは農薬の使用量を少なくすることにもつながる。しかし、植物病原菌の種類は非常に多く、日本植物病名データベース(<http://www.nias.affrc.go.jp/database/>)によると、例えばイネでは 146 種、トマトでは 79 種が報告されており、これらの鑑別は容易ではない。これまでは顕微鏡的観察の他、抗体の利用、一般的な PCR 法によってきたが、相応の時間とコストがかかっていた。

【MS-CAPS 法】

質量分析装置を用いて、1 時間以内で目的遺伝子の有無を検出する手法(MS-CAPS, mass spectrometric cleaved amplified polymorphic sequence)を開発した¹⁾。即ち、狭い範囲で高速 PCR を行い、産物をウラシル DNA グルコシラーゼ等で断片化し、あらかじめプライマーにつけておいたビオチンを利用して一本鎖化した増幅断片を回収するものである。これを質量分析することで、予測された位置にピークが検出されることをもって目的遺伝子の有無を確認する。

元々は遺伝子組換え作物に導入された遺伝子を検出するために開発したが、品種鑑別²⁾や植物病原菌の検出³⁾にも応用できることがわかった。適当な添加物を加えると未精製のゲノム抽出液でもそのまま使用でき、病兆が表れる前に病原菌を検出できることも示された⁴⁻⁵⁾。また、multiplex PCR も可能で全工程の自動化もできた。

【MALDI-biotyping 法】

MS-CAPS 法は、植物病原菌の迅速かつ安価な検出法として応用できると期待された。しかし、トマト病原菌でも、部分的でもゲノム配列が調べられているものは 2-3 割程度で全構造がわかっているものは数えるほどだった。幾つかクローニングされた遺伝子の配列をもとにプライマー設計を綿密に行っても特異的に反応しなかったりする例があり、全くゲノム情報がないものについては手の出しようがなかった。植物病原菌についてはまだゲノム

情報が不足しており、現状では MS-CAPS 法で網羅的に植物病原菌の同定は困難だと考えられた。しかし、そのような状況下でも菌の鑑別を判別できる手法として期待されたのが、MALDI-biotyping である。

農業生物資源研究所にはジーンバンクがあり、多くの作物種子とともに植物病原菌が収集・維持され、その一部については研究用に配布されている。2011 年現在で植物病原菌については約 27 万点が登録されている。MALDI-biotyping 法ではゲノム情報が不要で、コロニーさえ取得できれば約 5 分で菌に由来するフィンガープリントを得ることができ、それに基づいて菌の種類を同定できる。MALDI-biotyper (ブルカードルトニクス) を試用し、多くの細菌および糸状菌について調べてみた。その結果、植物病原菌の鑑別に十分に MALDI-biotyping 法は利用可能であると判断された。しかし同時に、ブルカードルトニクス社提供のデータベースにはヒト感染症に関係するものが多く、植物病原菌に関するものは少ないことがわかった。植物病原菌については、当研究所のジーンバンク所蔵菌を利用し、in-house のデータベースを構築することで十分対応できると考えられた。

【展望】

MS-CAPS 法および MALDI-biotyping 法にはそれぞれの長所があり、それを利用して早期の段階で迅速かつ安価な植物病原菌の検出に応用していきたいと考えている。また、安全性などの問題点はあるが、家畜等の病原菌の同定にも応用できないかと期待する。

【文献】

- [1] H. Kajiwara (2011) *Anal. Biochem.* 411: 152-154.
- [2] H. Kajiwara, M. Yamaguchi, H. Sato, and H. Shibaie (2012) *Plant Omics J.* 5: 231-237.
- [3] H. Kajiwara, M. Sato, and A. Suzuki (2012) *J. Electrophoresis* 56: 13-17.
- [4] H. Kajiwara (2012) *Plant. Mol. Biol. Rep.* 30: 1507-1512.
- [5] H. Kajiwara (2013) *Methods Mol. Biol.* (in press).

PCR-DGGE による土壌微生物の分析

對馬誠也（独・農業環境技術研究所 農業環境インベントリーセンター）

はじめに

安定した作物生産を行う上で、地力の確保、連作障害等の病害の克服が重要であり、そのためには、土壌の物理性、化学性、生物性を正確に把握して、その診断に基づいた適切な管理を行う必要がある。しかし、土壌の物理性、化学性の診断技術は開発されているものの、生物性を診断する技術の開発は著しく遅れていた。

遅れていた理由としては、1) 土壌中には従来の培養法では解析できない「培養できない微生物」が多数存在する、2) 微生物といっても土壌中には細菌、糸状菌、線虫など異なる種類の微生物があり、解析にはそれぞれの専門知識が必要なため、誰もが簡単に解析することができない、などの問題が常に指摘されていた。

そこで、この問題を克服するために、生物に共通で、かつ誰でも比較的容易に扱うことができる DNA を用いて土壌生物性を解析する技術の開発を目的として、平成 18 年に、農林水産省委託プロジェクト「土壌微生物相の解明による土壌生物性の解析技術の開発」（以下、eDNA プロジェクト、H18～H22）が開始された。

1. eDNA プロジェクトの概要

複雑な土壌に適用可能な技術を作り、かつ解析情報を有効に活用するために、本プロジェクトでは、1) 統一した土壌 DNA 解析手法 (PCR-DGGE) で全国の畑の解析を行う、2) 解析した情報をすべてデータベース化して誰でも活用できるようにする、ことを柱にして研究が進められた。その結果、1) 技術マニュアル、2) 解析事例、3) 研究者用マニュアルのダイジェスト版を作成し、1) については、さらに「PCR-DGGE を用いた土壌微生物相解析・活用マニュアル」、「eDNA データベース ユーザーマニュアル ver1.0」の詳細解説版を作成して全国の関係機関に配布することができた。以下にその成果の一部を紹介する。

1) PCR-DGGE 解析マニュアルについて

「土壌細菌・糸状菌相解析法」と「土壌線虫相解析法」からできている。PCR-DGGE の弱点は、ゲル間の DNA バンドパターンと比較ができない点にある。そこで、ここでは、微生物毎に標準 DNA マーカーを開発し、それを基準にすることで、ゲル間の比較ができるようにした。これにより、多数の土壌サンプルを対象に、3 種（細菌、糸状菌、線虫）の土壌微生物相が解析できるようになった。

2) eDNA データベースの開発

国内初の「農耕地 eDNA データベース (eDDASs: eDNA Database for Agricultural Soils)」を開発し、平成 23 年 3 月 31 日に公開した。

(<http://eddass.niaes3.affrc.go.jp/hp/index.html>)。eDDASs の特徴は、農耕地の土壌理化学性、作物栽培様式、eDNA 解析情報（細菌、糸状菌、線虫）など約 60 項目の情報を収録し、ユーザーは、登録されている全ての情報と DGGE 解析データを利用することができること、さらには、誰でも情報を登録することができる点にある。

3) PCR-DGGE の研究事例

本マニュアルでは、技術マニュアル「PCR-DGGE 解析法」を活用した 6 件の研究事例（土壌病害関連 4 件、肥培管理関連 2 件: ケーススタディ 1～6）を紹介している。

また、このマニュアルにはないが、この他に、実際の農家圃場の解析も一部行っており、農薬を使わない自然農法を行い、「奇跡のリンゴ」として知られている青森県の木村氏の畑と周辺の慣行農法の畑の「細菌、糸状菌、線虫」の 3 種の PCR-DGGE パターンを 3 年間にわたり調査して解析している。

これらの研究成果から、たとえば、ある種の病害の発生が 30 年見られないトマトの栽培圃場において、特異的な DNA バンドが見られ、その DNA バンドの塩基配列から推定された糸状菌を実際に畑から分離した結果、病原菌の生育を抑制する菌であることが明らかになった。このことから、病害未発生と拮抗菌の増加の関係が示唆されている。また、別の研究では、土壌消毒をした畑で、DNA パターンから推定した多様性指数により、農薬の効果の持続性（残効性）や処理ムラを判定できる可能性が示唆されている。

このように、PCR-DGGE の弱点としては、DNA バンドしか得られない（シークエンスデータがただちには得られない）などの問題があるが、その反面、低コストで、比較的短時間で、多数の土壌サンプルの比較ができる利点もあり、「土壌微生物性に関する大まかな傾向を推定するための土壌診断」や、「土壌優先菌群の挙動を大まかに把握」などには有効であると考えられた。

おわりに

現在、複数の農林水産省委託プロジェクト等の中で、多くの県の研究機関が加わり、様々な土壌病害を対象に、PCR-DGGE の利用可能性を評価しており、ここではそれらの研究の現状等も紹介する。

2D-DIGE 解析を用いた *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄取り込み機構に関与するタンパク質群の網羅的解析

大阪薬科大学 微生物学研究室 宮本勝城

【緒言】

当研究室では、臨床分離株 *Vibrio vulnificus* M2799 株の鉄欠乏ストレスに関与するタンパク質群を網羅的に明らかにする目的で研究を行っている。*V. vulnificus* は、汚染された魚介類の摂食や海水の創傷部曝露等を介して、全身性の感染症を引き起こす細菌である。一般に、鉄はほとんどの生物の生存と増殖に不可欠な元素であるが、宿主生体内において病原菌が自由に利用できる遊離鉄は極めて少ない。したがって、宿主生体内で増殖し得る病原菌は、何らかの巧妙な鉄獲得系を保持しているはずである。そこで、臨床分離株 *V. vulnificus* M2799 株の鉄獲得系タンパク質を網羅的に明らかにする目的で、プロテオーム解析を行った。

【方法】

鉄含有培地としてハートインフュージョン培地、鉄欠乏培地として最終濃度が 10 µg/ml となるように ethylenediamine-di (*o*-hydroxyphenylacetic acid) (EDDA, Sigma) を同培地に添加したものをを用いた。本菌株を 37°C で攪拌培養後、菌体を細胞溶解緩衝液で溶菌させ、それぞれ、50 µg のタンパク質を Cy2、Cy3 および Cy5 DIGE Fluors minimal dye で標識し、2次元ディファレンシャルゲル電気泳動(2D-DIGE)を行った。得られたゲルイメージを DeCyder 6.0 Software (GE Healthcare)により解析し、*t* 検定値が 0.01 以下で発現量が 2 倍以上変動するスポットを選択した。同様に調製した 250 µg のタンパク質の 2次元電気泳動を行い、作成したピックリストに従ってゲルからスポットの切り出しを行った。次に、Montage In-Gel Digest Kit (Millipore)を用いてトリプシン消化後、MALDI-TOF/MS (Voyager DE-STR)でペプチド断片の MS を測定し、PMF 法によりタンパク質の同定を試みた。また、同定したタンパク質の機能を明らかにする目的で、高発現系を構築した。さらに、多重変異株の作製を目的として、M2799 株の遺伝子欠損株作製法を確立した。

【結果および考察】

臨床分離株 M2799 株の細胞内タンパク質のうち、鉄過剰および欠乏下で発現量が 2 倍以上変動したスポットは、対数増殖前期、中期、後期においてそれぞれ 32、53、42 種類存在した。次に、これらタンパク質の同定を試みたところ、対数増殖前期、中期、後期に発現差異が認められたタンパク質のうち、それぞれ 18、31、26 種類を同定することができた。これらのうち、前期特異的なタンパク質は認められなかったが、中期特異的なタンパク質は 10 タンパク質、後期では 9 タンパク質存在した。また、

鉄欠乏条件下において、鉄獲得に関与するタンパク質は対数増殖前期から中期にかけて、種々の代謝に関与するタンパク質は対数増殖中期から後期にかけて発現量が増大した。さらに、*V. vulnificus* の鉄獲得機構において、バルニバクチンが中心的な役割を担っていることが示唆された¹。

次に、発現量が変動したタンパク質のうち、イソコリスミン酸合成酵素(ICS)および Fe³⁺-バルニバクチン還元酵素(VuuB)タンパク質の高発現系を構築した。その結果、ICS タンパク質は封入体を形成したが、VuuB タンパク質は可溶化で発現した。そこで、本タンパク質を Ni-Sepharose 6FF および HiLoad Superdex 75pg クロマトグラフィーにより、電気泳動的に均一にまで精製した。今後、本タンパク質の諸性質を明らかにし、構造解析を行う予定である。

さらに、遺伝子欠損株の作製を試みた。鉄獲得機構に関与するタンパク質群のグローバルレギュレーターである *fur* 遺伝子をターゲット遺伝子とし、pDM4²に本遺伝子の上流と下流を連結したインサートを連結して pDMΔ*fur* を作製した。得られた pDMΔ*fur* を有する SM10λ*pir* 株による接合伝達により、1.5% NaCl、5 µg/ml クロラムフェニコールおよび 100 units/ml ポリミキシン B 含有 LB 寒天培地を用いて M2799 株の相同組換え体を作製した。pDM4 に存在する *sacB* 遺伝子にコードされるレバンスクラゼは、本菌株に対して、27°C、15%スクロースの存在下で良好な活性を示したことから、1 回目の相同組換え体を 15%スクロース、100 units/ml ポリミキシン B 含有 LB 寒天培地に塗抹し、27°C で一晚培養した結果、クロラムフェニコール感受性株を得た。2 回目の相同組換え株のうち、リバータントと欠失株の検出は、欠失領域上下流に基づき設計したプライマーを用いた PCR により確認した。今後、確立した遺伝子欠損株作製法を用いて、プロテオーム解析により同定されたタンパク質の機能解析を行う予定である。

【参考文献】

1. Miyamoto K, Kosakai K, Ikebayashi S, Tsuchiya T, Yamamoto S, Tsujibo H. (2009) Proteomic analysis of *Vibrio vulnificus* M2799 grown under iron-repleted and iron-depleted conditions. *Microb. Pathog.* **46**:171-177.
2. Milton DL, Norqvist A, Wolf-Watz H. (1992) Cloning of a metalloprotease gene involved in the virulence mechanism of *Vibrio anguillarum*. *J. Bacteriol.* **174**:7235-7244.

質量分析法を用いた細菌同定の原理と今後の展望

大楠清文（岐阜大学大学院医学系研究科 病原体制御学分野）

ポストゲノムの時代を迎えた今日、基礎的研究が新しい理論や技術を生み出し、社会や産業を一変させる成果へと進展した姿を見ることが出来る。2002年にノーベル化学賞を受賞した田中耕一博士（島津製作所）が開発した技術「タンパク質の質量分析法と核磁気共鳴分光法」である。この成果を発端としているマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析計（MALDI-TOF MS）による微生物の新しい同定法が注目を集めている。細菌に由来したタンパク質成分の分子量情報（マスペクトル）のパターンから、わずか10分足らずで分離菌株の同定ができるようになったのである。まさしく、臨床微生物検査のワークフローを一変させる技術革新そのものと言える。わが国でも2011年から臨床微生物検査の現場での使用が開始されており、今後急速に普及していくことが予想される。本発表では、質量分析技術による菌種同定の原理を概説しながら、日常検査における活用法と今後の展望について紹介したい。

MALDI-TOF MSによる細菌同定の基本原理

質量分析法による細菌同定の装置・システムとして2種類が販売されている。1つはブルカー・ダルトニクス社（ドイツ）の「MALDI Biotyper」である。国内ではブルカー・ダルトニクスの日本法人と日本BDそしてシーメンズの3社が取り扱っている。もう1つは島津製作所のAXIMA微生物同定システムである。本システムはシスメックス・ビオメリュウ社から「VITEK MS」としても販売されている。

微生物の同定にMALDI-TOF MSタイプの質量分析計が利用される理由として次の3つがあげられる。①少ない菌量（約 10^5 個）で前処理が簡便である、②精製されたタンパクでなくてもイオン化の効率がそれほど低下しない、③1価のイオン生成が主体であるためスペクトルの解析が容易である。

さまざまな菌種のさまざまな菌株をデータベースに登録しておき、コンピューターの力を借りて未知の菌株のマスペクトルがどの菌種のパターンと一致しているかをデータベースの中から瞬時に探す。つまり、MALDI-TOF MSを用いた菌種の同定を一言で表現すれば、「データベースに登録されている菌種とのマスペクトルのパターンマッチング」である。

MALDI-TOF MSシステムによる細菌同定の実際

質量分析法による菌株の同定は3つのステップからなる。①菌体とマトリックス試薬を混ぜて乾燥させる、②MALDI-TOF MSでマスペクトルを取得する、そして

③そのマスペクトルをデータベースに照合してパターンマッチングを行う。基本的には新鮮な集落を直接サンプルプレートに載せて解析を行う。うまく解析ができなかった場合には、菌体からタンパクを抽出する操作が必要である。1検体あたりのランニングコストは20円から50円ほどである。なお、測定機器・システムの定価は、MALDI Biotyperが2,800万円、VITEK MSは2,980万円と公開されている。

MALDI-TOF MSシステムの活用と今後の展望

MALDI-TOF MSは一般細菌だけでなく、嫌気性菌、抗酸菌、酵母様真菌、糸状菌の同定にも実施できることが大きな利点である。すなわち、同定キットの種類や自動同定機器のパネルを選択することなく、1つのシステムで臨床的に重要なあらゆる菌種を取り扱うことができるのである。嫌気性菌、放線菌は、データベースに収載されている菌種がやや少ないが、今後ライブラリーが充実してくれば利用できるであろう。なお、抗酸菌はMALDI Biotyperには2011年末に約100菌種の*Mycobacterium*属菌がライブラリーに追加された。

菌株からの同定だけでなく、MALDI-TOF MSの活用として最も臨床的に有用性が高いのが、血液培養陽性時の培養液から直接の菌種同定である。既に多くの施設で検討されており、約70～80%の同定精度との報告が多い。

次には、おそらく臨床検体から直接に菌種の同定ができないかとの期待が大きく膨らむであろう。現在のシステムでは 10^5 個くらいの菌量を必要とするため、敗血症の診断に血液から直接に菌種の同定は行うことは困難である。一方、感染時の菌量が多い尿や髄液では検体直接の同定が可能との報告がある。とりわけ、細菌性髄膜炎では迅速な起炎菌の診断が患者の予後に大きく影響するため、MALDI-TOF MSによる髄液から直接の菌種同定は臨床への貢献度がきわめて高い。尿や血液培養液に複数菌が存在する場合（混合感染）があるが、2菌種の比率が5:1くらいであれば、双方の菌種を同定できる。これ以上の比率になると多く存在する方の菌種のみが同定されて、少量の方の菌名は候補にあがらないようである。

その他、薬剤耐性菌の鑑別については、 β -ラクタム薬やカルバペネム系薬での検討結果が報告されているが、今後の詳細な検討を待つべきである。

株レベルのタイピングは現状のシステムではあまり期待できない。すなわち、MALDI-TOF MSの主要な用途はあくまでも菌種レベルの同定であり、株レベルの異同の判定は現在のところ、困難であるとの見解である。

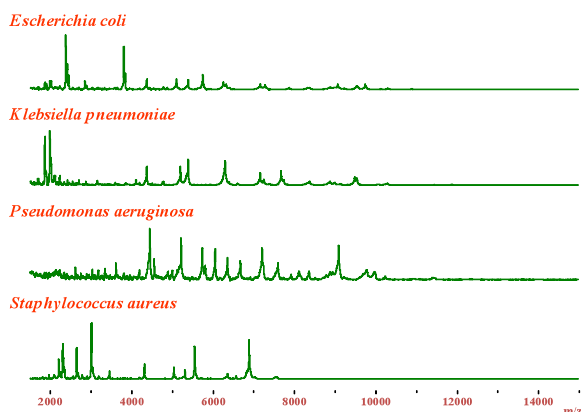
微生物検査室における質量分析計（MALDI-biotyper）の応用

渡邊正治（千葉大学医学部附属病院検査部）・曾川一幸（千葉大学医学部附属病院疾患プロテオミクス研究センター）・野村文夫（千葉大学大学院医学研究院分子病態解析学）

日常検査における細菌の同定は、グラム染色などの形態と糖分解能などの生化学的性状により行われている。この方法は培養時間が必要であり日数がかかる。識別能力の高い 16SrRNA などを用いる遺伝学的方法も用いられているが、操作が煩雑であり専門知識を必要とするため日常検査に導入している施設は少ない。近年、一つのツールとして迅速で簡便な方法として質量分析法を用いた検査法が開発され注目を集めている。

質量分析計を用いた細菌同定は 1975 年の Anhalt らの報告から始まり、欧州諸国では 2010 年から臨床応用が始まり、100 ヶ所以上の病院や検査センターで使用されている。この方法はすべての菌種に対し、コロニーを直接、質量分析計（MALDI-TOF MS）にかける方法により 1 菌種約 10 分程度で同定が可能となる。日本では 2 種類が販売されている。1 つは MALDI Biotyper（ブルカー・ダルトニクス社）で、ブルカーダルトニクス社の日本法人、日本 BD、シーメンスの 3 社が取り扱っている。もう 1 つは島津製作所の AXIMA 微生物同定システムであり、シスメックスビオメリユー社から VITEK MS としても販売されている。

原理は菌体とマトリックス溶液を添加したスポットにパルスレーザーを照射する。スポットにある細菌の蛋白質は脱離し、イオン化され飛行する。その到達時間から蛋白質の質量が変換され質量の異なるピークが検出される。このように得られたマスペクトルのピークは菌体のリボソーム蛋白質が主体となるため 16S rRNA と高い相同性がみられる。細菌の種類によってマスペクトルパターンが異なるため、既存のデータベースと照合することにより同定を行う。細菌の典型的なマスペクトルパターンを図に示す。



我々も 2010 年から検討を始めた。当時、講座の研究室にあった MALDI-TOF MS として Autoflex II (Bruker Daltonics) を使用し、データ解析として MALDI BioTyper™ 2.0 ソフトウェアを用い、ライブラリーとのパターンマッチングにより同定を行い従来法と比較した。使用菌株は当院検査部で分離された 92 菌種 514 株を用い、培養したコロニーを直接ターゲットプレートに乗せ、マトリックス溶液を添加後、測定した。全体で種レベルの一致は 514 株中 479 株 (93.1%) であった(Anal Bioanal Chem, 2011)。しかし、*Enterobacter cloacae*、*Stenotrophomonas maltophilia*、*Enterococcus casseliflavus* などで不一致がみられた。また、報告されているとおり *Streptococcus mitis* Group と *S. pneumoniae* の鑑別、*Shigella* spp. と *Escherichia coli* との鑑別はできなかった。*Klebsiella pneumoniae*、*Pseudomonas aeruginosa* などのムコイド株ではピークパターンが検出できず同定不能となることがあった。一方、嫌気性菌ではピークパターンが出るものの同定不能となる菌株が多かった。そこでデータベースの追加を検討した。MALDI BioTyper™ は標準株をデータベースにしているため実際の臨床分離株でのマスペクトルパターンと若干異なっている。そこでである一定期間臨床分離株のパターンをデータベースに加え検討した。市販データベースでは、種レベルで 86.8% の一致率であったが、臨床分離株を追加した後のデータベースでは、96.7% と同定一致率が向上した(Anal Bioanal Chem, 2012)。この結果十分に日常検査に使用可能と考え 2012 年 6 月から MALDI Biotyper を導入している。

菌血症は重要な疾患であり、血液培養陽性時に培養液からの直接同定を試みた。前処理として陽性ボトルから生化学検査用採血管に 3ml 分注し遠心後、その沈渣に 1ml の蒸留水を加え懸濁し遠心した。その沈渣に 300 μ l の蒸留水と 900 μ l のアルコールを加え混和し、遠心し、その沈渣に 70% ギ酸 20 μ l とアセトニトリル 20 μ l を加え懸濁し遠心し、上清を試料とした。単独菌分離例では腸内細菌、緑膿菌、腸球菌では高い一致率が見られたがブドウ球菌では一致率は低かった。複数菌分離例では 1 菌種のみ同定されることが多かった。また、MSSA と MRSA の MALDI-TOF MS による迅速鑑別アルゴリズムを作成し検証を試みた。検証に用いた臨床分離株 205 株では、MSSA で 95.8% (91 株/95 株)、MRSA で 81.8% (90 株/110 株) であった。MRSA の鑑別に関わっているピークの 1 つは、Penicillin-binding protein 2a のフラグメントであった。不一致例が見られるためさらなる検討が必要である。

MALDI/TOF MS を用いた酵母菌の識別と品質管理の現状

川崎浩子((独) 製品評価技術基盤機構・NBRC)

肉眼で見ることでできない微生物の分類は、科学技術の進歩と共に、その分類・同定手法が進化し、分類体系そのものに影響を与えてきた。顕微鏡観察による形態学的特徴から、エネルギー代謝や生育因子などの生理性状が種を分類・同定する主要な指標へととなり、さらに分析機器の進歩によって、細胞の構成成分が属や種レベルで異なることがわかり、化学分類学が分類の主流となった。さらに 1980 年代に入り、分類学に進化系統という概念が導入され、遺伝子の塩基配列を用いた分子系統分類、それに基づく迅速同定へと発展した。細菌、酵母においては、それぞれ 16S rRNA 遺伝子、LSU rRNA 遺伝子 D1/D2 領域 (LSU rDNA D1/D2) に基づく系統分類が、分類体系を決定する主たる指標となっている。現在では、それら遺伝子の塩基配列データベースが構築されており、分類学者でなくても種レベル以上の検討をつけることが可能となっている。一方、これら分子情報では未だ識別困難な微生物種が数多く存在しており、酵母では *Candida* などの病原微生物や *Saccharomyces* などの工業微生物は、同種であっても病原性や有用機能の性質が異なっており、種レベル以下の識別が求められているとことである。

そこで、近年注目されているのが Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI/TOF MS) を用いた同定手法である。その原理は、細胞を構成するタンパク質のパターンが微生物種で異なることに着目し、MALDI/TOF MS を用いて細胞を構成する全タンパク質の分子量を網羅的に解析し、そのパターン構成をデータベースとマッチングさせて同定していく方法である。分析に必要な細胞量が非常に少ないこと、分析速度が他の手法に比べて圧倒的に早く簡便であること、ランニングコストが安価であることから、迅速同定技術として臨床並びに品質管理の現場で注目されている。病原細菌の迅速同定として発展した手法だが、現在ではその対象が、その他の細菌、酵母、糸状菌へと広がりを見せている。

私が所属する NBRC カルチャーコレクションでは、多種多様な微生物を保存し、依頼に応じて頒布を行っている。新たに寄託される微生物や分譲のための微生物標品の同定や品質管理において、一部の分類群に対し、MALDI/TOF MS を導入し、その他の微生物群に対しても導入の検討を進めているところである。本シンポジウムでは、特に酵母菌について、MALDI/TOF MS を用いた同定・識別の可能性と限界について紹介したい。

使用した MALDI/TOF MS は Bruker 社の Microflex で、使用したソフトウェアは MALDI Biotyper である。本手法に

よる同定はデータベースとのマッチングであることから、基準となる株のデータベースが必要である。しかしながら、市販のデータベースには分類群の偏りがあり、酵母菌のデータの構築も合わせて検討している。試料の調整は、タンパク質溶出を確実にするため、試料の前処理を下記の手順で行っている。寒天培地上で 2 日間培養した細胞を約 5-10mg 掻き取り、300ml の滅菌水で洗浄する。その後、EtOH 液に浸水させ凍結保存する。まとまった数のサンプルが集まったところで、EtOH 保存した細胞を遠心分離によって集菌し、完全に EtOH を除去する。細胞に 70%ギ酸溶液 (50 μ l) を加えよく攪拌させ、さらにアセトニトリル (50 μ l) を加え攪拌する。14,000 rpm で 2 分間遠心分離し、上清を解析試料とする。約 1 μ l (0.5 - 2.0 μ l 程度) の上清を MALDI/TOF MS ターゲットプレートに置き、デシケーターを用いて乾燥させた後、本体に設置し解析を行った。

Saccharomyces 属関連酵母約 296 株について MALDI/TOF MS 解析を行ったところ、属及び種レベルの同定が可能であることが明らかとなった。LSU rDNA D1/D2 の塩基配列ではほぼ完全に一致している *S. cerevisiae* 種内の株間の解析では、タンパク質パターンの違いが認められ、種レベル以下の識別の可能性が示唆された。本シンポジウムでは、LSU rDNA D1/D2 よりさらに解像度の高いチトクローム遺伝子 (*COX2*) に基づく系統解析の結果との比較を用いて、MALDI/TOF MS 解析の酵母識別法としての可能性について述べたい。究極は株の識別を目標としているが、Burker 社の MALDI Biotyper のスコア値を目安にした方法では、現在のところ株の識別は困難であることも分かってきた。

酵母菌では時々コロニーバリエーションが観察される。プレート上のコロニーや顕微鏡観察では、それがコンタミネーションなのかコロニーバリエーションなのか識別不可能である。これまで NBRC カルチャーコレクションでは LSU rDNA D1/D2 解析によりその確認を行っていたが、MALDI/TOF MS 解析がこれらの区別に適用できることを明らかにし、品質管理への導入を実施したところである。

Saccharomyces 属以外の子のう菌や担子菌酵母についてもデータベースの構築を進めており、多糖を産性する *Lipomyces* 属酵母菌や細胞が破壊しにくい株の前処理の改良が必要なが分かってきた。MALDI/TOF MS の機種によるデータの互換性の問題も残されており、今後多くのデータが蓄積されることによって、手法の改良やデータ処理方法の改良が進む事を期待する。

HPCE による微生物の迅速分離とその応用

鳥村政基(独立行政法人産業技術総合研究所)

【微生物細胞の分離技術】

キャピラリー電気泳動 (HPCE : High Performance Capillary Electrophoresis) の技術はイオン性化学物質に対する極めて高い効率の分離を達成できることから、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 法と同様に汎用される分離技術である。HPLC 法が分離担体が充填されたカラムを用いるのに対し HPCE 法は中空のキャピラリーを分離に用いることから、細胞のような懸濁液試料でもカラムに細胞が詰まって流れなくなるようなこともなく、高性能な分離が期待できるのではむないか、ということで HPCE による微生物の分離研究が始まった。微生物の表面は各種糖タンパク質ポリマーが存在していることが知られており、生理的環境下においてはほとんどの微生物細胞はマイナスの電荷を帯びる。最初の我々の微生物細胞の HPCE 分離の試みは分離効率という意味では全く満足できるものではなかったが、キャピラリー内部で電場の中を泳動する微生物の細胞活動を同時に観察できることを示すことができた[1]。また、本法を複合微生物から構成される培養槽の管理にも応用し、各々の微生物の増減を HPCE 法で簡便に定量できることを証明した[2]。

その後 10 年、微生物細胞の分離効率を向上させるために種々の工夫がなされてきた。我々は泳動液への微量の陰イオンポリマー添加が飛躍的な分離効率の向上をもたらすことを見出した[3]。ただし、これらのポリマーの添加効果も万能とは言えず、効果が認められる微生物とそうでない微生物がある。

また、小さなガラス板などに溝を彫りこの溝を電気泳動の分離場として用いるマイクロチップ電気泳動の技術も、多くのアプリケーションが蓄積されてきている。我々もマイクロチップでの微生物の迅速分離を試みた[4]。マイクロチップでは注入エリアに導入された微生物の混合物が分離される過程を顕微鏡で観察したところ、わずか 1 秒間で乳酸菌 (*Streptococcus thermophilus* 510、*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* B-5b) と酵母細胞(清酒酵母 K-9) が完全分離されることが確認できた。このように、分離の条件として泳動液の組成や泳動チャンネルの形状を最適化することで目的微生物の迅速分離を実現できる場合もあるが、一方で、表面構造が似ている微生物同士の分離はこのような単純な電気泳動の分離技術では達成できない。これらの似た微生物細胞同士を分離するためには細胞表面の電荷だけでなく他の特徴を利用した分離モードの組合せが必要となる。

【微生物細胞の分離・同定技術へ】

微生物の HPCE 分離技術と MALDI-TOFMS 同定分類技術[5]は、組み合わせることで単独では為し得ない効果が期待できる。両技術をつなぎ合わせる方法としては、HPCE 分離キャピラリーの出口をアースした MALDI-MS 用のステンレス基板 (プレート) 上に配置し、泳動してキャピラリー端を出てくる細胞がマトリックス試薬とリアルタイムに混和されながら上記プレート上に塗布されるようにプレートが X-Y 軸に自由に移動できるように準備しておく。このシステムにより、マトリックス試薬の溶媒に泳動してきた細胞が接すると、細胞が崩壊し細胞内部のリボソームタンパク質が細胞外に漏出し、同時にプレート上で塗布乾燥されることになる[6]。しかし、この方法は微生物の中でも比較的細胞膜がやわらかいグラム陰性菌などに限られ、グラム陽性菌や酵母などの硬い細胞には適用が難しい。

今回紹介する微生物の分離および同定技術はその迅速性の点で大きな可能性を持っている。一方でまだ多くの技術的な課題も残されており、技術の紹介だけでなく次の課題についても共有できればと思う。

文献

- [1] M. Torimura, S. Ito, K. Kano, T. Ikeda, Y. Esaka, T. Ueda, *J. Chromatogr. B*, 712, 31-37 (1999).
- [2] K. Yamada, M. Torimura, S. Kurata, Y. Kamagata, T. Kanagawa, K. Kano, T. Ikeda, T. Yokomaku, R. Kurane, *Electrophoresis*, 22, 3413-3417 (2001).
- [3] T. Shintani, K. Yamada, M. Torimura, *FEMS Microbiol. Lett.*, 210, 245-249 (2002).
- [4] T. Shintani, M. Torimura, H. Sato, H. Tao, T. Manabe, *Anal. Sci.*, 21, 57-60 (2005).
- [5] K. Teramoto, H. Sato, L. Sun, M. Torimura, H. Tao, H. Yoshikawa, Y. Hotta, A. Hosoda, H. Tamura, *Anal. Chem.*, 79, 8712-8719 (2007).
- [6] 特開 2006-126039「細胞の分離、同定装置及び方法」