

質量分析計MALDI-TOF MSによる 血清型レベルでの細菌の識別

— 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 Ver. 2の活用例 —
Serotype-level bacterial discrimination using MALDI-TOF MS

加藤 晃代¹、田村 廣人^{1,2}、山本 奈保美²、島 圭介³

Abstract:

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等をマーカーとしたプロテオタイピング法 (S10-GERMS法) を用いることにより、腸管出血性大腸菌の血清型レベルでの識別を行うことができました。この手法は、従来のMALDI-TOF MSフィンガープリント法による微生物同定法では困難な種レベル以下の細菌識別法として、今後の活用が期待されます。

Keywords: 食中毒菌、MALDI-TOF MS、プロテオタイピング、S10-GERMS

1. はじめに

食品・製菓分野や臨床微生物検査では、迅速かつ正確に微生物同定することが日常的に求められています。特に、病原微生物や汚染菌(日和見菌)に対する迅速同定の重要性はますます高まっています。微生物同定には、一般的に、生理・生化学試験や16S rRNA遺伝子配列を対象としたDNA塩基配列解析による手法がよく用いられています。しかし、これらの手法には、1) 迅速性に欠ける、2) 人手と技術が必要、3) 菌種によっては属・種レベル以上の詳しい同定ができない場合がある、4) 特に、病原微生物の識別には高コストな試薬(抗血清・抗体)が必要、などの課題があります。そんな中、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(MALDI-TOF MS)を用いた本手法は、新たな微生物の迅速同定法として注目を集めています。本手法の特徴は、非常に簡便で、多検体の迅速処理が可能という点です。基本的には、シングルコロニー程度の微生物試料をごく少量のマトリックス溶液(イオン化補助剤)と混合するだけで分析を行えます。また、1検体あたりに必要な分析時間は1分足らずであり、短時間で多検体処理できるという点も優れています。MALDI-TOF MSによる微生物同定法は、臨床微生物検査分野を中心に2000年代後半以降急速に拡大し、米国では2013年にFDAに認可されました。

MALDI-TOF MSによる微生物同定の仕組みは、分析によって得られた微生物試料のマスペクトルを、あらかじめデータベースに収録された各菌種のマスペクトル情報と照合する(フィンガープリント法)というものです。しかし、フィンガープリント法では属・種レベルまでの同定が可能ですが、例えば、食中毒菌である大腸菌やサルモネラ菌の血清型まで識別することができません。そこで筆者らは、フィンガープリント法を超える高精度の微生物識別が可能プロテオタイピング法^{※1}の一つである、S10-GERMS法(S10-*spc-alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum)¹⁾による食中毒細菌の血清型レベルでの識別法と、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 Ver. 2を開発してきました(Fig. 1)。本稿では、腸管出血性大腸菌^{※2}の例²⁾をまじえ、MALDI-TOF MSとStrain Solution Ver. 2による微生物の血清型レベルでの識別について紹介します。

※1 プロテオタイピング法:

MALDI-TOF MS等により検出されるタンパク質成分をバイオマーカーとして微生物の識別を行う方法。プロテオタイピングに用いるバイオマーカーは、遺伝子の塩基配列情報等に基づいて、あらかじめ特定しておきます。MALDI-TOF MSによるプロテオタイピングは、従来のDNAシーケンシング等の遺伝学的手法に基づくタイピング法と比べ、簡便・迅速という利点があります。目的菌種のゲノム配列が解読されていない場合は、リボソームタンパク質の約半数をコードしているS10-*spc-alpha* オペロンの塩基配列を解読することにより、プロテオタイピングを行うことが可能となります。このS10-GERMS法は、学校法人 名城大学 農学部 環境微生物学研究室と国立研究開発法人 産業技術総合研究所 環境管理技術研究部門 計測技術研究グループによって開発されました。

※2 腸管出血性大腸菌:

大腸菌の血清型(O抗原型)は現在約200種類が報告されていますが、その中でも志賀毒素産生性のO157、O26およびO111は食中毒の主な原因菌として問題となっています。しかしながら、従来のフィンガープリント法に基づく同定法においては種までの同定が限界であり、血清型まで決定することはできませんでした。

2. S10-GERMS法とStrain Solution Ver. 2

S10-GERMS法は、MALDI-TOF MSで検出される微生物の血清型・株に固有のタンパク質(バイオマーカー)の質量ピークがどの遺伝子由来のものかを特定します。そのため、遺伝子のDNA配列情報と実際の測定値に基づき、血清型・株識別のバイオマーカーとなりうる質量ピークの理論質量のデータベースを構築することができます。Strain Solution Ver. 2では、理論値データベースとサンプルの質量ピークリストを照合します。

本法は、フィンガープリント法と異なり、バイオマーカーの成分が明確であり、1塩基の変異に由来する1アミノ酸変異さえも区別することができます。そのため、微生物同定後の分子系統解析や、後述する混合サンプル解析に対しても威力を発揮します。

1 学校法人 名城大学 総合研究所
2 学校法人 名城大学 農学部 環境微生物学研究室
3 島津製作所 分析計測事業部

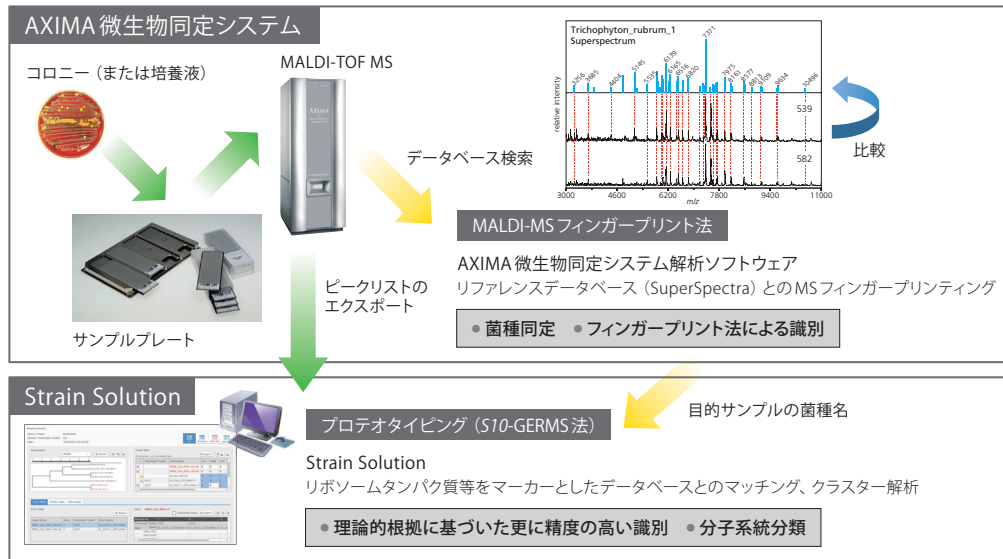


Fig. 1 AXIMA 微生物同定システムとStrain Solution

3. 実施例

ここでは、腸管出血性大腸菌の中でも主要な血清型である O157、O26 および O111 を識別するためのデータベース構築および Strain Solution Ver. 2 による分析例を紹介します。

- AXIMA 微生物同定システムにより分析し、マススペクトルを得る。
- 得られたマススペクトルの質量ピークリストとデータベースに登録したマーカーピークとのマッチングを Strain Solution Ver. 2 によって行う。

3-1. Strain Solution Ver. 2 搭載用データベースの構築

まず、菌株分譲機関より様々な O 抗原の大腸菌 50 株を入手し、MALDI-TOF MS (AXIMA 微生物同定システム) によって測定し、血清型識別の指標となり得るバイオマーカータンパク質を選出しました。ゲノム情報または実験的に解析した DNA 配列情報および MALDI-TOF MS の実測データを照合し、選出したバイオマーカーの理論質量表を構築しました (Fig. 2)。その結果、大腸菌の血清型によって特徴的な質量数を示す複数のバイオマーカー候補を見出し、50 株の大腸菌を A~L の 12 グループに区別することができました。その中でも、酸ストレスタンパク質 HdeB (m/z 9066.2) の有無、リボソームタンパク質サブユニット S15 (m/z 10166.6 または 10138.6) と L25 (m/z 10676.4 または 10694.4)、DNA 結合タンパク質 H-NS (m/z 15409.4 または 15425.4) は、腸管出血性大腸菌の中でも主要な血清型である O157、O26 および O111 において特徴的であり、他の大腸菌と識別できるバイオマーカーであることがわかりました。

3-2. 野生株による検証

食中毒患者および食品から単離された様々な血清型の大腸菌野生株 45 株を用い (Table 1)³⁾、構築したデータベースの実用性を検証しました。トリプトンソイ寒天培地および一般的な大腸菌選択培地 (デゾキシコレート寒天培地、CT-SMAC 培地、Chromagar X-gal 培地、VRBL 培地) にて培養し、具体的には Fig. 1 のステップにて実施しました。

- Fig. 2 に示す理論質量リストに基づき、大腸菌 O157、O26、O111、K12 株の HdeB、S15、L25、H-NS のマーカーピークを Strain Solution Ver. 2 のデータベースに登録する。
- 寒天培地で培養した検証用野生株のシングルコロニー (約 10^7 細胞) を分析用金属プレートに塗り付け、マトリックス溶液 (20 mg/mL シナピン酸、50% アセトニトリル、1% トリフルオロ酢酸) 1 μ L と混合する。

Table 1 検証に使用した大腸菌株³⁾

ID	Serotype	Gene			Source
		stx1	stx2	eae	
KB0137	O157	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0139	O157	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0150	O157	-	-	N. D.	Patient (USA)
KB0152	O157	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0155	O157	-	+	N. D.	Patient (Kenya)
KB0156	O157	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0340	O157	-	+	N. D.	Beef liver
KB0341-1	O157	-	+	+	Beef omasum
KB0341-2	O157	-	-	-	Beef omasum
KB0514	O157	-	+	+	Patient (Japan)
KB0521	O111	+	-	+	Patient (Japan)
KB0522	O157	+	+	+	Patient (Japan)
KB0548	O159	+	+	N. D.	Patient (Kenya)
KB0549	UT	-	+	N. D.	Patient (Kenya)
KB0617	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0618	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0619	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0620	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0621	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0622	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0623	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0624	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0625	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0626	O26	+	+	N. D.	Patient (unknown)
KB0627	O111	+	-	N. D.	Patient (Japan)
KB0628	O111	+	+	N. D.	Patient (Japan)
KB0732	O121	-	+	+	Patient (Japan)
KB0733	UT	+	+	-	Minced meat
KB0734	O145	+	-	+	Patient (Japan)
KB0735	O91	+	-	-	Patient (Japan)
KB0738	UT	-	+	+	Patient (Japan)
KB0739	O121	-	+	+	Patient (Japan)
KB0740	O91	+	+	-	Patient (Japan)
KB0741	O145	+	-	+	Patient (Japan)
KB0742	O128	+	+	-	Patient (Japan)
KB0743	O91	+	+	-	Patient (Japan)
KB0744	UT	-	+	-	Patient (Japan)
KB0745	O157	+	+	+	Patient (Japan)
KB0746	O115	+	-	-	Patient (Japan)
KB0747	O121	-	+	+	Patient (Japan)
KB0748	O145	-	+	+	Patient (Japan)
KB0749	O103	+	-	+	Patient (Japan)
KB0750	O103	+	-	+	Patient (Japan)
KB0751	O145	+	-	+	Patient (Japan)
KB0752	O145	-	+	+	Patient (Japan)

Serotypes were determined by performing antisera agglutination tests and PCR.
UT, untyped.
N. D., not determined.

理論質量データベース

		Group of mass pattern																											
		A		B		C		D				E		F		G		H		I		J		K		L			
Number of strains		14	2	2	9	3	1	1	4	1	1	1	1	2	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
Protein	Coded operon	O157	O157	O111	O26	O121	O128	O152	-	O115	O119	O63	-	K12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	O150			
L23	S10	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	11200.1	
L24	spc	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	11186.0	
S14	spc	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	11450.3	
L15	spc	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	14967.4	
S11+Me	alpha	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	13728.8	
S15		10166.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6	10138.6
L25		10676.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4	10694.4
HdeB		-	-	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2	9066.2
H-NS		15409.4	15409.4	15428.4	15428.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4	15409.4

大腸菌 O157、O26 および O111 識別のためのバイオマーカーピーク

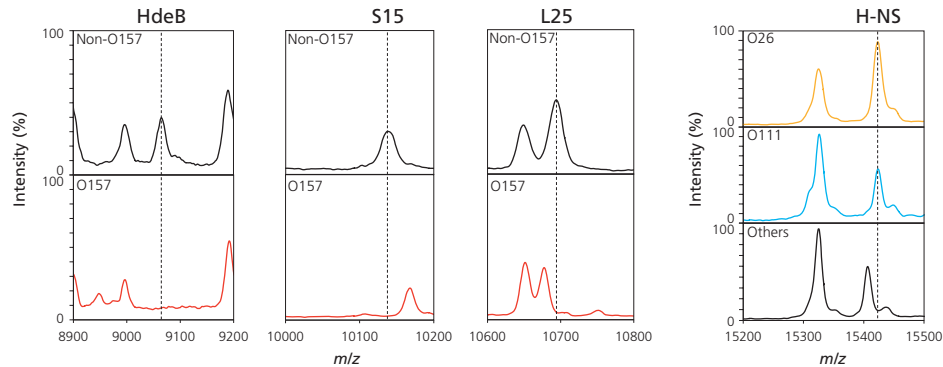


Fig. 2 S10-GERMS法に基づく腸管出血性大腸菌の識別用データベースの構築

Strain Solution Ver. 2のクラスター解析機能による識別結果を Fig. 3に示します。大きくO157 (A)、その他 (B)、O26とO111 (C)、およびO157 (D) から成る4つのクラスターに分類されました。今回対象としたO157 (12株)、O26およびO111 (13株) の識別正答率は11株 (92%) および13株 (100%) であり、従来法で決定した血清型と高い一致度を示しました。なお、志賀毒素産生O157 (11株)に限れば100%の識別率でO157 (D) のクラスターに分類され、その他 (B) に分類された大腸菌O157 KB0341-2 (志賀毒素非産生) が一般的なO157と異なることが明らかとなりました。また、O121 KB0747はHdeBピークが消失していたことから、O157の少数派であるGTC14550と同じグループAに分類されました。

ここではトリプトンソイ寒天培地で生育したコロニーの測定結果を示していますが、各種選択培地の場合でも同様の結果が得られました。もちろん、さらに複数のサンプルで検証を重ねる必要がありますが、多くの野生株において本データベースとプロテオタイピングによる血清型識別が有効であると考えられます。公定法や自主検査法で使用する選択培地上のコロニーを分析することができるため、従来の微生物検査工程を変更することなく適用できるという点も魅力の一つです。Strain Solution Ver. 2には、オプションとして本データベースが用意されています。さらには、目的に応じてオリジナルのデータベースを作成することができます。

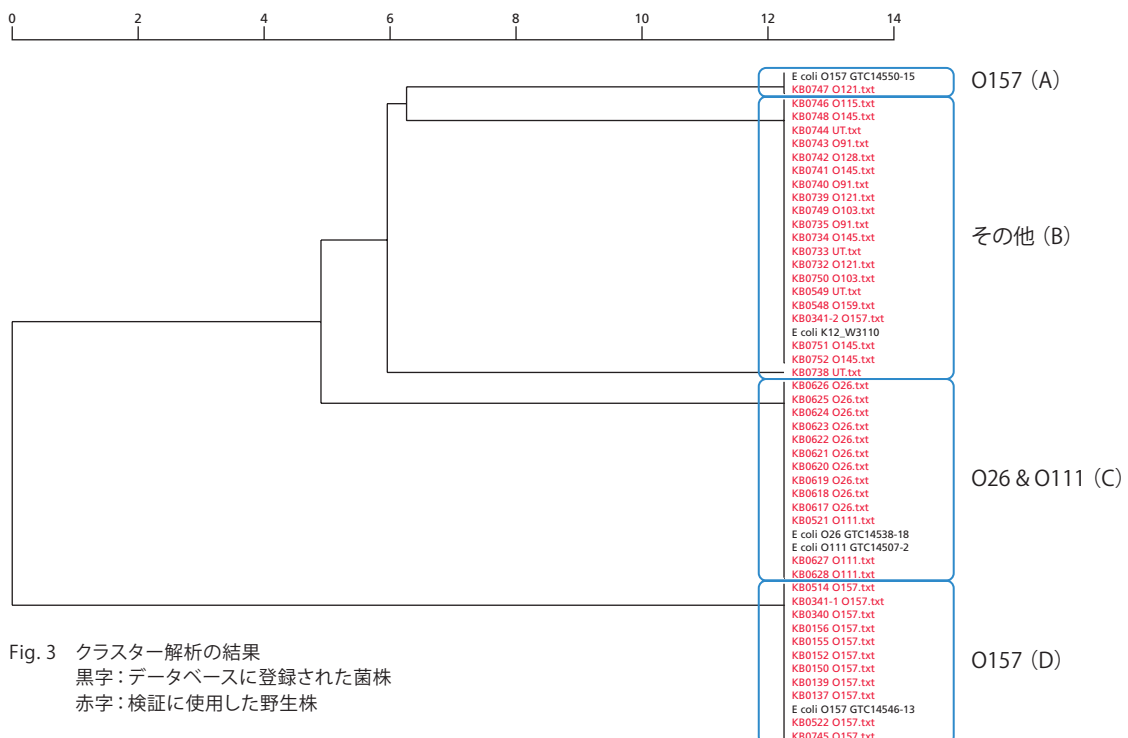
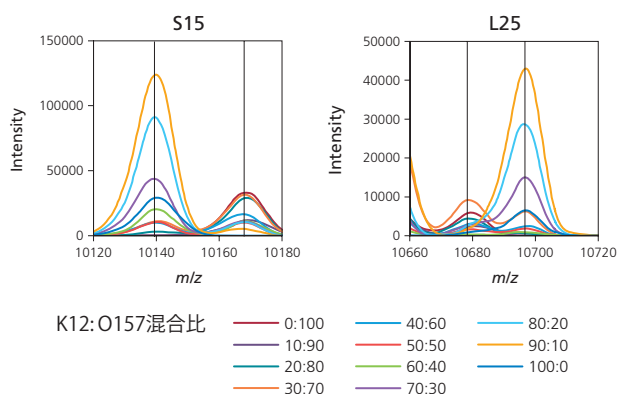


Fig. 3 クラスター解析の結果
黒字：データベースに登録された菌株
赤字：検証に使用した野生株

3-3. 混合サンプル

ここでは、一般的な実験用大腸菌K12株と腸管出血性大腸菌O157とを様々な比率で混合しMALDI-TOF MSにて分析し、3本のバイオマーカーを指標としてStrain Solution Ver. 2により混合物として識別可能かを検証しました。その結果、O157が10~80%混在していれば、O157とその他大腸菌 (K12株) の混合物として判定可能であり、40~70%の際は3本のバイオマーカーがすべて2本の質量ピークとして認識されることがわかりました (Fig. 4) ³⁾。

バイオマーカーの質量ピーク



Strain Solutionの結果

混合比率 K12:O157	ヒットバイオマーカー			Strain Solutionによる識別結果
	S15	L25	H-NS	
100:0	C	C	C	Other serotypes
90:10	A, C	C	A, C	O157 and other serotypes
80:20	A, C	C	A, C	O157 and other serotypes
70:30	A, C	C	A, C	O157 and other serotypes
60:40	A, C	A, C	A, C	O157 and other serotypes
50:50	A, C	A, C	A, C	O157 and other serotypes
40:60	A, C	A, C	A, C	O157 and other serotypes
30:70	A, C	A, C	A, C	O157 and other serotypes
20:80	A, C	A	A, C	O157 and other serotypes
10:90	A	A	A	O157
0:100	A	A	A	O157

A: O157タイプ、C: その他の大腸菌のバイオマーカー質量であったことを意味する

Fig. 4 混合菌の識別

参考文献

- [1] Yudai Hotta, Kanae Teramoto, Hiroaki Sato, Hiromichi Yoshikawa, Akifumi Hosoda, and Hiroto Tamura: Classification of Genus *Pseudomonas* by MALDI-TOF MS Based on Ribosomal Protein Coding in *S10-spc-alpha* Operon at Strain Level. *J. Proteome Res.*, 2010, 9, 6722–6728.
- [2] Teruyo Ojima-Kato, Naomi Yamamoto, Mayumi Suzuki, Tomohiro Fukunaga, and Hiroto Tamura: Discrimination of *Escherichia coli* O157, O26 and O111 from other serovars by MALDI-TOF MS based on the *S10*-GERMS method. *PLoS ONE*, 2014, 9: e113458.
- [3] Teruyo Ojima-Kato, Naomi Yamamoto, Yoshio Iijima, and Hiroto Tamura: Assessing the performance of novel software Strain Solution on automated discrimination of *Escherichia coli* serotypes and their mixtures using matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J. Microbiol. Methods*, 2015, 119, 233–238.

Strain Solutionは、学校法人名城大学と国立研究開発法人 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。

一般的な微生物同定法と同様に、通常はMALDI-TOF MSにおいても分析したい菌を単離する必要がありますが、もし近縁の菌株が混在している場合は、フィンガープリント法で見分けることは不可能です。従って、Strain Solution Ver. 2のこのような機能は、近縁の菌株を複数扱う際のヒューマンエラーの監視、食品企業のスターターなどの菌株品質管理、さらには菌株分譲機関における入荷・出荷管理にも有用であると考えられます。

4. まとめと展望

MALDI-TOF MSは、その迅速性・簡便性から臨床や製薬および食品分野の微生物管理でその用途が急速に拡大しています。近年では、血液培地や食品サンプルからの直接測定に関する研究も盛んに報告されており、より簡単かつ高精度な解析が求められています。S10-GERMS法を基盤としたStrain Solution Ver. 2によるプロテオタイピング手法は、これまでは重要視されていなかった微小なバイオマーカー質量の変化を高感度に区別できるため、単一微生物の血清型または株識別のみならず、単離されていない菌混合物や腸内フローラの詳細な分析、診断など幅広い活用を期待したいと思います。

謝辞

本研究は、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の支援を受けて実施しました。野生株の検証では、神戸市環境保健研究所の協力を得ました。

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

本資料の掲載情報に関する著作権は当社または原著者に帰属しており、権利者の事前の書面による許可なく、本資料を複製、転用、改ざん、販売等することはできません。掲載情報については十分検討を行っていますが、当社はその正確性や完全性を保証するものではありません。また、本資料の使用により生じたいかなる損害に対しても当社は一切責任を負いません。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。

初版発行: 2016年12月
© Shimadzu Corporation, 2016