

小型MALDIデジタルイオントラップ型質量分析計 MALDImini™-1を用いた細菌芽胞の迅速同定

■はじめに

微生物の種を同定することは、感染症を引き起こす原因となった起炎菌に対する適切な抗菌薬の処方や、食品を腐敗させる菌の発生源の追跡につながります。近年、細菌や真菌の簡便・迅速な同定が行える、質量分析計 MALDI-TOF MS による微生物同定法が普及してきており、臨床微生物検査や食品・製薬などの産業分野における品質管理目的で、広く用いられるようになってきました。しかしながら、MALDI による一般的な微生物同定法は、混合菌や芽胞状態の細菌には適用が容易ではないという制限があります。例えば、テロリズム対策としての、粉末化した炭疽菌芽胞の迅速同定への MALDI の適用は、現行のシステムでは困難という課題がありました。この課題を克服する手法の一つとしては、細菌のタンパク質をトリプシン消化して得られるペプチドを MS/MS 測定し、データベース検索することによりタンパク質を同定する手法が挙げられます。MS/MS によるタンパク質同定法は、タンパク質の由来となる生物種まで絞り込むことも可能なことと、複数のピークから特定のピークを選ぶことができるためタンパク質の混合物に対しても適用が可能なことから、MALDI による通常の微生物同定法と異なるアプローチで微生物同定が行える可能性があります。そこで、我々は、Fenselau らの報告¹⁾を参考に、トリプシンビーズを用いたタンパク質の迅速トリプシン消化と小型 MALDI デジタルイオントラップ型質量分析計 MALDImini-1 の MS/MS 機能を用いて、細菌の芽胞の迅速同定を試みました。

K. Shima

■小型 MALDI-DIT 質量分析計 "MALDImini-1"

MALDImini-1 (図1) は、一般的な MALDI-TOF MS から大きくサイズダウンし、A3 サイズを下回るフットプリントと本体重量 25 kg という軽量省スペースを実現した質量分析計です。この小型化は、質量分離部を飛行時間型質量分析計 (TOF MS) に代わって当社独自技術であるデジタルイオントラップを採用することにより実現しました。また、MALDImini-1 は、イオントラップの特徴である MS/MS および MS³ 測定機能を有しているため、この機能によるタンパク質の同定や構造解析も行えます。



図1 小型 MALDI デジタルイオントラップ型質量分析計 MALDImini™-1

■実験

バチルス属に分類される細菌の一つである枯草菌の *Bacillus subtilis subsp. subtilis* NBRC 13719[†] を芽胞形成菌のモデル試料としました。バチルス属は芽胞を形成するグラム陽性桿菌です。納豆菌 (*Bacillus subtilis natto*) のように食品に用いられる種のほかに、食中毒菌のセレウス菌 (*Bacillus cereus*) や強い感染性を持つ炭疽菌 (*Bacillus anthracis*) などの種が含まれます。

芽胞は、枯草菌を普通寒天培地にて 30 °C で 1 週間以上培養することによって形成させました。芽胞が形成されていることは、顕微鏡により確認しました。サンプル調製のワークフローを図2に示します。まず、菌体を MALDI ターゲットプレートに塗布、そこに 1 μL の 10%トリフルオロ酢酸を添加し、芽胞に含まれるタンパク質を抽出しました。自然乾燥の後、トリプシンビーズ (ProteoChem) 2 μL を添加し、トリプシン溶液が乾かないように湿潤環境下にて 37 °C で 30 分間保温して、芽胞タンパク質のトリプシン消化を行いました。トリプシンビーズを用いることにより、通常は数時間以上かかるトリプシン消化の時間を短縮できます。トリプシン消化後、マトリックス溶液 (1 μL) を重層して乾燥させた後、小型 MALDI デジタルイオントラップ型質量分析計 "MALDImini-1" を用いて MS、MS/MS を行いました。マトリックスには CHCA (α -cyano-4-hydroxycinnamic acid) を用いました。

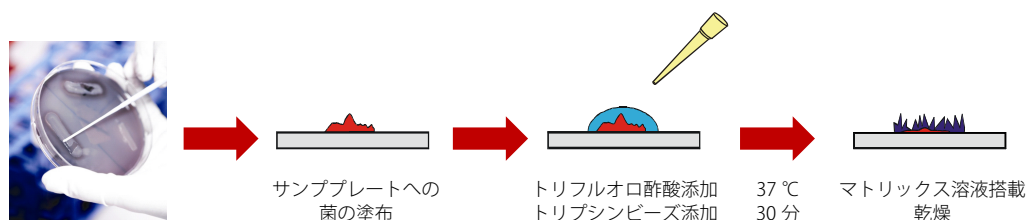


図2 サンプル調製のワークフロー

結果

MALDImini-1 を用いて測定した、芽胞のトリプシン消化物のマスペクトルを図3に示します。芽胞のタンパク質由来のトリプシン消化ペプチドが複数検出されました。検出されたペプチドのピークのうち m/z 1879 のピークを選択し、MS/MSを行った結果を図4に示します。このMS/MSにより得られたデータを、Mascot (Matrix Science) のMS/MS Ion Searchによるデータベース検索を行ったところ、枯草菌由来の Small, acid-soluble spore protein A が同定されました (図5)。また、同定されたペプチドの配列をタン

パク質のアミノ酸配列のホモロジー検索を行う BLAST 検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を行ったところ、他の生物種および炭疽菌やセレウス菌などとは異なる配列を有していたことから、このペプチドの配列は菌種を絞り込むために十分な特異性を有していることがわかりました。ここでは、枯草菌のみの検討結果を示しましたが、Fenselau らの報告¹⁾ではセレウスグループや炭疽菌においても同様の検討を行い、これらの菌種の芽胞についても同様の手法で菌種を絞り込める可能性が示されています。

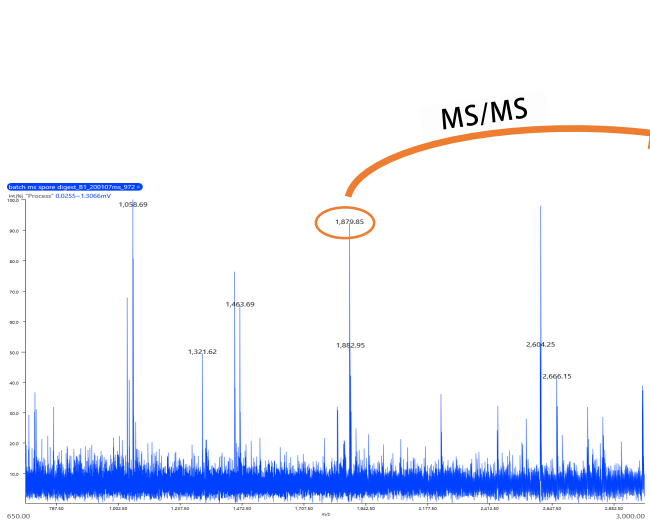


図3 芽胞のトリプシン消化物のマスペクトル

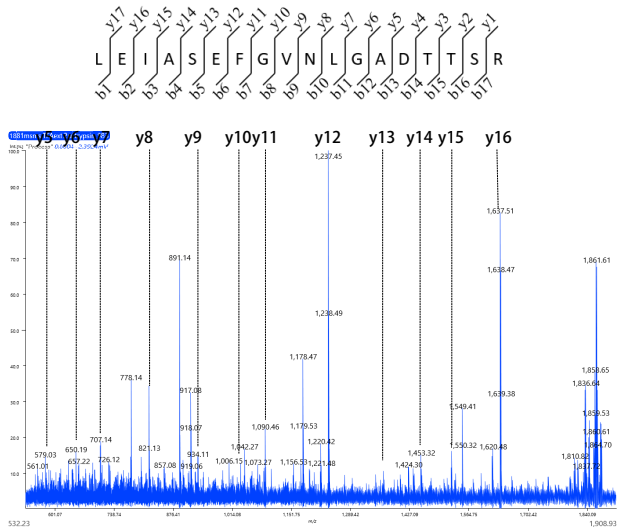


図4 m/z 1879 の MS/MS

[SSPA_BACSU](#) Mass: 7066 Score: 81 Matches: 1(1) Sequences: 1(1)
Small, acid-soluble spore protein A OS=Bacillus subtilis (strain 168) GN=sspA PE=3 SV=1
 Check to include this hit in error tolerant search or archive report

Query	Observed	Mr (expt)	Mr (calc)	Delta	Miss	Score	Expect	Rank	Unique	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 1	1879.9400	1878.9327	1878.9323	0.0004	0	81	3.9e-006	1	U	K.LEIASEFGVNLGADTTSR.A

図5 MS/MS Ion Search によるデータベース検索の結果

まとめ

MALDImini-1 の MS/MS 機能と、迅速な消化が行えるトリプシンビーズを用いた芽胞タンパク質のトリプシン消化を組み合わせることにより、一般的な MALDI 微生物同定法とは異なる手法によって芽胞の迅速な同定が行える可能性を示しました。コンパクトなサイズとシンプルな装置構成により、これまで質量分析計を置けなかった場所にも設置が可能な MALDImini-1 は、今回示した手法による迅速な芽胞の同定をより多様な場所で実現することが、将来的に期待されます。

参考文献

- 1) B. Warscheid and C. Fenselau (2003) Characterization of Bacillus Spore Species and Their Mixtures Using Postsource Decay with a Curved-Field Reflectron. *Anal. Chem.* 75:5618-5627.

MALDImini 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。
その他、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」、「®」を明記していません。

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5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。