

16S rRNA塩基配列類似菌種のMALDI-TOF MSによる識別の試み

Application of MALDI-TOF MS for Discrimination of Species Possessing Highly Conserved Ribosomal RNA Gene Sequences

従来法とは全く異なる原理に基づいた、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) を用いた微生物同定法が、迅速・簡便な細菌同定検査法として近年注目を集めています。細菌の迅速同定検査法としては16S rRNA遺伝子解析による方法がよく使われていますが、菌種によっては16S rRNA遺伝子配列の相同性が高く、互いに識別困難な場合があります。

ここでは、当社のMALDI-TOF MSラインナップである

AXIMAと微生物同定のためのデータベース検索用ソフトを組み合わせたシステムとして開発・リリースを行った“AXIMA微生物同定システム”を用いて、95%以上の16S rRNA遺伝子配列相同性を有する*Escherichia*属菌株のMALDI-TOFMSによる識別能を検討した結果¹⁾について紹介します。

K. Shima

注:AXIMA微生物同定システムの使用は研究用途に限ります。臨床診断目的の使用は行えません。

Fig. 1にAXIMA微生物同定システムによる微生物同定のながれを示します。1) 微生物試料の採取を行います。 10^5 cells/サンプルウェル程度のごく微量の試料量から分析が可能です。2) 採取した菌体をMALDI-TOF MSのサンプルプレートウェルに塗布します。塗布した菌体をMALDIのイオン化補助剤であるマトリックスと混合し、試料が乾燥すれば試料調製は完了です。3) 調製した菌体試料を、

MALDI-TOF MSを用いた微生物同定システム、“AXIMA微生物同定システム”で解析することにより、試料の微生物種同定や分類が行えます。同定は、AXIMA微生物同定システムのスペクトルデータベースSuperSpectra™に登録されている微生物種毎のマスペクトルデータと、微生物サンプルのMALDI-TOF MS測定データを照合することにより行います。

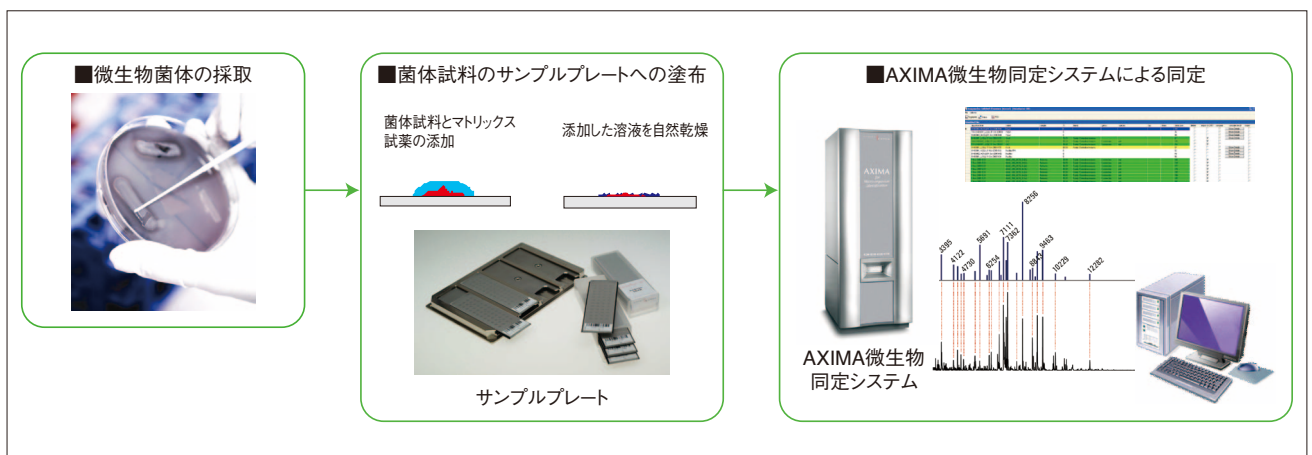


Fig. 1 AXIMA微生物同定システムによる微生物同定のながれ
Schematic Overview of the Analysis of MALDI-TOF Mass Spectra of Intact Cells of Microorganisms Using AXIMA Microorganism Identification System

Table 1 16S rRNA塩基配列の一致率(参考文献¹⁾より許可を得て転載)
Percent Identity of 16S rRNA Gene Sequences. From Muroi et al. (2011) with permission from Pharmaceutical Society of Japan.

Species	Strains	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>E. coli</i>	NBRC 12734	1											
	NBRC 3972	2	99.1										
	NBRC 12713	3	99.7	99.3									
	NBRC 13168	4	99.4	99.5	99.3								
	NBRC 13891	5	99.9	99.3	99.8	99.5							
	NBRC 13893	6	99.7	99.3	100.0	99.3	99.8						
	NBRC 3301	7	99.7	99.0	99.7	99.2	99.5	99.7					
	NBRC 102203	8	99.5	99.0	99.5	99.2	99.7	99.5	99.3				
	NBRC 14237	9	99.7	99.2	99.7	99.3	99.8	99.7	99.4	99.6			
<i>E. fergusonii</i>	NBRC 102419	10	99.6	98.9	99.5	99.3	99.6	99.5	99.7	99.3	99.5		
<i>E. hermanii</i>	NBRC 105704	11	97.4	97.4	97.3	97.5	97.5	97.3	97.1	97.2	97.4	97.1	
<i>E. blattae</i>	NBRC 105725	12	95.9	96.0	96.0	96.0	96.0	96.0	95.8	95.8	95.9	96.0	95.8

検討に用いた菌株の一覧をTable 1に示します。*E. coli* 9株の16S rRNA遺伝子配列相同性は99-100 %でした。*E. coli*と*E. fergusonii*は98.9-99.7 %, *E. blattae*および*E. hermanii*は他の菌株間と95.8-97.5 %と、種レベルで異なるにもかかわらず高い相同性を示しており、16S rRNA遺伝子配列の解析では識別困難であることが予想されました。

今回の検討では、各微生物サンプルから得られたMALDI-TOF MS測定データ間のピーク一致度を指標にクラスター解析を行い、16S rRNA遺伝子配列相同性が高い菌株の識別を試みました。AXIMA微生物同定システムのソフト機能を用いて行ったクラスター解析の結果をFig. 2に示

します。*E. blattae*と*E. hermanii*はもとより、*E. coli*との16S rRNA遺伝子配列相同性が非常に高い*E. fergusonii*についても*E. coli*とは異なる群を形成しており、MALDI-TOF MSでこれらの菌種を識別することが可能であることが示されています。

以上の結果から、16S rRNA遺伝子解析による識別が困難な菌種においてもMALDI-TOF MSによる識別が可能な場合があることが示されました。MALDI-TOF MSによって微生物の同定・分類を行う手法は、従来の手法では困難であった部分を補う強力なツールとなることが今後期待されます。

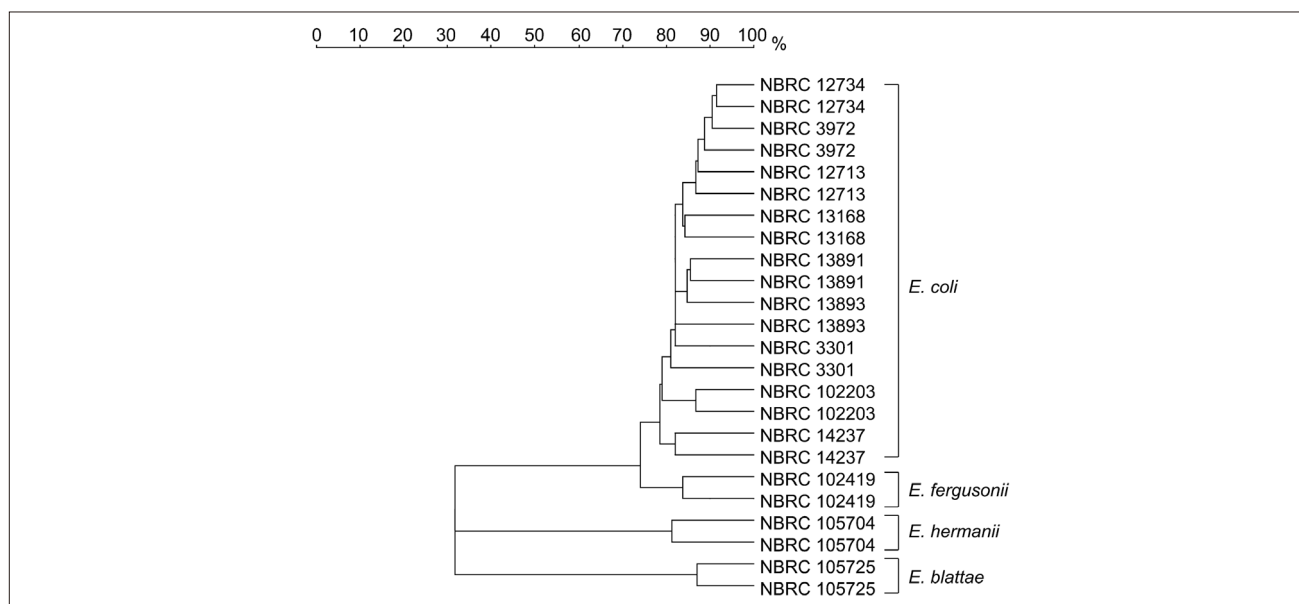


Fig. 2 各サンプルのマススペクトル間のピーク一致度を基に作成したデンドログラム(参考文献¹⁾より許可を得て転載)
A Dendrogram of MALDI Profiles Generated Using a Single Link Agglomerative Clustering Algorithm. All Strains were Analyzed in Duplicate. From Muroi et al. (2011) with permission from Pharmaceutical Society of Japan.

[参考文献]

1) Masashi Muroi, Keisuke Shima, Yasuyoshi Nakagawa, and Ken-ichi Tanamoto, Biol. Pharm. Bull. 2011, 34(3), 430-432

[謝辞]

本アプリケーションニュースは、武蔵野大学薬学部 棚元 憲一教授、室井 正志准教授、製品評価技術基盤機構 中川 恭好様からご提供いただいたデータおよび文献をもとに作成しています。図表については、文献出版元の日本薬学会の許可を得て転載しました。

初版発行：2011年8月

島津製作所 分析計測事業部
応用技術部

島津コールセンター

☎0120-131691
TEL: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。