SHIMADZU
Excellence in Science

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 微生物同定ソフトウェア

Application News

微生物同定ソフトウェアMicrobialTrack™と卓上MALDI-TOF MSによる*Acinetobacter*属細菌の同定

寺本 華奈江、西風 隆司

ユーザーベネフィット

- ◆ 多種多様な種が含まれ、識別が困難とされてきた*Acinetobacter*属細菌を高精度で同定できます。
- ◆ 卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8030”により迅速簡便に、微生物由来のMALDIマススペクトルが得られます。
- ◆ 検出されたタンパク質をタンパク質の塩基配列から予測した理論質量により解析できます。

■はじめに

Acinetobacter 属は、土壌や河川水など自然環境に広く分布するグラム陰性細菌です。一部の株は環境汚染物質や原油を分解する産業的な機能をもつ一方で、*A. baumannii* や *A. haemolyticus* など病原性をもつものも存在し、薬剤耐性を獲得した株も報告されています。また、これらの中には、現在微生物検査で使用されているMALDI-TOFMS微生物同定システムでは識別が困難とされてきた種もあります。

そこで本アプリケーションでは、一般に識別が難しいといわれている*A. baumannii, A. haemolyticus*, および*A. lwoffii* を含む、基準株を主とした*Acinetobacter* 属細菌をMALDI-TOF MS微生物同定ソフトウェアMicrobialTrackにより同定した結果をご紹介します。

■実験

試料微生物株とMALDI-TOF MS測定

試料微生物株として、独立行政法人製品評価技術基盤機構（NITE）バイオテクノロジーセンター（NBRC）もしくは国立研究開発法人理化学研究所バイオリソース研究センター（RIKEN BRC）微生物材料開発室（JCM）から提供された16種の*Acinetobacter* 属細菌を使用しました。各微生物試料は、標準寒天培地を用いて30℃で24時間培養しました。

MALDIマトリックス試薬にはα-シアノ-4-ヒドロキシけい皮酸(CHCA)を使用しました。マトリックス溶液として、1%トリフルオロ酢酸、15%エタノール、および35%アセトニトリルを含む水溶液で10 mg/mLとしたCHCA溶液を調製しました。ごく微量の培養微生物細胞を試料スライドに塗抹し、CHCA溶液を1 µL滴下して乾燥させて試料/マトリックス混合結晶を調製する直接塗抹法により試料調製しました。

MALDIマススペクトルの取得には、卓上型MALDI-TOF MS “MALDI-8030”を用い、Linear positive モードにより *m/z* 3,500-20,000の質量範囲を測定しました。

MALDIマススペクトルの解析

得られたMALDIマススペクトルをASCII形式でエクスポートし、約85,000種/40万ゲノムの原核微生物（バクテリア・アーキア）のゲノム情報をもとに構築したデータベースを用いて微生物同定するMicrobialTrackにより解析しました（図1）。

同定結果はReliabilityがHighもしくはVery highが得られたものを採用することとし、結果が分かれた場合は、オンプレート25%ギ酸抽出法、およびインチューブギ酸/アセトニトリル抽出法により調製した試料を分析しました。

■結果と考察

MALDIマススペクトル

一例として、図2に *m/z* 4,000-18,500 における *A. baumannii* NBRC 109757^{T}のMALDIマススペクトルを示します。MicrobialTrackにより、リボソームタンパク質として20本、その他のタンパク質として41本のピークが帰属されました。帰属されたピークのうち、MALDI-TOFMSにより検出されやすいハウスキーピングタンパク質であり、かつ、系統分類の指標としても有効であることが知られているリボソームタンパク質にアスタリスクを付けました。

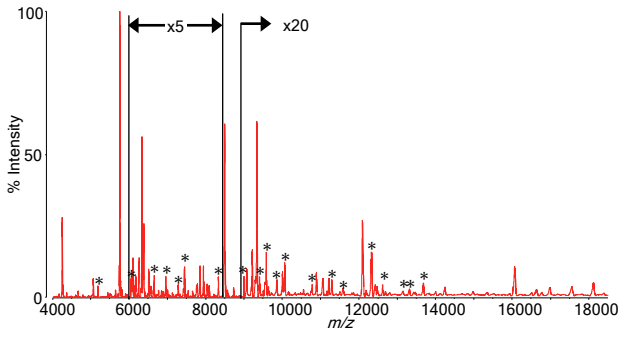

図2 *A. baumannii* NBRC 109757^{T}のMALDIマススペクトル

上述した通り、MALDI-TOFMSにより微生物を測定すると、リボソームタンパク質を主としたピークが観測されると言われています。しかし、タンパク質の理論質量に基づきマススペクトルを解析すると、実際にはリボソームタンパク質以外のタンパク質も多数観測されていることが分かります。また、ここに示したマススペクトルでは、ピーク強度としても、リボソームタンパク質以外が主要なピークとして観測されていることも分かりました。

図1　MicrobialTrackを用いたMALDIマススペクトル解析フロー

表 1　MicrobialTrackによる16株の*Acinetobacter* 属細菌の同定結果

Sample strain		Top candidate	Reliability	Resampling	
Acinetobacter baumannii	NBRC 109757^T	*Acinetobacter baumannii*	Very High	*Acinetobacter baumannii*	100%
Acinetobacter baylyi	NBRC 112578^T	*Acinetobacter baylyi*	Very High	*Acinetobacter baylyi*	100%
Acinetobacter beijerinckii	NBRC 112579^T	*Acinetobacter beijerinckii*	Very High	*Acinetobacter beijerinckii*	100%
Acinetobacter bouvetii	JCM 18991^T	*Acinetobacter bouvetii*	Very High	*Acinetobacter bouvetii*	100%
Acinetobacter calcoaceticus	NBRC 12552	*Acinetobacter calcoaceticus*	Very High	*Acinetobacter calcoaceticus*	100%
Acinetobacter gyllenbergii	NBRC 112581^T	*Acinetobacter gyllenbergii*	Very High	*Acinetobacter gyllenbergii*	100%
Acinetobacter haemolyticus	NBRC 109758^T	*Acinetobacter haemolyticus*	Very High	*Acinetobacter haemolyticus*	100%
Acinetobacter johnsonii	NBRC 102197	*Acinetobacter johnsonii*	Very High	*Acinetobacter johnsonii*	100%
Acinetobacter junii	NBRC 109759^T	*Acinetobacter junii*	Very High	*Acinetobacter junii*	100%
Acinetobacter lwoffii	NBRC 109760^T	*Acinetobacter lwoffii*	Very High	*Acinetobacter lwoffii*	100%
Acinetobacter nosocomialis	NBRC 110498	*Acinetobacter nosocomialis*	Very High	*Acinetobacter nosocomialis*	100%
Acinetobacter parvus	NBRC 112582^T	*Acinetobacter parvus*	Very High	*Acinetobacter parvus*	100%
Acinetobacter pittii	NBRC 110505	*Acinetobacter pittii*	Very High	*Acinetobacter pittii/lactucae*	93%
Acinetobacter radioresistens	NBRC 102413^T	*Acinetobacter radioresistens*	Very High	*Acinetobacter radioresistens*	100%
Acinetobacter schindleri	NBRC 112583^T	*Acinetobacter schindleri*	Very High	*Acinetobacter schindleri*	100%
Acinetobacter venetianus	NBRC 112585^T	*Acinetobacter venetianus*	Very High	*Acinetobacter venetianus*	100%

なお、リボソームタンパク質以外で検出されたタンパク質の中で、特に機能的に重要と思われるものとして、以下のタンパク質が含まれました: glutaredoxin, bacterioferritin-associated ferredoxin, beta-lactamase hydrolase-like protein, lactoylglutathione lyase, major cold shock protein CspA, DNA-binding protein Fis, translational regulator CsrA, potassium binding protein Kbp, trans-acting regulatory protein HvrA, および sec-independent protein translocase protein TatB .

MicrobialTrackでは、種を同定するだけではなく、理論質量による観測ピークの解析ができます。翻訳語修飾がないと考えられるタンパク質、あるいはN末端メチオニン切断が想定されるタンパク質として帰属されたピークに関連するタンパク質では、アミノ酸配列も表示されます。このアミノ酸配列を活用すれば、特定のタンパク質のアミノ酸配列の僅かな違いに着目したバイオマーカー法による亜種あるいは株レベルの分類（タイピング）にも応用できます。

【注意】MicrobialTrackでは、理論質量と実測質量が一致した（観測質量が許容誤差範囲内で理論質量と一致した）ものであるため、実際にそのタンパク質であると断言できるものではありません。

同定結果

表 1 に、MicrobialTrackによる*Acinetobacter* 属細菌16株の同定結果と、リンサンプリング（観測ピークからランダムに検出ピークを削除して、残ったピークで複数回同定を行うことで、同定結果の確からしさを評価する機能）による解析結果示します。16株の*Acinetobacter* 属細菌のうち、*A. pittii* 以外は微生物試料とCHCA溶液とで調製した試料で、同定結果第一候補がNITE NBRCまたは理研JCMの学名と一致しました。*A. pittii* では直接塗抹法とオンプレート25%ギ酸抽出法でreliabilityがLowまたはMiddleとなり、2種類の微生物種が第一候補に挙がりました。そのため、インチューブギ酸/アセトニトリル抽出法でHigh以上のreliabilityで同定された*A. pittii* が最終結果とみなされて、正答となりました。ただし、*A. pittii* にはコンプレックス（リボソームタンパク質の理論質量が80%以上一致する別種）として、*A. lactucae* の存在が示されました。

リサンプリングによる多面的な解析結果

観測ピークの一部をランダムに選択して繰り返し同定を行い、第一候補として推定される属種がどの程度の頻度で推定されたかを示すMicrobialTrack独自の解析アルゴリズム“リサンプリング”による解析の結果、*A. pittii* 以外では、100%第一候補菌種となり、第一候補菌種の信頼度が支持される結果が得られました。これに対して、*A. pittii* は93%、コンプレックスである*A. lactucae* が3%となり、タンパク質レベルで類縁性が高いものの、本試料微生物株が*A. pittii* であることが強く支持されました（表2）。

表 2　*A. pittii* NBRC 110505^{T}のリサンプリングによる解析結果

Candidates　Resampling　General Info

Genus	Acinetobacter	100%
Species	Acinetobacter pittii	93%
	Acinetobacter lactucae	7%

■まとめ

本アプリケーションでは、自然環境に広く分布して、多様な機能をもつ*Acinetobacter*属細菌をMALDI-8030およびMicrobialTrackで分析しました。その結果、一般に判別が難しいといわれてきた*Acinetobacter baumannii*コンプレックスを含む試料微生物株を正しく同定できました。リボソームタンパク質レベルで80%以上の類似度の別種（コンプレックス）が存在する*A. pittii*でも、リサンプリング解析の結果から、正しく同定できていることを確認できました。

<関連アプリケーション>

1. MALDI-MSプロテオタイピングによるアクネ菌の分類 B114
2. MALDI-MSを用いたプロテオタイピングによる乳酸菌の分類　01-00438-JP
3. 微生物同定ソフトウェアMicrobialTrack™による*Acinetobacter*属細菌の同定　01-00954-JP

株式会社 島津製作所　分析計測事業部
https://www.an.shimadzu.co.jp/　01-01040-JP　初版発行：2025年 9月

アンケート

関連製品 一部の製品は新しいモデルにアップデートされている場合があります。

MicrobialTrack™
MALDI-TOFMS 微生物同定ソフトウェア

MALDI-8030
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

関連分野

ライフサイエンス

微生物

価格お問い合わせ

製品お問い合わせ

技術お問い合わせ

その他お問い合わせ