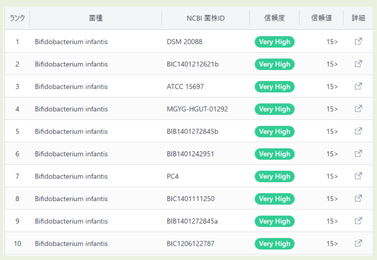
# 理論タンパク質量情報を活用した新しいMALDI微生物同定法による腸内細菌の大規模同定性能評価

○押川 大起[1)]・関口 勇地[2)]・井上 莉子[1)]・三井 一高[1)]・古田 匡智[1)]・寺本 華奈江[1)]・岩本 慎一[1)]・玉木 秀幸[2)]・鎌形 洋一[2)]
1) 株式会社 島津製作所、2) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所

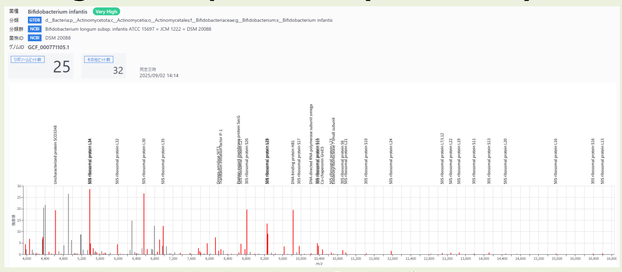
## 次世代創薬技術開発のための迅速な腸内細菌探索システムの構築を目指して

腸内細菌は健康や疾患に密接に関係しており、ルミノコッカス科に属する株によるがん免疫チェックポイント阻害薬の効果向上[1]など、腸内細菌の創薬実用化を目指した探索研究が進められている。島津製作所では腸内細菌の探索迅速化のため、 MALDI-MSによる微生物同定を用いた前処理から同定までを一貫して自動で行うシステムの構築を目指している。著者らが開発した新しいMALDI-MS微生物同定ソフトウェア「MicrobialTrack™」は理論タンパク質量情報を用いることでおよそ8万5千種の同定が可能である。本手法を用いることで、従来よりも遥かに多くの腸内細菌の同定を迅速に行うことができる。本発表では、これまでに取得した腸内細菌およそ4万スペクトルについてMicrobialTrackによる同定性能評価を試みた。

**MicrobialTrackによる*Bifidobacterium longum* subsp. *Infantis* (JCM 1222T)の解析結果**



同定結果上位10候補一覧



同定菌種と推定タンパク質ピーク帰属結果

**MicrobialTrack™**
**微生物ゲノム情報を基にしたタンパク質理論マススペクトルデータベースによるMALDI-MS微生物同定法[2]**
**⇒4万スペクトルを超える腸内細菌の同定性能評価**
**96%以上で種を同定可能に**

## 【Materials & Methods】

**・腸内細菌の培養、MALDI-MS測定**

ヒトマイクロバイオームに存在する腸内細菌を中心に、6門にまたがる231種418株を培養

3種類の手法を用いて菌体に前処理を実施

**①直接塗抹法**
(菌体をプレートに塗抹、マトリックスを滴下して風乾)

**②オンプレートギ酸抽出法**
(菌体を塗抹、ギ酸を滴下、風乾後マトリックス滴下)

**③エタノール・ギ酸抽出法**
(菌体を80%エタノール内で攪拌、遠心後のペレットにギ酸とアセトニトリルを滴下してタンパク質抽出、プレートに上清滴下後風乾してマトリックスを滴下)

MALDI-8020(島津製作所製)で測定

MicrobialTrackで解析、信頼度を確認
(本ソフトウェアでは信頼度が表示され、低信頼では再測定を推奨している。)

前処理法手順

**①直接塗抹法**
**②オンプレートギ酸抽出法**

コロニー釣菌、MALDI-MS用スライドに塗抹

ギ酸滴下(②のみ)後、マトリックス滴下

マトリックスが乾燥後、MALDI-MS測定

**③エタノール・ギ酸抽出法**

マクファーランド比濁標準液2の菌液にエタノールを終濃度80%になるように加えて攪拌

遠心後、ペレットにギ酸を滴下、攪拌後アセトニトリルを加えて攪拌、再度遠心

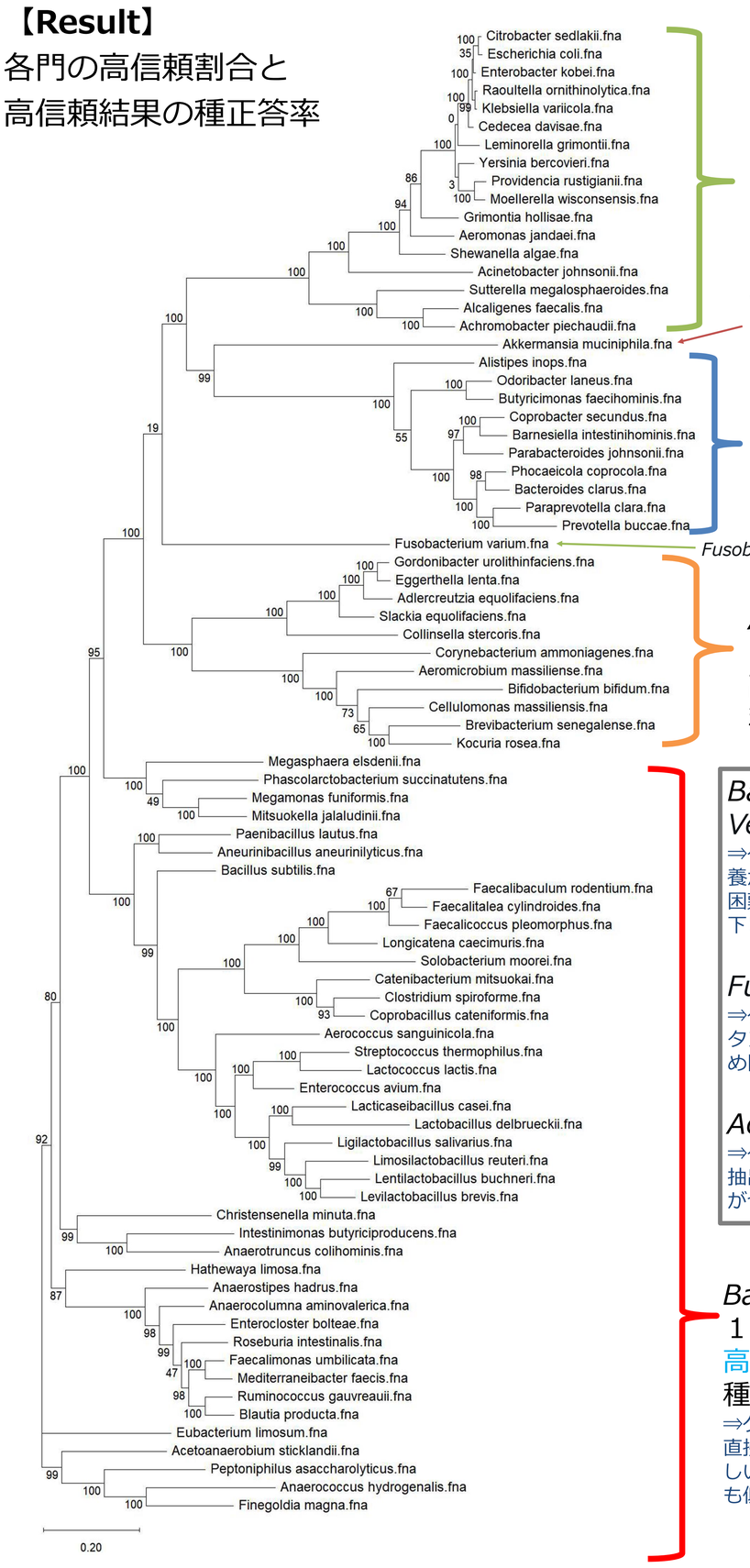
遠心後、上清を滴下し乾燥、マトリックスを滴下再度乾燥後、MALDI-MS測定

**・分子系統解析・高信頼割合および高信頼の種正答率評価**

高信頼度の結果が得られた菌種について、1属につき1種を選択し、20のシングルコピー遺伝子セットを用いた系統解析ソフトウェア「VBCG[3]」を用いて系統樹作成を実施した。各菌種が属する門ごとに高信頼の割合を集計し、高信頼結果の種正答率を評価した。

## 【Result】

各門の高信頼割合と高信頼結果の種正答率




*Pseudomonadota*門
23菌種
高信頼割合:76.0%
種正答率:98.5%
⇒グラム陰性菌が多く直接塗抹法等でもタンパク質抽出が容易なため、高信頼割合が高い

*Verrucomicrobia*門１菌種
高信頼割合：23.4%
正答率90.9%

*Bacteroidota*門
49菌種
高信頼割合:66.7%
種正答率:98.8%

*Fusobacteriota*門1菌種 高信頼割合：83.3%
正答率：100%

*Actinomycetota*門
３５菌種
高信頼割合:66.5%
種正答率：93.6%

*Bacteroidota*門・*Verrucomicrobia*門
⇒グラム陰性菌だが偏性嫌気性で培養が難しい菌種が多く、菌量確保が困難であったため、高信頼割合が低下したと思われる

*Fusobacteriota*門
⇒グラム陰性菌であり
タンパク質ピークを検出しやすいため同定が容易と思われる

*Actinomycetota*門
⇒グラム陽性菌であり、タンパク質抽出が困難であったため、種正答率がやや低下したと思われる

*Bacillota*門
１２２菌種
高信頼割合:61.8%
種正答率:96.1%
⇒グラム陽性菌であり、直接塗抹法ではタンパク質抽出が難しい菌も多いため、高信頼割合が最も低い

※ブートストラップ確率を各分岐に記載

表：採用した前処理手法ごとの信頼度割合および総スペクトル数

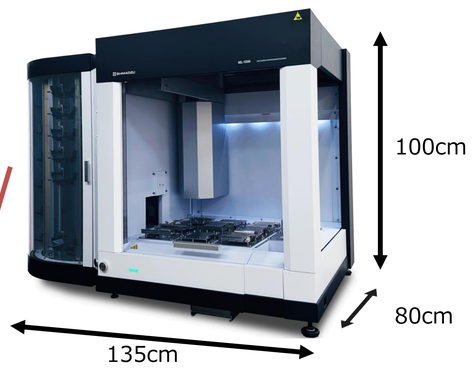
| 採用した前処理法 | 信頼度 高信頼 | 低信頼 | 総スペクトル数 |
|---|---|---|---|
| 直接塗抹法 | 49.4% | 50.6% | 5777 |
| オンプレートギ酸抽出法 | 62.5% | 37.4% | 18281 |
| エタノール・ギ酸抽出法 | 70.4% | 29.6% | 16130 |
| 全前処理合計 | 63.9% | 36.1% | 40188 |

合計4万スペクトルの内、63.9%で高信頼の結果を得た。高信頼度のスペクトルの内、96.2%で種まで、99.8%で属まで同定できた。高信頼割合はエタノール・ギ酸抽出法が最も高かった。

MicrobialTrackはより多くのタンパク質ピークを検出できるほど高い信頼度を得られる。本ソフトウェアと開発中のMALDI-MS微生物同定用前処理装置を組み合わせることで、腸内細菌を迅速かつ高精度で同定することが可能である。

## ハイスループットMALDI-MS微生物同定用前処理装置の開発

高信頼割合が最も高いエタノール・ギ酸抽出法を自動で行うことができる前処理装置を開発中。96ディープウェルプレートで液体培養した菌体からタンパク質を抽出、MALDI-MS用スライドに滴下するまでを自動で行うことができる。




前処理装置「ML-1200」

寒天培地から**コロニーを自動ピッキング**

タンパク質抽出に適した**自動前処理**と**MALDIプレート**への**自動塗布**

**MALDI-MS微生物同定**

コロニーピッキングシステムと組み合わせ、菌体採取からMALDI-MS測定までをハイスループットで行うシステムを構築中

本研究は国立研究開発法人　日本医療研究開発機構(AMED)の次世代治療・診断実現のための創薬基盤技術開発事業　（腸内マイクロバイオーム制御による次世代創薬技術の開発）【課題管理番号：24ae0121035h0004】の支援の元で行われています。

1:N. YT. Lin *et al.*, *Nature*, 2025, **644**, 1058.
2: Y. Sekiguchi *et al.*, *Genome Biol.*, 2023, **24**, 257.
3: R. Tian, B. Imanuan *Microbiome*, 2023, **11**, 247.