

# 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

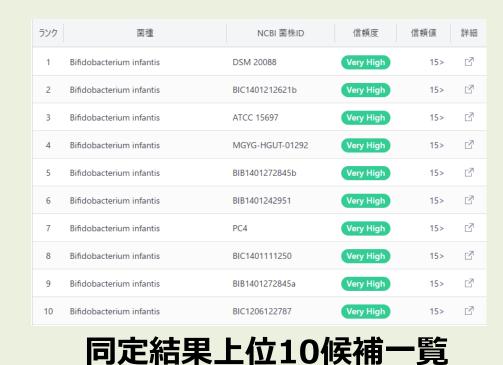
〇押川 大起1)・関口 勇地2)・井上 莉子1)・三井 一高1)・古田 匡智1)・寺本 華奈江1)・岩本 慎一1)・玉木 秀幸2)・鎌形 洋一2)

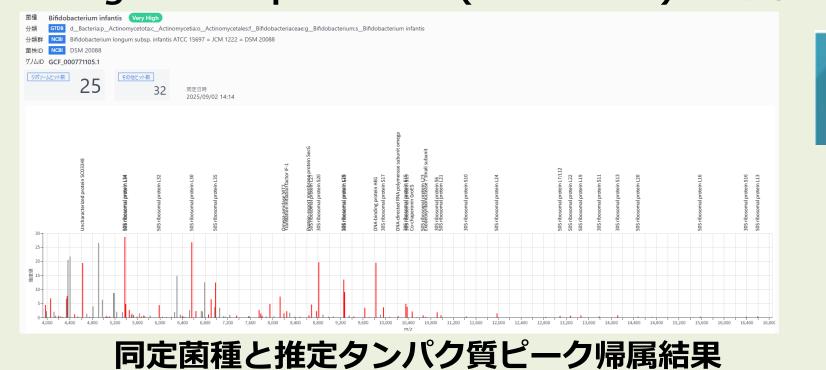
#### 1) 株式会社 島津製作所、2) 国立研究開発法人 産業技術総合研究所

# 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





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、

マトリックスが乾燥

後、MALDI-MS測定

マトリックス滴下

前処理法手順

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、

後、MALDI-MS測定

マトリックスを滴下再度乾燥

# MicrobialTrack<sup>TM</sup>

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

### [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。)

#### ・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「VBCG3」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。

# ハイスループットMALDI-MS微生物同定用前処理

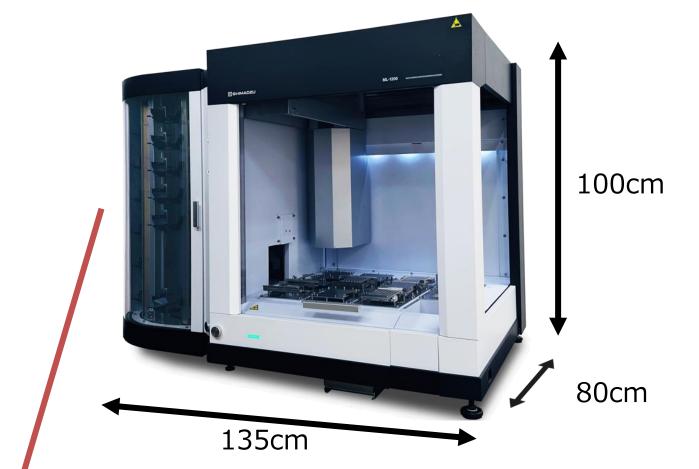
### 装置の開発

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。

菌体を播種した

寒天培地からコロニーを

自動ピッキング



前処理装置「ML-1200」

スライド

[MALDI-8020]

MALDI-MS微生物同定

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

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

#### 96%以上で種を同定可能に **(Result)** Citrobacter sedlakii.fna Pseudomonadota門 Escherichia coli.fna 各門の高信頼割合と Enterobacter kobei.fna 23菌種 Raoultella ornithinolytica.fna 高信頼結果の種正答率 高信頼割合:76.0% Klebsiella variicola.fna Cedecea davisae.fna 種正答率:98.5% Leminorella grimontii.fna Yersinia bercovieri.fna ⇒グラム陰性菌が多く Providencia rustigianii.fna 直接塗抹法等でもタンパク質抽 100 Moellerella wisconsensis.fna Grimontia hollisae.fna 出が容易なため、高信頼割合が Aeromonas jandaei.fna 高い Shewanella algae.fna Acinetobacter johnsonii.fna Sutterella megalosphaeroides.fna Verrucomicrobia門1菌種 Alcaligenes faecalis.fna 高信頼割合: 23.4% Achromobacter piechaudii.fna 正答率90.9% Akkermansia muciniphila.fna Alistipes inops.fna Odoribacter laneus.fna Bacteroidota門 Butyricimonas faecihominis.fna Coprobacter secundus.fna 49菌種 - Barnesiella intestinihominis.fna Parabacteroides johnsonii.fna 高信頼割合:66.7% Phocaeicola coprocola.fna Bacteroides clarus.fna 種正答率:98.8% Paraprevotella clara.fna Prevotella buccae.fna\_ Fusobacterium varium.fna Fusobacteriota門1菌種 高信頼割合:83.3% Gordonibacter urolithinfaciens.fna 正答率:100% Eggerthella lenta.fna Adlercreutzia equolifaciens.fna Actinomycetota門 Slackia equolifaciens.fna Collinsella stercoris.fna 35菌種 Corynebacterium ammoniagenes.fna Aeromicrobium massiliense.fna 高信頼割合:66.5% Bifidobacterium bifidum.fna Cellulomonas massiliensis.fna 種正答率:93.6% Brevibacterium senegalense.fna Megasphaera elsdenii.fna Bacteroidota門 · Megamonas funiformis.fna Mitsuokella jalaludinii.fna Verrucomicrobia門 Paenibacillus lautus.fna ⇒グラム陰性菌だが偏性嫌気性で培 Aneurinibacillus aneurinilyticus.fna Bacillus subtilis.fna 養が難しい菌種が多く、菌量確保が Faecalibaculum rodentium.fna 困難であったため、高信頼割合が低 Faecalitalea cylindroides.fna 下したと思われる Faecalicoccus pleomorphus.fna Longicatena caecimuris.fna Solobacterium moorei.fna Catenibacterium mitsuokai.fna Fusobacteriota門 Clostridium spiroforme.fna ⇒グラム陰性菌であり Coprobacillus cateniformis.fna タンパク質ピークを検出しやすいた Aerococcus sanguinicola.fna Streptococcus thermophilus.fna め同定が容易と思われる Lactococcus lactis.fna Enterococcus avium.fna Lacticaseibacillus casei.fna |*Actinomycetota*門 Lactobacillus delbrueckii.fna Ligilactobacillus salivarius.fna ⇒グラム陽性菌であり、タンパク質 Limosilactobacillus reuteri.fna 抽出が困難であったため、種正答率 Lentilactobacillus buchneri.fna Levilactobacillus brevis.fna がやや低下したと思われる Intestinimonas butyriciproducens.fna Anaerotruncus colihominis.fna Hathewaya limosa.fna Anaerostipes hadrus.fna Bacillota門 Anaerocolumna aminovalerica.fna 122菌種 Enterocloster bolteae.fna Roseburia intestinalis.fna 高信頼割合:61.8% Faecalimonas umbilicata.fna Mediterraneibacter faecis.fna 種正答率:96.1% Ruminococcus gauvreauii.fna Blautia producta.fna ⇒グラム陽性菌であり、 Eubacterium limosum.fna 直接塗抹法ではタンパク質抽出が難 Acetoanaerobium sticklandii.fna しい菌も多いため、高信頼割合が最 Peptoniphilus asaccharolyticus.fna Anaerococcus hydrogenalis.fna も低い Finegoldia magna.fna

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

	信頼度		
採用した前処理法	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。

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.

※ブートストラップ確率を各分岐に記載

2: Y. Sekiguchi et al., Genome Biol., 2023, 24, 257. 3: R. Tian, B. Imanuan Microbiome, 2023, 11, 247.