

解 説

マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法による細菌の迅速分類

石田康行

中部大学応用生物学部

要 旨

ソフトなレーザーイオン化法を採用したマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; MALDI-MS) の手法が, 近年, 煩雑な試料前処理を行うことなく, 細菌種によってはその属や種を迅速に分類または同定できる方法として注目を集めている. この手法では, マイクログラムオーダーの極微量の細菌試料を用いて, 細菌細胞中に含まれるタンパク質や脂質などの構成成分を高感度に検出することが可能である. さらに, それらの成分からなる質量スペクトルを指紋判定的に活用して, 細菌類の種類を迅速かつ簡便に分類・同定することができる. 本稿では, まず, MALDI-MS の基本的な原理と細菌試料の測定における試料調製法を簡単に説明し, 次に本法による細菌種の分類及び同定例として, 以下の内容を概説する.

- 1) タンパク質検出に基づいたレンズケースから回収した細菌類の分類
- 2) リン脂質検出に基づいた腸内細菌の分類
- 3) ミコール酸成分の検出に基づいたマイコバクテリウム属の分類

1. MALDI-MS の基礎原理と試料調製方法

タンパク質や脂質等の生体関連物質の分子量や分子構造の解析に有用な手法として, 最近, マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法 (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass Spectrometry; MALDI-MS) の手法が生化学の分野において重要な地位を占めている. この MALDI-MS における試料成分のイオン化のモデル図を図 1 に示す (佐藤, 2002). まず, レーザーエネルギーを効率よく吸収し, かつプロトン供与体となり得る, 「マトリックス試薬」と総称される化合物と試料分子を溶液化して混合する. この溶液を MALDI-MS 用の試料プレート上に滴下した後, 溶媒を乾燥除去してマトリックス試薬と試料の混合結晶を調製する. 次いで, この試料プレートを装置本体に導入した後, 混合結晶の表面にレーザー光 (通常, 紫外レーザー光が使用される) をパルス照射すると, まずマトリックス分子が光エネルギーを共鳴吸収して, イオン化すると共に急速に加熱されて気化する. この際, レーザー照射による試料分子の直接的な励起や気化はほとんど進行しないが, それらを取り囲んでいたマトリックス試薬分子の気

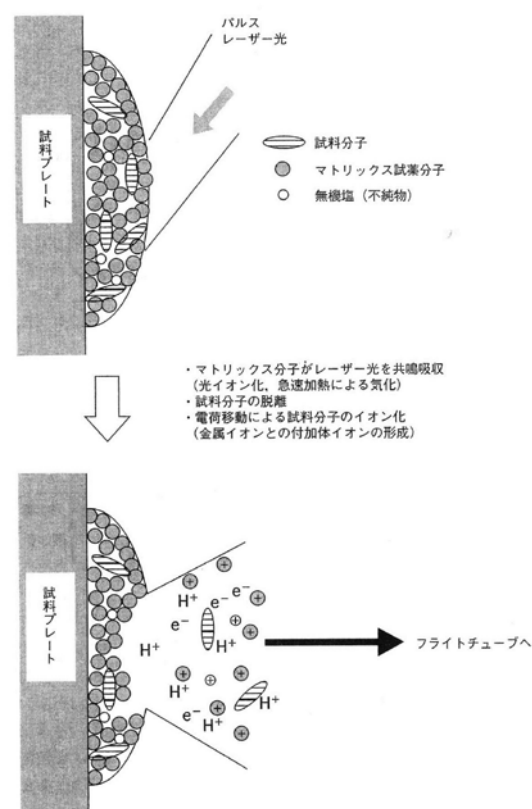


図 1 MALDI-MS 法におけるイオンの生成機構 (佐藤, 2002) (講談社の許可を得て転載)

化に伴い、試料分子もほぼ同時に気相に放出される。引き続き、イオン化したマトリックス試薬と一部の試料分子間でプロトンの授与が起こることによって、試料分子は直接的に光エネルギーを受けることなく「間接的に」イオン化され、質量分離された後に検出される。このように、イオン化に際して試料分子はレーザー光エネルギーを直接吸収しないため、この方法では難揮発性で熱的に不安定な生体関連物質についても、イオン化の際のフラグメンテーションをかなりの程度回避して、元の構造をそのまま分析することが可能である。

次に、MALDI-MS により細菌の構成成分を測定する際の、マトリックス試薬の選択や試料調製法について説明する。まず、マトリックス試薬には、一般に MALDI-MS によりタンパク質や脂質等を直接測定する際に汎用されているものが、細菌試料に対してもそのまま利用できる。例えば、タンパク質測定の場合には α -シアノ-4-ヒドロキシケイ皮酸やシナピン酸などが、また、脂質の測定では 2,5-ジヒドロキシ安息香酸が主に用いられている。なお、これらのマトリックス試薬は、一般に測定試料に対して、物質質量比で 100 から 1,000 倍量程度の大過剰量を添加するかたちで使用される。

また、試料調製に関しては、本法による細菌種の識別が報告された当初は、予めバクテリアから溶媒抽出により単離・精製したタンパク質や脂質成分の溶液を測定に供するのが一般的であった。その後、より簡便な調製方法として、細菌の懸濁液を直接測定に用いる方法が主流となり、その結果、前処理操作を含めた実験時間の大幅な短縮化が図られた。さらに、最も簡便な試料調製法として「オンプローブ試料調製法」が知られている。この方法では、培地から金属ループを用いて採取した細菌試料を MALDI-MS の試料プレート上に塗布し、次にマトリックス試薬溶液を試料上に滴下して、溶媒を乾燥除去するという極めて簡便な試料調製が行われる。このオンプローブ試料調製法を採用した MALDI-MS により、*Pseudomonas* 属や *Bacillus* 属等の細菌類をより迅速かつ簡便に識別できた例が報告されている (Madonna et al., 2000)。さらに、この論文ではマトリックス試薬の滴下に先だって、アルコール類を試料上に滴下することにより、測定結果の再現性が向上することも報告されている。この

理由として、著者らはアルコールの滴下によって、細菌試料がマトリックス試薬の結晶全体に渡って比較的均一に分散するようになるためと考察している。

2. タンパク質分析に基づく細菌の分類

タンパク質は、細菌の乾燥重量の約 50% を占める主要な構成成分であることに加えて、一般に細菌中に 200 から 6000 種ともいわれる極めて多様な分子種として存在していることから、バクテリア類の化学分類法における指標成分としてよく用いられている成分の一つである (Fenselau et al., 2001)。また MALDI-MS 法の開発や改良が、主にタンパク質工学などの生化学的な分野からの要求が推進力となって行われてきたという背景と関係して、本法による細菌類の分析においても、バクテリア中のタンパク質に注目してその識別や同定を行う方法が最も中心的である。これまでに、MALDI 質量スペクトル上に観測されるタンパク質類の種類や分布を手がかりとして、各種細菌類の属、及び種の分類を指紋判定的に行った例が多数報告されている。

さらに、最近では多種の細菌試料の質量スペクトルを蓄積したデータベースからなる、MALDI-MS 用の微生物解析ソフトも市販され、より簡便な細菌種の決定の実現に貢献している。このアプリケーションでは、簡単な前処理を施した、主としてタンパク質からなる微生物の抽

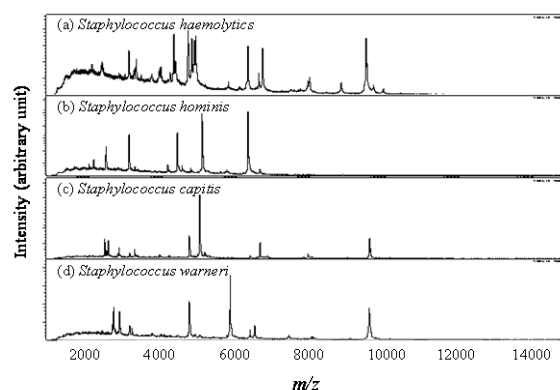


図 2 レンズケースから回収した細菌コロニー試料の MALDI 質量スペクトル

(a) *S. haemolyticus*, (b) *S. hominis*, (c) *S. capitis*, (d) *S. warneri* (角出ら, 2009)

(日本質量分析学会の許可を得て転載)。

出物をMALDI-MS測定し、得られた質量スペクトルを既存のデータベースと比較する事により、菌種の分類が行われる。例えば、著者らはコンタクトレンズケアに使用したレンズケースから回収した細菌類の分類に本法を応用した(角出ら, 2010)。図2に、回収した細菌類のコロニーのうち、*Staphylococcus* 属であると帰属できた一連の菌種の質量スペクトルを示す。この図において、 m/z 値 9500 付近のピークのように、複数の種に共通して見られるピークも存在するが、種に特異的なものも多く確認されており、それらのピークパターンをデータベースと照合する事により、各菌種を種レベルまではっきりと分類することができた。さらに、この報告では、レンズケースから回収された659種の細菌種のうち644種を同様の手順によって種レベルまで決定することができ、微生物解析ソフトを搭載したMALDI-MSが細菌の迅速な分類に威力を発揮することが示された。

3. 脂質の分析に基づく細菌の分類

一般に、細菌の全乾燥重量に対する脂質類の存在量は10%以下であり、タンパク質に比べるとその含量はかなり少ないものの、その分子種や分布パターンがバクテリア種ごとに多様であることから、これまでに脂肪酸、極性脂質およびイソプレノイドキノンなどの種々の脂質成分が細菌の化学分類を行う際の有効な指標成分として

用いられてきた。MALDI-MSによる細菌種の識別においても、細胞膜の主な構成リン脂質であるホスファチジルエタノールアミン(PE)類およびホスファチジルグリセロール(PG)類を高感度に検出し、それらのピークパターンからバチルス属細菌の識別を行う方法が提案されている(Ho et al., 1996)。

こうした中で筆者らは、前節で紹介した「オンプローブ試料調製法」を併用したMALDI-MSにより、腸内細菌群として知られる、一連の細菌中に含まれるリン脂質成分を煩雑な試料前処理を行わずに、迅速、簡便かつ高感度に検出できることを報告した(Ishida et al., 2001)。ここでは、培地から採取した細菌コロニー試料をMALDI-MSの試料プレート上に直接設置し、次にマトリックス試薬を試料上に滴下して、溶媒を乾燥除去した後にMALDI-MS測定を行うという簡便な方法を採用した。その結果得られた、大腸菌(*E. coli*)の典型的なMALDI質量スペクトルを図3に示す。このスペクトル上には、大腸菌の細胞膜を構成するPEおよびPG類がそれらのナトリウム付加体として高感度に観測された。さらに豚コレラ菌(*Salmonella choleraesuis*)を含む、種々の腸内細菌類を同様の方法により測定したところ、いずれの試料のスペクトル上にも同じ種類のリン脂質類が共通して観測されたが、それらの相対強度は属の違いを反映して細菌種の間でかなりの程度異なっていた。それ

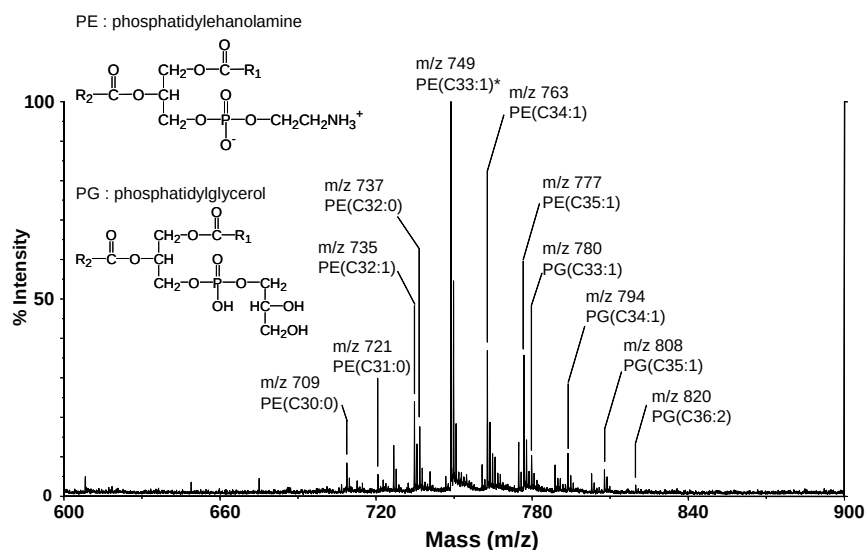


図3 大腸菌のリン脂質に注目したMALDI質量スペクトル (Ishida et al., 2006)

(Reprinted with permission from J. Anal. Appl. Pyrolysis Copyright 2006 Elsevier)

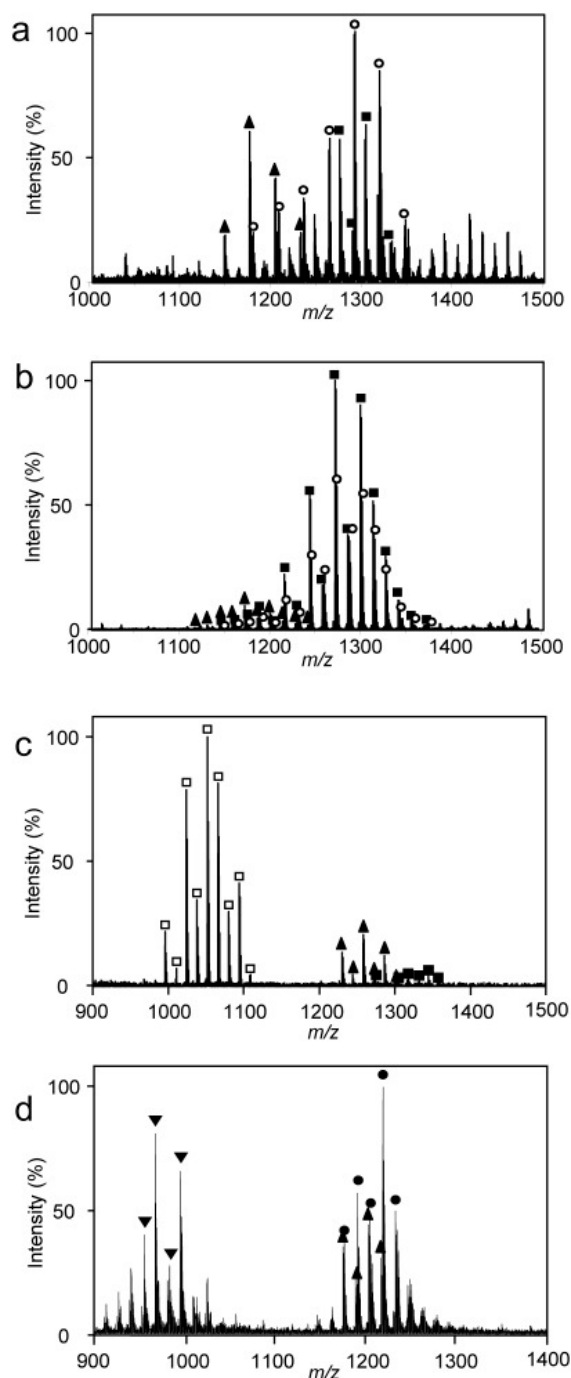


図4 マイコバクテリウム属のヘキサン抽出物のMALDI質量スペクトル

(a) *M. tuberculosis*, (b) *M. bovis*, (c) *M. kyorinense*, (d) *M. smegmatis*

(Teramoto et al., 2015) (Reprinted with permission from Mass Spectrometry. Copyright 2015 the Mass Spectrometry Society of Japan)

らの分布の違いを手掛かりにして、各種の腸内細菌群をはっきりと識別することができた (Ishida et al., 2001)。

さらに、Teramoto らは MALDI-MS によるミコール酸の高感度検出に基づいて、一連のマイコバクテリウム属の分類が可能であることを報告した (Teramoto et al., 2015)。ここでは、細菌からの *n*-ヘキサン抽出物を、マトリックス試薬およびカチオン化剤である 2,5-ジヒドロキシ安息香酸およびヨウ化ナトリウムと混合させて調製した溶液試料が測定に使用された。さらに、この報告では、「スパイラル型飛行時間型質量分離部 (Sato et al., 2007)」と呼ばれる、高分解能型の MALDI-MS 装置が用いられた。この質量分離部では、スパイラル型のイオン軌道を設計することにより、その飛行長が約 17 m まで延伸されており、60,000 超の質量分解能が達成されている。この MALDI-MS システムを用いて得られたマイコバクテリウム属の抽出物試料の典型的な質量スペクトルを図4に示す。これらのスペクトル上には、メキシ型、ケト型、ジカルボキシ型およびエポキシ型などの、様々なタイプのミコール酸類のピーク群が明瞭に観測された。さらに、当該成分のタイプや、その分子中に含まれる炭素数の分布はマイコバクテリウム属の種の違いによって明瞭に異なっており、それらのスペクトルパターンを基にして、それらの種をはっきりと分類できる可能性が示された。

6. おわりに

細菌類の分類や同定を MALDI-MS により迅速かつ簡便に行った例をいくつか紹介した。現在では、細菌分類データベースを搭載した MALDI-MS は国内の多くの病院に導入されており、医療の現場にて簡便に細菌種を同定するための手段として、既に確立された方法論になりつつある。一方で、感度や分解能などのより一層の高性能化や、細菌の混合系から特定の菌種のみを測定に供するための選択性の付与など、ハードおよびソフトの両面において解決すべき課題も少なくない。今後、ハード及びソフト両面の発展を通じて、この方法が医療の現場での実用的な細菌同定法として利用されるだけでなく、薬剤耐性菌の早期発見や細菌の脂質代謝の機序解明など、細菌学の様々な課題解決のための重要なツールとして活躍することが期待される。

引用文献

佐藤浩昭, 生命科学のための最新マスマススペクトロメ
リー, 原田健一, 田口良, 橋本豊 (編), I-2
MALDI-MS, 講談社, 2002.

Madonna AJ, Basile, Ferrer FI, Meetani MA, Rees JC,
Voorhees KJ, On-probe sample pretreatment for
the detection of proteins above 15 KDa from
whole cell bacteria by matrix-assisted laser
desorption/ionization time-of-flight mass
spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*
2000;14:2220-2229.

Fenselau C, Demirev PA, Characterization of intact
microorganisms by MALDI mass spectrometry. *Mass
Spectrom. Rev.*, 2001;20:157-171.

角出泰造, 豊原恵, 野町美弥, 角田真英, 中田和彦, 石
田康行, 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による使用済みコンタクトレン
ズケースから回収された微生物の迅速分類. *質量
分析* 2009;57:241-248.

Ho Y-P, Fenselau C, Applications of 1.06- μ m IR Laser
Desorption on a Fourier Transform Mass Spectrometer.
Anal. Chem., 1998;70:4890-4895.

Ishida Y, Kitagawa K, Nakayama A, Ohtani H,
Complementary analysis of lipids in whole bacteria
cells by thermally assisted hydrolysis and
methylation-GC and MALDI-MS combined with
on-probe sample pretreatment. *J. Anal. Appl. Pyrolysis*,
2006;77:116-120.

Ishida Y, Madonna A, Rees J, Mohammed M, Voorhees KJ,
Rapid analysis of intact phospholipids from whole
bacterial cells by matrix-assisted laser
desorption/ionization mass spectrometry combined
with on-probe sample pretreatment, *Rapid Commun.*

Mass Spectrom. 2002;16:1877-1882.

Teramoto K, Suga M, Sato T, Wada T, Yamamoto A,
Fujiwara N, Characterization of Mycolic Acids in
Total Fatty Acid Methyl Ester Fractions from
Mycobacterium Species by High Resolution
MALDI-TOFMS. *Mass Spectrometry*, 2015;4:
A0035.

Satoh T, Sato T, Tamura J, Development of a
High-Performance MALDI-TOF Mass Spectrometer
Utilizing a Spiral Ion Trajectory. *J. Am. Soc. Mass
Spectrom.* 2007;18:1318-1323.

Title : Rapid Classification of bacteria by
Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Mass
Spectrometry

Author : Yasuyuki Ishida

Address : College of Bioscience and Biotechnology,
Chubu University

Keywords : MALDI-TOFMS, Bacteria, Protein,
Phospholipid, Micolic acid