



MALDI-TOF MS微生物同定法の解説と NBRCの支援

～MALDI-TOF MSを用いた微生物の迅速同定を導入しようとお考えの方へ～

バイオテクノロジーセンターバイオ技術評価・開発課

森脇 芙美

講演内容

はじめに

- ①MALDI-TOF MSの原理と微生物同定法の実際
- ②MALDI-TOF MS微生物同定法の産業界等での活用例
- ③NBRCによる支援のご紹介

■ MALDI-TOF MSとは

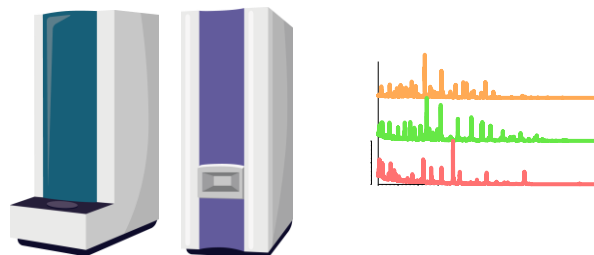
- MALDI-TOF MSとは、マトリックス支援レーザー脱離イオン化法（Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization, MALDI）と、飛行時間型質量分析計（Time of Flight, TOF）を組み合わせた分析法（または分析計）であり、2002年に田中耕一先生がノーベル賞を受賞された技術が活用されている
- タンパク質など生体高分子の分析に優れている



→MALDI-TOF MSを用いて微生物細胞のタンパク質も分析可能である

■ MALDI-TOF MSを用いた微生物同定

微生物細胞を構成するタンパク質組成・分子量が微生物種や株レベルで特徴的であることを利用して、タンパク質の質量（MS）スペクトルを取得し、それを用いて微生物を同定する



【ポイント】

- ・ 迅速（1検体あたり数分）、工程がシンプルで他の方法よりも簡便
- ・ 16S rDNAなどの塩基配列解析では識別できない近縁種が識別できる場合がある
- ・ 産業界で普及が進んできている

■ MALDI-TOF MS微生物同定法はこんなことに使われている

品質管理

例…汚染菌の同定、製造工程の微生物汚染検査、汚染源の特定

スクリーニング

例…微生物探索の過程で標的微生物の絞り込み、重複株排除による微生物を利用した製品開発の効率化

講演内容

はじめに

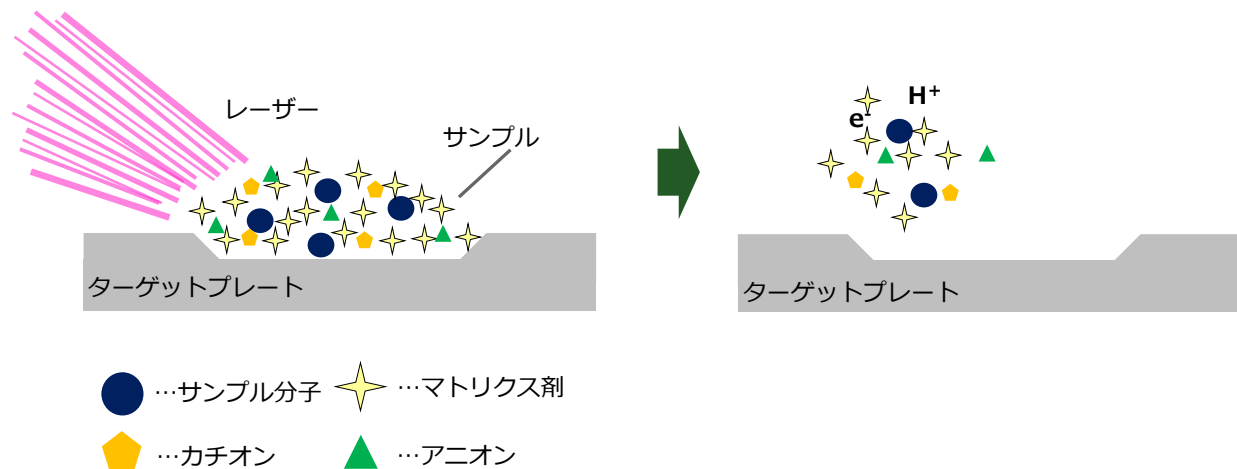
①MALDI-TOF MSの原理と微生物同定法の実際

②MALDI-TOF MS微生物同定法の産業界等での活用例

③NBRCによる支援のご紹介

■ MALDI-TOF MSの原理（イオン化法）

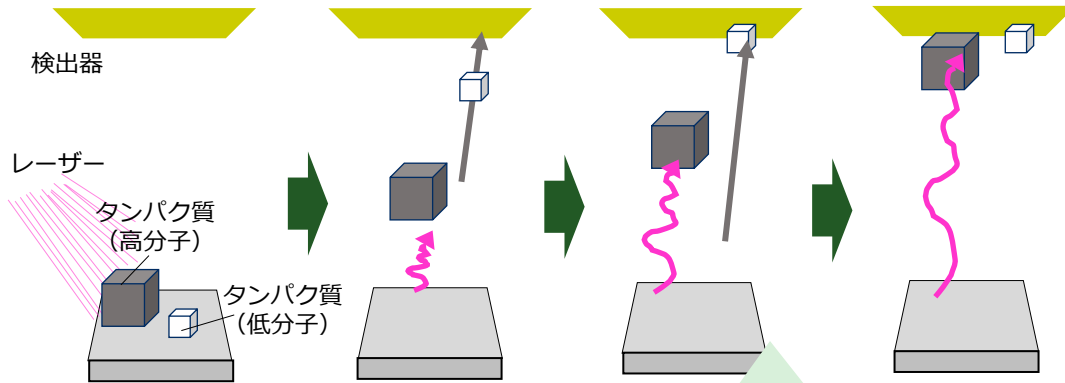
MALDI…**M**atrix **A**ssisted **L**aser **D**esorption / **I**onization（マトリクス支援レーザー脱離イオン化法）



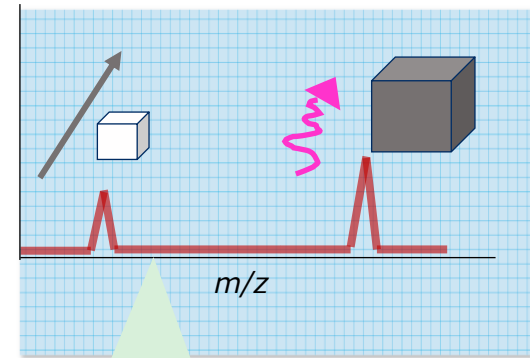
マトリクス剤がレーザー光を吸収し、熱エネルギーに変換、このエネルギーを用いてサンプルとマトリクス剤の混合物が瞬時に気化・イオン化する

■MALDI-TOF MSの原理（分離法）

TOF MS…Time Of Flight Mass Spectrometry（飛行時間型質量分析法）



軽いイオンほど早く飛んで検出器に到達する。
質量電荷比（ m/z ）の大きさと飛行時間の関係を利用した質量分析



質量（MS）スペクトルが得られる

■ MALDI-TOF MS微生物同定法の種類

指紋判定法（フィンガープリント法）

サンプルの微生物のタンパク質MSスペクトルと、比較参照用とする既知微生物のタンパク質MSスペクトルをデータベース（ライブラリー）と照合、その類似性から近縁な微生物を同定する方法

バイオマーカー法

特定の微生物の識別において、当該微生物種の同定指標となる複数のタンパク質の分子量（バイオマーカー）に着目し、MALDI-TOF MS解析によって得られたMSスペクトルの推定分子量との照合によって同定する方法

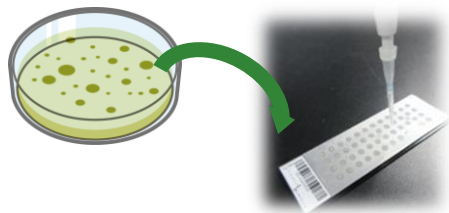
プロテオミクス法（製品名：MicrobialTrack®）

MALDI-TOF MSで測定し、取得した微生物のタンパク質MSスペクトルと、ゲノム配列から推定された微生物のタンパク質の理論質量との類似度で同定する方法

■ 指紋判定法（フィンガープリント法）

【指紋判定法による微生物同定の大まかな流れ】

前処理



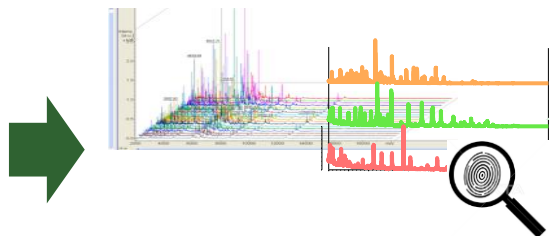
純粋培養した微生物のコロニーをピックアップし、ターゲットプレートへ乗せ、**マトリクス剤**と混合

測定



MALDI-TOF MSによる微生物のタンパク質MSスペクトルを取得

解析



微生物のタンパク質の構成が種や株レベルで異なること
＝個々人で指紋が異なること
を利用してサンプルの微生物が何なのか同定

得られたサンプルと比較参照用ライブラリーを照合

■ 前処理方法の種類

・スメア法（セルスメア法、ダイレクトスメア法）

滅菌済みの爪楊枝などを用いて微生物のコロニーをターゲットプレートへ直接塗布し、**マトリクス剤**を滴下し乾燥後に、測定に供する方法

・On plateギ酸抽出法（ギ酸ダイレクト法）

滅菌済みの爪楊枝などを用いて微生物のコロニーをターゲットプレートへ直接塗布し、ギ酸と**マトリクス剤**を順に滴下し乾燥させ、測定に供する方法

・エタノール・ギ酸抽出法

マイクロチューブ内で終濃度80%のエタノールに微生物のコロニーを懸濁し、洗浄。遠心分離後エタノールを除去、ペレットにギ酸、アセトニトリルを加え十分に懸濁し、再度遠心分離した上清をターゲットプレートへ滴下。乾燥後に**マトリクス剤**を滴下し、再度乾燥後に測定に供する方法

大腸菌のように比較的容易に細胞が壊れる場合はセルスメア法を用いる。
一方で、枯草菌、放線菌、酵母菌、糸状菌のように比較的細胞が壊れにくい場合は、On plateギ酸抽出法やエタノール・ギ酸抽出法を用いることで、MSスペクトルを検出しやすくなる場合がある。

■マトリクス剤

マトリクス剤	略称	化学式 (分子量)	適合サンプル
alpha-cyano-4-hydroxy cinnamic acid	HCCA (CHCA)	$C_{10}H_7NO_3$ (189.17)	ペプチド
sinapinic acid	SA	$C_{11}H_{12}O_5$ (224.21)	タンパク
2,5-dihydroxy benzoic acid	2,5-DHB	$C_7H_6O_4$ (154.12)	汎用 (特に親水性) 極性ポリマー
Super DHB	SDHB		糖タンパク、タンパク (ISD)
1,5-diamino naphthalene	1,5-DAN	$C_{10}H_{10}N_2$ (158.20)	タンパク (ISD)
dithranol	DIT	$C_{14}H_{40}O_3$ (226.23)	汎用 (特に疎水性)、 極性ポリマー
trans-3-indole acrylic acid	IAA	$C_{11}H_9NO_2$ (187.19)	非極性ポリマー
9-nitroanthracene	9NA	$C_{14}H_9NO_2$ (223.23)	非極性低分子、フラーレン
trans-2-[3-(4-tert-Butylphenyl)-2-methyl-2-propenylidene]malononitrile	DCTB	$C_{17}H_{18}N_2$ (250.34)	非極性ポリマー、錯体

サンプルの種類・物性や測定目的によってマトリクス剤を選択する
微生物にはHCCA (CHCA) または、SA (高分子量のタンパク質検出用) を用いる

■スメア法の実際



1. 菌体を採取



2. 採取した菌体をプレートに塗布



3. マトリクス剤を取る



4. マトリクス剤を2へ滴下，乾燥

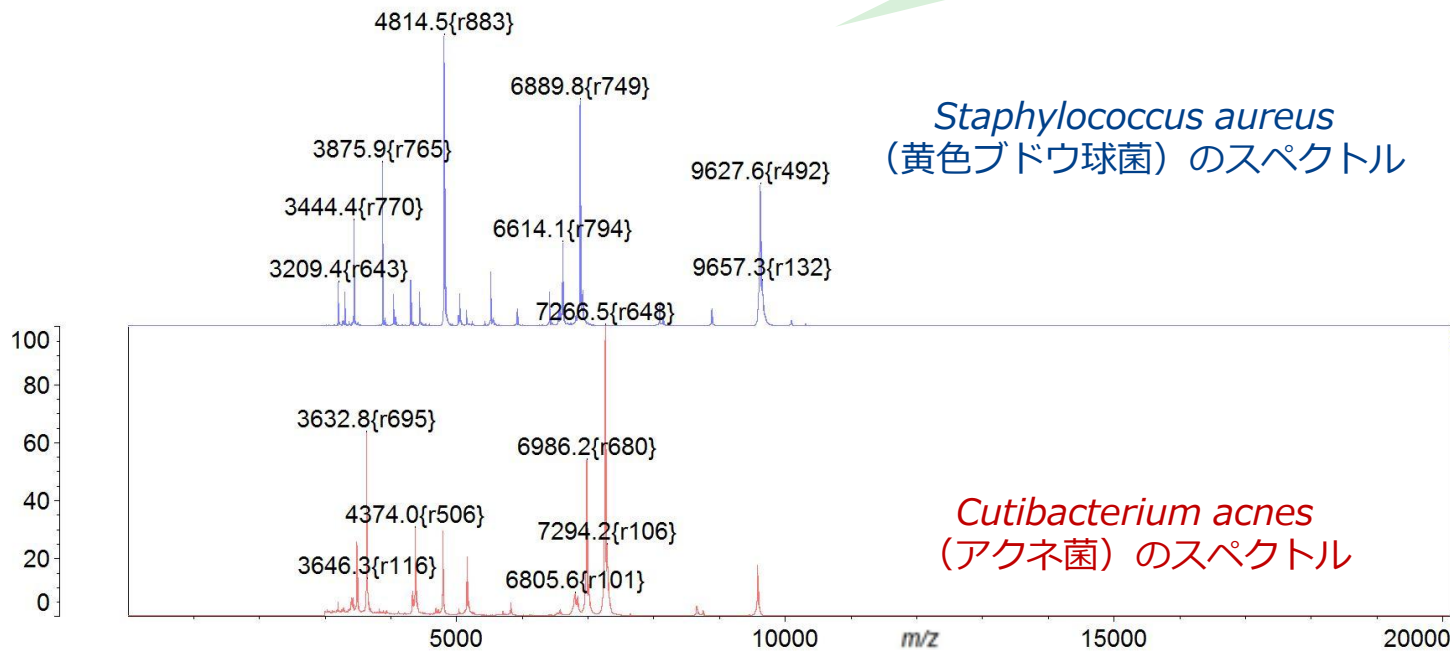


5. プレーートをMALDI-TOF MSへ、その後MALDI-TOF MSで測定、市販の解析ソフトで解析

MALDI-TOF MSの測定開始から
同定結果が得られるまで
1検体あたり数分

■異なる属のMSスペクトルの違い

NBRC_000_1666, NBRC_000_1723
Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624
%Int. 107 mV 77 mV



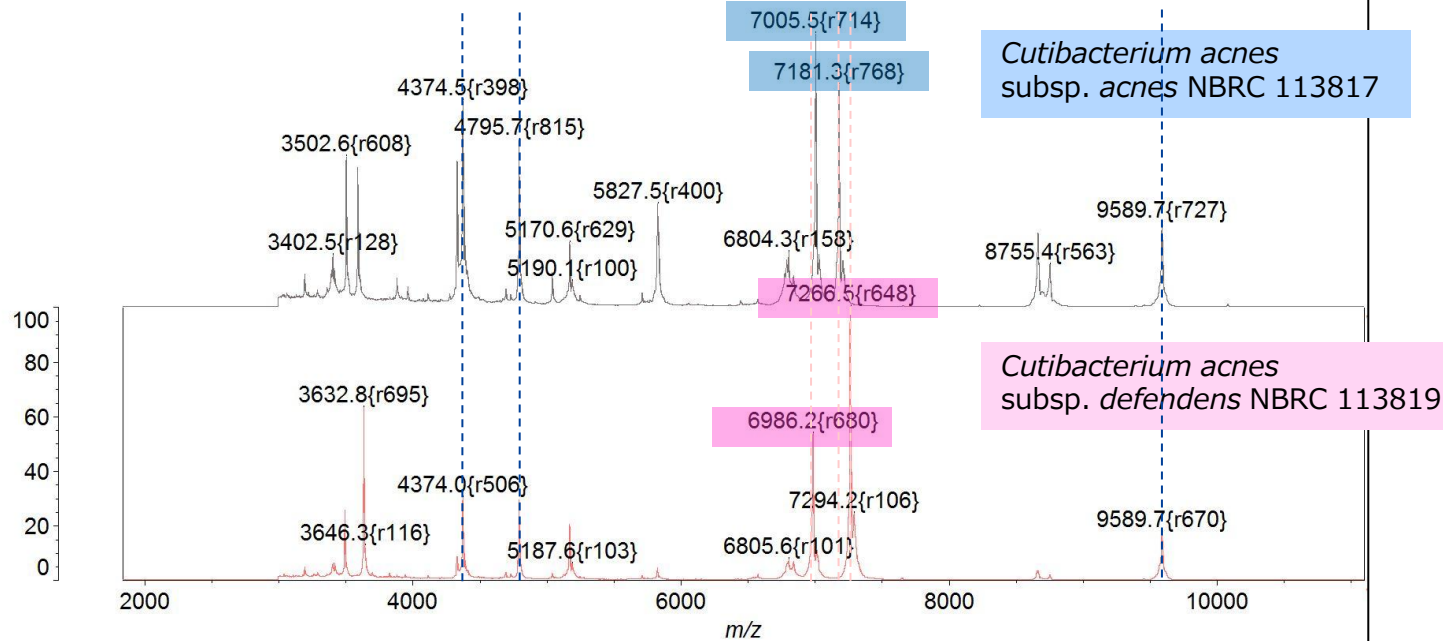
得られるMSスペクトルに大きな差がある

Staphylococcus aureus
(黄色ブドウ球菌) のスペクトル

Cutibacterium acnes
(アクネ菌) のスペクトル

■ 同じ種の別亜種株のMSスペクトルの違い

NBRC_000_1666
Shimadzu Biotech Axima Performance 2.9.3.20110624
%Int. 107 mV 44 mV



類似するピークもあるが、
株によって特異的なピークもある

Cutibacterium acnes
subsp. *acnes* NBRC 113817

Cutibacterium acnes
subsp. *defendens* NBRC 113819

■ 解析結果の解釈

Biotyper Compass Explorer (ブルカー)

- ・ 株ごとのライブラリー構築
- ・ 検出強度が高い方から70ピークを用いて強度、種類の双方のデータから相同性を計算

Range	Description	Symbol	Color
2.300 ~ 3.000	Highly probable species identification (ほぼ確実な種の同定)	(+++)	Green
2.000 ~ 2.299	Secure genus identification, probable species identification (属名の同定と、推定種名)	(++)	Green
1.700 ~ 1.999	Probable genus identification (推定属名)	(+)	Yellow
0.000 ~ 1.699	No reliable identification (信頼できる識別なし)	(-)	Red

SARAMISTM/VITEK®MS

(AXIMA微生物同定システム) (ビオメリュー & 島津)

- ・ 種もしくはグループごとのライブラリー構築
- ・ 複数株のコンセンサスMSスペクトルで構築、検出されたMSスペクトルに対してこのコンセンサスMSスペクトルと類似しているものがあるかどうかで相同性を計算

信頼度レベル	表示色	
99.9%以上	深緑	同種に間違いはない
99.9 ~ 90.0%	緑	同種である
90.0 ~ 80.0%	黄色	近縁種、同属レベル
80.0 ~ 75.0%	白	別種であるが、さほど遠くでもない種 (同属もしくは別属の)
赤色表示	赤	コンタミしている

【参考】両メーカーを比較した論文 Evaluation of the Bruker Biotyper and Vitek MS Matrix-Assisted Laser Desorption Ionization-Time of Flight Mass Spectrometry Systems for Identification of Nonfermenting Gram-Negative Bacilli Isolated from Cultures from Cystic Fibrosis Patients Marko, D. C. et. al. Journal Clinical Microbiology, Vol. 50, p2034-2039 (2012)

■解析結果（Biotyper Compass Explorer（ブルカー））での表示例）

Lactiplantibacillus plantarum NBRC 15891^TのMSデータに対して、Bruker市販ライブラリー（BDAL Ver.13）を用いて解析した

ライブラリー照合結果
上位の順から表示

ライブラリーに登録された
MSライブラリー名※1

相同性の値

NCBI
Taxonomy 情報

Rank (Quality)	Matched Pattern	Score Value	NCBI Identifier
1 (++)	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 1055 DSM	2.14	1590
2 (++)	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20246 DSM	2.11	1590
3 (++)	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 13273 DSM	2.11	1590
	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 2601 DSM	2.11	1590
	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 12028 DSM	2.07	1590
6 (++)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ssp <i>plantarum</i> DSM 20174 ^T DSM	2.01	1590
7 (+)	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 2648 DSM	1.96	1590
8 (+)	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10641 DSM	1.89	60520
9 (+)	<i>Lactobacillus plantarum</i> ssp <i>argentinae</i> DSM 16365 ^T DSM	1.86	1590
10 (+)	<i>Lactobacillus pentosus</i> DSM 20314 ^T DSM	1.75	1589
11 (+)	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> DSM 10667 ^T DSM	1.75	60520
12 (-)	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSM 20205 DSM	1.69	1590
13 (-)	<i>Lactobacillus pentosus</i> DSM 16366 DSM	1.61	1589
14 (-)	<i>Lactobacillus pentosus</i> DSM 20199 DSM	1.41	1589

*Lactiplantibacillus plantarum*の基準株

NBRC 15891株は、*Lactiplantibacillus plantarum*の複数株と高いスコア値（2.00～3.00）を示し、これらと同種であると判定された

NBRC 15891株は、その他の*L. plantarum*、*L. paraplantarum*、*L. pentosus*と、同属レベルのスコア値（1.70～1.99）が示された

また、これらの種に属する別株とは、低スコア（0.00～1.69）で、信頼できる識別なしという判定結果が得られた

※1 現在、*Lactobacillus*属は再分類され、新属*Lactiplantibacillus*属が提唱され、一部の種は*Lactiplantibacillus*属に移行されています。*Lactobacillus plantarum*も*Lactiplantibacillus plantarum*に再分類されています。

講演内容

はじめに

①MALDI-TOF MSの原理と微生物同定法の実際

②MALDI-TOF MS微生物同定法の産業界等での活用例

③NBRCによる支援のご紹介

■ 汚染菌の同定と汚染原因の追究

顧客からの報告や官能検査で異常が見られ、汚染菌混入が疑われる場合



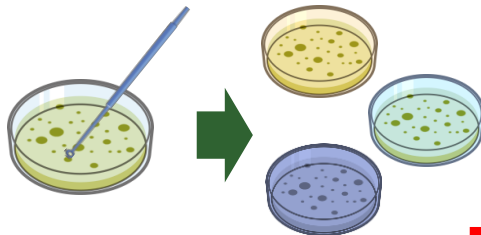
同定できた微生物の特性をもとに汚染源を特定、製造ライン衛生改善へ

■商品化に適した微生物のスクリーニング



釜石市の花：
はまゆり

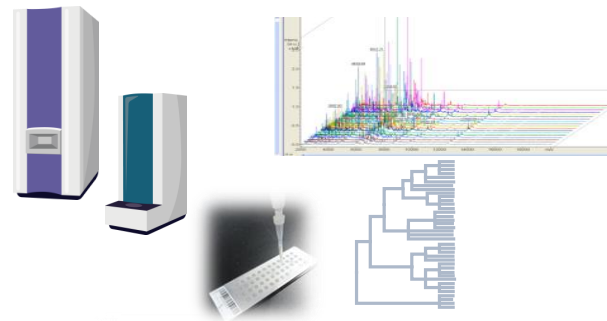
微生物の特性とそれを活用できる
食品の特性を考慮、分離



商品化に適した酵母の選定
製品化までの時間の短縮



MALDI-TOF MSインハウスライブラリー参照、
クラスタリングによる迅速な菌株の選定



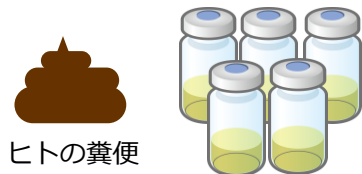
※他には、MALDI-TOF MS による清酒の蔵付き酵母及びワインの野生酵母の分離・選抜を行い
取得した株を使用した試験醸造の結果、ワインのオフフレーバー低下や、新たな清酒の商品化に
つながった山形工業技術センターの事例がある

(https://yrit.jp/wp-content/uploads/R6_03.pdf)

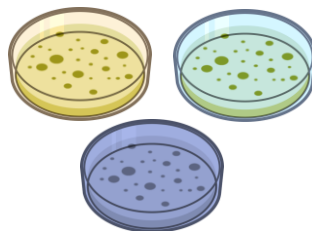
■有用菌単離における重複株の排除

難培養の腸内細菌の効率的な分離

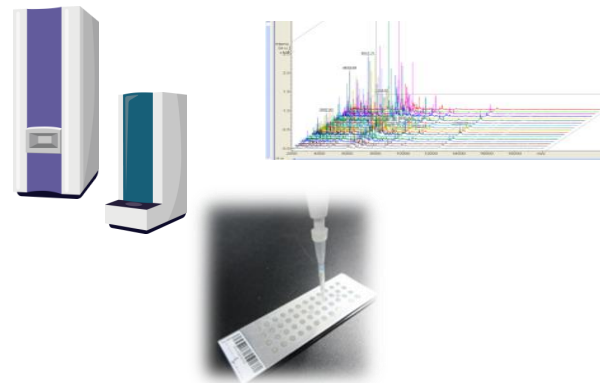
複数の培養条件による集積培養



希釈平板培養法による分離



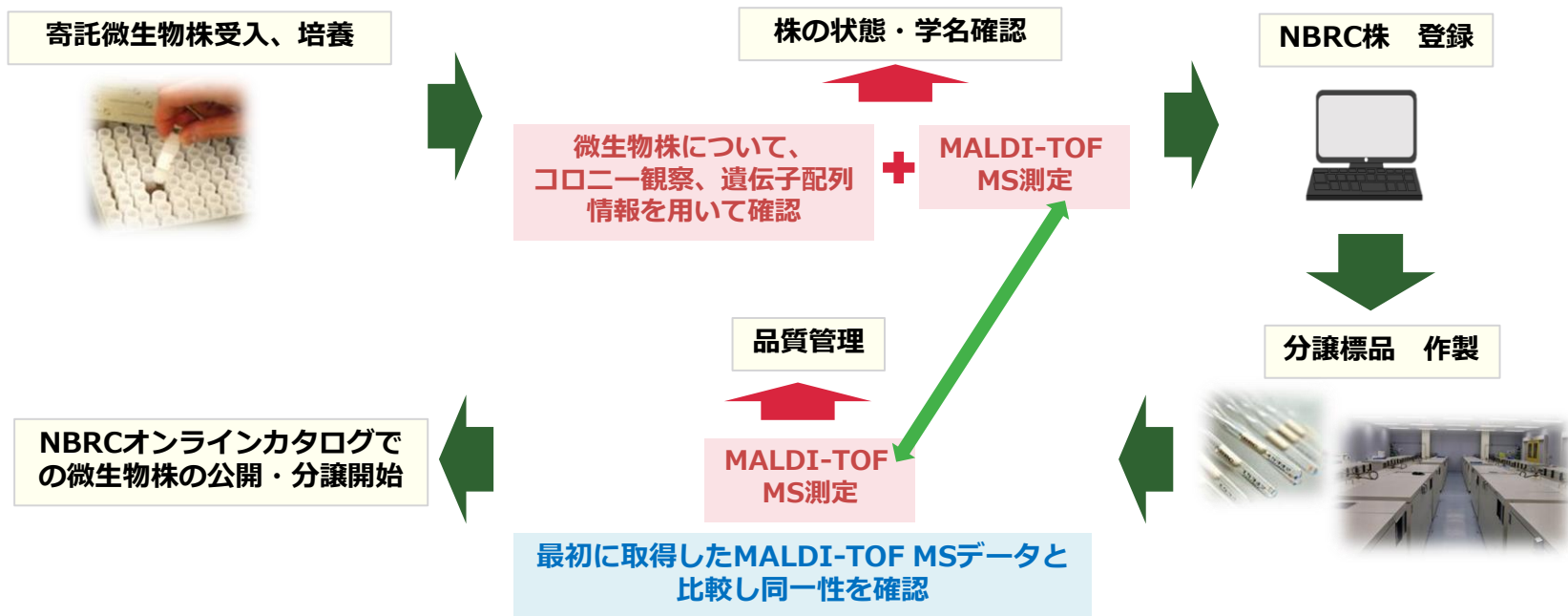
MALDI-TOF MSを用いた迅速な重複株の排除



難培養の有用菌単離、微生物アッセイの効率化

■NBRCのカルチャーコレクション事業における活用

寄託微生物株・標品の品質管理へのMALDI-TOF MSインハウスライブラリーの利用※



※MALDI-TOF MSを用いた品質管理はすべての寄託微生物・標品ではなく、酵母およびグラム陰性菌のそれぞれ一部の菌株に対して実施

講演内容

はじめに

- ①MALDI-TOF MSの原理と微生物同定法の実際
- ②MALDI-TOF MS微生物同定法の産業界での活用例
- ③NBRCによる支援のご紹介

■ MALDI-TOF MS微生物同定法の利活用支援

微生物の識別や迅速同定は、様々な産業分野で不可欠な基盤技術であるため、NBRCでは以下のとおり利活用の支援を行っています。無料ですので是非ご活用ください。

・微生物同定用ライブラリー（指紋判定法）の提供

NBRCが保有する高品質で分類学的位置が明らかな微生物株を用いて、食品等の汚染菌や産業に有用な菌群とそれらと区別しづらい日和見感染菌について、ライブラリーを作成し提供しています。

詳細：[MALDI-TOF MS微生物同定用ライブラリー（指紋判定法）の提供](#)

・バイオマーカー法によるセレウスグループの同定支援ツールの提供（cereco）

指紋判定法では識別が困難なセレウスグループについて、バイオマーカー法による同定を支援するツールを提供しています。

詳細：[セレウス菌グループに着目したデータベース cereco](#)

・MALDI-TOF MS実測データの提供

産業分野で広く用いられている細菌179属591種のMALDI-TOF MS実測データを提供しています。解析のリファレンスや保有微生物データとの比較、タンパク質の探索等にご活用ください。

詳細：[次世代MALDI-TOF MS微生物同定ソフトウェアの開発と実測データの公開について](#)

【お問い合わせ先】

バイオ技術評価・開発課 MALDI担当メールアドレス

nbrc-maldi@nite.go.jp

ご不明な点などございましたらお気軽にお問い合わせください

ご清聴ありがとうございました