



MALDI-TOF/MSで見える微生物の多様性

谷 明生

あなたは寒天培地上の微生物のコロニーを目で見て、何という菌なのか、すぐに判別できますか？

微生物は特徴的なコロニーの形状を示すため、ある程度の判別は可能で、さらに細胞の形態から属名までは何とか類推可能である。また、炭素源の資化性などによる、生化学的性質などから種レベルの分類がなされる。細菌の種レベルの場合、近年では16SrRNA遺伝子(16SrDNA)の配列解析による、分子生物学的な分類が重要視されている。さらには、リボゾームRNA遺伝子間の配列やDNA gyraseの塩基配列も、系統分類に用いられることがある。一般的には、16SrDNA配列解析が最も簡便で、ある程度信用のおける系統分類ツールとして認識されている。

16SrDNA配列解析では、通常、菌のゲノムDNAからPCRによって遺伝子を増幅、塩基配列を解析し、配列の相同性検索から最も近縁の微生物を探す。しかし、種を同定するために必要な相同性の値(%)には属によって幅があり、配列の相同性だけでは種の決定が不可能なことが多くある。

一方、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、以下MALDI)はタンパク質などの生体高分子をマトリックスと共にイオン化し質量を測る機器であり、主にプロテオーム解析などに威力を発揮している。この機器を用いて、微生物を分類することが最近可能になってきた。その方法とは、MALDIターゲットプレートに、微生物コロニーを爪楊枝などで直接塗布し、マトリックス溶液を重ねて機械にセットするだけ、というきわめて簡単なものである。それをサンプルとし分析すると、菌体のさまざまなタンパク質質量(2-20 kDa程度)に由来するマスペクトルが得られる。

得られるスペクトルの由来は、菌体内に大量にあるタンパク質、すなわちリボゾームタンパク質である¹⁾。リボゾームタンパク質は構成的発現をしているため、得られるスペクトルは、コロニーを形成させる培地の組成や温度にはあまり影響を受けない。種によって特徴的なマスペクトルが得られるため、パターンマッチングおよび主成分解析などによって微生物の種の同定や分類が可

能である²⁾。また、数秒で1サンプルのデータを得ることができ、オートメーション化すれば、384サンプルを1.5時間程度で解析可能である。さらに、細菌だけでなく、酵母、カビにも応用可能であり、方法が簡便で特別な実験技術の習熟も必要としない。

この方法は、16SrDNAの配列だけに依存する方法に比べ、複数の遺伝子に由来するタンパク質の情報に基づくので、より多面的に微生物の特徴を示していると言える。この方法による、さまざまな既知微生物のMSライブラリが(筆者の知るところでは)ブルカードルトニクス社、ジャスコインターナショナル社により作られており、未同定微生物のマスペクトルをライブラリと照合することによって、数分で微生物を同定できる。ただし現在、それらのライブラリは病原性細菌が主体で環境細菌のライブラリが少ないため、どんな菌でも一発で同定するまでには到っておらず、ライブラリの充実が待たれる。

Burkholderia 属細菌で解析された例において、16SrDNA配列とマスペクトルに基づく系統的位置がそれぞれ異なることが報告されている³⁾。つまり、16SrDNAによる方法では、微生物の多様性を過小評価、または本来の進化的系統を見誤っている可能性も考えられる。進化系統を評価する一つの指標としての16SrDNA解析は、同属菌の分類の場合、相同性が高すぎ(バリエーションが少なすぎ)、種を分類するためには幾分情報が少ないことが原因と考えられる。今後、現在の分類指標との違いを埋める研究が待たれる。

このMALDIによる方法は、複数の指標をパターン化して利用することから、簡便で、かつハイスループットであるにもかかわらず情報量が多い。今後、質量分析器の普及とライブラリの充実が進めば、この微生物同定法が、16SrDNA解析と共に用いられ、または取って代わるかもしれない。そして、さらなる微生物の多様性がMALDI-TOF/MSの目によって明らかになってくると思われる。

1) Sun, L. et al.: *Rapid Commun. Mass Spec.*, **20**, 3789 (2006).

2) Bright, J. et al.: *J. Microbiol. Meth.*, **48**, 127 (2002).

3) Mellmann, A. et al.: *J. Clin. Microbiol.*, **46**, 1946 (2008).