

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 10 月 2 日現在

機関番号：87402

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850100

研究課題名(和文)食品汚染による食中毒を引き起こす有害微生物の迅速な同定法の開発

研究課題名(英文)Development of a method for rapidly detecting and identifying noxious microorganisms

研究代表者

佐藤 崇雄(SATOH, TAKAO)

熊本県産業技術センター(ものづくり室、材料・地域資源室、食品加工室)・その他部局等・研究主任

研究者番号：80467977

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文): 醸造や発酵等に利用する有用微生物及び食中毒などを引き起こす有害微生物の同定を、高速液体クロマトグラフ質量分析法(LC qTOF-MS)やキャピラリー電気泳動質量分析法(CE qTOF-MS)を利用して、迅速かつ正確に実施する方法の確立を行った。加えて、代謝物の精密質量分析を行い分析のデータベース化を行うことにより、菌の単離やPCRでの増幅作業など複雑な手順を省略し、同定が可能なシステムの構築に成功した。

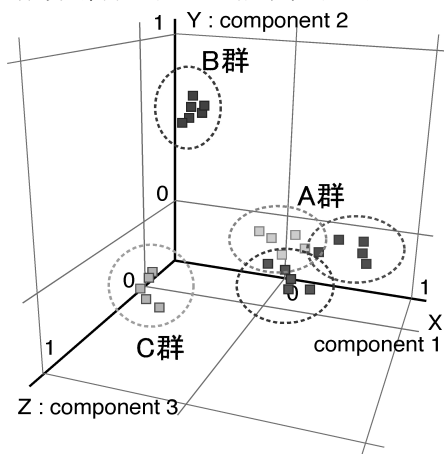
研究成果の概要(英文): We established a method for rapidly detecting and identifying noxious microorganisms using high performance liquid chromatograph mass spectrography and capillary electrophoresis mass spectrography. We estimated the measured accurate mass of the microbial metabolite using LC/MS or CE/MS system. As a result, we succeeded in identifying noxious microorganisms without isolating microorganisms and PCR.

研究分野：食品科学

キーワード：食品安全性 質量分析

1. 研究開始当初の背景

微生物の同定は、医薬分野や食品産業において、抗生物質の生産や発酵食品の製造などに利用する有用微生物のみならず中毒などを引き起こす有害微生物の迅速な同定技術の確立は急務である。現在主流である 16S リボソームリボ核酸遺伝子塩基配列解析法では、非常に専門性の高い技術が必要であり現場レベルでの対応は困難である上、PCR 等での遺伝子の増幅時間などを加味すると同定には 48 時間以上必要であり、食中毒等への初期対応の限界とされる 24 時間を大きく上回る。このような背景の基、質量分析法を利用した微生物の同定に関する研究例が報告されている。例えば、MALDI-TOF MS を利用したバクテリアの迅速分類に関する研究などがあげられる (K. Teramoto et al., *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, 2008 等)。これらは、菌体破砕物を直接 MALDI-TOF MS 分析し、得られたマスペクトルとライブラリに登録されたマスペクトルとを照合し、菌種の同定を行うものであり、その迅速な同定法は非常に画期的なものである。しかしながら、微生物菌体の構成成分のマスペクトルは培養する培地の成分などに依存し再現性に乏しい。従って、あらかじめ培養条件などを統一しておく必要があり、未知の微生物に迅速に対応することは困難であると考えられる。申請者は、酒類及び発酵食品の製造に使う *Aspergillus oryzae*、*Aspergillus kawachii* 及び *Aspergillus sojae*、食酢の醸造に利用する *Acetobacter aceti*、ナタデココを生産する微生物として知られる *Acetobacter xylinum* の 5 種類の微生物をそれぞれ 5 種類の異なる条件 (培地組成、培養温度) により培養し、その菌体から構成成分を抽出した後に高速液体クロマトグラフ質量分析 (LC-MS) を利用し、検出された各成分の精密質量の測定を行った。MALDI-TOF MS とは異なり、各成分を分離した後に質量分析するためマトリックスの影響を受けにくく各ピークにおいて良好なマスペクトルが検出可能であった。この精密質量の測定結果を多変量解析法を用いた主成分解析を行った結果、下の図に示すよ

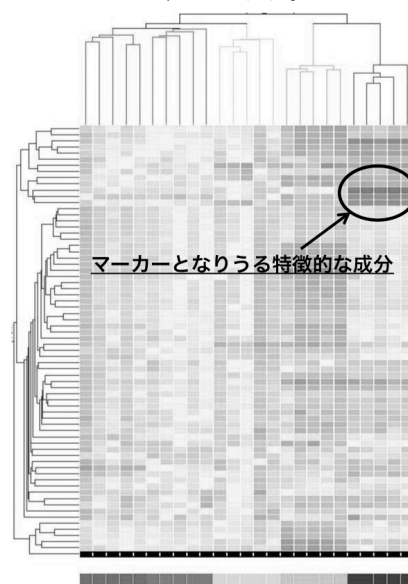


精密質量分析による微生物代謝物の主成分解析例 (代謝物の組成により3つのカテゴリに分類可能)

うに培養条件が異なるにも関わらず各微生物の特徴を反映したクラスター分類に成功 (A 群: *A. oryzae*, *A. kawachii*, *A. sojae* B 群: *Acetobacter aceti* C 群: *Acetobacter xylinum*) した。しかしながら、A 群ではそれぞれのクラスターが近接しており、最終的な同定が困難な条件を示す結果も得られていることから、分離条件の検討、バイオマーカーの決定など解決すべき問題点も明らかになった。

2. 研究の目的

醸造や発酵等に利用する有用微生物及び食中毒などを引き起こす有害微生物の同定を、高速液体クロマトグラフ質量分析法 (LC-qTOF-MS) やキャピラリー電気泳動質量分析法 (CE-qTOF-MS) を利用して、迅速かつ正確に実施する方法の確立を目的とする。これまでの研究において、培養方法の異なる菌体について網羅的に分析し、精密質量より割り出された化合物組成について多変量解析ソフトを利用しバイオマーカーの探索を実施してきた。下図に抗生物質を投与しストレス存在下で酢酸菌を培養した際の 2 次代謝物を CE-MS で網羅的に分析し、その結果を多変量解析によりクラスター分類した例を示す。約 200 種類の化合物 (60-1,700 m/z) が検出され、そのうち 80 % 前後の化合物の組成式が精密質量より推定可能であった。分離や検出のパラメーターを最適化し同様の解析を行った結果、マーカーとなり得る化合物の同定することが可能である。本実験では、この方法を応用し、LC-MS と CE-MS の測定から得られる情報を一元的に管理しバイオマーカーの探索を実施する。加えて、代謝物の精密質量分析を行い分析のデータベース化を行うことにより、菌の単離や PCR での増幅作業など複雑な手順を省略し、同定が可能なシステムの構築を目指す。



ストレスの有無による酢酸菌の代謝物の変化
抗生物質によるストレスを強くかけたものに特定の化合物が多く生成されることが分かった。

3. 研究の方法

(1) 分離及び質量分析条件の確立

LC-MS の特徴である分離と質量分析が同時に行えるメリットを最大限に用いるため、微生物構成成分をより分離できる条件を調査し決定した。加えて、対象物質が極性の高いイオン性化合物である可能性があるため、分析時に移動相に添加するギ酸などの濃度によりイオン化にバラツキが見られる可能性が高い。従って移動相の組成についても最適化を実施した。

(2) 低分子量バイオマーカーの探索

先に述べたように構成成分の比較だけでは、一部を除き完全に微生物種を決定することは困難である。従って、マーカーの探索が必要不可欠になるが、精密質量が正確に測定可能な 60~3,200 m/z の領域を重点的に測定し、培養条件が異なっても変化しない成分、存在比などを調査した。

(3) 高分子量バイオマーカーの探索

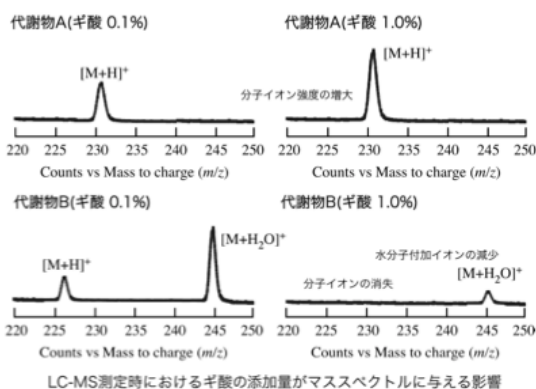
低分子量のバイオマーカー探索と平行して、おおむね 20,000 m/z 以下の化合物にターゲットを絞り探索した。F. J. Pineda (*Anal. Chem.*, 2003) らによってリボソームタンパク質を MALDI-TOF MS を利用して検出しバクテリアの同定を行った報告がなされているが、全抽出物がイオン化され検出されるため、同定作業は複雑なものになる。本研究においては、各成分を分離した後に質量分析を行うため目的のタンパク質のみの質量の測定が可能であり、その解析も容易である。さらに、MS/MS 測定により、そのタンパク質のアミノ酸配列を推定しマーカーを確定する

(4) 微生物（代謝物含む）構成成分ライブラリの構築

市販の微生物種及び申請者らがこれまでに同定した微生物種を（1）で確立した手法により分析を行い、その結果を（2）及び（3）に適用し、ライブラリの構築を実施した。

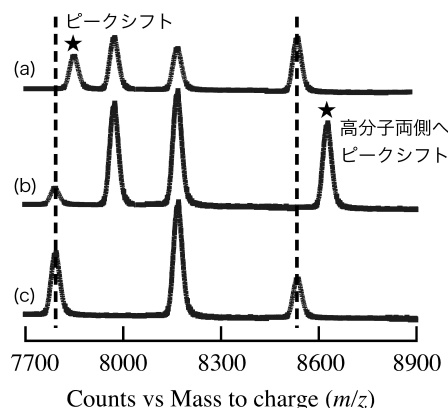
4. 研究成果

事前に培養した菌種の異なる菌体について溶媒抽出を行い、迅速性を確保するため前処理を実施せず測定サンプルとした。再現性



などを考慮し、分離部分には液体クロマトグラフィー (Agilent 1290 Infinity LC) を用いた。質量分析計は、精密質量を測定する必要があり、さらにバイオマーカーの探索時に MS/MS スペクトルの測定が必須になることから qTOF 型 (Agilent 6520 Accurate Mass Q-TOF LC/MS) を利用した。

本研究で目的とする代謝物の LCMS 測定には移動層にギ酸添加が必要となるが、その添加量の最適化を行った結果、0.1%及び 1.0% の添加量でスクリーニングを実施するのが最適である事が確認された。加えて菌体のリボソームタンパク質をマーカーとして微生物種の同定可能性の有無について検討した。具体的には、サンプルの菌体から抽出したリボソームタンパク質を抽出し、LC-MS によりそのシーケンスを解析する。この結果をゲノム解析され帰属されている既知の微生物出比較することにより同定可能性の有無を判断した。加えて、16S リボソームリボ核酸遺伝子塩基配列解析も併せて行い、結果の確からしさについても確認した。



上記で特定したバイオマーカーの妥当性を確認するため、申請者らが保有しており、しかも菌株名と塩基配列が判明している微生物株 *Acetobacter aceti*, *Acetobacter xylinum* など約 25 種類を利用し、培養条件や抽出溶媒などを変化させ、先に特定したバイオマーカーを利用したスクリーニングを行い判別精度の確認を実施した結果、98%以上の同定精度を確認できた。

以上の事より、代謝物の精密質量分析を行い分析のデータベース化を行うことにより、菌の単離や PCR での増幅作業など複雑な手順を省略し、菌種の同定が可能である事が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計 3 件)

- 1 日本分析化学会 第 62 年会
2013年9月

キャピラリー電気泳動質量分析計を利用した微生物及び植物代謝物の評価
佐藤崇雄、清水茂樹

2 日本分析化学会 第63年会

2014年9月

赤外分光分析を利用した脂肪酸の構造解析法の構築

佐藤崇雄、藤野加奈子、大王龍一

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤崇雄 (SATOHI Takao)

熊本県産業技術センター・食品加工室・

研究主任

研究者番号：80467977