

知の拠点 重点研究プロジェクト

「食の安心・安全技術開発プロジェクトP2公開セミナー2013」

平成25年5月13日(月)13:00 - 16:30

- 食品に混入した微生物検査装置の開発 -

MALDI-TOFMS: 短時間で微生物の株レベルまで
分類同定できる

リボソームに含まれる遺伝情報に基づく
微生物の迅速・簡便同定

-S10-GERMS法による微生物同定-

(株)島津製作所 主任 島圭介
名城大学 教授 田村廣人

所属グループ: 3

「食品等の微生物を検出できる高度な計測デバイスの開発」

グループリーダー: 田村廣人

所属サブテーマ: 3

「全自動迅速微生物同定手法の開発」

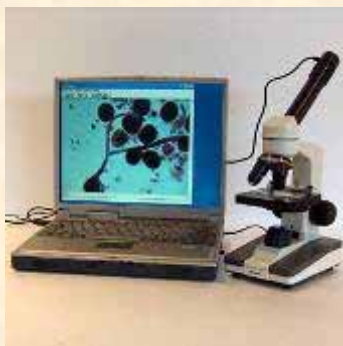
サブテーマリーダー: 森山龍一



現在の主な微生物同定法

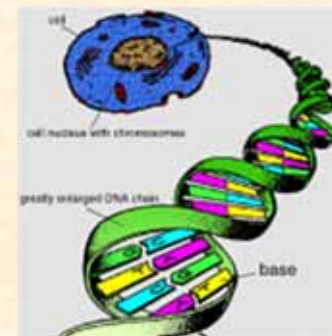
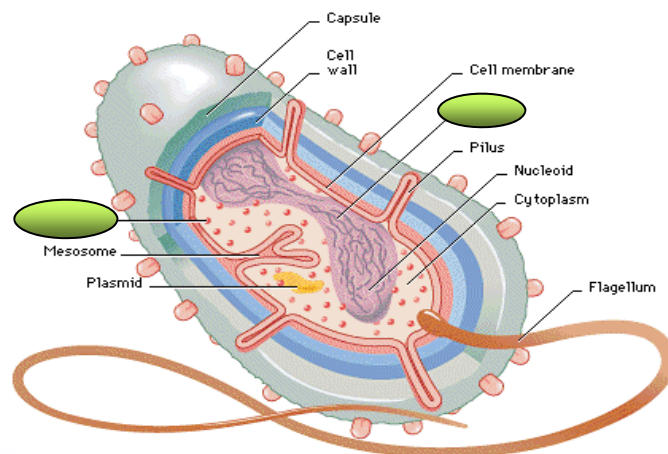
知覚による手法

コロニーの特徴
(形態, 臭気, 色...) など



分子生物学的手法

PCR, ヌクレオチド配列,
MLST, RFLP, RAPD, リアルタイム PCR



免疫学的手法

モノ(ポリ)クローナル
抗体



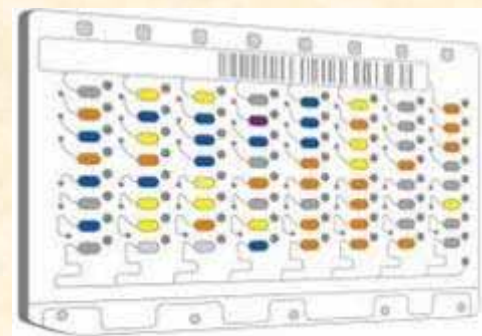
質量分析による手法



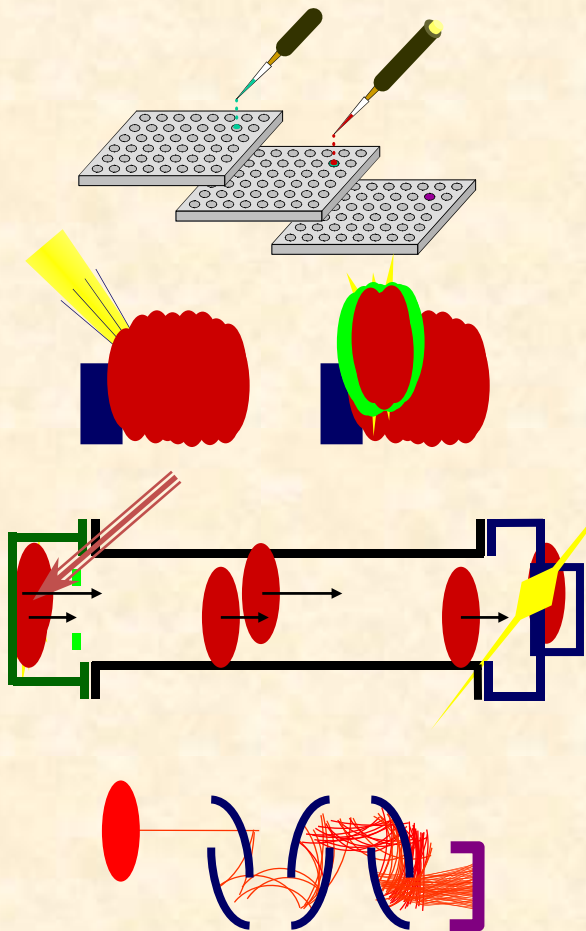
新規な手法

生化学的手法

代謝能、薬剤耐性



質量分析計の基本的な機器構成



試料導入・分離

イオン化

質量分離

検出

データ処理

直接導入
GCインタフェース
LCインタフェース

電子衝撃 (EI)
高速原子衝撃 (FAB)
レーザー光 (MALDI)
エレクトロスプレー (ESI)

磁場型
四重極型
イオントラップ型
飛行時間型 (TOF)
サイクロトロン型

電子増倍管
マイクロチャネルプレート

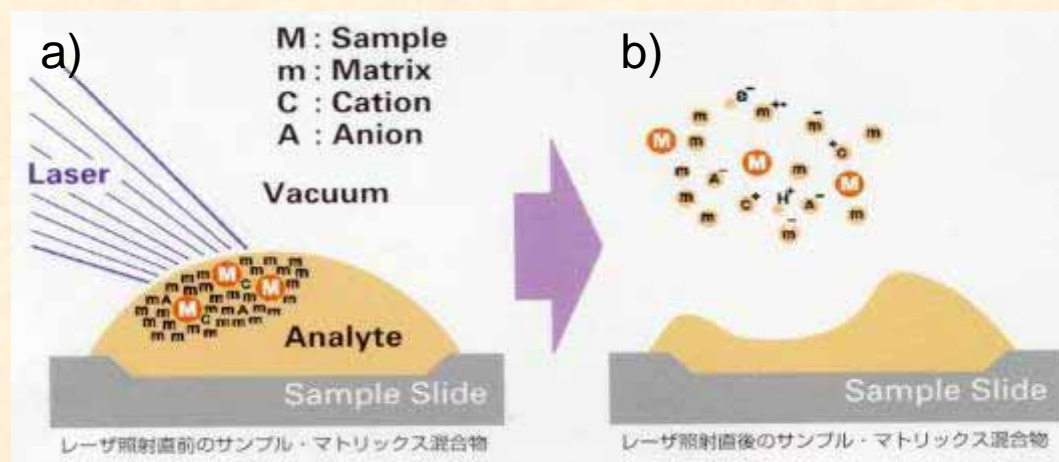
組み合わせによる装置構成が多様

マトリックス支援レーザー脱離イオン化

MALDI (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization)

MALDIとは・・・

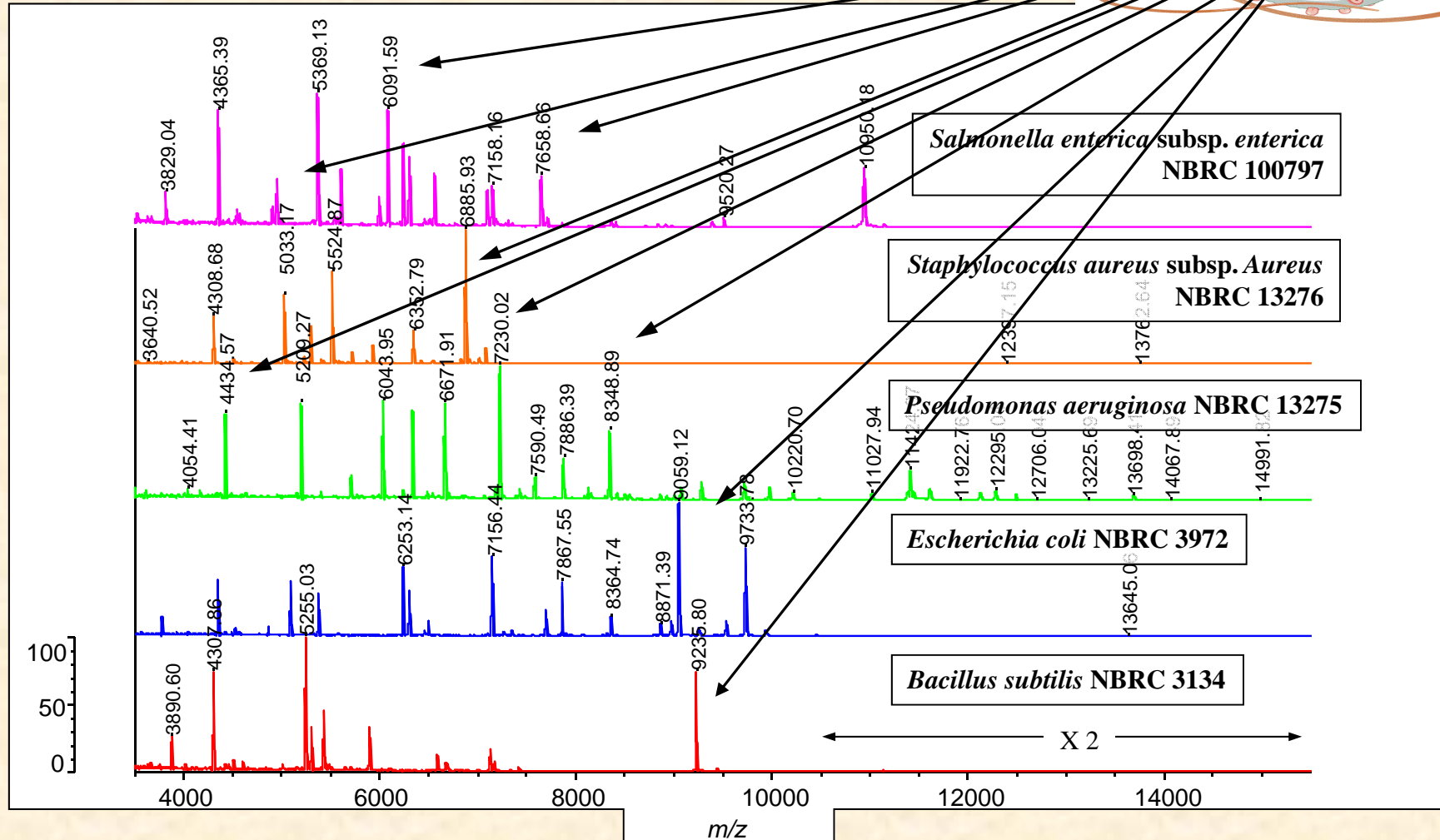
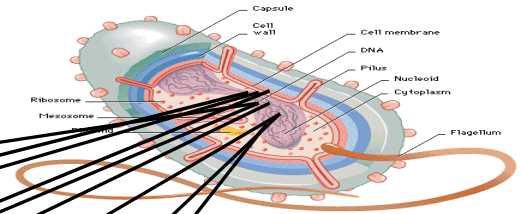
- a) “マトリックス”という試薬と試料を混合し、これにレーザーを照射することによって試料をイオン化する手法
- b)レーザー光がマトリックスに吸収され、試料は間接的に脱離・イオン化



- < 特長 >
- サンプル調製・操作・データ取得が**簡便で迅速**。
 - 分離培養した菌体試料をまるごと測定することが可能

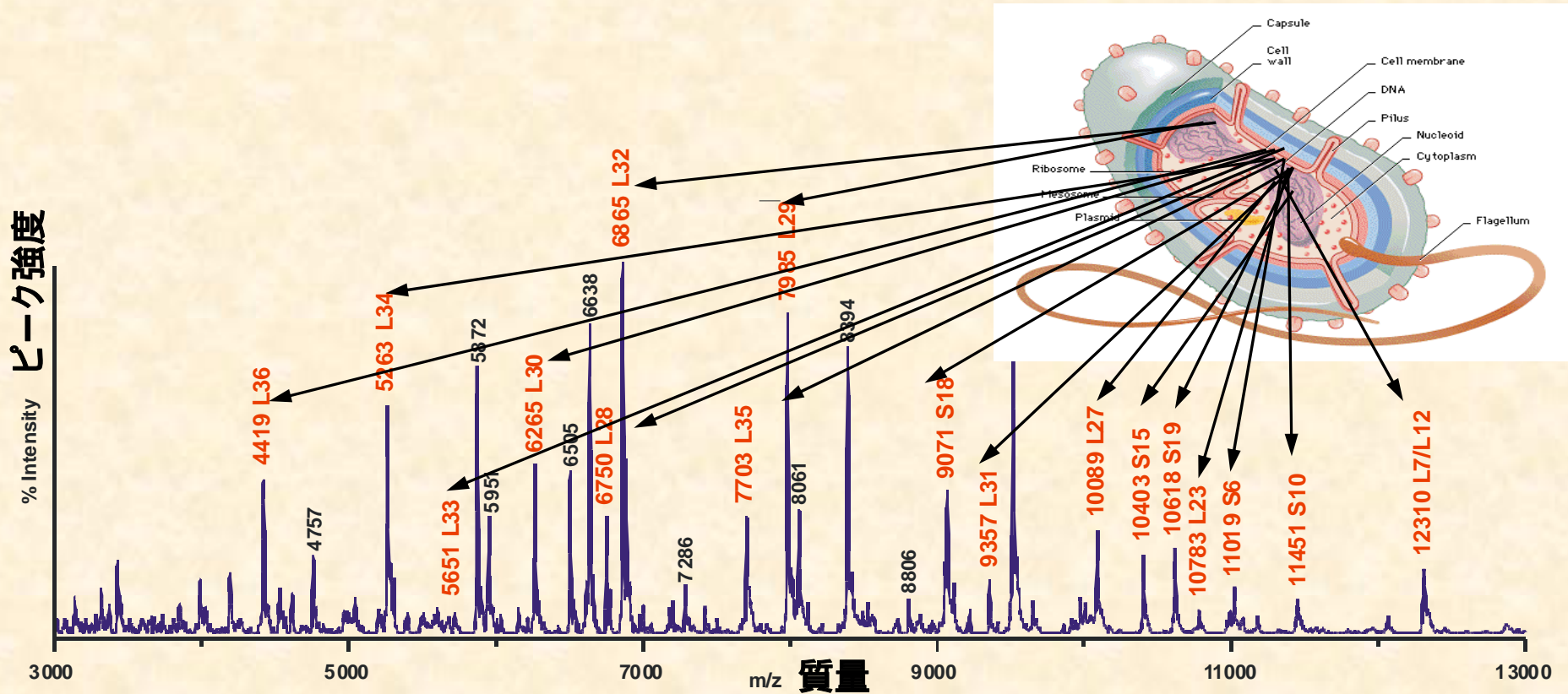
参) MALDIは、日本の島津製作所で田中耕一らにより1985年に開発された技術を発端としている田中は、「生体高分子の同定および構造解析のための手法の開発(生体高分子の質量分析法のための穏和な脱離イオン化法の開発)」により2002年ノーベル化学賞受賞

微生物をまるごとMALDIで測定した際に得られるマ ススペクトル:各菌株間でマススペクトルが異なる



細菌の同定・分類が可能

微生物をまるごとMALDIで測定した際に得られるマスペクトル: ピークの由来



- 分子量4000以上の範囲で検出されるピークの~50%はリボソームタンパク質由来(赤印)。
- リボソームとは? :細胞内でタンパク質を合成する機能を持つタンパク質複合体。

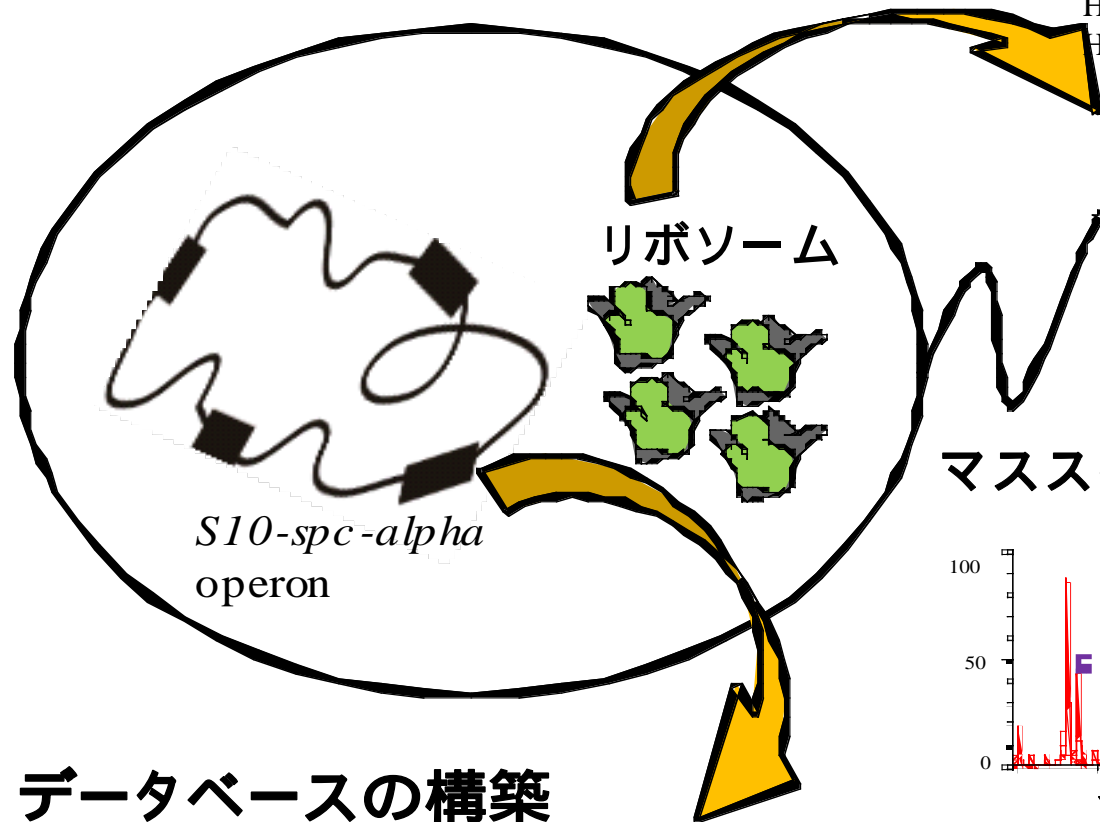
S10-GERMS法による迅速・簡便な微生物同定

(*S10-spc-alpha* operon Gene Encoded Ribosomal protein Mass Spectrum)

Hotta et al. J. Proteome Res. 2010, 9, 6722–6728.

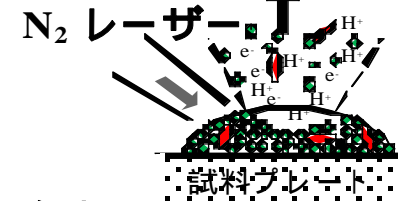
Hotta et al. J. Agric. Food Chem. 2011, 59:5222–5230.

Hotta et al. FEMS Microbiol. Lett. 2012, 330, 23-29

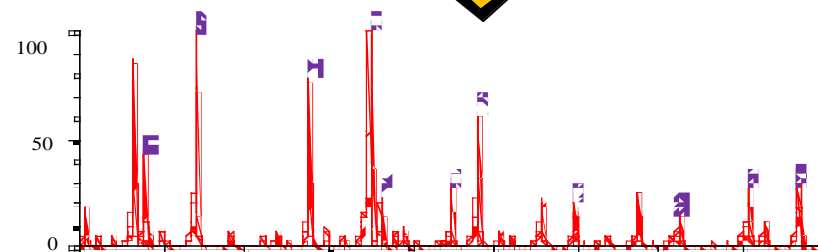


MALDI-TOF MS 測定

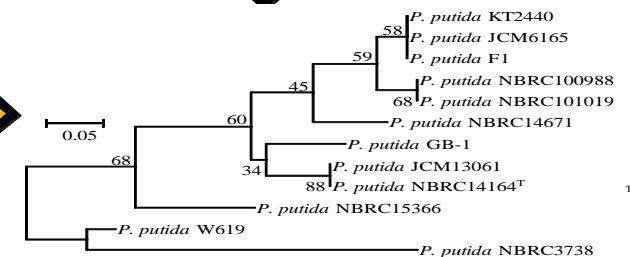
質量分析



マススペクトル



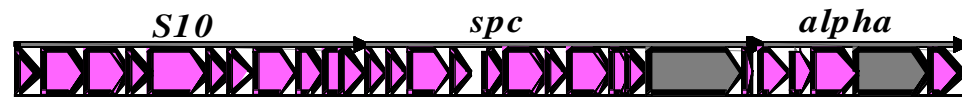
系統解析



データベースの構築

S10-spc-alpha オペロン

◀ : リボソームタンパク質



- 約半数のリボソームタンパク質をコードしている。
- 全ての細菌ゲノムに保存されている。