

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 細菌中の脂質類の直接分析

石 田 康 行, 大 谷 肇

1 はじめに

細菌中に含まれる脂質類は、細菌細胞膜の基本構成成分や、細胞外からのシグナルを伝達するメディエーターなどの多彩な役割を担っている。従って、細菌脂質とその代謝産物を詳細に解析することは、細胞膜の構造や生体内における脂質の多様な機能を解明するうえで重要である。さらに、分析の結果得られる脂質構成成分の種類や分布などの情報は、細菌種の識別や同定を容易に行うための手掛かりとしても有用である。これまで一般に、細菌脂質の分析には、諸クロマトグラフィーの手法が主として用いられてきた。しかし、これらの分析法の多くは、脂質成分の溶媒抽出や誘導体化など、少なくとも半日を要する煩雑な試料前処理が必要である。従って、微生物学や医学などの分野では、できるだけ試料前処理を必要としない、細菌脂質類の実用的な分析法の開発が望まれている。

一方、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 (MALDI-MS) が、細菌細胞中のタンパク質や脂質などの構成成分を詳細に解析できる手法として注目されている。さらに、この方法では質量スペクトル上に観測されるそれらの成分のピークパターンから、しばしば細菌類の種類を迅速かつ簡便に識別・同定することができることも報告されている^{1)~3)}。例えばこれまでに MALDI-MS により、細菌の細胞膜の主な構成リン脂質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⁴⁾。しかし、これらの応用例ではいずれも、細菌試料から溶媒抽出して得られた脂質成分や、細菌の懸濁液などが試料として用いられていたため、MS 測定に先立つ前処理操作が不可欠であった。

これに対して、筆者らは最近、MALDI-MS の手法にオン・プローブ試料調製法と呼ばれる極めて簡便な試料調製法を採り入れることにより、溶媒抽出や懸濁液の調製などを行わず

に、 μg オーダーの極微量の細菌試料を用いて、細菌脂質を高感度に直接分析することに成功した⁵⁾。さらに本法を応用して、細菌類の識別を迅速かつ簡便に行う方法の開発についても検討も進めてきた。本稿では、その概要を紹介する。

2 細菌脂質の直接分析のための試料調製法

マトリックス試薬の種類や濃度、さらにはその溶媒種などの MALDI-MS 測定の諸条件を系統的に検討した結果、細菌脂質の直接分析には図 1 に示すような試料調製法が適切であることを見いだした。まず初めに、培地から金属ループを用いて大腸菌などの細菌試料を数百 μg 程度の極微量採取し、それを MALDI-MS の試料プレート上に直接塗布する。次に、マトリックス試薬である 2,5-ジヒドロキシ安息香酸 (DHB) とイオン化助剤として作用するヨウ化ナトリウム (NaI) のクロロホルム/メタノール混合溶液 [DHB 500 mM, NaI 100 mM] を細菌試料上に 1 μl 滴下し、溶媒を乾燥除去してから N_2 レーザー ($\lambda = 337 \text{ nm}$) を備えた飛行時間型質量分析計を用いて MS 測定を行った。なお後述するように、細胞壁中に強固なペプチドグリカン層を有するグラム陽性菌を測定する際には、その細胞壁の分解を促進して脂質のイオン化効率を高めるために、試薬溶液にトリフルオロ酢酸を 3% 添加して試料調製を行った。

3 MALDI-MS によるグラム陰性菌の直接分析⁵⁾

まず、上述した方法により、細胞壁が比較的薄い大腸菌などのグラム陰性菌の測定を試みた。図 2 に、(a) 大腸菌試料を直接 MALDI-MS 測定して得られた質量スペクトルを、(b) 大腸菌からの溶媒抽出物を標準的な方法により MALDI-MS 測定した結果と比較して示す。いずれのスペクトル上にも、細菌細胞膜の構成リン脂質に由来すると推定される一連のピーク群が、質量電荷比が 700 から 800 の間にほぼ同じ強度分布で明

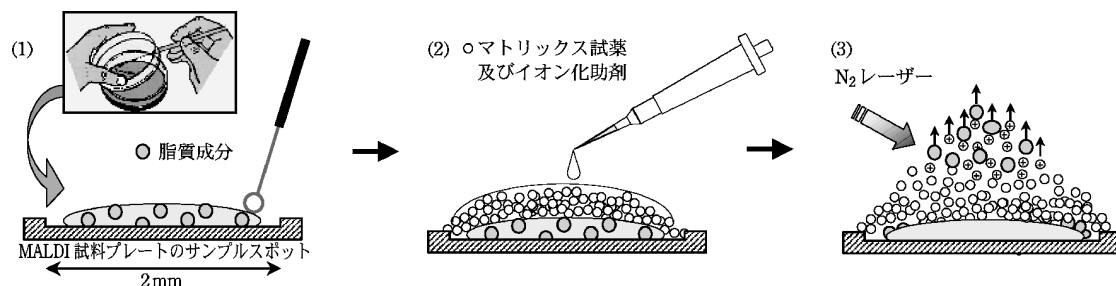
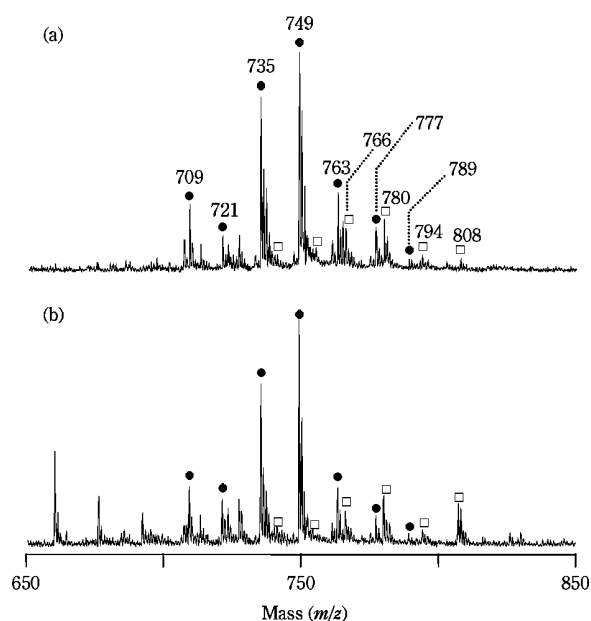


図 1 細菌脂質の MALDI-MS 直接分析のためのオン・プローブ試料調製法



(a) オン・ブロープ試料調製法により、大腸菌試料を直接測定して得られたスペクトル、(b)標準的な方法により、大腸菌試料の溶媒抽出物を測定して得られたスペクトル。●はPE類を、また□はPG類を示している。

図2 大腸菌試料のMALDI質量スペクトル

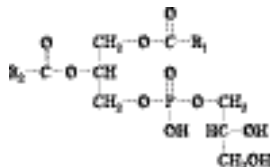
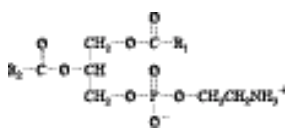
表1 大腸菌試料のMALDI質量スペクトル上に観測される主ピークの同定

<i>m/z</i>	同定された脂質成分 ^a	推定される脂肪酸成分の組み合わせ ^b
709	PE (30:0) + 2Na ⁺ - H ⁺	14:0, 16:0
721	PE (31:1) + 2Na ⁺ - H ⁺	14:0, cy17:0
735	PE (32:1) + 2Na ⁺ - H ⁺	16:0, 16:1 ; 14:0, 18:1
749	PE (33:1) + 2Na ⁺ - H ⁺	16:0, cy17:0 ; 14:0, cy19:0
763	PE (34:1) + 2Na ⁺ - H ⁺	16:0, 18:1
777	PE (35:1) + 2Na ⁺ - H ⁺	16:0, cy19:0
789	PE (36:2) + 2Na ⁺ - H ⁺	cy17:0, cy19:0 ; 18:1, 18:1
780	PG (33:1) + 2Na ⁺ - H ⁺	16:0, cy17:0 ; 14:0, cy19:0
794	PG (34:1) + 2Na ⁺ - H ⁺	16:0, 18:1 ; 17:0, cy17:0
808	PG (35:1) + 2Na ⁺ - H ⁺	16:0, cy19:0 ; 18:0, cy17:0

^a PE および PG はそれぞれ phosphatidylethanolamine と phosphatidylglycerol の略。また、括弧内の数字は、アシル基中に含まれる総炭素数と総二重結合数を示している。

PE : phosphatidylethanolamine

PG : phosphatidylglycerol



^b 例えば 16:1 は、炭素数が 16、二重結合数が 1 の脂肪酸メチルであることを示している。また、cy は当該成分中にシクロプロパン環が存在していることを表している。

瞭に観測されている。この測定結果と、微生物中の脂質脂肪酸組成の分析に威力を発揮する反応熱分解 GC^(6,7)により同一の細菌試料を測定して得られる相補的な情報とを総合して、これらのピーク群の脂質種および構成脂肪酸の同定を試みた結果を表1にまとめて示す。この表に示すように当該ピーク群は、主な構成脂肪酸残基として炭素数 16, 17 や 19 の飽和脂肪酸を

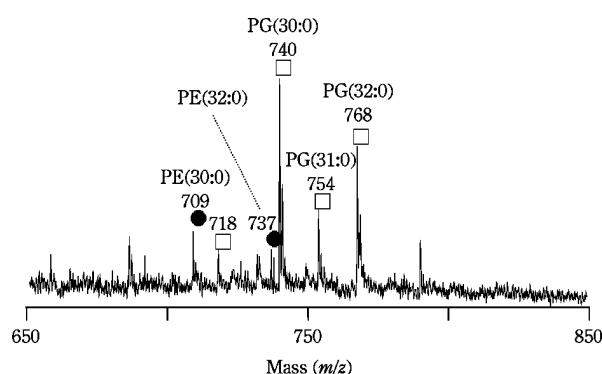


図3 直接MALDI-MS測定によって得られた枯草菌試料の質量スペクトル

含む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) 類のナトリウム付加体であると推定した。また、大腸菌の懸濁液試料を用いて MALDI-MS 測定における細菌脂質の検出下限を確認したところ、約 500 ng の極微量の細菌試料まで脂質成分を観測することができ、本法により溶媒抽出を介さずに細菌中の脂質を高感度に直接検出することが可能になった。

さらに、大腸菌以外に、豚コレラ菌 (*Salmonella choleraesuis*) やボイド赤痢菌 (*Shigella boydii*) などの病原体を含む、種々のグラム陰性菌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種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微妙に異なっていた。このようにグラム陰性菌を直接 MALDI-MS 測定し、質量スペクトル上に観測されるリン脂質類の分布の違いを手掛かりにして、それらの細菌種を識別することができる⁵⁾。

4 MALDI-MS によるグラム陽性菌の直接分析⁸⁾

これまで述べてきたように、MALDI-MS により大腸菌などのグラム陰性菌を直接測定し、細菌類を構成する脂質を高感度に検出することが可能になった。しかし、より強固なネットワーク構造を有する細胞壁によって脂質膜が覆われているグラム陽性菌については、前述の方法では脂質成分をほとんど観測することができなかった。そこで、当該細菌の細胞壁の分解を促進して脂質のイオン化効率を高めるために、試薬溶液にトリフルオロ酢酸 (TFA) を 3% 添加して試料調製を行う方策を講じた。この方法により、代表的なグラム陽性菌である枯草菌を直接 MALDI-MS 測定して得られた典型的な質量スペクトルを図3に示す。この図に示すように、TFA を添加することにより、グラム陽性菌である枯草菌のスペクトル上にも、細胞膜の主な構成リン脂質である PE 類や PG 類などのピーク群をはっきり観測することができた。さらに、このスペクトルと図2(a)の大腸菌の測定結果を比較すると、枯草菌では PG 類が主成分であるのに対して、大腸菌では主にPE類が観測されていることなど、構成脂質の種類や分布の違いを反映して、両者のスペクトルパターンは明瞭に異なっている。この結果から、グラム陽性と陰性菌が混在しているような試料系に対しても、本法が各種細菌種の迅速同定法として威力を発揮することが示唆

された。

5 まとめと展望

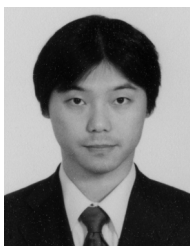
近年、脂質分子群（「リビドーム」と総称される）を解析対象として、様々な生体機能の解明を目指すアプローチは「リビドミクス」と呼ばれ、タンパク質やDNAを対象とする「プロテオミクス」や「リボスクレオミクス」などと同様、ポストゲノム時代の新しいバイオ分析の潮流の一つとして注目されている。中でも、細菌脂質類やその代謝産物の解析を迅速かつ簡便に行うことができる直接分析法は、当該分野の今後の発展に大きなブレークスルーをもたらすものとして大きな期待を集めている。例えば、細菌に種々の外的因子を与えた際に生じる、脂質成分あるいはその代謝物の変性過程を高い時間分解能で追跡するためには、溶媒抽出を伴わない直接分析法が必要不可欠である。

本稿で紹介したMALDI-MSによる細菌脂質の直接分析法は、こうした手法の一つに位置づけることができる。また、各種の病原体が生物兵器として悪用されることへの危惧がいよいよ現実味を帯びている昨今では、細菌種を迅速に判別する目的で、本法を実際に活用することも考えられる。しかし、スペクトル上に観測される脂質類の定量的な議論を可能にすることや、細菌の識別結果の正確さ・精度をより一層向上させることなど、本法にはなお克服すべき課題がいくつか残されている。それらの諸問題を解決するためには、今後、1) 新しいマトリックス試薬や試料プレート素材の開発、および2) ラウンドロビンテスト等を通じての測定条件の適正化やデータベースの整備など、ハード面およびソフト面の双方について、本法をさらに洗練された手法へと高めていくことが必要であろう。これらを通じて、今後、細菌類のリビドーム解析の分野において、MALDI-MSによる細菌脂質の直接分析法がますます大きな

貢献をしていくことが期待される。

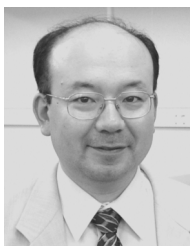
文 献

- 1) J. O. Lay, Jr.: *Mass Spectrom. Rev.*, **29**, 172 (2001).
- 2) C. Fenselau, P. A. Demirev: *Mass Spectrom. Rev.*, **20**, 157 (2001).
- 3) Y. Ishida: *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.*, **51**, 108 (2003).
- 4) Y.-P. Ho, C. Fenselau: *Anal. Chem.*, **70**, 4890 (1998).
- 5) Y. Ishida, A. J. Madonna, J. C. Rees, M. A. Meetani, K. J. Voorhees: *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, **16**, 1887 (2002).
- 6) 石田康行: 化学と工業, **56**, 97 (2003).
- 7) O. Nakanishi, Y. Ishida, S. Hirao, S. Tsuge, H. Ohtani, J. Urabe, T. Sekino, M. Nakanishi, T. Kimoto: *J. Anal. Appl. Pyrolysis*, **68-69**, 187 (2003).
- 8) Y. Ishida, K. Kitagawa, A. Nakayama, H. Ohtani: 投稿準備中.



石田康行 (Yasuyuki ISHIDA)

名古屋大学エコトピア科学研究機構 (〒464-8603 名古屋市千種区不老町)。名古屋大学大学院工学研究科修了。博士(工学)。《現在の研究テーマ》生体脂質の解析とその応用、高効率なバイオマス変換技術の開発。
E-mail: ishida@esi.nagoya-u.ac.jp



大谷 肇 (Hajime OHTANI)

名古屋大学工学研究科化学・生物工学専攻 (〒464-8603 名古屋市千種区不老町)。名古屋大学大学院工学研究科博士後期課程修了。工学博士。《現在の研究テーマ》高分子材料及び天然有機物の構造キャラクタリゼーション。《主な著書》“高分子の熱分解ガラクロマトグラフィー基礎およびデータ集”。《趣味》ライフル射撃。
E-mail: hajime@apchem.nagoya-u.ac.jp

原 稿 募 集

話題欄の原稿を募集しています

内容: 読者に分析化学・分析技術及びその関連分野の話題を提供するもので、分析に関係ある技術、化合物、装置、公的な基準や標準に関すること、又それらに関連する提案、時評的な記事などを分かりやすく述べたもの。

但し、他誌に未発表のものに限ります。

執筆上の注意: 1) 広い読者層を対象とするので、用語、略語などは分かりやすく記述すること。2) 啓蒙的であること。3) 図表は適宜用いてもよい。4) 図表を含めて4000字以内(原則として

図・表は1枚500字に換算)とする。

なお、執筆者自身の研究紹介の場とすることのないよう御留意ください。

◇採用の可否は編集委員会にご一任ください。採用分については規定の原稿料をお支払いします。原稿の送付先及び問い合わせは下記へ。

〒141-0031 東京都品川区西五反田1-26-2

五反田サンハイツ304号

(株)日本分析化学会「ぶんせき」編集委員会

〔電話: 03-3490-3537〕