

平成 27 年度 修士論文

MALDI-TOF MS を用いた担子菌の
種間および種内変異の検出

Detection of interspecific and intraspecific variations
of basidiomycetes using MALDI-TOF MS

高知工科大学大学院 工学研究科 基盤工学専攻
物質・生命システム工学コース

1185013

濱田亮祐

担当教員：堀澤栄 准教授

1. 概要

微生物の同定は、医療、農業・水産業などの産業、食品生産などの分野で重要である。これまでの微生物の同定は、主に形態観察や生理・生化学的性状試験により行われてきた。担子菌類の種の同定は、主に子実体、孢子、菌糸などの形態情報を顕微鏡などで観察する手法、生育温度や代謝産物などの生理学的性状などの条件を似合わせて判断する手法、生体分子である rDNA を用いた手法などが挙げられる。しかし、菌糸は形態的特徴に乏しく、子実体は条件によって特徴が変化するため、専門家であっても種の同定が困難な場合がある。遺伝子を用いた方法は、検出感度も信頼性も高いが目的遺伝子のクローニングなどが煩雑でシーケンス試料の調製と配列解析のコストが高く多検体の解析には不適である。近年、微生物の新しい同定方法として質量分析装置である MALDI-TOF MS を用いた同定が信頼性があると評価され開発が進んでいる。MALDI TOF MS は微生物の主にリボソーム由来のタンパクから得られたスペクトルパターンをマッチングすることにより菌種を特定するもので、従来法と比較すると、迅速かつ正確な結果が得られ低コストであることが特徴である。すでに医療分野や品質管理分野では MALDI-TOF MS を用いた同定方法が利用され病原微生物や有害微生物の同定が行われている。このようにバクテリアなどのタンパク質を利用した同定は正確性があると評価され研究報告も数多くある。

本研究では、誤りやすい担子菌類の同定において MALDI-TOF MS を用いた同定が可能であるのか、担子菌の種の判定、種内変異の検出は可能なのか、成長段階によるマススペクトルの相違がみられるのか、について検討した。供試菌は担子菌の中から 4 属 6 種 26 株を用いた。菌体からタンパク質抽出を行い質量電荷比 2000~20000Da にあるペプチドすべてを測定した。

その結果、MALDI-TOF MS を用いた担子菌類の同定は可能であることが示された。また、ある菌種には種内に異なるマススペクトルを持つグループがあることが分かった。そして、近縁種の種間のスコア値の値が明確に低下したため近縁種の種間の判定が可能であると示された。

さらに、菌種によっては菌糸の生育段階の違いで得られるスペクトルパターンが異なる種があることが確認できた。このことから培養日数の異なるスペクトルを幅広くライブラリーに登録することで生育段階の異なる菌株でも同定することが可能であると考えられる。