

18. LC-MS/MS を用いた黄色ブドウ球菌エンテロトキシン類の定量分析法の開発

○永井 宏幸 (岐阜県保健環境研究所)

高橋 春 (京都大学農学研究科 助教)

【研究目的】

標的タンパク質をペプチドに断片化し、高感度質量分析 (MS/MS) で検出する手法は、多成分分析が可能で、食品成分による妨害を受けにくいことから、アレルギー物質等の検査での応用が期待されている。そこで、本研究では黄色ブドウ球菌 (*Staphylococcus aureus*) が生産し、毒素型食中毒の原因となるエンテロトキシン類について、高速液体クロマトグラフ質量分析器 (LC-MS/MS) を用いた定量分析法を開発することを目的とする。

【研究の必要性】

黄色ブドウ球菌など毒素型食中毒では、毒素の検出が重要であるが、現時点では免疫学の原理を活用するものが主流で、遺伝子学的手法などと組み合わせて検討されることが多い。免疫学的手法は高感度かつ操作が簡便であるものの、偽陽性偽陰性の発生を防ぐことができず、また、黄色ブドウ球菌エンテロトキシン A~E、G~V、X のようにターゲットの種類だけ抗体が必要になり、それだけ検査が煩雑化する。一方、質量分析は、高速スキャンによる多成分分析が可能で、多種のエンテロトキシンにも応用が期待できる。また、定量性にも優れることから、毒素生産メカニズムなど高度な研究も可能となる。微生物同定においても実用化が進んでおり、微生物検査における質量分析の重要性は高まっている。

【研究計画】

1) マーカーペプチドの探索

市販のエンテロトキシン A 標準物質を緩衝液に溶解させ、ジチオトレイトール存在下でシステイン基を還元し、ヨード酢酸で還元システイン基をアルキル化したのち、トリブシン処理 37℃により、ペプチド断片に分解する。多数生成されるペプチドを LC-MS/MS で網羅的にスキャンを行う。得られたデータについて、統計解析ソフトを用いて、安定性、定量性等に優れたマーカーペプチドを複数選択する。さらに、プロテインデータバンクから得られたペプチドがエンテロトキシンに特異的であるかについて調べる。

2) エンテロトキシン A の分析

1) で得られたペプチドを元に、LC-MS/MS における MRM 分析条件を設定し、再度エン

テロトキシン A 標準物質がピークとして検出できるかを確認し、標準物質の濃度と相関性の高い面積値を示したペプチドを定量用ペプチドに設定する。さらに、実際に食中毒の原因となった食品残品について、本手法を用いて測定し、検出可能であるかについて検討する。

3) その他のエンテロトキシン類の分析

標準品がないその他のエンテロトキシンについても、エンテロトキシン A の結果を元にフラグメントパターンを推定し、検出条件を作成する。

【実施内容・結果】

エンテロトキシン A 標準物質標準溶液を用いて LC-MS/MS 条件を検討した。LC-MS/MS には Agilent 社製 1200LC(SL)および質量分析装置：ABSciex 社製 4000QTRAP を使用した。検出するペプチド選択の基準としては、システイン、メチオニンが存在しないこと、アミノ酸修飾がないこと、アミノ酸の長さは5～25 残基とした。図 2 にエンテロトキシン A 標準溶液から得られたマスペクトルを示す。エンテロトキシン A 由来ペプチドとして SELQGTALGNLK、GFFTDHSWYNDLLVDFDSK、KVDLYGAYYGYQC を検出した。

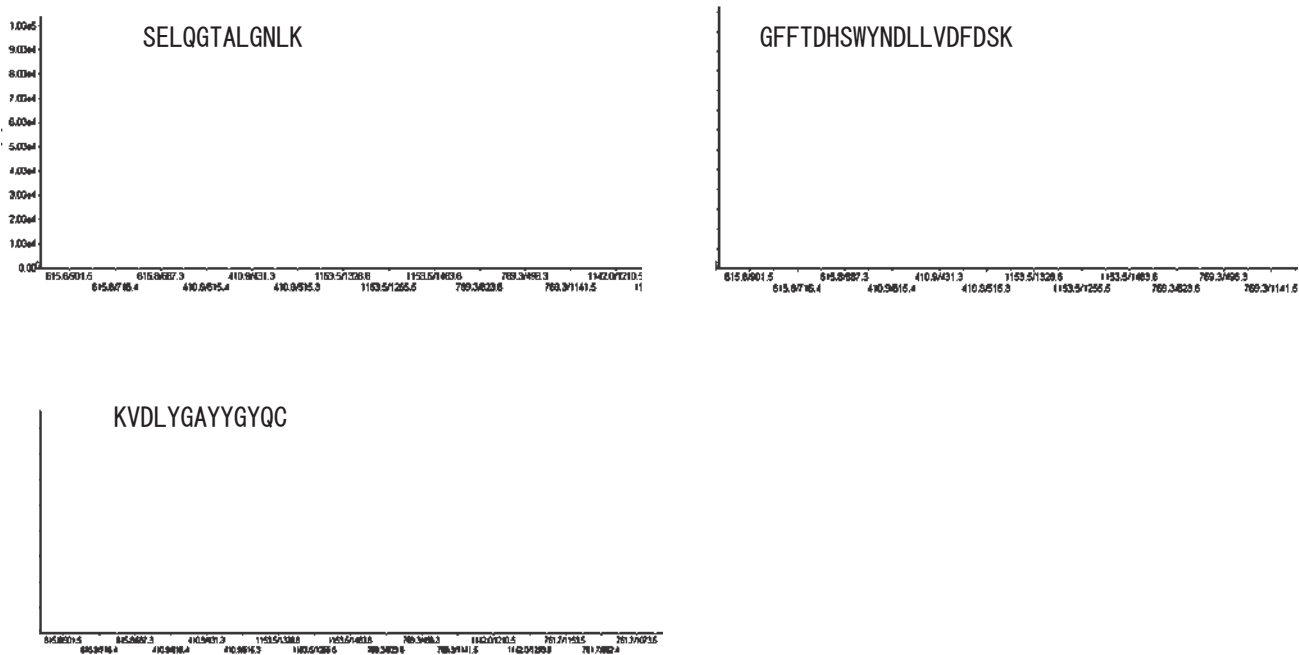
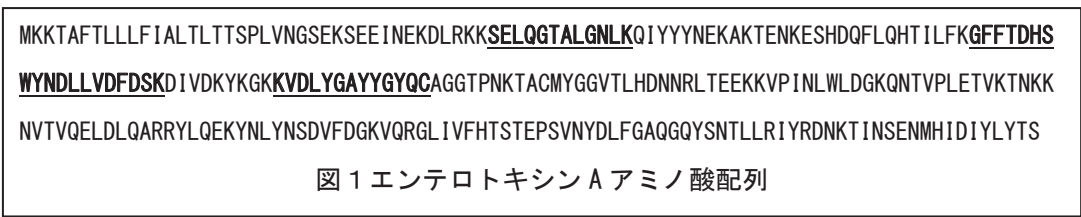


図 2 SELQGTALGNLK、GFFTDHSWYNDLLVDFDSK、KVDLYGAYYGYQC、のマスペクトル

次に、エンテロトキシン A の検出条件を表 1 のとおり作成し、LC-MS/MS による分析を行った。HPLC カラムは (財) 化学物質評価研究機構製 L-column2 (2.1×150 mm, 3 μm) を用いた。分離条件は以下の通り。カラム温度 40℃, 注入量 10 μL, 移動相 : A 液 0.1% ギ酸, B 液 0.1% ギ酸アセトニトリル, 移動相流速 : 0.30 mL/min, グラジエント条件 : 0 分 (A : B = 98 : 2) → 1.3 分 (A : B = 98 : 2) → 11 分 (A : B = 60 : 40) → 12.5 分 (A : B = 2 : 98) → 20 分 (A : B = 2 : 98)

イオン化モード : エレクトロスプレーイオン化法ポジティブモード (ESI (+)), 測定モード : sMRM (Scheduled Multiple Reaction Monitoring), イオンスプレー電圧 : 5.5 kV, ターボガス温度 : 600℃

表 1 エンテロトキシン A の検出条件

Protein	Peptide	Precursor (m/z)	Product (m/z)			
Enterotoxin A	SELQGTALGNLK	615.8	773.5	901.5	716.4	616.3
	KVDLYGAYYGQC	761.7	910.5	1073.5	990.4	1130.6
	GFFTDHSWYNDLLVDFDSK	769.3	710.5	823.6	611.4	978.4

その結果、図 3 のとおり、それぞれのペプチドにあたるピークが現れ、タンパク質性食中毒毒素であるエンテロトキシン A を液体クロマトグラフィーで分析できることが分かった。

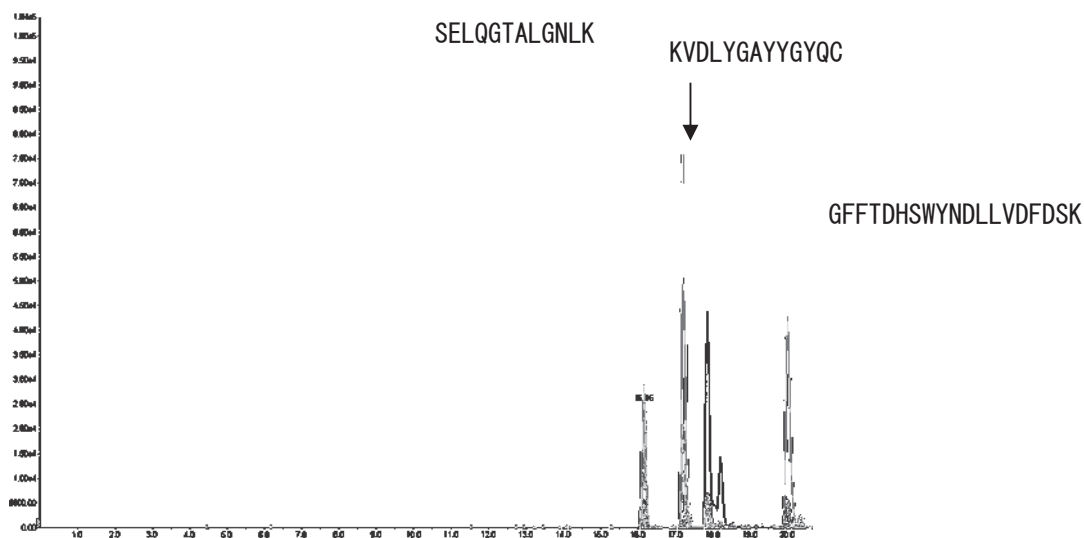


図 3 エンテロトキシン A のクロマトグラム

黄色ブドウ球菌 α 毒素についても同様に表 2 の条件で分析できることがわかった。

※黄色ブドウ球菌 α 毒素は分子量 33,000 の分泌性タンパク質で、293 個のアミノ酸から構成され、溶血作用、皮膚壊死作用、動物に対する致死作用を示すことが知られている。

表 1 黄色ブドウ球菌 α 毒素の検出条件

Protein	Peptide	Precursor (m/z)	Product (m/z)		
α -toxin	IGGLIGANVSIGHTLK	775.5	1097	755.5	668.5
	SGLAWPSAFK	532.3	549.4	735.6	806.6
	VFYSFIDDK	567.3	887.6	724.8	1034.9
	TGTTDIGSNTTVK	646.9	706.4	819.7	1035.8

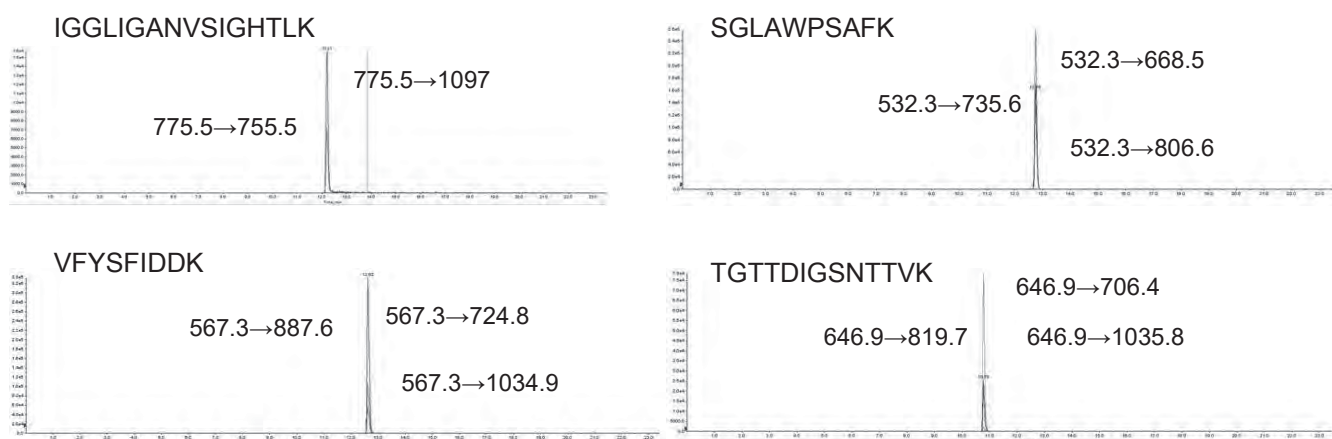


図 3 黄色ブドウ球菌 α 毒素のクロマトグラム

【考察と今後の課題】

本研究において、黄色ブドウ球菌の食中毒毒素エンテロトキシン A および α 毒素の標準品を LC-MS/MS で分析することに成功した。最終的な目標は実際に食中毒の原因となった食品残渣からエンテロトキシン類を検出することであり、そのためにまず食品検体を用いた妥当性評価試験を実施する必要がある。標準品だけの場合と異なり、食品中には分析阻害物質が存在することから、カートリッジ等による精製によってエンテロトキシン A を効率よく回収できる方法を開発することが今後の課題となる。

【参考文献】

Nagai et al. A Method for Simultaneous Determination of 3T3-L1 Adipocyte Metabolites by liquid Chromatography/Mass Spectrometry using a $[^{13}\text{C}]$ -stable Isotopes Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 2011;75(8):1485-9. Epub 2011 Aug 7.

永井ら LC-MS/MS を用いたアレルギー物質検査法開発 岐阜県保健環境研究所報 1-5 22(2014)

Nagai H et al. Development of a Method for Crustacean Allergens Using Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. J AOAC Int. 2015 Sep-Oct;98(5):1355-65. doi: 10.5740/jaoacint.14-248.

Nagai, H., Development of a Method for Determination of Buckwheat Allergens Using Liquid Chromatography with Tandem Mass Spectrometry. Journal of AOAC Int., 100, 4, 1051-1057 (2017).

【経費使途明細】

使 途	金 額
安定同位体標準品	222,588 円
エンテロトキシン A 特異的ペプチド LGNYDNVR	43,200 円
0.1vol% ギ酸-アセトニトリル LC/MS 用溶媒 1L 3 本	26,438 円
超純水 LC/MS 用 1 L 4 本	5,962 円
ユニパック 100 枚	1,813 円
合計	300,001 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円
預金利息	1 円