



HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	Study on MALDI Glycotyping : Development of a Structure-Based Typing Method for Bacterial O-Antigens
Author(s)	浦上, 彰吾
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(生命科学)
Dissertation Number	甲第16595号
Issue Date	2025-09-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16595
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98205
Type	doctoral thesis
File Information	Shogo_Urakami_review.pdf, 審査の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 審 査 の 要 旨

博士の専攻分野の名称: 博士 (生命科学) 氏 名 浦 上 彰 吾

審査担当者	主査	教 授 比 能 洋
	副査	教 授 中 村 公 則
	副査	准教授 安 達 広 明
	副査	助 教 横 井 康 広

学 位 論 文 題 名

Study on MALDI Glycotyping: Development of a Structure-Based Typing Method for Bacterial O-Antigens
(MALDI Glycotyping による O 抗原構造に基づく型分類法の開発に関する研究)

博士学位論文審査等の結果について (報告)

微生物は種の多様性に加え、種内多様性を有する。特に表層多糖の種内多様性はその種がウイルスや宿主免疫による淘汰圧に対応するための生存戦略によって獲得したものである。グラム陰性菌は最外層がリポ多糖と呼ばれる糖脂質で覆われており、その多糖糖鎖の最外層は O 抗原と呼ばれる繰り返し多糖で構成されている。この O 抗原多糖はその名の通り抗原として獲得免疫に識別されるため、血清型と呼ばれており、大腸菌からは約 200 種の O 抗原多糖が発見・同定されている。この O 抗原は菌種内多様性の指標として、腸管出血性大腸菌 0157 のような疫学的分類に使用されてきた。一方で、血清学的に重複する多糖構造の異性体はさらに、O1a-c のようなその亜型として分類されてきたが、化学構造の違いを厳密に同定するためには、これまでは NMR のような検体量と解析時間を要する手法が必要であり、臨床現場では陰性・陽性判定法である血清や PCR 法を用いて診断が行われてきた。一方で、O 抗原は多様性が非常に大きいため、この O 抗原同定は非常に負担の大きい作業であった。

著者は、本論文研究に先立ち、まず無処理糖タンパク質に対し糖鎖選択的なイオン化を実現するマトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析 (MALDI-MS) のためのマトリックスを開発した。本論文ではそのマトリックス特性を基盤とし、グラム陰性菌から簡単な前処理のみで MALDI-MS 解析による O 抗原多糖型の迅速同定を目的とした。

筆者はまず、大腸菌 4 株 (O1 株、O6 株、および O157 株 2 株) の O 抗原を対象とし、系統的な条件検討によりその迅速同定プロセスの基盤構築を行い、安全キャビネット内で単コロニーの大腸菌から 1 時間以内に O 抗原繰り返し多糖の構成単糖に相当する質量パターンシグナルを得ることに成功した。大腸菌 O1 および O6 抗原は血清診断キットでは識別困難な亜型多糖が報告されているが、MALDI-MS 法ではその亜型判定まで実施できることを明確に示した。また、得られた O 抗原繰り返し多糖の MALDI-MS シグナルには繰り返し多糖単位を示す特徴的な分子量シグナルに加え、その多糖単位の構成単糖成分および配列情報を示すシグナル得られることを示した。単一コロニーから分析できる感度を活用し、異なる O 抗原の大腸菌の混合液から得られた寒天培地上の任意のコロニーを解析することにより、それぞれのコロニーを構成する株の O 抗原同定ができること、コンタミしているコロニーに含まれる O 抗原株の組み合わせを同定できることを示した。さらに、単一コロニーを分割し、従来のタンパク質解析による菌種同定と、この O 抗原多糖同定を並列実施することにより菌種と O 抗原多糖をそれぞれ同定できることを実証した。また、大腸

菌科の2株を調査した結果、それぞれの2株が有するO抗原の特徴的シグナルをそれぞれ得ることに成功した。特筆すべきはO抗原構造が未知のE. Tardaの解析により、これまで報告例がない新規O抗原多糖パターンを示スペクトルが得られたことである。すなわち、質量分析法により、O抗原多糖を直接解析することにより、既存の間接的な陰性陽性解析技術では不可能であった新規構造の同定までを実現したことは驚異的な発見である。さらに、仮性結核菌を対象としたO抗原解析では化学的に加水分解しやすいジデオキシ糖由来のシグナルパターンから同一組成の異性体を識別できると共に、デオシキ体を明確に識別できる新しいMALDI-MS用マトリックス組成を乱すことに成功した。さらに、著者が開発した新規マトリックスがポジティブモードに加え、ネガティブモードでも糖鎖成分のイオン化効率が高いことを実証し、ウロン酸含有多糖など、ポジティブモードではイオン化効率が低いため同定が困難なO抗原多糖を質量分析装置内で測定モードを切り替えるのみで、同定可能となることを見出した。著者らが見出した前処理プロセスとこの測定モード切替を組み合わせたO抗原同定法を用い、大腸菌と赤痢菌からなる71株を対象とした大規模解析を実施したところ、8割以上の菌株のO抗原が同定可能であることを実証した。さらに、報告と異なるO抗原多糖を有する菌株群を見出し、従来の血清検査法と組み合わせることにより、MALDI-MSによるO抗原構造同定技術がより精度の高いO抗原同定を実現するとともに、新規O抗原多糖パターンを有する株の発見につながることを実証した。

本論文によって、MALDI-MS分析法によりO抗原多糖の化学構造を高分解能、高感度、かつ迅速に直接同定することに成功した。著者らの成果は従来の抗血清やPCR法など陰性/陽性検査の繰り返しによる絞り込みによるO抗原同定技術と比較すると、同定までの時間が大幅に短縮されることに加え、未知O抗原が同定でき、食中毒などの検査と疫学調査の迅速化に加え、微生物多糖資源の迅速探索などに大きく貢献できると考えられる。

よって著者は、北海道大学博士（生命科学）の学位を授与される資格あるものと認める。