



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_summary.pdf, 全文の要約



学 位 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称 博士(生命科学) 氏 名 浦上 彰吾

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)

MALDI-MS (マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析法) は、マトリックスの特性を活かし、高分子を高分解能かつ高感度に分析できる技術であり、近年、微生物の同定法として世界中で活用されている。この技術は、菌種に特異的なタンパク質を検出することで菌種を同定できるが、同一種内の「抗原型」の識別には対応できていない。抗原型は感染経路の追跡や疫学解析に重要であり、特にグラム陰性菌の O 抗原は病原性大腸菌 O157 などの識別に有用である。O 抗原はリポ多糖 (LPS) の最外層に位置する糖鎖であり、繰り返し構造を構成する糖の種類や配列の違いにより、大腸菌では 187 種類の型が知られている。従来の O 抗原同定法である血清型別試験や PCR 法では、抗原ごとの試薬による段階的な絞り込みが求められ、未検査の O 抗原の同定には時間と労力を要する。さらに、構造未報告の O 抗原には迅速な対応が難しく、新興病原菌の感染拡大防止における課題となっている。

このような背景を踏まえ、私は従来の MALDI-MS による菌種同定に用いられてきた「タンパク質」ではなく、O 抗原を構成する「糖鎖」に着目した。本研究に先立ち、糖鎖を選択的にイオン化する MALDI マトリックスを発見し、前処理なしで精製糖タンパク質から糖鎖を検出する技術を確認した。さらに、新規 MALDI マトリックス (DAN/DHB/Na) を開発し、混合試料中でも糖鎖シグナルを迅速かつ選択的に検出できることを実証した。これらを基盤に、本研究では、O 抗原の糖鎖構造を直接検出し、既知および構造未報告の O 抗原を一度の測定で包括的に同定する新たな手法「MALDI glycotyping」を開発し、その有効性を体系的に検証した。

第 2 章では、MALDI glycotyping 法の開発と基盤的評価を行った。まず、O 抗原の糖鎖構造を迅速に検出するため、洗浄・酸加水分解・遠心のみを用いる簡便な測定系を構築した。糖鎖を選択的に検出する DAN/DHB/Na マトリックスを用いることで、他の生体高分子が混在する試料からでも糖鎖に特異的なシグナルを取得でき、1 時間以内に同定を完了できる測定プロセスを確立した。この手法では、O 抗原の繰り返し構造や構成糖に由来する特異的な m/z 値を明瞭に検出できた。大腸菌 O157 を含む 3 種 6 株のグラム陰性菌に適用した結果、すべての菌株で既報 O 抗原構造に対応する特異的な m/z シグナルが得られた。 m/z 値に基づき亜型を識別できただけでなく、構造未報告の O 抗原についても繰り返し構造や構成糖の分子量を特定できた。このことから、既知・未知を問わず、構造情報に基づいて O 抗原を識別できることが実証された。また、単一コロニーから菌種と O 抗原を同時に同定できるほか、複数菌株が混在する共培養環境下でも個別の識別が可能であった。これらの成果は、実環境下における感染源迅速特定技術としての有効性を明確に示した。

第3章では、構造解釈精度の向上に焦点を当て、偽結核菌を対象に MALDI glycotyping 法のマトリックス改良を行った。さらに、同一構成要素を有する異なる O 抗原の識別能力についても検証を行った。まず、第2章で使用した DAN/DHB/Na マトリックスにおいて、二種類の付加イオンが共存する現象を確認した。この課題を解決するため、付加イオンの統一を目的に、DAN/DHB/K マトリックスを新たに活用した。その結果、スペクトルの明瞭化と、それに伴う構造解釈精度の向上が確認された。この改良手法を4株の偽結核菌に適用した結果、それぞれの O 抗原に由来するシグナルが検出され、いずれも既報の構造と一致することが確認された。また、同一分子量を有する異なる O 抗原においても、構造差異に起因するシグナルパターンの違いを捉えることで識別が可能であることが実証された。これらの結果により、繰り返し構造や構成要素に基づく識別に加え、亜型間の微細な構造差異も高精度に検出可能であることが明らかとなった。さらに、それぞれの O 抗原から生じる特徴的なシグナルパターンを活用することで、同一構成要素を有する O 抗原に対しても精密な識別が可能であることが示された。今後、多数の測定結果を蓄積し、データベースとの照合環境を整備することで、さらに高精度な O 抗原同定が可能になると期待される。

第4章では、MALDI glycotyping の汎用性および臨床応用可能性を広範に検証した。大腸菌および赤痢菌の71株を対象に、正負イオンモードを併用して測定を実施した結果、80%以上の株において O 抗原の同定に成功した。特に、負イオンモードの導入により、従来法では検出が困難であった酸性 O 抗原の検出感度が大幅に向上し、より幅広い O 抗原構造への対応が可能となった。第2章と第3章に引き続き、同一分子量を有する O 抗原型間の識別や、構造差異に基づく亜型の同定も、多数検体において実現した。さらに、本解析では、保存機関により登録された O 抗原を有する株を対象としたが、71株中10株において MALDI glycotyping の結果と登録 O 抗原との不一致が認められた。そこで従来法である血清型別試験を実施した結果、2株では登録された O 抗原に対して陽性反応が確認され、いずれも既報構造とは異なる新規の亜型であることが明らかとなった。登録 O 抗原が確認されなかった6株に加え、その他2株を含む計8株について、50種類の O 抗原型に対するスクリーニング検査を実施した。その結果、4株では登録とは異なる O 抗原型が、4株では O 抗原型自体が同定できなかった。続いて、スクリーニング検査対象の8株に対して、MALDI glycotyping による構造情報をもとに、既報の大腸菌および赤痢菌 O 抗原の構造情報との比較を行った。その結果、構造情報に基づき、200種類を超える O 抗原型から1種類または数種類にまで絞り込むことに成功した。以上より、MALDI glycotyping は、単一の測定条件下で広範な検体に適用可能であり、得られた構造情報に基づき、既知および構造未報告の O 抗原を迅速かつ高精度に判定できる手法であることが示された。

総括として、MALDI glycotyping は、迅速（1時間以内）、簡便かつ高精度な O 抗原同定法としての有効性を示した。本手法では、繰り返し構造および構成単糖組成に基づく構造同定が可能であり、さらに、特徴的な MS パターンとの比較により、高精度な O 抗原同定を実現した。一方、O 抗原構造データベースの拡充が今後の重要課題であることも明らかとなった。同一構成要素を有する O 抗原型間の識別には、事前に既知 O 抗原のシグナルパターンを整備し、データベース比較に基づく判別を行う必要がある。これにより、より多様な O 抗原型への対応が可能になると期待される。

本学位論文では、MALDI glycotyping による構造情報に基づき、迅速かつ高精度な O 抗原同定が可能であること、ならびに未同定株に対する新型 O 抗原検出の可能性を明らかにした。