

特別賞

MALDI-MS による O 抗原糖鎖同定技術の  
開発と臨床応用性の開拓

北海道大学大学院 生命科学院 生命科学専攻  
博士課程 3 年

浦上 彰吾

# 1. 緒 言

## 1.1 研究の背景・目的

近年、分子の質量を測定する質量分析技術は、食品分析、医療診断、宇宙探査など幅広い分野で活用されている [1-3]。中でも 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、マトリックスがレーザーを吸収して試料のイオン化を助ける特性を活用し、高分子を高感度かつ高分解能で分析可能な手法として注目されている [4, 5]。2002年には、この技術の発展に貢献した田中耕一氏がノーベル化学賞を受賞した [6]。近年では、微生物の種特異的なタンパク質を標的とすることで、MALDI-MS による迅速な菌種同定が臨床現場で実用化されている [7-9]。一方で、現行法では菌種レベルの識別にとどまり、同一種内の「抗原型」のような細分類には対応していない。これは、従来法が主に種内で共通するリポソームタンパク質を標的としているため、抗原型の違いが測定シグナルに反映されにくいいためである。

抗原型は感染症の疫学解析や感染経路の追跡において重要であり、特にグラム陰性菌における O 抗原は病原性大腸菌 O157 などの識別に有用なマーカーである [10-12]。この O 抗原はリポ多糖 (LPS) の最外層に位置する多糖(糖鎖)成分であり、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、赤痢菌では46種類もの多様な O 抗原型が報告されている (図1a) [13-16]。従来 O 抗原同定法には、抗血清法、PCR 法、生化学試験などが用いられてきたが [11, 17]、いずれも抗原ごとの試薬を要し、検査前の O 抗原の判別には段階的な絞り込みが必要となる (図1b 左)。さらに、構造未報告の O 抗原を持つ新興病原菌による集団感染では、従来法による迅速な同定が困難であり、感染拡大を防ぐ上での大きな障壁となっている。

こうした課題を踏まえ、申請者らは、従来 MALDI-MS による菌種識別で用いられてきた「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、我々は糖鎖を選択的にイオン化する MALDI マトリックスを開発し、前処理なしで精製糖タンパク質から糖鎖のみを検出する技術を確立した [18, 19]。さらに、より高感度な新規 MALDI マトリックス (DAN/DHB/Na) を設計し、複雑な混合物中でも糖鎖シグナルを迅速かつ選択的に検出可能であることを示した [20]。

これらの成果を基盤として、本研究では、MALDI-MS により O 抗原の糖鎖構造を直接検出し、迅速に同定する新たな手法の確立を目指す (図1b 右)。本技術では、O 抗原の抗原性を決定づける糖鎖の化学構造に由来するシグナルを直接検出することで、従来必要とされた絞り込み操作を要せず、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できる。この技術により、感染源の特定や集団感染への迅速な対応、さらには国際的な疫学調査の高度化への貢献が期待される。

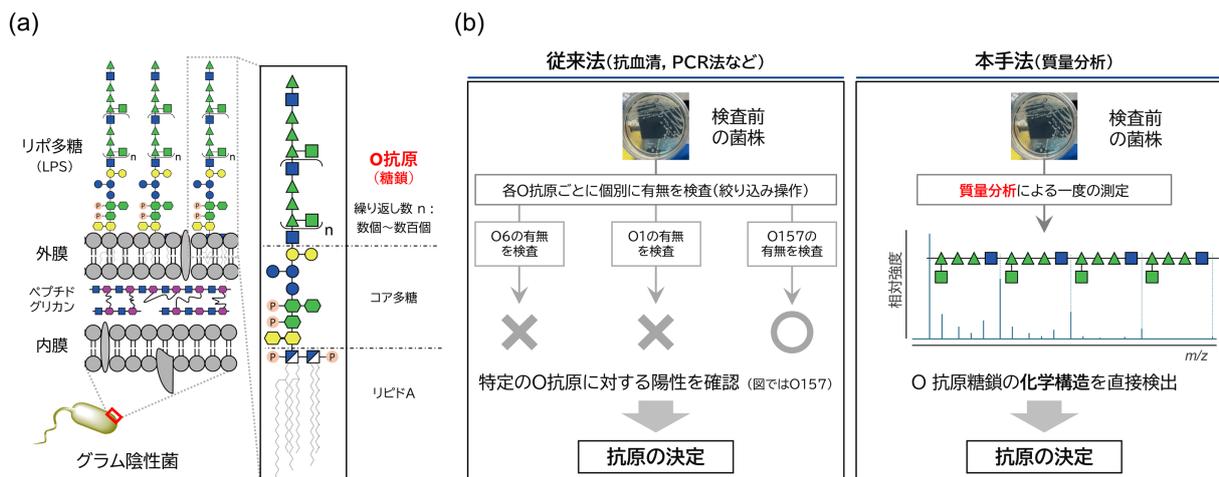


図1. グラム陰性菌におけるO抗原の構造的特徴と、本技術による同定手法の概要。(a) グラム陰性菌の細胞膜構造。リポ多糖(LPS)はグラム陰性菌の外膜を構成する分子であり、その最外層は、繰り返し単位(repeating unit, RU)から成るO抗原糖鎖で構成されている[13]。(b) 従来法と本手法の比較。従来法では各O抗原に対し個別に有無を検査する必要があるが、本技術では絞り込み操作を要さず、質量分析により、一度の測定でO抗原を化学構造に基づき同定可能。

## 1.2 研究の課題と技術的意義

本研究では、質量分析を用いた幅広いO抗原に対応可能な新規同定法の確立に向けて、以下の4項目を課題として設定し、取り組む。

### ① O抗原糖鎖同定に向けた質量分析測定系の構築

MALDI-MSによりO抗原糖鎖の化学構造を直接検出し、絞り込み操作を要しない迅速な同定技術の開発を目指す。同一種内および異種間での識別性を評価し、再現性と判別性能の有効性を検証する。

### ② 実環境条件におけるO抗原糖鎖同定技術の評価

検査環境への応用可能性を評価するため、単一コロニーからの菌種およびO抗原の並行同定を実施する。あわせて、複数菌株の共培養条件下において、O抗原に基づいてコロニーを識別可能か検証する。臨床現場や検査室での使用を想定した条件下での検証を通じ、感染源の迅速特定への展開可能性を示す。

### ③ O抗原糖鎖同定技術の測定精度向上と測定対象の拡張

多様なO抗原に対応するため、測定条件を最適化する。MALDIマトリックスの改良により付加イオンの統一性を高めてシグナル解釈の精度を向上させるほか、負イオンモードの適用により酸性O抗原を含むより広範なO抗原への対応を目指す。これにより、解析精度と実用性の両面での向上が期待される。

### ④ 多様なO抗原に対する同定技術の実証

大腸菌53株および赤痢菌18株の計71株を対象に、幅広いO抗原糖鎖構造への適用性を検証する。赤痢菌は大腸菌と進化的に近く、遺伝子レベルでの識別が困難である[21]。この両菌種を対象とすることで、本技術の汎用性と識別性能をより広い系統的背景にわたり評価する。また、同定困難な菌株については構造的要因を検討し、技術の限界と今後の課題を明確化する。

これらの取り組みにより、O 抗原糖鎖に基づく迅速な同定技術(O 抗原糖鎖同定技術)を確立する。本技術は、O 抗原の化学構造を直接検出する新たなアプローチに基づき、高い汎用性と実用性を備えた診断基盤として、臨床・産業応用に向けた展開が強く期待される。

## 2. O 抗原糖鎖同定に向けた質量分析測定系の構築

### 2.1 MALDI-MS による大腸菌 O 抗原糖鎖の直接測定と同定

まず、MALDI-MS による O 抗原糖鎖の測定に向け、洗浄・酸加水分解・遠心のみでシグナルを取得可能な前処理プロトコルを構築した。酸加水分解時間を10分以内に抑えることを目的として、大腸菌 O157株を用い、塩酸濃度と温度を調整した。また、単一コロニーからの測定に向けて菌体量と濃度を最適化し、DAN/DHB/Na マトリックスを用いて糖鎖を選択的に検出した。測定には広く用いられる正イオンモードを使用し、菌体接種から同定までを1時間以内で完了できた(図2) [22, 23]。

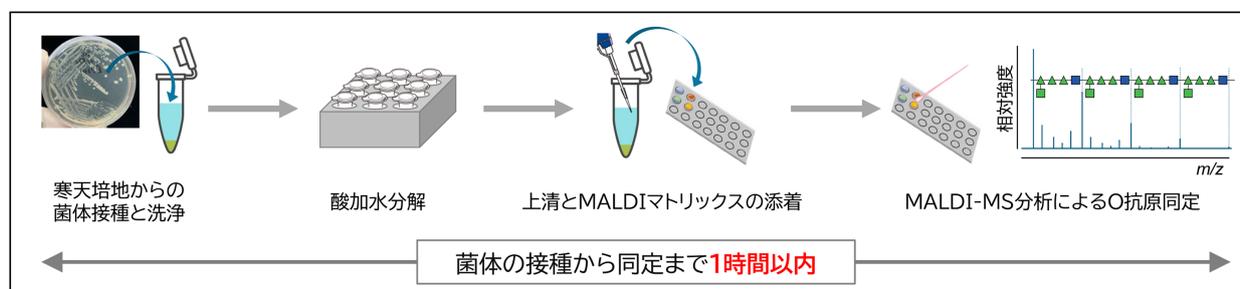


図2. O 抗原糖鎖同定技術の測定フローの概要。寒天培地から菌体を接種・洗浄した後、酸加水分解を行い、得られた上清と MALDI マトリックスを添着して測定を実施 [22, 23]。MALDI-MS により O 抗原糖鎖を同定し、菌体接種から同定までを1時間以内で完了可能であることを確認。

次に、開発した手法を用いて、大腸菌4株(O157株 [ATCC43888、ATCC700728]、O1株 [ATCC11775]、O6株 [ATCC25922])のO 抗原糖鎖を測定した。O157、O1、O6の構造と構成単糖は図3a, bに示す [24-29]。O1およびO6には、分子量の異なる複数の亜型が報告されている一方、O157の亜型情報はこれまで確認されていない。測定の結果、各O 抗原に特有の構成単糖や繰り返し構造に由来する特徴的なシグナル( $m/z$ )が得られた(図3c, d) [22, 23]。O157を有する2株からは共通したシグナルパターンが得られ、菌株に依存せず再現性高く同定可能であることが示された。一方、今回扱ったO1株およびO6株では構造の違いに応じた異なるシグナルが得られ、それぞれO1AおよびJanssonのO6の亜型を有することが確認された。これらの結果は、抗原性を決定づけるO 抗原糖鎖の化学構造を直接検出し、その構造差に基づいて同定が可能であることを示している。また、O 抗原の亜型識別についても、従来法では抗体やプライマー整備が必要であったのに対し、本技術では追加操作を要せずに識別可能であることを実証した。

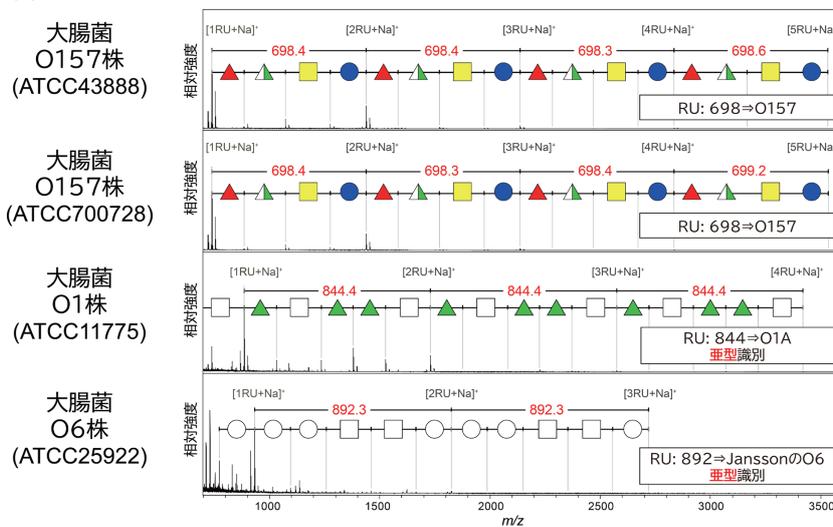
(a)

略称	名称	シンボル	精密質量
Rha	Rhamnose	▲	146.06
Fuc	Fucose	▲	
Hex	Hexose	○	162.05
Glc	Glucose	●	
Man	Mannose	●	
Gal	Galactose	●	
RhaNAc	N-acetylrihamnosamine	▲	187.08
HexNAc	N-Acetylhexosamine	□	203.08
GlcNAc	N-acetylglucosamine	■	
GalNAc	N-acetylgalactosamine	■	

(b)

菌種	O抗原	亜型	繰り返し構造(RU)	シンボル	精密質量
大腸菌	O157	-	→ - RhaNAc - Fuc - Glc - GalNAc - →	▲▲●■	698.27
	O1	O1A	→ - Rha - Rha - Rha - GlcNAc - → ManNAc	▲▲▲■	844.33
		O1B O1C	→ - Rha - Rha - Gal - GlcNAc - → ManNAc	▲▲●■	860.33
		Jann	→ - GalNAc - Man - Man - GlcNAc - → GlcNAc	■●●■	933.34
	O6	Jansson	→ - GalNAc - Man - Man - GlcNAc - → Glc	■●●■	892.32

(c)



(d)

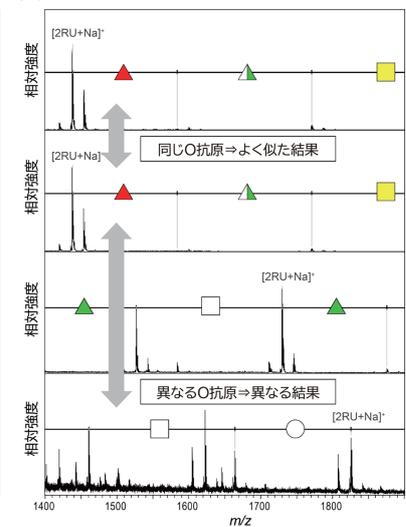


図3. 大腸菌 O 抗原の構造と測定結果。(a) O157、O1、O6 抗原を構成する単糖の名称、構造、シンボルおよび精密質量。(b) 各 O 抗原の繰り返し単位 (RU) の構造および、それぞれの RU に対応する精密質量 [24-29]。(c) 大腸菌 4 株 (O157 株 (2 株)、O1 株、O6 株) の MALDI-MS 測定結果。各 O 抗原に由来する特有のシグナル ( $m/z$ ) を検出 [22, 23]。白塗りのシンボルは、分子量が同じ異性体 (例: Glc, Gal など) を区別せずに表現。(d) 測定結果の拡大図。O157 の二株では類似したスペクトルが得られ、O1 および O6 株では亜型に応じたシグナルの違いを確認。構造情報に基づく O 抗原の同定を実現。

## 2.2 他菌種への O 抗原糖鎖同定技術の展開

次に、本技術の他菌種への適用可能性を評価するため、尿路感染、消化器疾患、水産感染症などを引き起こすグラム陰性菌である *Citrobacter freundii*、偽結核菌 (*Yersinia pseudotuberculosis*)、および *Edwardsiella tarda* の 3 菌種 [30-32] を対象に、前処理および測定条件を変更せずに O 抗原糖鎖の測定を行った。各菌種の O 抗原構造および構成単糖は図 4a, b に示す [33-35]。いずれの菌種においても、O 抗原の繰り返し構造および構成単糖に由来するシグナル ( $m/z$ ) を検出することに成功した (図 4c) [23, 36]。 *C. freundii* (NBRC 16624) は大腸菌 O157 株と同一の O 抗原構造 (図 3b) を有しており、測定結果においても両者で同様のシグナルが確認された。偽結核菌 (NBRC112616) については、O2b 型の O 抗原の保有が報告されており、本研究においても O2b に特異的なシグナルパターンが得られた。

*E. tarda* (ATCC15947) は、構造未報告の O1483 型抗原を有している。本測定により、この O 抗原が  $\Delta m/z$  846 の繰り返し単位を持ち、2つのデオキシヘキソース ( $\Delta m/z$  146)、2つの N-アセチルヘキソサミン ( $\Delta m/z$  203)、および未知の  $\Delta m/z$  147 成分から構成されることが明らかとなった。以上の結果から、本技術は大腸菌以外のグラム陰性菌に対しても、前処理や測定条件の変更なしに適用可能であり、構造未解明な O 抗原に対しても、その繰り返し構造および構成要素の分子量を特定可能であることを実証した。

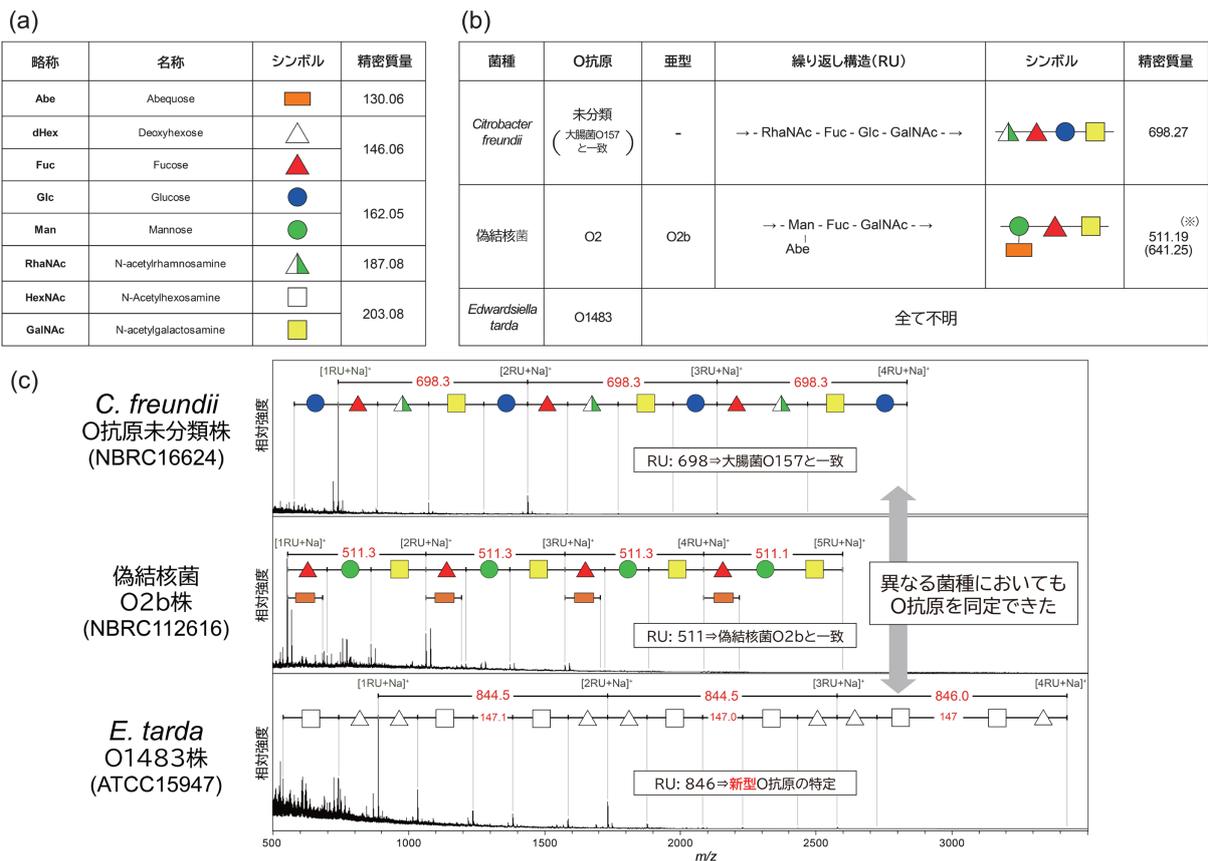


図4. 異種菌種における O 抗原の構造と測定結果。(a) *C. freundii* (NBRC16624) および偽結核菌 O2b 株に含まれる単糖の名称、構造、シンボルおよび精密質量。(b) 各 O 抗原の繰り返し単位 (RU) の構造および対応する精密質量 [33-35]。※偽結核菌 O2b に含まれる Abequose (Abe) は脱離しやすいため、RU の精密質量は Abe を除いた質量を記載し、括弧内に全体の精密質量を併記。(c) *C. freundii*、偽結核菌、*E. tarda* の MALDI-MS 測定結果 [23, 36]。白塗りのシンボルは、分子量が同じ異性体 (例: Glc, Gal など) を区別せずに表現。いずれの菌種でも、O 抗原に由来する特徴的なシグナル ( $m/z$ ) を検出し、構造情報に基づく同定を実現した。

### 3. 実環境条件における O 抗原糖鎖同定技術の評価

#### 3.1 単一コロニーからの MALDI-MS による菌種・O 抗原の一括同定

現在、MALDI-MS による菌種同定は、微生物検査において単一コロニーを用いて日常的に実施されている [7]。一方、O 抗原の同定には、別途 PCR 法や抗血清法などの検査が必要とされる。そこで本研究では、従来の菌種同定手法と O 抗原糖鎖の測定技術を組み合わせ、単一コロニーから菌種と O 抗原を迅速かつ並行して同定可能であるかを検証した。具体的には、大腸菌 O157 株 (ATCC43888) の単一コロニー (直径約 2.5mm) を二分し、一方からはギ酸-アセトニトリル抽出法によるタンパク質を用いた菌種同定 [37] を、他方からは図 2 のワークフローに基づいて得た糖鎖を用いた O 抗原同定を実施した (図 5a)。その結果、大腸菌に特異的なタンパク質シグナル ( $m/z$ ) および O157 に由来する糖鎖シグナル ( $m/z$ ) がそれぞれ検出され (図 5b, 5c)、単一コロニーから両者を同時に同定できることが示された [22, 23]。

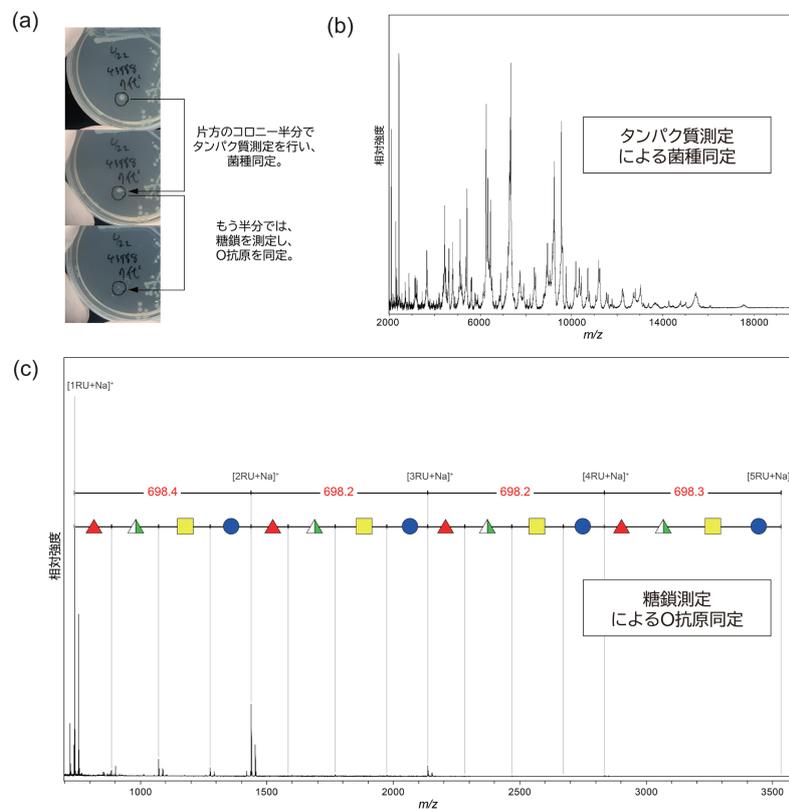


図 5. 単一コロニーからの菌種および O 抗原の一括同定 [22], [23]。(a) 大腸菌 O157 株 (ATCC43888) の単一コロニーからの二段階採取。(b) MALDI-MS によりタンパク質由来のシグナルを測定し、菌種を同定。(c) 単一コロニーから O 抗原由来のシグナル ( $m/z$ ) を検出し、糖鎖構造に基づく同定を実施。単一コロニーからの並行同定の有効性を確認。

### 3.2 複数菌株共培養条件下における O 抗原およびコロニー識別

次に、複数菌株を播種した寒天培地上で、それぞれのコロニーから O 抗原を個別に同定可能かを検証した。大腸菌 O157 株 (ATCC43888)、O1 株 (ATCC11775)、O6 株 (ATCC25922) の 3 株を混合し、寒天培地に播種した (図 6a)。ランダムに選択した 10 個のコロニーを対象に、O 抗原糖鎖同定技術を用いて並列測定を実施したところ、すべてのコロニーから O 抗原に由来するシグナルパターンが取得された (図 6b)。このうち 8 つのコロニーでは単一の O 抗原が同定され、コロニー 4 および 6 では O1A 型、7 および 10 では Jansson の O6 型、2・3・5・9 では O157 型であることが確認された。一方、コロニー 1 および 8 では複数の O 抗原由来シグナルが検出され、異なる菌株が混在したコロニーであることが示された (図 6c)。以上より、本技術は複数菌株が播種された培地においても、各コロニーの O 抗原を並列に同定可能であり、菌株混在の有無も明確に識別できることを示した [22, 23]。特に、O 抗原に基づいて個々のコロニーを識別できる点は、感染拡大時における感染源の迅速特定や複数感染株の判別において有用であり、現場対応力の向上に資する技術である。

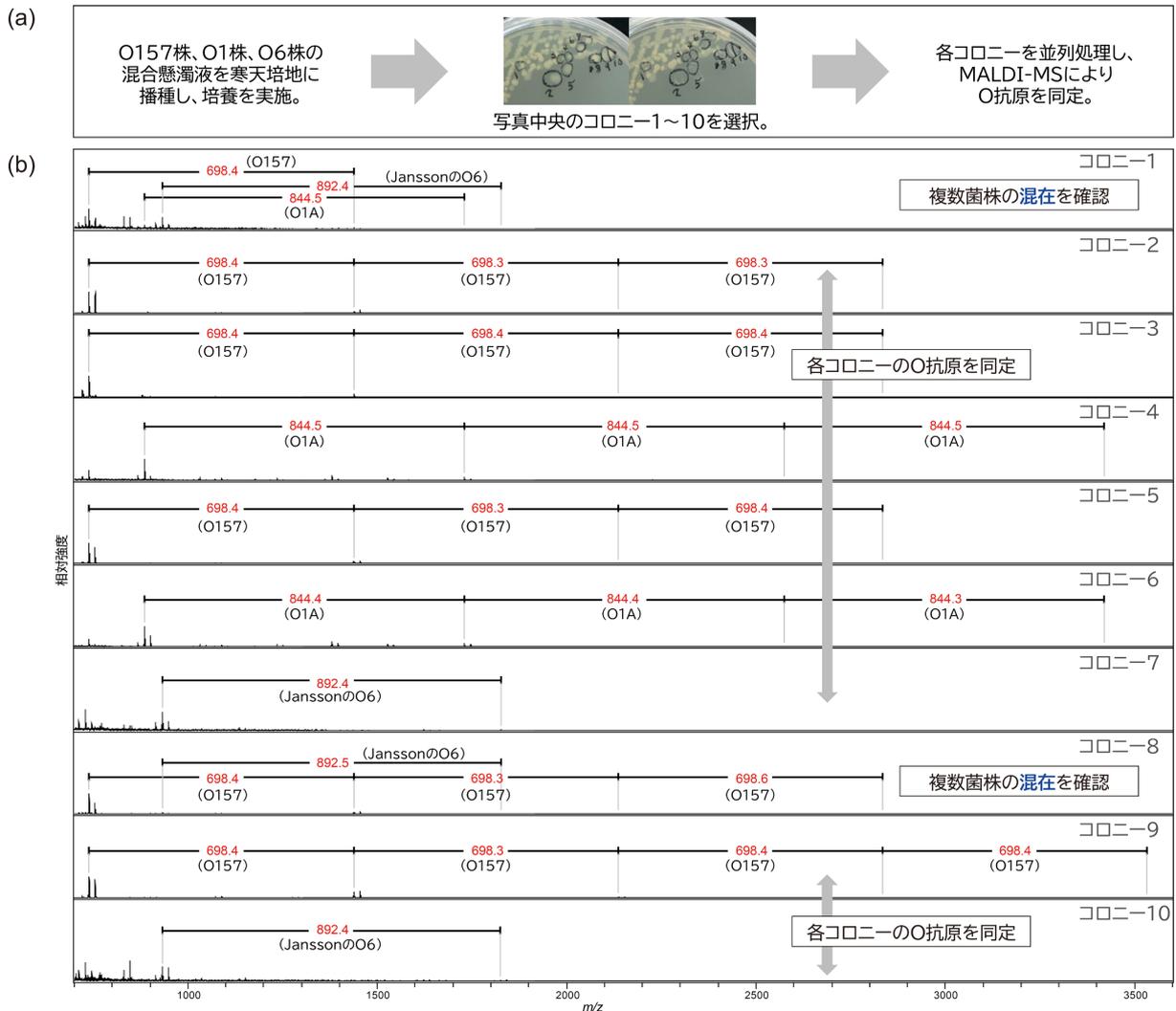


図6. 複数菌株共培養条件下における O 抗原およびコロニー識別 [22], [23]。(a) 大腸菌 O157、O1、O6 株の混合培養と 10 個のコロニー採取手順。(b) 各コロニーの MALDI-MS 測定結果。O1A 型 (コロニー 4・6)、Jansson の O6 型 (コロニー 7・10)、O157 型 (コロニー 2・3・5・9) を同定。コロニー 1 および 8 では複数の O 抗原由来シグナルを検出し、異なる菌株が混在したコロニーであることを確認。

## 4. O 抗原糖鎖同定技術の測定精度向上と測定対象の拡張

### 4.1 O 抗原糖鎖シグナルの最適化と解釈精度の向上

MALDI-MSでは、分析対象とマトリックスを混合して測定を行う。なかでもマトリックスの選択は、イオン化効率や付加イオンの選択性、シグナル強度に大きく影響し、測定結果および解釈精度を左右する[38]。そこで本研究では、O 抗原糖鎖同定技術の測定精度を高めることを目的に、MALDIマトリックスの最適化を行った。従来の測定では、O 抗原の繰り返し構造や構成単糖に由来するシグナルが検出可能であったが、スペクトル中には $\Delta m/z$  16を隔てたシグナルペアが一貫して観測された(図7a, bの上図)[36]。このシグナルペアは、 $\text{Na}^+$ (ナトリウムイオン)と $\text{K}^+$ (カリウムイオン)の付加イオンが共存することで生じたと考えられる。実際、両イオンの質量差( $\Delta m/z$  15.97)を踏まえると、従来の DAN/DHB/Na マトリックスでは $\text{Na}^+$ と $\text{K}^+$ の付加体が混在していた可能性が高い。そこで、付加イオンの選択性を制御するため、炭酸水素ナトリウムを含む従来のマトリックスを、炭酸水素カリウムを含む DAN/DHB/K マトリックスに変更し、偽結核菌(NBRC112616株)を対象にO 抗原糖鎖の測定を行った。その結果、 $\Delta m/z$  16のシグナルペアは消失し、シグナルパターンが明瞭化された(図7a, bの下図)[36]。これは、 $\text{K}^+$ の付加体のみが選択的に検出されたことを示しており、付加イオンの競合が抑制されたことを意味する。以上の結果から、マトリックスの選択を通じて付加イオンの状態を制御することで、O 抗原糖鎖に由来するシグナルの解釈精度が向上し、スペクトルの明瞭性が高まることが示された。これにより、本技術の同定精度と信頼性のさらなる向上が期待される。

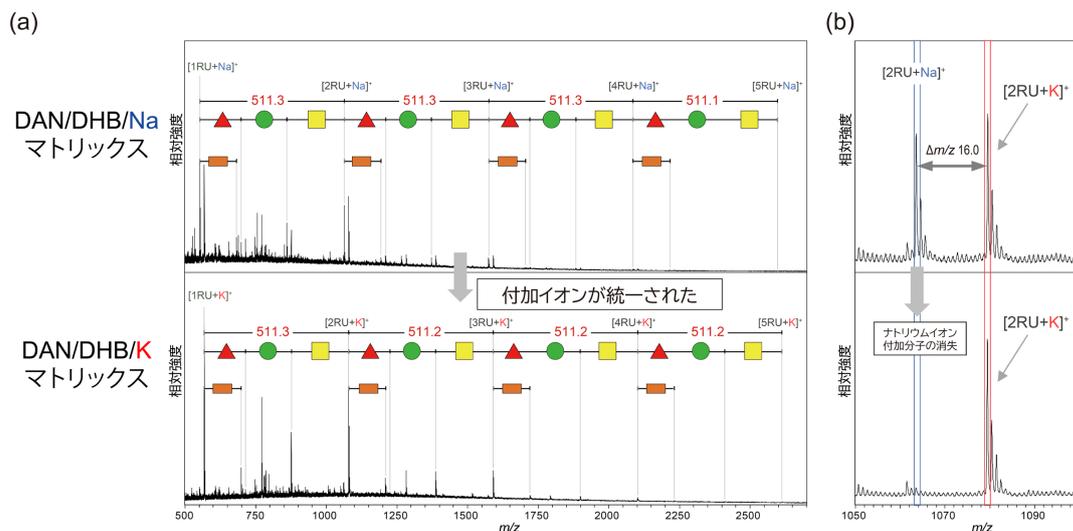


図7. 偽結核菌 O2b 株 (NBRC112616) における DAN/DHB/Na および K マトリックスを用いた MALDI-MS 測定結果の比較 [36]。偽結核菌 O2b の O 抗原構造および構成単糖は、図4a, b に示す。(a)  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の付加体が共存する DAN/DHB/Na マトリックスでは、 $\Delta m/z$  16のシグナルペアが観測された。一方、DAN/DHB/K マトリックスでは付加イオンが統一され、シグナルパターンが明瞭になった。(b)  $\text{Na}^+$  と  $\text{K}^+$  の付加体のシグナルを拡大して表示。 $\text{K}^+$  の付加体  $[2\text{RU}+\text{K}]^+$  のみが検出され、シグナルの明瞭化を確認。

## 4.2 酸性 O 抗原糖鎖の測定に向けた検討

次に、本技術の適用対象が酸性成分を含む O 抗原にまで拡張可能か検証した。従来の測定では中性成分を主とした O 抗原を対象としており、正イオンモードによる測定が中心であった。しかし、質量分析においては化合物の性質によりイオン化効率が異なり、特に酸性糖鎖は正イオンモードではイオン化が困難とされている [39]。一方、大腸菌の O 抗原 187 種のうち少なくとも 30 種以上が酸性成分を有すると報告されており [15]、酸性糖鎖を高感度に検出する技術の確立は、多様な O 抗原型に対応する上で重要な課題である。そこで、酸性成分であるグルクロン酸を含む O 抗原 (図 8a, b) [40] を有する大腸菌 O53 株 (GTC03596) を対象に、従来と同様の前処理および正イオンモードで測定を行ったところ、O53 に由来する特徴的なシグナルは検出されなかった (図 8c 上図)。そこで、同一の測定スポットを用いて負イオンモードで再測定を行った結果、O 抗原の繰り返し構造および構成単糖に由来するシグナル ( $m/z$ ) が明確に検出された (図 8c 下図)。これらの結果は、酸性 O 抗原糖鎖の測定において負イオンモードが有効であることを示している。さらに、使用した DAN/DHB/K マトリックスは正・負イオンモード双方に対応可能であり、酸性成分を含む O 抗原の高感度検出にも適していることが確認された。以上より、O 抗原糖鎖同定技術に負イオンモード測定を組み合わせることで、酸性成分を含む O 抗原にも対応可能となり、本技術の適用範囲と汎用性がさらに拡張されることが示された。

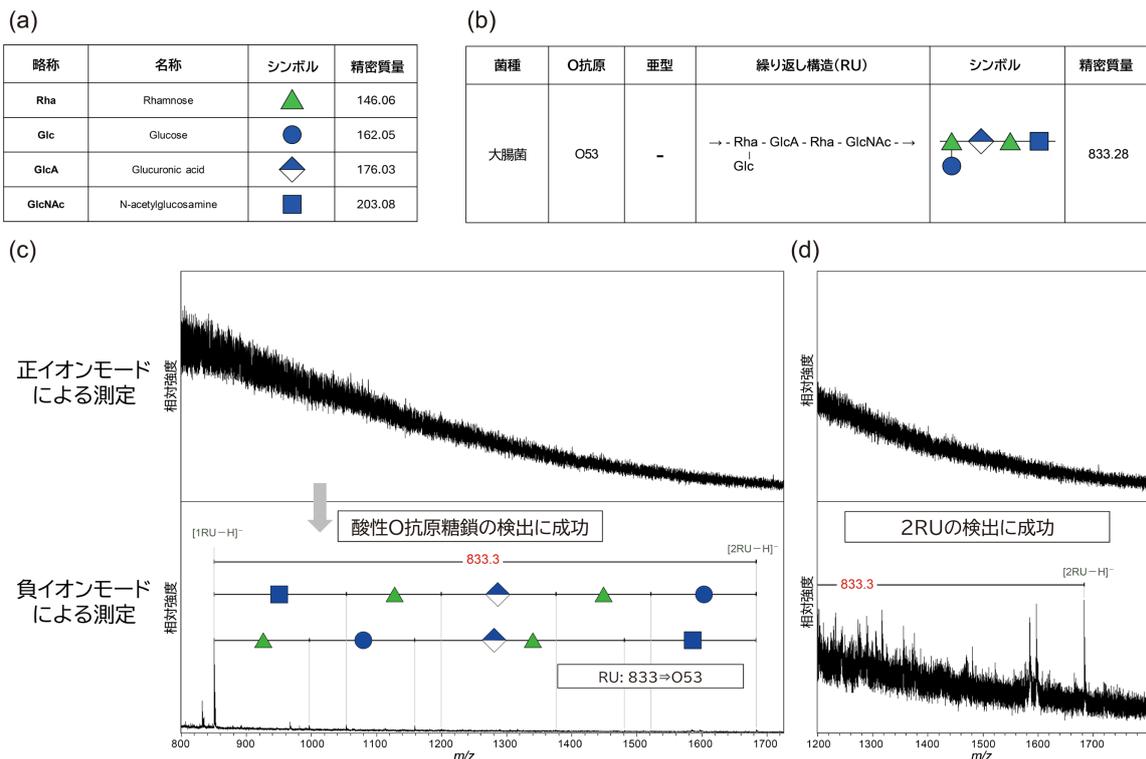


図 8. 酸性 O 抗原 O53 における正・負イオンモードによる MALDI-MS 測定結果の比較。(a) O53 株 (GTC03596) の O 抗原を構成する単糖の名称、構造、シンボルおよび精密質量。(b) O53 抗原の繰り返し単位 (RU) の構造および対応する精密質量 [40]。(c) O53 株の MALDI-MS 測定結果。正イオンモードではシグナルを検出できなかったが、同一スポットを用いた負イオンモードでは、RU および構成単糖に由来する明確なシグナル ( $m/z$ ) を確認し、酸性 O 抗原に対する検出に成功した。(d) 測定結果の拡大図。2RU に対応するシグナルの検出を確認。

## 5. 多様な O 抗原に対する同定技術の実証

O 抗原糖鎖同定技術の広範な O 抗原構造への適用性を検証するため、大腸菌 53 株および赤痢菌 18 株、計 71 株を対象に測定を実施した。全菌株に共通の前処理および測定条件を適用し、まず正イオンモードで測定を行い、O 抗原由来のシグナルが検出されなかった菌株には負イオンモードでの追加測定を実施した (図 9)。モード切り替えには約 30 秒を要するが、2.1 節で示したとおり、菌体の接種から同定までを 1 時間以内で完了できた。その結果、図 10 に示すとおり、正・負イオンモードの併用により 80.3% の同定率を達成した。一方、残る 19.7% (14 株) では O 抗原の同定が困難であった。これらの株では、O 抗原の繰り返し構造の単位ユニット数が短く、糖鎖量が少ないため、MALDI-MS の検出感度を下回った可能性が高いと考えられる。O 抗原の長さは Wzz タンパク質によって制御されており [41, 42]、例えば大腸菌では、Wzz のアミノ酸配列の違いにより、約 7~25 ユニットの範囲で長さが増減することが知られている [43]。一般に、同一の O 抗原を有する菌株は同じ Wzz タンパク質を持つ傾向があり、O 抗原長も共通するとされる [43]。そのため、これらの菌株では測定結果も類似すると考えられ、実際、本研究においてもその傾向が確認された。なお、大腸菌における O 抗原長の網羅的な解析は報告されていないが、今回同定が困難であった菌株では、O 抗原の構造的違いが検出感度に影響した可能性がある。また、O 抗原は免疫回避 [44] やファージ耐性 [45] に関与するとされ、病原性を有する細菌では長鎖型の O 抗原を持つ傾向がある [46]。そのため、感染症診断の現場で検出対象となる菌株では、本技術で測定可能な長鎖型 O 抗原が優占するケースが多いと考えられ、臨床応用上の有用性は高い。以上より、

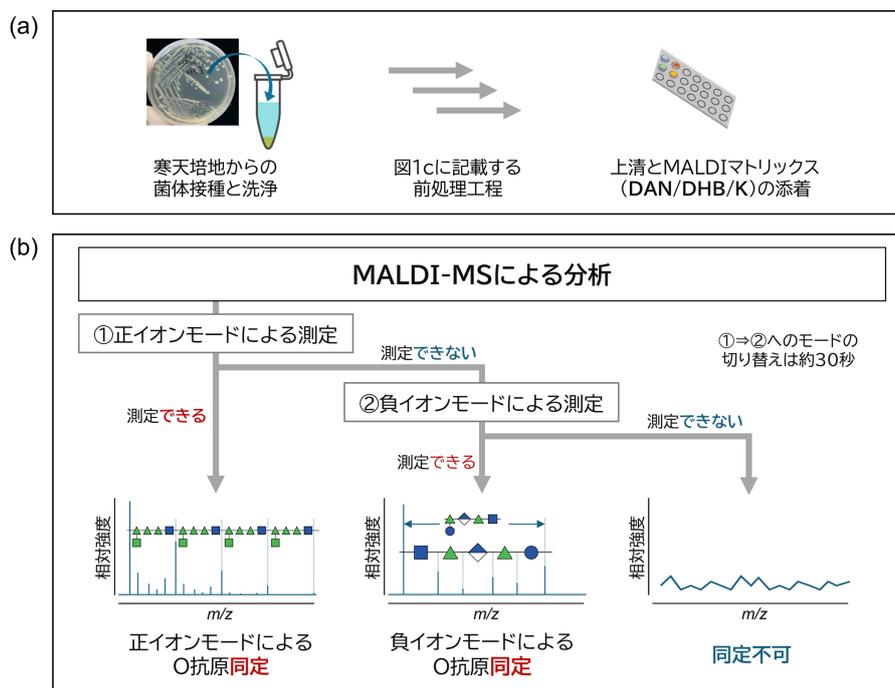


図 9. O 抗原糖鎖同定技術における測定ワークフロー。(a) 最適化された前処理フロー。図 2 に示す手法において、DAN/DHB/K マトリックスを用いた測定系を構築。(b) 測定フロー。正イオンモードでシグナルが得られない場合に負イオンモードへ切り替え、酸性成分を含む O 抗原に対応。正・負イオンモードの併用により、多様な O 抗原に対応可能な測定フローを提示。

構造的な制約により一部の O 抗原で同定が困難となる場合があるものの、測定条件や前処理を統一した環境下で、80% 以上の O 抗原を再現性高く同定できた。これにより、本技術が多様な O 抗原に対して高い適用性と実用性を有することが示された。

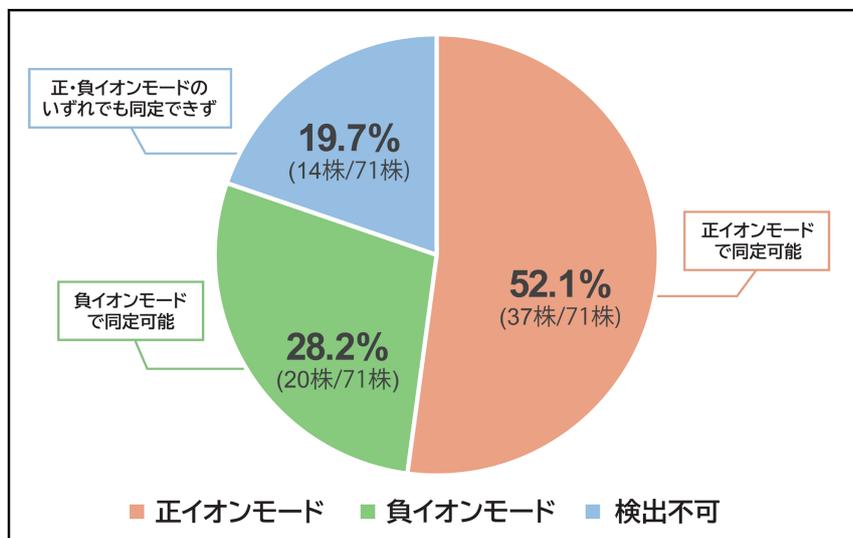


図10. MALDI-MSによるO抗原糖鎖同定結果の内訳。大腸菌および赤痢菌71株に対して測定を実施。正イオンモードで52.1% (37株)、負イオンモードで28.2% (20株)を同定。両モードで同定困難であったのは14株 (19.7%)。中性・酸性を含む広範なO抗原に対する同定率の高さを確認。

## 6. まとめと今後の展望

本研究では、MALDI-MSによりO抗原の糖鎖構造を直接検出し、迅速に同定する新たな手法を確立した。菌体の接種から同定までを1時間以内で完了できるプロトコルを構築し、菌種を問わず共通の前処理条件で適用可能であることを示した。また、単一コロニーからの菌種・O抗原の並行同定や、複数菌株共培養条件下におけるコロニー識別を実施し、臨床現場での柔軟な運用に対応できる技術であることを実証した。さらに、マトリックスの最適化によるシグナル解釈精度の向上や、負イオンモード導入による酸性O抗原への対応により、より広範なO抗原糖鎖構造への適用が可能となった。大腸菌53株および赤痢菌18株を対象とした検証では、共通条件下で80%以上の同定率を達成し、本技術の高い汎用性と再現性が確認された。

従来のO抗原同定法は、抗血清法やPCR法に依存しており、抗原ごとの試薬を用いた段階的な絞り込みが必要であった。また、構造が未報告のO抗原を有する新興病原菌の集団感染においては、迅速な対応が困難である。これに対し本技術は、抗原性を決定づける糖鎖の化学構造に基づくシグナル ( $m/z$ ) を直接取得する。これにより、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でき、重型の識別にも対応可能である。従来の抗血清法やPCR法による定性検査とは異なり、本技術は抗原の化学構造を直接検出する新たなアプローチに基づいており、感染源の迅速な特定や新興感染症への即応を可能とする診断基盤として機能する。

さらに、既存のMALDI-MS装置をそのまま活用できることから、装置の追加改変を要さ

ず現場導入が可能であり、実装に向けた大きな利点を有している。測定結果は高い再現性を備え、データベース化やクラウド共有を通じた国際連携にも展開可能である。今後は、パターン同定アルゴリズムとの連携によって、識別の客観性と自動化が一層進み、実用化に向けた展開が現実的な段階に入ると期待される。加えて、本技術は臨床診断や疫学調査にとどまらず、食品・環境モニタリングや微生物由来資源の品質評価などにも応用可能である。このほか、腸内細菌叢のO抗原に着目した機能性評価や、バイオ資材の構造評価なども含め、多様な分野への展開が期待される。本研究で確立したO抗原糖鎖同定技術は、既存インフラを活用可能な高精度・高汎用性の診断ツールであり、臨床・産業分野への導入に向けて実装の現実味を増している。学術的・産業的価値を兼ね備えた技術として、さらなる展開が期待される。

## 謝 辞

本研究の推進にあたり、多くの方々から多大なるご助言とご支援を頂戴しました。この場を借りて深く感謝申し上げます。特に、北海道大学大学院先端生命科学研究院の比能洋教授には、長きにわたりご指導を賜り、厚く御礼申し上げます。また、本研究は、申請者が代表を務めるJST次世代研究者挑戦的研究プログラム(JPMJSP2119)およびJSPS科学研究費補助金(23KJ0052)による助成を受けて実施されました。

## 参考文献

- [1] Kaufmann, A. *Anal. Bioanal. Chem.* 403, 1233–1249 (2012).
- [2] Jannetto, P. J. & Fitzgerald, R. L. *Clin. Chem.* 62, 92–98 (2016).
- [3] Arevalo, R., Ni, Z. & Danell, R. M. *J. Mass Spectrom.* 55, e4454 (2020).
- [4] Karas, M. & Krüger, R. *Chem. Rev.* 103, 427–439 (2003).
- [5] Li, D., Yi, J., Han, G. & Qiao, L. *ACS Meas. Sci. Au* 2, 385–404 (2022).
- [6] Tanaka, K. *Angew. Chem. Int. Ed.* 42, 3860–3870 (2003).
- [7] Seng, P. *et al. Clin. Infect. Dis.* 49, 543–551 (2009).
- [8] Croxatto, A., Prod'homme, G. & Greub, G. *FEMS Microbiol. Rev.* 36, 380–407 (2012).
- [9] Sekiguchi, Y. *et al. Genome. Biol.* 24, 257 (2023).
- [10] van Belkum, A. *et al. Clin. Microbiol. Infect.* 13, 1–46 (2007).
- [11] Orskov, I., Orskov, F., Jann, B. & Jann, K. *Bacteriol. Rev.* 41, 667–710 (1977).
- [12] Stenutz, R., Weintraub, A. & Widmalm, G. *FEMS Microbiol. Rev.* 30, 382–403 (2006).
- [13] Di Lorenzo, F. *et al. Chem. Rev.* 122, 15767–15821 (2022).
- [14] Whitfield, C., Williams, D. M. & Kelly, S. D. *J. Biol. Chem.* 295, 10593–10609 (2020).
- [15] Liu, B. *et al. FEMS Microbiol. Rev.* 44, 655–683 (2020).
- [16] Liu, B. *et al. FEMS Microbiol. Rev.* 32, 627–653 (2008).
- [17] Wang, L., Wang, Q. & Reeves, P. R. *Sub-Cell. Biochem.* 53, 123–52 (2010).
- [18] **Urakami, S.** & Hinou, H. *Anal. Sens.* 2, e202100040 (2022).
- [19] **Urakami, S.** & Hinou, H. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 16836 (2023).
- [20] **Urakami, S.** & Hinou, H. *ACS Omega* 7, 39280–39286 (2022).

- [21] Devanga Ragupathi, N. K., Muthuirulandi Sethuvel, D. P., Inbanathan, F. Y. & Veeraraghavan, B. *NMNI*, 21, 58–62 (2018).
- [22] **Urakami, S.** & Hinou, H. *J. Mass Spectrom. Soc. Jpn.* 70, 237–240 (2022).
- [23] **Urakami, S.** & Hinou, H. *Sci. Rep.* 14, 12719 (2024).
- [24] Perry, M. B., MacLean, L. & Griffith, D. W. *Biochem. Cell Biol.* 64, 21–28 (1986).
- [25] Jann, B., Shashkov, A. S., Gupta, D. S., Panasenko, S. M. & Jann, K. *Carbohydr. Polym.* 18, 51–57 (1992).
- [26] Baumann, H., Jansson, P. E., Kenne, L. & Widmalm, G. *Carbohydr. Res.* 211, 183–190 (1991).
- [27] Gupta, D. S., Shashkov, A. S., Jann, B. & Jann, K. *J. Bacteriol.* 174, 7963–7970 (1992).
- [28] Jansson, P. E., Lindberg, B., Lönnngren, J., Ortega, C. & Svenson, S. B. *Carbohydr. Res.* 131, 277–83 (1984).
- [29] Jann, B., Shashkov, A. A., Kochanowski, H. & Jann, K. *Carbohydr. Res.* 263, 217–25 (1994).
- [30] Samonis, G. *et al. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 28, 61–68 (2009).
- [31] Jalava, K. *et al. J. Infect. Dis.* 194, 1209–1216 (2006).
- [32] Park, S. Bin, Aoki, T. & Jung, T. S. *Vet. Res.* 43, 67 (2012).
- [33] Nishiuchi, Y., Doe, M., Hotta, H. & Kobayashi, K. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 28, 163–171 (2000).
- [34] Kondakova, A. N. *et al. Carbohydr. Res.* 344, 405–407 (2009).
- [35] Sechter, I. *et al. J. Clin. Microbiol.* 17, 669–671 (1983).
- [36] **Urakami, S.** & Hinou, H. *BBA Advances* 7, 100131 (2025).
- [37] Matsuda, N. *et al. J. Clin. Microbiol.* 50, 3862–3866 (2012).
- [38] Gusev, A. I., Wilkinson, W. R., Proctor, A. & Hercules, D. M. *Anal. Chem.* 67, 1034–1041 (1995).
- [39] Han, L. & Costello, C. E. *Biochemistry (Moscow)*, 78, 710–720 (2013).
- [40] Knirel, Y. A. *et al.* Structural relationships between genetically closely related O-antigens of *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Biochem (Mosc)*. 81, (2016).
- [41] Bastin, D. A., Stevenson, G., Brown, P. K., Haase, A. & Reeves, P. R. *Mol. Microbiol.* 7, 725–34 (1993).
- [42] Huszczyński, S. M., Coumoundouros, C., Pham, P., Lam, J. S. & Khursigara, C. M. *J. Bacteriol.* 201, (2019).
- [43] Franco, A. V., Liu, D. & Reeves, P. R. *J. Bacteriol.* 180, 2670–2675 (1998).
- [44] Maldonado, R. F., Sá-Correia, I. & Valvano, M. A. *FEMS Microbiol. Rev.* 40, 480–493 (2016).
- [45] Letarov, A. V. *Int. J. Mol. Sci.* 24, 17390 (2023).
- [46] Lerouge, I. & Vanderleyden, *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 17–47 (2002).