

多糖抗原のわずかな違いを迅速に捉える技術の実証

～病原性大腸菌 O111 亜型株の発見と構造決定、ワクチン開発等の迅速化に期待～

ポイント

- ・ 出血性大腸菌 O111 抗原亜型株の迅速同定とその抗原構造決定に成功。
- ・ 大腸菌 O111 のバイオリソース菌株と市販リポ多糖の変異型混在を実証。
- ・ 新型感染症、ワクチン開発、機能性食品開発の迅速化に期待。

概要

北海道大学大学院先端生命科学研究院の比能 洋教授と同大学大学院生命科学院博士後期課程のリー・ジュン・チェリン氏及び浦上彰吾氏らの研究グループは、O111 型の腸管出血性大腸菌^{*1}及び O111 由来の市販リポ多糖^{*2}に、それぞれ既知の O111 型抗原多糖^{*3}とその亜型^{*4}が混在していることを迅速同定・発見しました。また、核磁気共鳴法 (NMR) ^{*5}を用いて亜型 O111 型抗原多糖の化学構造を決定しました。

大腸菌などのグラム陰性菌^{*6}は、リポ多糖と呼ばれる糖脂質^{*7}で覆われており、最外部に O 抗原と呼ばれる繰り返し多糖を提示しています。O 抗原は微生物の生存戦略に伴う多様性を有します。大腸菌ではこれまでに 200 種以上の繰り返し多糖構造が報告され、食中毒や感染症の疫学指標、ワクチン抗原等として利用されています。

本成果は、研究グループが開発した MALDI (マトリックス支援レーザー脱離イオン化) グリコタイプング法^{*8}を用いた腸管出血性大腸菌の O 抗原解析により、O111 型抗原多糖の変異型を発見し、さらには化学構造の決定に成功したものです。

O 抗原は抗体による迅速診断やワクチン治療の標的となります。そのため抗原の変異は既存の方法での診断・治療を難しくする原因になります。MALDI グリコタイプング法は従来の抗体検査や PCR 検査と異なり、O 抗原多糖構造を直接解析する技術であるため、既知の O 抗原の同定に加え新型 (変異型) も解析可能です。また、解析から得られた O 抗原の糖鎖構造パターン情報をインターネット経由で共有することにより、世界中で診断に使用することが可能となります。

MALDI グリコタイプング法は、同一装置で「大腸菌 O111」など「菌種 + 糖鎖型」情報の同定を可能とします。また微生物の持つ多糖は発酵食品の食感や免疫賦活機能等にも深く関与します。本技術は臨床微生物学分野にとどまらず、食品産業、物流の安全保障など、幅広い分野での活用が期待されます。

なお、本研究成果は、2024 年 11 月 4 日 (月) 公開の International Journal of Biological Macromolecules 誌に掲載されました。

【背景】

生物の表面は糖鎖（糖が鎖状につながった分子）で覆われています。大腸菌などのグラム陰性菌は、最外部に O 抗原と呼ばれる繰り返し多糖を提示しています。グラム陰性菌の O 抗原は、哺乳動物の血液型と並び、社会で広く活用・認知されている糖鎖バイオマーカー^{*9}です。抗原の違いは感染症などの診断や疫学調査指標及びワクチン開発の標的となります。そのため、グラム陰性菌が持つ O 抗原の迅速同定技術はグローバル社会の「恒常性」を支える基盤技術の一つです。

生物表面に存在する糖鎖の多様性は、生物多様性を支える基本的生存戦略と言えます。抗体や PCR による従来のプローブ依存型分子バイオマーカー同定技術は、抗原の多様性への対応が難しいという問題がありました。抗原の変異により新たな糖鎖構造が出現した場合も対応が困難です。

【研究手法】

これまでに研究グループは、同グループが開発した糖鎖選択的イオン化技術を活用し、マトリックス支援レーザー脱離イオン化質量分析（MALDI-MS）装置により糖鎖型（グリコタイプ）を迅速決定する、MALDI グリコタイピング法を開発しています。

本研究では、バイオリソースプロジェクト^{*10}が提供する腸管出血性大腸菌 O111 二株、及び市販されている大腸菌 O111 株由来のリポ多糖二品目を対象として、O 抗原の MALDI グリコタイピング法を実施しました。その結果、いずれも一方の株は既知の O 抗原を有し、もう一方の株はヘキソースから N アセチルヘキソサミンへの変異型 O 抗原を有することを同定しました。

さらに、核磁気共鳴法（NMR）により O 抗原多糖の繰り返し単位の構造決定を実施しました。その結果、変異型株が報告された O111 型 O 抗原では、多糖の繰り返し単位を構成するグルコースが N アセチルグルコサミンに変異していることを決定しました。

【研究成果】

本成果は MALDI グリコタイピング法が、①従来法では困難であった新型 O 抗原の迅速同定に効果的であることと、②NMR による「新型」構造決定へと迅速に移行できることを実証しました。

また、NMR を用いたことにより、O111 繰り返し単位に二つ含まれるコリトースと呼ばれる糖残基のうち、片方が加水分解しやすいことも確認されました。これまで O111 の化学構造は学会発表されたデータが引用されるばかりで、論文等の元データにアクセスできませんでしたが、今回の研究で O111 構造データの再現が困難であった理由にも迫ることができました。

【今後への期待】

本研究成果により、「大腸菌 O111」のような「菌種＋多糖型」の判定が同一装置で可能となります。さらに、MALDI グリコタイピング法は質量パターンの「類似性」ではなく「同一性」を指標とするため、抗原多糖化学構造のわずかな違いを鋭敏に捉え、「新型・亜型」の発見が可能となります。今回、構造決定した大腸菌 O111 抗原の亜型構造は、糖残基内の水酸基とアセトアミド基の違い（ヒトの血液型では A 型と B 型の違いに相当）により生じたものでした。

従来の O 抗原同定技術は、その煩雑さのため、感染経路の事後決定や種内系統分類等の疫学的指標などに利用が限られてきました。しかし MALDI グリコタイピング法により O 抗原を迅速同定できれば、抗体治療や予防用ワクチン選択の指標として早期診断に使用できるなど、抗原としての医療用途が広がります。また、微生物の持つ多糖は発酵食品の機能性や食感に大きく影響します。本技術は機能性食品開発など様々な分野にも応用できると期待されます。

【謝辞】

本研究は科学研究費補助金（基盤研究 B: JP22H02191、JP23K23458）及び JSPS 拠点形成プログラム（アジア-アフリカ型）の支援を受けて実施しました。また、岐阜大学高等研究院微生物遺伝資源保存センターから文部科学省バイオリソースプロジェクトとして公開された腸管出血性大腸菌 O111 菌株の提供を受けて実施しました。

論文情報

論文名 Integration of MALDI glycotyping and NMR analysis to uncover an O-antigen substructure from pathogenic *Escherichia coli* O111 (MALDI グリコタイピングと NMR 解析による病原性大腸菌 O111 由来 O 抗原変異構造の発見)

著者名 June Chelyn Lee¹、浦上彰吾¹、比能 洋² (¹北海道大学大学院生命科学院、²北海道大学大学院先端生命科学研究院)

雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules

DOI 10.1016/j.ijbiomac.2024.137178

公表日 2024 年 11 月 4 日 (月) (オンライン公開)

お問い合わせ先

北海道大学大学院先端生命科学研究院 教授 比能 洋 (ひのうひろし)

T E L 011-706-9040 F A X 011-706-9042 メール hinou@sci.hokudai.ac.jp

U R L <https://sites.google.com/eis.hokudai.ac.jp/hinou/>

配信元

北海道大学社会共創部広報課 (〒060-0808 札幌市北区北 8 条西 5 丁目)

T E L 011-706-2610 F A X 011-706-2092 メール jp-press@general.hokudai.ac.jp

【参考図】

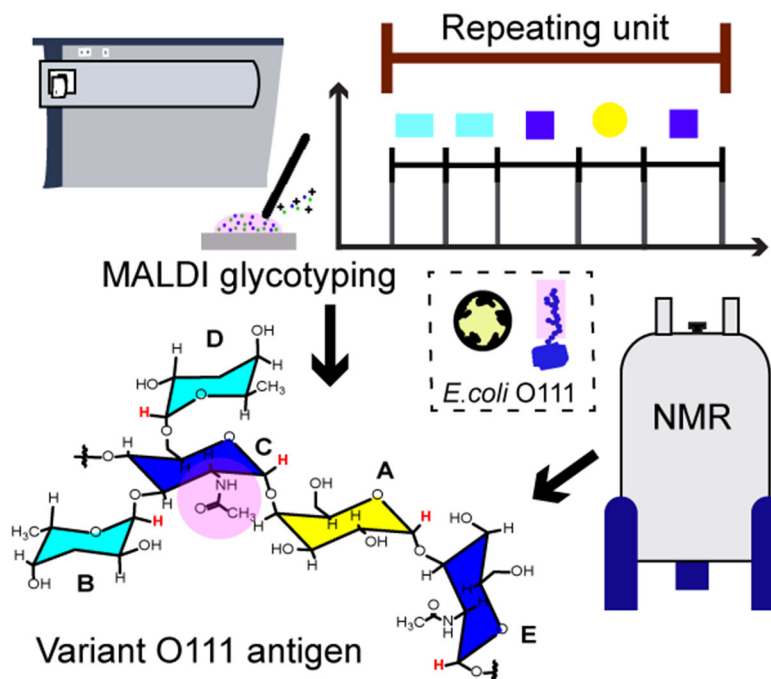


図 1. 大腸菌 O111 抗原の変異の迅速発見と構造決定の模式図

【用語解説】

- *1 腸管出血性大腸菌 … 病原性を有する大腸菌のうち、ベロ毒素を産生し腸管出血などの重篤な疾患症状をもたらす大腸菌の総称。
- *2 リポ多糖 … グラム陰性菌の表層を覆う糖脂質。Lipid A と呼ばれる脂質部分、コアオリゴ糖、及び O 抗原多糖で構成される。Lipid A が過剰な免疫応答を誘導するため、内毒素とも呼ばれる。
- *3 O 抗原多糖 … リポ多糖の最外部多糖成分。2~7 糖の繰り返し単位を持つ。多糖による物理的障壁効果や繰り返し単位の多様性を用いて外敵や環境から身を守っている。宿主の免疫機構にさらされており、獲得免疫（抗体）の標的分子パターン（抗原）となる。大腸菌では発見された順番に番号が付けられている。O111 は大腸菌から 111 番目に発見された O 抗原である。
- *4 亜型 … 特定の型と部分的に特徴が異なる派生型。O 抗原では糖鎖構造が異なるが、同じ抗体が反応するものを亜型として示される。大腸菌 O1 には O1A、O1B、O3C の糖亜型が存在する。
- *5 核磁気共鳴法（NMR） … Nuclear Magnetic Resonance の略。複雑な分子の化学構造決定に利用される。
- *6 グラム陰性菌 … 膜で覆われた細胞小器官（核など）を有さない原生生物の中で、グラム染色と呼ばれる操作において染色色素が脱色される細菌の総称。脱色する性質は、細胞表層を覆うリポ多糖で構成された糖脂質膜の有無により生じる。
- *7 糖脂質 … 糖と脂質の複合体。細胞では糖を親水性部位として細胞外に提示する。提示された糖鎖は親水性バリアの役割を果たすとともに、タンパク質を介したシグナル伝達、感染、分化、免疫等による生物多様性の一翼を担うバイオマーカーとなる。
- *8 MALDI グリコタイピング法 … 糖鎖型（グリコタイプ）をマトリックス支援レーザー脱離イオン化飛行時間型質量分析（MALDI-TOF MS）装置により迅速決定する技術群の総称。比能教授が提唱。糖質を選択的にイオン化できる新規 MALDI 用マトリックス群を活用し、糖タンパク質の直接解析法など、様々な新技術を実現・発表している。
- *9 バイオマーカー … 生物の固有の特徴や疾患などの状態変化の指標となるもの。PCR や抗原抗体反応によるコロナウイルスの診断もコロナウイルスの持つ特徴的な分子配列を指標としている。
- *10 バイオリソースプロジェクト … 生命科学研究のためのバイオリソース（生物遺伝資源）の収集・保存・提供を行う文部科学省のプロジェクト。