腸内細菌の組織血液型決定抗原様物質分泌関連遺伝子に関する研究

東北大学工学部建築社会環境工学科　学生会員　○小島友祐
東北大学大学院工学研究科　非会員　AMARASIRI Mohan
東北大学大学院工学研究科　正会員　佐野大輔

１．はじめに

ノロウイルスなどの胃腸炎ウイルスは，感染受容体として腸管上皮細胞表面の組織血液型決定抗原（HBGA）を利用する[1)]．組織血液型決定抗原とは，抗原構造を含む糖鎖であり，ヒトの赤血球表面だけでなく，腸管上皮細胞表面上にも存在することが確認されている.また，グラム陰性細菌の一部は HBGA 様物質を分泌することが確認されており，例えば *Enterobacter cloacae* SENG-6 株は，分泌 HBGA 様物質によりノロウイルス様粒子を強く捕捉することが報告されている[2)]．以上の知見から，HBGA 様物質陽性細菌は胃腸炎ウイルスを捕捉し，ヒトへの感染効率や水環境中挙動に対し影響を及ぼすと考えられる．本研究では，形質転換を用いたマーカー遺伝子の導入により，*Enterobacter cloacae* SENG-6 株の HBGA 様物質分泌関連遺伝子に関する情報を得ることを試みた．

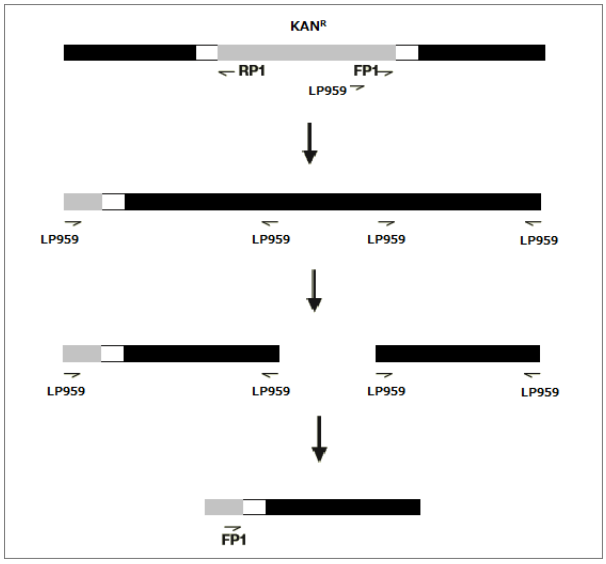

図１．RATE PCR の概要図．KAN^R はトランスポゾンに含まれるカナマイシン耐性遺伝子．FP1，LP959 はトランスポゾンの塩基配列に特異性を持つプライマー．LP959 により DNA 断片を増幅し，FP1 によってシーケンシングを行った．

２．方法

Enterobacter cloacae SENG-6 の形質転換はエレクトロポレーションにより行った．カナマイシン耐性を保持するトランスポゾンをエレクトロポレーションにより導入し，カナマイシン耐性を得た *Enterobacter cloacae* SENG-6 変異株の選択培養及び単離を行った．トランスポゾンは，EZ:Tn5™<kan-2>tnp Tranposome kit(epicentre 社)を使用した．次に，単離した変異株の HBGA 様抗原を検出するために，血液型抗原検出キットである ABOsphia(鎌倉テクノサエンス社)と，ELISA(Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay)を行った．これらの試験で抗原発現量が低下していると認められた変異株をストックとして保存した．

得られた変異株からゲノム DNA を抽出し，RATE PCR[3)] を行った．RATE PCR は，3 ステップのシングルプライマーPCR であり，変異株のゲノム DNA において，トランスポゾンが挿入された位置の DNA 断片を増幅させるものである(図１)．その後，アガロースゲル電気泳動により，PCR 産物の有無を確認した．

最後に，得られた PCR 産物に対しシーケンシングを行い，配列を同定することにより，トランスポゾンが挿入された遺伝子の位置を特定した．既往の研究によって明らかになっている *Enterobacter cloacae* SENG-6 株の塩基配列[4)] の参照，あるいは BLAST 検索によって，トランスポゾンが挿入された遺伝子領域を特定し，その遺伝子が HBGA 様物質の分泌に与える影響を考察した．

キーワード：胃腸炎ウイルス，*Enterobacter cloacae* SENG-6，組織血液型決定抗原，形質転換
連絡先：宮城県仙台市青葉区荒巻字青葉 6-6-06　東北大学大学院工学研究科　佐野大輔　022-795-7481

３．結果・考察

エレクトロポレーションによる形質転換を行うことで，*Enterobacter cloacae* SENG-6 変異株ライブラリを作成することに成功した. その後, 血液型抗原検出キットによりHBGA様物質分泌に変化が見られた変異株を 17 株単離した. その中でも変化が顕著であった 4 株について，抗原の発現量を ELISA によって測定した（図２）. 測定結果について t 検定を行ったところ，122304B 株及び 122903F 株は有意水準 5%で有意な差があるとの結論を得た．122402C 株, 122903G 株に関しては，有意水準 5%で帰無仮説が棄却されなかったが，ほぼ常に野生株より低い S/N 比を示すことから，抗原発現量について他の手法により再検討する必要があると考えられた.

塩基配列決定及び BLAST による検索の結果, 122402C 株及び 122401G 株が，多糖の合成に関わる糖転移酵素遺伝子を欠損していることが判明した．*Enterobacter cloacae* SENG-6 の HBGA 様物質は細胞外の多糖中に存在することから[2)]，HBGA 様物質の分泌に糖転移酵素が関わっている可能性は高いと考えられる．しかしながら，122402C 株と 122401G 株とは異なる糖転移酵素遺伝子が失われていた 122401G 株は HBGA 発現量に変化が見られなかったことから．HBGA 発現に関わる糖転移酵素を具体的に同定する作業が今後必要であると言える.

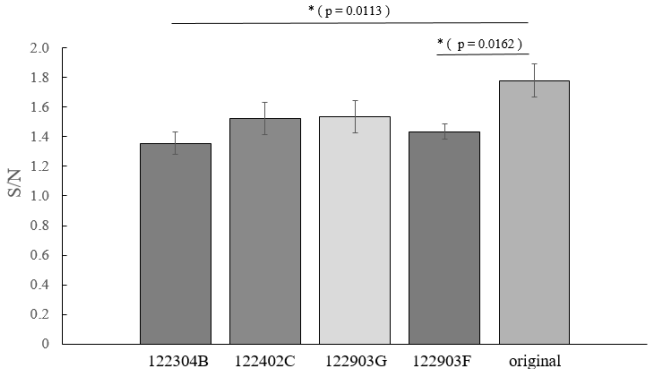

図 2．ELISA による抗原反応量の検討．図に示した 4 株 122304B,122402C,122903G,122903F はいずれも変異株であり，Enterobacter cloacae SENG-6（野生株）は original と示されている．S/N 比は，ELISA によって計測された各株の吸光度(490nm)を，ネガティブコントロールの吸光度で除したものである.

４．結論

エレクトロポレーションによる形質転換によって，*Enterobacter cloacae* SENG-6 変異株のライブラリ作成に成功した．単離した変異株の遺伝子配列決定により，*Enterobacter cloacae* SENG-6 の HBGA 様物質の分泌に糖転移酵素が関与していると考えられた.

謝辞

本研究は，科学研究費補助金・基盤研究(A)(一般)「ノロウイルスの水環境中キャリアーとなる糖鎖分泌細菌の多様性と存在実態の解明」により行われた.

参考文献

1） 白土（堀越）東子，武田直和（2007）. ノロウイルスと血液型抗原 ウイルス,57(2), 181–189.

2） Miura, T., Sano, D., Suenaga, A., Yoshimura, T., Fuzawa, M., Nakagomi, T., Okabe, S. (2013). Histo-Blood Group Antigen-Like Substances of Human Enteric Bacteria as Specific Adsorbents for Human Noroviruses. Journal of Virology, 87(17), 9441–9451.

3） Ducey, T. F., & Dyer, D. W. (2002). Rapid Identification of EZ :: TN TM Transposon Insertion Sites in the Genome of Neisseria gonorrhoeae. Epicentre Forum, 9(2), 6–7.

4） Ishii, S., Amarasiri, M., Hashiba, S., Yang, P., Okabe, S., & Sano, D. (2016). Genome Sequence of Enterobacter cloacae Strain SENG-6, a Bacterium Producing Histo-Blood Group Antigen-Like Substances That Can Bind with Human Noroviruses. Genome Announcements, 4(4), e00893-16