

## B-28 ヒトノロウイルス粒子を特異的に捕捉する ヒト腸内細菌由来細胞外物質 に関する研究

吉村 岳<sup>1\*</sup>・三浦 尚之<sup>2</sup>・佐野 大輔<sup>2</sup>・岡部 聡<sup>2</sup>

<sup>1</sup>北海道大学大学院工学研究院環境創生工学専攻（〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目）

<sup>2</sup>北海道大学大学院工学研究院環境創生工学部門（〒060-8628 北海道札幌市北区北 13 条西 8 丁目）

\*E-mail : [takeshi.yoshimura724@gmail.com](mailto:takeshi.yoshimura724@gmail.com)

### 1. 背景と目的

ノロウイルスによる感染性胃腸炎の流行を防ぐためには、ノロウイルスの生活環を解明し、人間社会における存在分布を把握した上で感染経路を遮断することが有効であると考えられる。しかしながら、環境中でのノロウイルスの存在形態およびその挙動は未だ十分には解明されていない。本研究では、環境中におけるノロウイルスの動態に大きな影響を与える因子として、組織血液型決定抗原（histo-blood group antigen : HBGA）様物質を保持するヒト腸内細菌に着目した。HBGA はヒトノロウイルスが小腸上皮細胞に感染する際のレセプターとして知られているが<sup>1), 2)</sup>、その一方で、ある種のヒト腸内細菌が HBGA 様物質を細胞外に保持していることがこれまでの研究により明らかとなっている<sup>3), 7)</sup>。この HBGA 様物質陽性菌体とヒトノロウイルス粒子の吸着親和性が十分に高いものであれば、ウイルス粒子が感染性胃腸炎患者の体外に排出された後、一定期間以上菌体に吸着した状態で環境中に存在することが期待される。すなわち、このノロウイルス吸着性ヒト腸内細菌の存在は、ノロウイルスの生活環を決定する重要な要因となりうる。

本研究では、HBGA 様物質を保持する菌株から HBGA 活性を有する細胞外物質（extracellular polymeric substances : EPS）を抽出し、ノロウイルス粒子との相互作用評価を行った。

### 2. 方法

#### (1) 菌体からの EPS 抽出

HBGA 活性が最も高い菌株として *Enterobacter* sp. SENG-6 (*E. cloacae* ATCC 13047<sup>T</sup> に近縁) を、SENG-6 より HBGA 活性の低い株として *E. coli* K12 を、HBGA 活性を示さない株として *S. epidermidis* ATCC 35984 をそれぞれ培養し、EPS を抽出した。EPS の抽出効率は TOC により評価した。

#### (2) ELISA による抽出 EPS の HBGA (A 抗原) 活性確認

PBS (pH6.5) で総タンパク質濃度 20μg/mL に調整した NoVLP GII.3 および GII.6 溶液 40μL を ELISA 用プレートに固定化し、5%BSA/PBS でブロッキングを行った。その後、EPS 試料、抗 A マウス IgM 抗体、及び HRP 標識抗マウス IgM ヤギ抗体を 40μL ずつ順に作用させた。各ステップの間では PBS でウェルを 2~4 回洗浄した。OPD 発色基質溶液を作用させ、2M 硫酸で反応を止めた後、プレートリーダー (ARVO MX) を用いて波長 490nm、0.1 秒での吸光度を測定した。

#### (3) HBGA 活性を有する EPS の分子量推定

ナノセップ遠心ろ過デバイスを用いた限外ろ過 (MWCO : 300kDa) を行うことで抽出 EPS の分画を行い、ろ液中に含まれる抽出 EPS が保持する A 型抗原量を定量した。

#### (4) QCM による NoVLP-EPS 間の吸着親和性評価

総タンパク質濃度 20μg/mL に調整した NoVLP GII.6 溶液 50μL を水晶発振子に固定化し、0.1% BSA/PBS でブロッキングを行った。Single-Q 0500 の反応槽に水晶発振子を取り付け、PBS で満たし、装

置内温度 37°C, 攪拌速度 300rpm の条件で運転を開始した。振動数が安定した後、既知の濃度のサンプルを一定量ずつ添加し、振動数変化を記録した。実験データを元に吸着等温線を作成し、吸着平衡定数 ( $K_a$  [ $M^{-1}$ ]) を算出した。

### (5) EPS の糖鎖構造解析

(1)で示した手順により抽出した EPS を、1.0M トリフルオロ酢酸を用いて 100°C で 1 時間熱処理し、遠心分離 (12,000 x g, 30 分) により脂質の除去を行った。上清を Bio-Gel P2 Gel 充填カラムにより脱塩処理し、凍結乾燥によりペレット化した。その後、糖鎖特異的捕捉処理を施し、MALDI-TOF/MS による質量分析を行った。

## 3. 結果と考察

### (1) ELISA による抽出 EPS の HBGA (A 抗原) 活性確認

抽出 EPS の TOC 値を測定したところ、*Enterobacter* sp. SENG-6 由来 EPS は  $0.239 \pm 0.056 \text{ mg/mL}$ , *E. coli* K12 由来 EPS は  $0.155 \pm 0.008 \text{ mg/mL}$ , *S. epidermidis* ATCC 35984 由来 EPS は  $0.147 \pm 0.03 \text{ mg/mL}$  であった。

HBGA 活性が確認されている菌株である *Enterobacter* sp. SENG-6 および *E. coli* K12 双方に由来する EPS を用いた場合において、NoVLP GII.3 および GII.6 と吸着した A 抗原様物質の存在を示す信号が確認された (図 1)。よって、これらのヒト腸内細菌は EPS 中に A 抗原様物質を有しており、ノロウイルス粒子の吸着サイトとなりうることが示唆された。

### (2) 抽出 EPS の分子量推定

限外ろ過 (MWCO : 300kDa) 後、*Enterobacter* sp. SENG-6 由来 EPS ではろ液中の A 抗原様物質の存在を示す信号が有意に低下した (図 2)。また、SENG-6 由来 EPS は、限外ろ過後に TOC 値が 50% 減少した (図 2)。これらの結果から、SENG-6 の EPS には分子量 300kDa 以上の成分にノロウイルスとの吸着に関わりうる A 抗原様物質が多く含まれると考えられた。

### (3) NoVLP—EPS 間の吸着親和性評価

EPS は粘着性の高い物質であるため、全ての菌由来の EPS においてセンサーに対する非特異的な沈着が生じ振動数が減少したが、*Enterobacter* sp. SENG-6 の場合には、NoVLP 存在下で振動数の有意な減少が

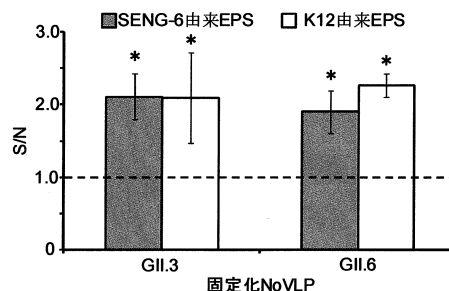


図 1. ELISA による A 抗原様物質の検出結果 (\* : 5%有意)

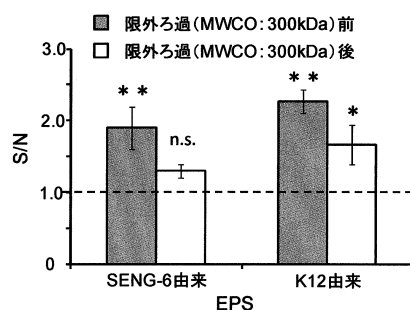


図 2. ELISA による A 抗原様物質の分子量推定 (NoVLP GII.6 をリガンドとして固定化, \* : 5%有意, \*\* : 1%有意, n.s. : 有意差なし)

見られた (図 3)。よって、この有意に減少した振動数分の EPS 吸着量 ( $\Delta\Delta F = [\text{NoVLP 固定化センサーを用いた場合の } \Delta F] - [\text{NoVLP 未固定センサーを用いた場合の } \Delta F]$ ) が NoVLP との特異的吸着分に相当すると考え、Langmuir モデルを用いて吸着能解析を行った (図 4)。解析の結果、NoVLP GII.6 と SENG-6 由来 EPS の間の吸着平衡定数  $K_a$  は  $3.1 \times 10^6 [M^{-1}]$  以上と推定された。この値は、(3)で示した結果より、SENG-6 由来 EPS の分子量を 300kDa 以上と算出したものである。一般的に、抗原抗体反応における吸着平衡定数値は  $10^6$ – $10^9$  であることが知られているため、NoVLP GII.6 と SENG-6 由来 EPS 間の吸着は、一般的な抗原抗体相互作用と同程度の親和性を有すると言える。

### (4) EPS の糖鎖構造解析

*Enterobacter* sp. SENG-6 由来 EPS を精製し、MALDI-TOF/MS により質量分析した結果、ヘキソース (グルコースまたはガラクトース) からなる繰り返し構造が多く存在することが明らかとなった (図

5). また、ヘキソース、N-アセチルヘキソサミン (N-アセチルグルコサミンまたは N-アセチルガラクトサミン)、デオキシヘキソース (フコース) からなる糖鎖構造の存在も確認された。以上の結果から、ヒトの HBGA (ガラクトース、N-アセチルグルコサミン、N-アセチルガラクトサミン、フコースにより構成) と極めて近い構造をもつ糖鎖が存在する可能性が示唆された。

#### 4. 結論

ヒト腸内細菌 *Enterobacter* sp. SENG-6 由来 EPS には、ヒトの HBGA と酷似した糖鎖構造が存在し、これらの HBGA 様物質は分子量 300kDa を超える繰り返し構造をもつことが示唆された。また、SENG-6 由来 EPS とヒトノロウイルス粒子との吸着平衡定数  $K_a$  は  $3.1 \times 10^6$  以上であることが確認された。

#### 5. 今後の展望

*Enterobacter* sp. SENG-6 から抽出した EPS に含まれる HBGA とノロウイルス粒子が直接相互作用していることを示す必要がある。また、MS/MS 等によりさらに詳細に質量分析を行うことにより、EPS 中の HBGA 様物質がヒト HBGA とどの程度近い構造を有しているか解明していく予定である。

#### 6. 参考文献

- 1) Ming et al. 2005. Norovirus and its histo-blood group antigen receptors: An answer to a historical puzzle. *Trends Microbiol.* 13: 285-293
- 2) Nasir et al. 2009. A study of norovirus-HBGA interactions. Chalmers University of Technology, University of Gothenburg.
- 3) Springer et al. 1961. Blood Group Activity Of Gram-Negative Bacteria. *J. Exp. Med.* 113: 1077-1092
- 4) Xiangliang et al. 2010. A comparison of five extraction methods for extracellular polymeric substances (EPS) from biofilm by using three-dimensional excitation-emission matrix (3DEEM) fluorescence spectroscopy. *Water SA.* 36: 111-116
- 5) Ito et al. 2006. Analysis on molecular weight of extracellular materials of photosynthetic bacteria. *お茶の水女子大学生活工学研究* 8(1): 106-107
- 6) Li et al. 2005. In-source fragmentation and analysis of polysaccharides by capillary electrophoresis / mass spectrometry : *Rapid Commun. Mass Spectrum.*

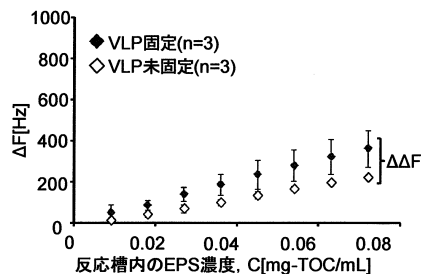


図 3. NoVLP GII.6 固定および未固定センサーに対する SENG-6 由来 EPS の吸着等温線

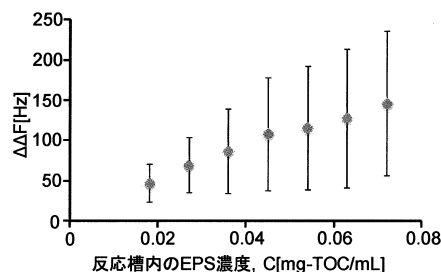


図 4. NoVLP GII.6 と SENG-6 由来 EPS との相互作用を示す吸着等温線

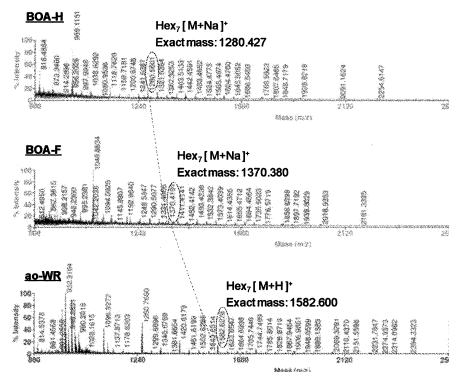


図 5. SENG-6 由来 EPS の質量分析により得られた MS スペクトル

- 19: 1305-1314
- 7) Yi et al. 2006. Formation of a new O-polysaccharide in *Escherichia coli* O86 via disruption of a glycosyltransferase gene involved in O-unit assembly: *Carbohydrate Research* 341: 2254-2260