

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：34602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08499

研究課題名(和文) 薬剤耐性大腸菌ST131におけるバイオフィーム形成および胃酸耐性能に関する研究

研究課題名(英文) Biofilm formation and gastric acid resistance capacity in antimicrobial-resistant *E. coli* ST131.

研究代表者

中村 彰宏 (Nakamura, Akihiro)

天理大学・医療学部・准教授

研究者番号：30647087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究はわれわれの既報で発見した抗菌薬耐性大腸菌ST131における特異的タンパク質アミノ酸変異のうち、YahO、CybCおよびHdeAについて、その機能を明らかにすることを目的とする。バイオフィーム形成および酸耐性能に着目し、mRNA発現定量および各種表現型試験を実施したが、特に有意な結果は得られなかった。一方、高発現株によるプルダウンアッセイにおいて、YahO E34Aのみタンパク質間相互作用を示唆するHchAタンパク質を検出した。加えて、全ゲノム解析およびRNA-seq解析においてST131パンデミッククレードC1-M27を低栄養培養した際に高発現する特徴的な遺伝子発現を複数発見した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で得られた新知見は、近年世界的に懸念されている抗菌薬耐性菌の蔓延のメカニズムを解明する一助となる。特に今回得られた新知見のうち、ST131が低栄養培地において他のクローンには持ち備えていない特殊な生存戦略メカニズムを解明するかもしれない。大変重要な研究データとなる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the function of YahO, CybC and HdeA among the specific protein amino acid mutations in antimicrobial resistant *E. coli* ST131 discovered in our previous report. Focusing on biofilm formation and acid resistance capacity, mRNA expression quantification and various phenotypic tests were performed, but no particularly significant results were obtained. On the other hand, in pull-down assays with high expressing strains, only YahO E34A detected HchA proteins, suggesting protein-protein interactions. In addition, whole-genome and RNA-seq analyses revealed several characteristic gene expressions that were highly expressed when ST131 pandemic clade C1-M27 was grown in low-nutrient culture.

研究分野：臨床微生物学、抗菌薬耐性菌

キーワード：Escherichia coli ST131 YahO タンパク質間相互作用解析 全ゲノム解析 RNA-Seq解析

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

基質拡張型 β ラクターマーゼ (ESBL) やカルバペネマーゼを産生する薬剤耐性腸内細菌目細菌は、2002 年以降 *Escherichia coli* の菌種を中心に病院内のみならず市中においても急増傾向にあり (Nicolas-Chanoine MH, et al. Clin Microbiol Rev 2014., Nakamura A, et al. J Infect Chemother 2016.) 2013 年には WHO や米国 CDC が人類の脅威であるとの警告を発した。また、このまま薬剤耐性菌が増加し続けると、2050 年には薬剤耐性菌感染症関連死亡率は現在最も死亡率の高い悪性腫瘍関連死亡率を上回るとの試算も報告されており、今後新たな薬剤耐性菌蔓延防止策が求められている (The JIM O'Neill commission, UK, 2016.) この薬剤耐性 *E. coli* 世界的蔓延の原因は sequence type 131 クローン (ST131) とよばれる単一クローンの世界的なパンデミックであるといわれており、ヒト由来臨床材料より分離される ESBL 産生 *E. coli* 全体の約 8 割を占める。ST131 は他のクローンに比べ、ヒト腸管内に長期間定着することが可能であり、尿路感染症を主とする様々な腸管外感染症を引き起こすが、その侵入門戸や長期間定着の詳細なメカニズムは不明である (Woerther PL, et al. Clin Microbiol Rev 2013.) われわれは過去の研究において、ST131 に特異的ないくつかのアミノ酸変異を伴うタンパク質の抽出に成功した (Nakamura A, et al. Sci Rep 2019., Nakamura A, et al. Diagn Microbiol Infect Dis 2015.) そのなかに、E34A を有する YahO、7 箇所のアミノ酸変異を有する可溶性チトクローム b562、および Q92K と N94S を有する HdeA の 3 つが存在し、前者 2 つは現在のところ詳細な機能は不明であるが、各種バイオインフォマティクス手法によるタンパク質間相互作用予測によってバイオフィーム形成への関与が示唆された。Kudinha T らは ST131 が他のクローンに比べてバイオフィーム形成能が高いと報告しているが、近年 Flament-Simon SC らや Surgers L らは全く異なる結果を報告しており、その真否は不明のままである (Kudinha T, et al. J Clin Microbiol 2013., Flament-Simon SC, et al. Front Microbiol 2019., Surgers L, et al. Int J Med Microbiol 2019.) 一方、HdeA は酸ストレスシャペロンであることは現在知られているが、その詳細な酸ストレス応答へのメカニズムはわかっていない。われわれは、これらの研究成果より ST131 がヒト腸管内に定着するメカニズムとして、ST131 は胃酸抵抗性を持ち、容易にヒト腸管内に到達、かつその腸管内でバイオフィームを形成し、長期定着している可能性を推測している。

ST131 は自身が世界的パンデミックを成功させる為に巧みに進化してきた高性能なクローンであり、本クローンの世界的蔓延のメカニズムを解明することは、今後新たに出現してくるであろう薬剤耐性菌の蔓延防止策を講じる上で大変重要な課題である。

2. 研究の目的

本研究の目的は ST131 が世界的パンデミックを遂げた原因を解明するため、われわれが過去の研究で発見したいくつかの ST131 特異的タンパク質の機能およびそれに伴うアミノ酸変異の影響を明らかにすることである。これらのタンパク質は腸管内バイオフィーム形成や胃酸耐性に関与している可能性があり、それらを証明することで、ST131 がヒト腸管内に長期定着するメカニズムが明らかになる可能性を秘めている。

本研究で得られる成果は、今後の世界的蔓延が懸念されている様々な薬剤耐性菌の蔓延を防止するためのストラテジーを構築するために大変重要な情報となるため、本研究遂行の臨床的意義は極めて高い。

3. 研究の方法

本研究はわれわれがこれまでに発見してきた ST131 特異的タンパク質のうち、バイオフィーム形成能関与を示唆する YahO および可溶性チトクローム b562、酸ストレスシャペロン関連 HdeA の機能とそれに伴うアミノ酸変異の影響について明らかにするため、研究期間内に以下の研究を実施した。

- 1) 各種表現型試験によるバイオフィーム形成能および酸耐性能の検証
- 2) pET システムを用いた各種タンパク質の高発現株の作製
- 3) タグ付きタンパク質を用いたプルダウンアッセイによるタンパク質間相互作用解析
- 4) 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析および RNA-Seq 解析

- 1) 各種表現型試験によるバイオフィーム形成能および酸耐性能の検証

対象は ST131 : 83 株、non-ST131 : 38 株の合計 121 株を使用し、各種タンパク質の機能予測情報を基に、各種表現型試験を実施した。バイオフィーム形成能試験は普通 LB プロスおよび低栄養 M9 プロス (0.4% グルコース含有) 培養によるクリスタル紫法を用いて ST131 および non-ST131 のバイオフィーム形成能を比較した。陽性対象は *E. coli* ATCC35218 および *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 を使用した。酸耐性試験は Kay KL らの方法 (Kay KL, et al. Front Microbiol 2017.) に基づき、酸は酢酸溶液および塩酸溶液の 2 種類で実施した。

- 2) pET システムを用いた各種タンパク質の高発現株の作製

ST131 特異的タンパク質のうち機能不明な YahO について、そのコーディング遺伝子を高発現 pET ベクター (Novagen) に遺伝子導入し、ST131 および non-ST131 特異的配列に対して 2 種類の遺伝子組み換え体を作製した。pET ベクターは pET-28a を使用し、それぞれ His タグ付きおよびタグ無し 2 種類計 4 株の高発現株を作製した。高発現用コンピテントセルは *E. coli* BL21 pLys (Novagen) を使用した。

3) タグ付きタンパク質を用いたプルダウンアッセイによるタンパク質間相互作用解析

2) で作成したタグ付き各種高発現タンパク質を用いて、磁性体ニッケル粒子 MagneHis-Ni-Particles (プロメガ) によるプルダウンアッセイを実施した。プルダウンアッセイで得られたタンパク質間相互作用を疑うタンパク質の同定は LC-MS/MS によるタンパク質アミノ酸配列解析を実施した。得られたペプチド情報は Mascot Database Search (http://www.matrixscience.com/cgi/search_form.pl?FORMVER=2&SEARCH=MIS) を用いてタンパク質同定を実施した。

4) 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析および RNA-Seq 解析

全ゲノム解析は ST131 : 83 株 (クレード A : 22 株、クレード B : 12 株、クレード C : 49 株 [C1-nM27 : 26 株、C1-M27 : 11 株、C2 : 11 株、other C : 1 株])、non-ST131 : 38 株の合計 121 株を使用し、ショートリードシーケンサー MiSeq (illumina 社) によるドラフトゲノムを構築し、全ゲノム解析による染色体構造比較を実施した。リファレンス配列は C2 クレードである EC958 (アクセッション番号 HG941718) および C1-M27 クレードである H105 (アクセッション番号 CP021454) を用いた。マッピングは Burrows-Wheeler Aligner (BWA) -MEM2、構造比較は BLAST Ring Image Generator (BRIG) を用いた。また周辺構造解析は EasyFig を使用し可視化した。

また、RNA-Seq 解析は ST131 のうち C1-M27、C1-nM27、B の各 1 株ずつを用い、NovaSeq (illumina 社) による測定後、エンリッチメント解析による比較を実施した。得られたリードは FastQC で品質評価、Trimomatic でトリミング、Bowtie2 で参照配列にマッピング、FeatureCounts でアラインメントリードをカウントし、DESeq2 で解析を行った。エンリッチメント解析は Gene Ontology (GO) term と Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) パスウェイ解析の両方を行い、大腸菌 K-12 substr. MG1655 (アクセッション番号: NC_000913) を参照配列として用いた。

4. 研究成果

ST131 特有遺伝子を LB ブロスや低栄養 M9 ブロスによる培養条件下で mRNA 発現量に変化がともなうか、またバイオフィーム形成試験や酸耐性試験を表現型試験で実験したが、これらの mRNA 発現定量試験および表現型試験において優位な結果は得られなかった。次に His タグ付き高発現ベクターを用いたプルダウンアッセイを実施し、タンパク質間相互作用解析を実施した。その結果、われわれが過去の研究で発見した ST131 特異的タンパク質アミノ酸変異のうち、YahO E34A のみタンパク質間相互作用を示す HchA タンパク質を検出した (図 1)。現在、抗体作成、さらにウェスタンブロッティングなどの詳細な解析を実施中である。

次に、次世代シーケンサーを用いて対象 121 株における全ゲノム解析による染色体構造比較、および網羅的遺伝子発現確認のための RNA-Seq 解析をパンデミッククレード C1-M27、非パンデミッククレード C1-nM27 および B の 3 株を対象に実施した。その結果、染色体構造解析ではパンデミッククレード C1-M27 において、ATP binding protein を含む特異的な遺伝子領域を抽出した (図 2)。また、ST131 パンデミッククレード C1-M27 では低栄養 M9 ブロス培養条件下において、通常のエネルギー代謝経路である TCA サイクルではなく、特殊な代謝経路を利用して代謝していることや一部の病原因子などが高発現していることが示唆された (図 3)。本知見についてもさらに詳細な解析を実施中である。

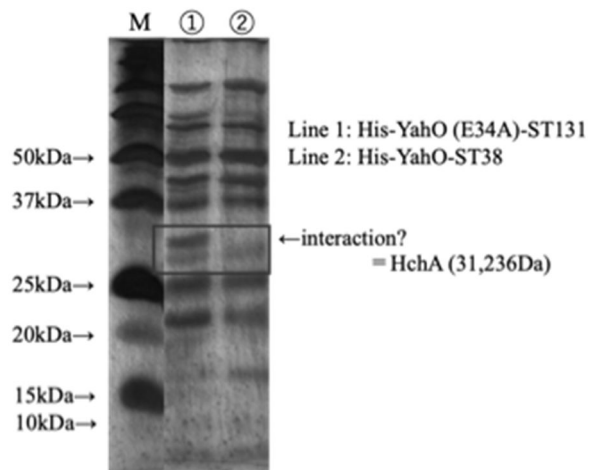


図1. Hisタグ高発現株におけるプルダウンアッセイの結果
Hisタグ(分子量0.8kDa)、YahO(分子量9.9kDa)

【約4500kbpC1-M27特異領域】

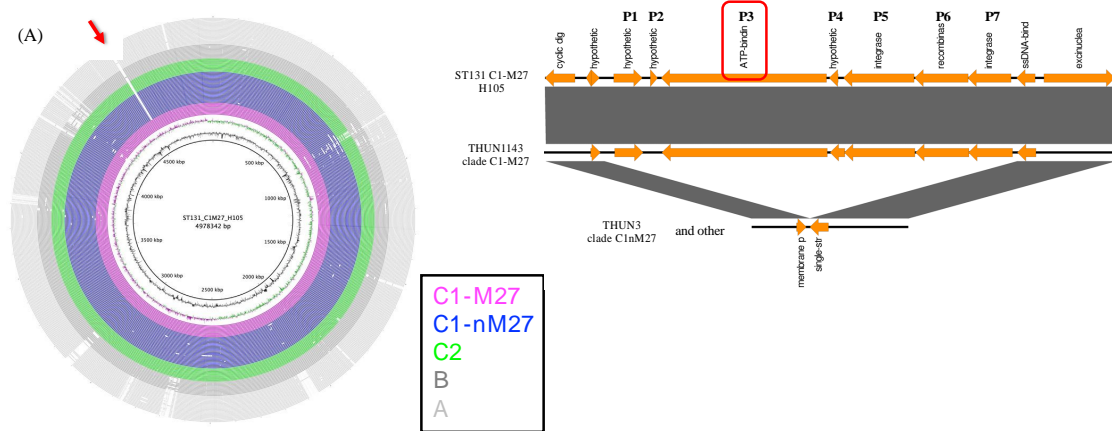


図2. 全ゲノム解析によるST131各クレードの染色体構造比較およびその差異を認めた特異的領域の周辺構造解析結果

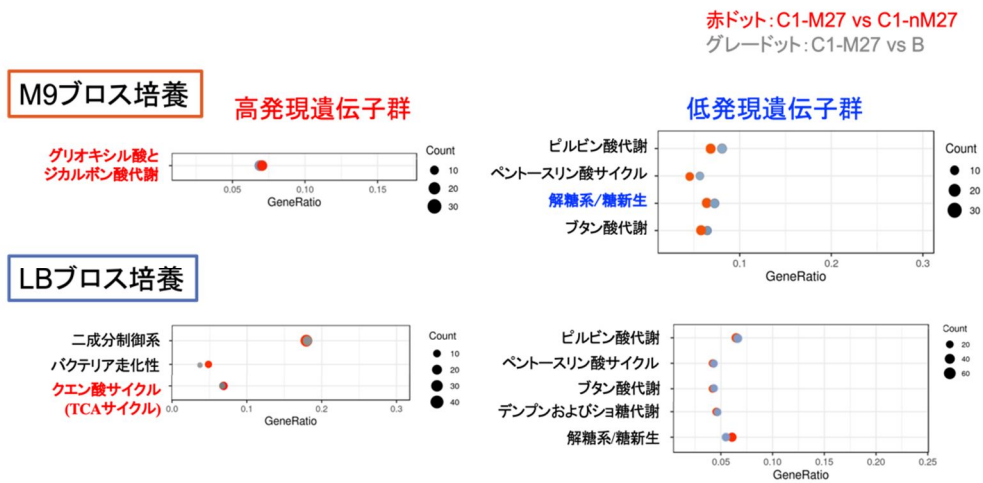


図3. 低栄養M9ブロスおよび普通LBブロス培養条件下におけるRNA-Seq解析によるエンリッチメント解析結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nakamura Akihiro, Komatsu Masaru	4. 巻 206
2. 論文標題 Performance evaluation of whole genome metagenomics sequencing with the MinION nanopore sequencer: Microbial community analysis and antimicrobial resistance gene detection	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Microbiological Methods	6. 最初と最後の頁 106688 ~ 106688
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.mimet.2023.106688	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakamura Akihiro, Nakamura Tatsuya, Niki Makoto, Kuchibiro Tomokazu, Nishi Isao, Komatsu Masaru	4. 巻 12
2. 論文標題 Genomic Characterization of ESBL- and Carbapenemase-Positive Enterobacteriaceae Co-harboring mcr-9 in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 665432
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.665432	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村彰宏、小松方
2. 発表標題 ナノポアシークエンサーMinIONを用いたメタゲノム解析の性能評価 菌叢解析および薬剤耐性遺伝子解析
3. 学会等名 第71回日本医学検査学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 Escherichia coli sequence type 131を語る
3. 学会等名 第34回日本臨床微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 ESBL産生菌の基礎から新知見まで
3. 学会等名 第33回日本臨床微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 Escherichia coli ST131のパンデミックと国内事情
3. 学会等名 第33回日本臨床微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村彰宏、小松方
2. 発表標題 ナノボアシークエンサーMinIONを用いたメタゲノム解析による菌叢解析および薬剤耐性遺伝子解析の性能評価
3. 学会等名 第33回日本臨床微生物学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	小松 方 (Komatsu Masaru) (00626814)	天理大学・医療学部・教授 (34606)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------