

令和 3 年 6 月 18 日現在

機関番号：34606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16189

研究課題名(和文)多剤耐性大腸菌ST131クローン特異的タンパク質の同定とその機能解析

研究課題名(英文)The function and identification of the specific proteins of multidrug-resistant Escherichia coli ST131

研究代表者

中村 彰宏(Nakamura, Akihiro)

天理医療大学・医療学部・講師

研究者番号：30647087

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、大腸菌ST131特異的タンパク質として、7655 m/zを示すE34Aアミノ酸置換を有するYah0タンパク質(機能不明)、11783 m/zを示す可溶性チトクロームb562(機能不明)、9710 m/zを示すHdeA(酸ストレス応答に関連)および8351 m/zを示すYjbJタンパク質(機能不明)などが検出された。また、11783 m/zを示す可溶性チトクロームb562において、ST131細分類Cクレードに特有の配列を発見した。現在のところ機能不明なYah0や可溶性チトクロームb562はそのタンパク質間相互作用予測解析からバイオフィーム形成に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ESBLやカルバペネマーゼを産生するEscherichia coli ST131の世界的なパンデミックが問題視されているが、その原因は未だ明らかになっていない。われわれはST131パンデミックの原因を追究すべく、MALDI-TOF MSを用いてST131特異的タンパク質を探索した。その結果主に4つのアミノ酸置換をともなうタンパク質を発見した。しかし、これらの中にはその機能が現在のところ不明なものも多く存在する。今後、これらの機能を明らかにすることにより、薬剤耐性菌が世界的パンデミックを引き起こす原因が追究できる可能性を秘めている。

研究成果の概要(英文)：Escherichia coli ST131-specific proteins were detected, including Yah0 protein with E34A amino acid substitution with 7655 m/z (unknown function), soluble cytochrome b562 with 11783 m/z (unknown function), HdeA with 9710 m/z (acid stress response related), and YjbJ protein with 8351 m/z (unknown function). In addition, we found a sequence unique to ST131 C clade in soluble cytochrome b562 with 11783 m/z. The predicted protein-protein interactions of Yah0 and soluble cytochrome b562, whose functions are currently unknown, suggest that they may be related in biofilm formation.

研究分野：臨床微生物学

キーワード：Escherichia coli sequence type 131 Yah0 可溶性チトクロームb562 HdeA YjbJ

## 1. 研究開始当初の背景

基質拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (ESBL) やカルバペネマーゼを産生する多剤耐性腸内細菌科細菌は、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 年には米国疾病予防管理センター (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. )。この多剤耐性 *E. coli* 世界的蔓延の原因は、ST131 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。また、ST131 は各種尿路病原因子や薬剤耐性因子を高率に保有しており、難治性尿路感染症や重症感染症に深く関与しているため、本クローンの重要性が注目されている (Woerther PL, et al. Clin Microbiol Rev 2013. )。ST131 が世界的パンデミックを遂げた原因の解明は、将来の薬剤耐性菌世界的蔓延防止策を講じる上で最重要課題であるが、その原因は未だ明らかになっていない。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、今後の新たな薬剤耐性菌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

本研究の目的はわれわれが MALDI-TOF MS を用いて、これまでに発見してきたいくつかの ST131 特異的バイオマーカーピークをタンパク質単離精製および同定し、その機能を解明することである。今後、これら未同定の ST131 特異的バイオマーカーピークについてタンパク質同定およびその機能解析を実施することで、ST131 が世界的蔓延を遂げた原因を追究できる可能性を秘めている。また、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新しいストラテジーを構築することが可能となるため、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 MALDI-TOF MS を用いて発見してきた ST131 特異的バイオマーカーピークのタンパク質精製および同定、そしてその特異的タンパク質機能解析のために、以下の研究を実施した。

### 1) 各種 ST131 特異的タンパク質の単離精製および同定

われわれがこれまでに MALDI-TOF MS を用いて発見した ST131 特異的タンパク質をクルードな ST131 クローンタンパク質から HPLC によって単離精製した。HPLC 機器は 1220 Infinity LC (Agilent Technologies) を用い、使用カラムは TSKgel ODS 100V (Tosoh Bioscience) を使用し単離精製した。精製したサンプルはペプチド分離用 Tricine SDS-PAGE を実施し、切り出したゲル片はトリプシン消化後、LC-MS/MS によるアミノ酸配列解析を実施した。使用機器は LCMS-IT-TOF (島津製作所) を用いた。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](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。翻訳後修飾は Mascot Error Tolerant Search を用いた。

### 2) 同定したタンパク質に対する塩基配列解析

同定した各種タンパク質はその遺伝子情報を基に各種プライマーを設計し、PCR ダイレクトシーケンシングにて塩基配列を決定した。その塩基配列情報から ST131 と non-ST131 間の各種タンパク質のアミノ酸配列における相違を検索した。

### 3) 機能不明なタンパク質に対するタンパク質間相互作用解析

各種 ST131 特異的タンパク質同定後、機能不明なタンパク質はそのコーディング遺伝子を高発現 pET ベクター (Novagene) に遺伝子導入し、ST131 および non-ST131 特異的配列の 2 種類の GST 融合タンパク質を作製し、タンパク質間相互作用解析を実施した。ベクターは pET-41a を使用した。

## 4. 研究成果

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. [ 図 1 ], 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 [ 図 1 ] .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 は酸ストレスシヤ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ため、引き続きプロテオミクス解析を実施していく予定である。

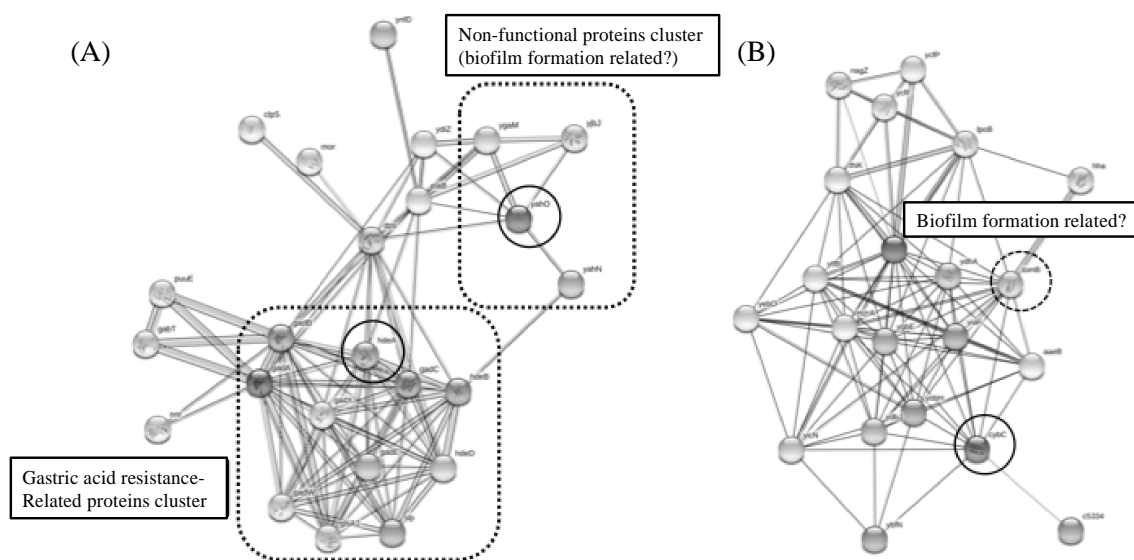


図1. 各種ST131特異的タンパク質におけるタンパク質間相互作用予測 . (A) *E. coli* K12 MG1655データベース , (B) *E. coli* CFT073データベース

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakamura A, Kohno A, Noguchi N, Kawa K, Ohno Y, Komatsu M, Yamanishi H	4. 巻 15
2. 論文標題 Prediction of Uropathogens by Flow Cytometry and Dip-stick Test Results of Urine Through Multivariable Logistic Regression Analysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0227257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Nakamura A, Komatsu M, Ohno Y, Noguchi N, Kondo A, Hatano N	4. 巻 9
2. 論文標題 Identification of specific protein amino acid substitutions of extended-spectrum $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing Escherichia coli ST131: a proteomics approach using mass spectrometry.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 8555
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -
1. 著者名 Harada S, Aoki K, Ishii Y, Ohno Y, Nakamura A, Komatsu M, Tateda K	4. 巻 53
2. 論文標題 Emergence of IMP-producing hypervirulent Klebsiella pneumoniae carrying a pLVPK-like virulence plasmid.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Antimicrob Agents	6. 最初と最後の頁 873-875
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 Maeda M, Maeda T, Nakamura A, Komatsu M	4. 巻 25
2. 論文標題 A case of otitis externa caused by Schizophyllum commune: An approach to antimicrobial stewardship using Gram staining of otorrhea in a medical clinic.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 731-734
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 中村彰宏、大野裕貴、野口延由、小松方	4. 巻 7
2. 論文標題 多剤耐性Escherichia coli sequence type 131が保有するYah0特異的アミノ酸変異E34Aが与えるタンパク質間相互作用および発現に関する研究	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 天理医療大学紀要	6. 最初と最後の頁 16-21
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 中村彰宏	4. 巻 48
2. 論文標題 技術講座 一般 尿沈渣中の白血球形態とその鑑別	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 検査と技術	6. 最初と最後の頁 118-123
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 野口延由、中村彰宏、小松方	4. 巻 7
2. 論文標題 Next Generation Sequencerを用いた細菌の全ゲノム解析方法	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 天理医療大学紀要	6. 最初と最後の頁 37-40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Maeda M, Maeda T, Nakamura A, Komatsu M	4. 巻 21
2. 論文標題 A case of otitis externa caused by Schizophyllum commune: an approach to antimicrobial stewardship using Gram staining of otorrhea in a medical clinic	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 30431-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2019.03.005.	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 Kuchibiro T, Komatsu M, Yamasaki K, Nakamura T, Nishio H, Nishi I, Kimura K, Niki M, Ono T, Sueyoshi N, Kita M, Kida K, Ohama M, Satoh K, Toda H, Mizutani T, Fukuda N, Sawa K, Nakai I, Kofuku T, Orita T, Watari H, Shimura S, Fukuda S, Nakamura A, Wada Y.	4. 巻 24
2. 論文標題 Evaluation of the modified carbapenem inactivation method for the detection of carbapenemase-producing Enterobacteriaceae.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Infect Chemother	6. 最初と最後の頁 262-266
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2017.11.010.	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 -

〔学会発表〕 計12件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 野口延由、中村彰宏、小松方
2. 発表標題 全ゲノム解析によるEscherichia coli ST131パンデミック要因の探索～C1-M27パンデミッククレードの特異的遺伝子変異の探索とその相互作用予測～
3. 学会等名 第36回奈良県医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 求められる尿沈渣検査にするために～微生物・寄生虫～
3. 学会等名 第59回日臨技近畿支部医学検査学会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福田菜々子、中村彰宏、野口延由、大野裕貴、仁木誠、中村竜也、西功、小松方
2. 発表標題 多剤耐性腸内細菌科細菌におけるコリスチン耐性状況とそのメカニズムに関する研究
3. 学会等名 第59回日臨技近畿支部医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 泌尿器疾患における尿一般検査の現状
3. 学会等名 第34回奈良県臨床細胞学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 TOF-MSを極める～MALDI-TOFMSを用いたESBL産生Escherichia coli ST131パンデミッククローンのバイオマーカー探索とそのプロテオミクス解析
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 薬剤耐性菌の検査法～日常検査でここまでできる～：遺伝子検査は日常検査でこう活かせ！～
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口延由、中村彰宏、小松方
2. 発表標題 Escherichia coli ST131のClade分類とGABA permeaseの遺伝子変異の関係性
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大野裕貴、阿部教行、松本学、橋本恵理子、福田砂織、河野久、中村彰宏、松尾収二
2. 発表標題 Desulfovibrio fairfieldensisによる菌血症の一例と文献レビュー
3. 学会等名 第68回日本医学検査学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Nakamura A
2. 発表標題 Proteomics approach to identify the specific proteins of multiple drug-resistant E. coli ST131 by MALDI-TOF MS
3. 学会等名 21th General Meeting The Korean Society of Clinical Microbiology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 ESBL産生大腸菌の進化とパンデミック～ゲノミクス、プロテオミクスレベルからみた考察～
3. 学会等名 第22回近畿耐性菌研究会特別講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村彰宏、野口延由、小松方
2. 発表標題 ESBL産生Escherichia coli ST131における特異的タンパク質同定とそのタンパク質間相互作用予測～ST131クレード別解析を含む～
3. 学会等名 第30回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2018年



1. 発表者名 中村彰宏
2. 発表標題 尿一般検査領域における更なる付加価値情報を再考する～細菌類～
3. 学会等名 第58回日本臨床検査技師会近畿支部医学検査学会（招待講演）
4. 発表年 2018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

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