



# Rapid detection of B2-ST131 clonal group of extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass...

Nakamura, Akihiro

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2016-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6522号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006522>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



## 学位論文の内容要旨

### Rapid detection of B2-ST131 clonal group of extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing *Escherichia coli* by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry: discovery of a peculiar amino acid substitution in B2-ST131 clonal group

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による  
基質拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ産生大腸菌 B2-ST131 クローンの迅速検出法  
: B2-ST131 クローンに特有のアミノ酸置換の発見

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
臨床検査医学分野  
(指導教員: 西村 善博 教授)

中 村 彰 宏

#### 【序論】

近年、基質拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: ESBL) 産生 *Escherichia coli* が院内のみならず市中においても世界的に蔓延している。この世界的蔓延の原因の一つはCTX-M型ESBL産生 *E. coli* B2-ST131クローン (B2-ST131) の世界的なパンデミックである。B2-ST131はESBL産生 *E. coli* の中でも高率にフルオロキノロン系抗菌薬耐性因子や尿路病原因子を保有しているため、疫学上重要なクローンである。また、B2-ST131の多くは $bla_{CTX-M-15}$ を保有しており、そのプラスミドはincompatibility groupsに属するInc FIIに分類され、TEM-1、OXA-1およびaac(6')-Ib-crを同時に産生することが多い。したがって、B2-ST131は $\beta$ ラクタム系抗菌薬以外にも多剤耐性を示すことが多く、感染症治療を実施する上でこのクローンを識別することは重要である。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 (Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry: MALDI-TOF MS) は分離培地上の集落を約10分以内に菌種同定することが可能な迅速性、経済性および正確性に優れた次世代細菌同定ツールである。本研究の目的はMALDI-TOF MSを用いて菌種同定と同時にB2-ST131を迅速同定する方法を確立するためバイオマーカークピークを探索すること、そしてその見いだしたバイオマーカークロタンについてプロテオミクス解析を実施することによりB2-ST131の特徴を明らかにすることである。

#### 【対象および方法】

バイオマーカークピーク探索のための対象菌株は2011年に天理よろづ相談所病院で臨床材料より分離したESBL産生 *E. coli* 74株を使用した。これらの菌株はphylogenetic group、multilocus sequence typing (MLST) およびpulsed-field gel electrophoresis (PFGE) にて特徴付けられたB2-ST131 16株およびother ST 58株を使用し、さらにB2-ST131はO25b抗原およびfimH30サブクローンタイピングを実施した。MALDI-TOF MSの前処理はエタノールギ酸抽出法を実施し、マススペクトル測定はMALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) を用いた。MALDI-TOF MSから得られたマススペクトル波形は、多変量解析ソフトウェアClinProTools v2.2 (Bruker Daltonik) を用いてB2-ST131とother STを識別する最も適当なバイオマーカークピークを探索した。B2-ST131に特有のバイオマーカークロタンは単離精製後にボトムアッププロテオミクス解析およびN末端アミノ酸シーケンスによって同定した。タンパク質の単離精製は硫酸分画、ジエチルアミノエチル (DEAE) によるイオン交換クロマトグラフィーおよびTSKgel Protein C4-300カラムによる逆相高速液体クロマトグラフィーを用い、その後Tricine-SDS-PAGEにて最終精製した。ボトムアッププロテオミクス解析は切り出したゲルをトリプシン消化後、LCMS-IT-TOF (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) によりペプチド情報を得た。得られたペプチド情報は Mascot MS/MS Ion Search を用いてタンパク質同定を実施した。一方、N末端アミノ酸シーケンスはゲルをポリビニルピロリジンジフルオライド膜 (PVDF膜) に転写後、Procise 494 HT (Life Technologies, Tokyo, Japan) を用いてN末端側から10アミ

ノ酸を決定した。プロテオミクス解析を用いて同定されたアミノ酸配列からプライマーを設計し、PCRダイレクトシーケンスにより塩基配列およびアミノ酸配列を比較した。また、これらのデータは2013年に国内医療施設（天理よろづ相談所病院を除く）において臨床材料より分離したESBL産生*E. coli* 51株（西日本由来株17株：東日本由来株34株、B2-ST131 30株：other ST 21株）から構成される別の母集団を用いて、交差検証を実施した。

#### 【結果および考察】

B2-ST131バイオマーカーピークを探索した結果、B2-ST131は7,650 *m/z*、other STは7,707 *m/z* が最も識別能力の高いバイオマーカーピークとして検出された。7,650 *m/z*のバイオマーカーピークの識別能力は、感度100%および特異度89.7%であった。7,650 Daおよび7,707 Daバイオマーカープロテインは共にLC-MS/MSを用いたボトムアッププロテオミクス解析およびN末端アミノ酸シーケンスによってUncharacterized periplasmic protein YahOのmature chainであることが判明した。また、*yahO*遺伝子をターゲットとしたプライマーによるPCRダイレクトシーケンスにより7,650 *m/z*と7,707 *m/z*のピーク分子量の差はE34Aアミノ酸置換が原因であることを証明した。

YahO proteinは1997年にUniProt databaseに登録されたペリプラスム層に存在する機能不明なタンパク質であり、腸内細菌科に局限した所在分布を示す。YahO proteinは*E. coli* O157: H7などが保有するBhsA/McbA familyに属し、そのBhsA proteinは銅の外膜透過性を低減化する機能などが解明されているが、YahO proteinに関しては未だ機能が不明である。この研究で明らかとなったB2-ST131に特有のYahO protein E34Aアミノ酸置換はヒト細胞との親和性や毒素の感受性などに影響し、結果的にヒトに病原性を示す因子と関連しているかもしれない。今後、YahO proteinの機能およびE34Aアミノ酸置換についての研究が興味深い。また、これらのデータは天理よろづ相談所病院を除く国内医療施設由来の別母集団で交差検証され、7,650 *m/z*バイオマーカーピークの識別能力は感度100%および特異度85.7%であった。

近年、Johnsonらの報告（2013年）においてB2-ST131のフルオロキノロン耐性は*fimH30*サブクローンやO25b血清型と非常に密接な関係があるとされている。本研究においても*fimH30*およびO25b血清型を決定したが、これらサブクローン別のMALDI-TOF MSによるタイピングは現在のところ不可能であった。今後、さらに母集団を拡大させた上でサブクローン別にみたタイピングを試みる必要がある。

MALDI-TOF MSはルーチンワークにおいてB2-ST131を迅速かつ簡便に同定可能な手法であり、この成績は適正なエンピリック治療を可能とし、院内感染制御のみならず世界的パンデミックを制御する可能性も秘めている。

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 2546 号	氏 名	中村 彰宏
論文題目 Title of Dissertation	Rapid detection of B2-ST131 clonal group of extended-spectrum $\beta$ -lactamase-producing <i>Escherichia coli</i> by matrix-assisted laser desorption ionization-time-of-flight mass spectrometry : discovery of a peculiar amino acid substitution in B2-ST131 clonal group 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による 基質拡張型 $\beta$ ラクタマーゼ産生大腸菌 B2-ST131 クローンの迅速検 出法 : B2-ST131 クローンに特有のアミノ酸置換の発見		
審査委員 Examiner	主 査 荒川 創一 Chief Examiner 副 査 片岡 徹 Vice-examiner 副 査 白川 利朗 Vice-examiner		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

## 【目的】

近年、基質拡張型  $\beta$  ラクタマーゼ (extended-spectrum  $\beta$ -lactamase: ESBL) 産生 *Escherichia coli* が院内のみならず市中においても世界的に蔓延している。この世界的蔓延の原因の一つは CTX-M 型 ESBL 産生 *E. coli* B2-ST131 クローン (B2-ST131) の世界的なパンデミックである。B2-ST131 は  $\beta$  ラクタム系抗菌薬以外にも多剤耐性を示すことが多く、感染症治療を実施する上でこのクローンを識別することは重要である。本研究の目的は MALDI-TOF MS を用いて菌種同定と同時に B2-ST131 を迅速同定する方法を確立するためバイオマーカーピークを探索すること、そしてその見いだしたバイオマーカープロテインについてプロテオミクス解析を実施することにより B2-ST131 の特徴を明らかにすることである。

## 【対象および方法】

バイオマーカーピーク探索のための対象菌株は 2011 年に天理よろづ相談所病院で臨床材料より分離した ESBL 産生 *E. coli* 74 株を使用した。これらの菌株は phylogenetic group、multilocus sequence typing (MLST) および pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) にて特徴付けられた B2-ST131 16 株および other ST 58 株を使用し、さらに B2-ST131 は O25b 抗原および *fimH30* サブクローンタイピングを実施した。MALDI-TOF MS の前処理はエタノールギ酸抽出法を実施し、マスマススペクトル測定は MALDI Biotyper (Bruker Daltonik, Bremen, Germany) を用いた。MALDI-TOF MS から得られたマスマススペクトル波形は、多変量解析ソフトウェア ClinProTools v2.2 (Bruker Daltonik) を用いて B2-ST131 と other ST を識別する最も適当なバイオマーカーピークを探索した。B2-ST131 に特有のバイオマーカープロテインは単離精製後にボトムアッププロテオミクス解析および N 末端アミノ酸シーケンスによって同定した。タンパク質の単離精製は硫酸分画、ジエチルアミノエチル (DEAE) によるイオン交換クロマトグラフィーおよび TSKgel Protein C4-300 カラムによる逆相高速液体クロマトグラフィーを用い、その後 Tricine-SDS-PAGE にて最終精製した。ボトムアッププロテオミクス解析は切り出したゲルをトリプシン消化後、LCMS-IT-TOF (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japan) によりペプチド情報を得た。得られたペプチド情報は Mascot MS/MS Ion Search を用いてタンパク質同定を実施した。一方、N 末端アミノ酸シーケンスはゲルをボリビリニデンジフルオリド膜 (PVDF 膜) に転写後、Procise 494 HT (Life Technologies, Tokyo, Japan) を用いて N 末端側から 10 アミノ酸を決定した。プロテオミクス解析を用いて同定されたアミノ酸配列からプライマーを設計し、PCR ダイレクトシーケンスにより塩基配列およびアミノ酸配列を比較した。また、これらのデータは 2013 年に国内医療施設 (天理よろづ相談所病院を除く) において臨床材料より分離した ESBL 産生 *E. coli* 51 株 (西日本由来株 17 株 : 東日本由来株 34 株、B2-ST131 30 株 : other ST 21 株) から構成される別の母集団を用いて、交差検証を実施した。

#### 【結果および考察】

B2-ST131 バイオマーカーピークを探索した結果、B2-ST131 は 7,650  $m/z$ 、other ST は 7,707  $m/z$  が最も識別能力の高いバイオマーカーピークとして検出された。7,650  $m/z$  のバイオマーカーピークの識別能力は、感度 100%および特異度 89.7%であった。7,650 Da および 7,707 Da バイオマーカープロテインは共に LC-MS/MS を用いたボトムアッププロテオミクス解析および N 末端アミノ酸シーケンスによって Uncharacterized periplasmic protein YahO の mature chain であることが判明した。また、*yahO* 遺伝子をターゲットとしたプライマーによる PCR ダイレクトシーケンスにより 7,650  $m/z$  と 7,707  $m/z$  のピーク分子量の差は E34A アミノ酸置換が原因であることを証明した。YahO protein は 1997 年に UniProt database に登録されたペリプラスム層に存在する機能不明なタンパク質であり、腸内細菌科に局限した所在分布を示す。YahO protein は *E. coli* O157: H7 などが保有する BhsA/McbA family に属し、その BhsA protein は銅の外膜透過性を低減化する機能などが解明されているが、YahO protein に関しては未だ機能が不明である。この研究で明らかとなった B2-ST131 に特有の YahO protein E34A アミノ酸置換はヒト細胞との親和性や毒素の感受性などに影響し、結果的にヒトに病原性を示す因子と関連しているかもしれない。今後、YahO protein の機能および E34A アミノ酸置換についての研究が興味深い。また、これらのデータは天理よろづ相談所病院を除く国内医療施設由来の別母集団で交差検証され、7,650  $m/z$  バイオマーカーピークの識別能力は感度 100%および特異度 85.7%であった。近年、Johnson らの報告（2013 年）において B2-ST131 のフルオロキノロン耐性は *fimH30* サブクローンや O25b 血清型と非常に密接な関係があるとされている。本研究においても *fimH30* および O25b 血清型を決定したが、これらサブクローン別の MALDI-TOF MS によるタイピングは現在のところ不可能であった。今後、さらに母集団を拡大させた上でサブクローン別にみたタイピングを試みる必要がある。MALDI-TOF MS はルーチンワークにおいて B2-ST131 を迅速かつ簡便に同定可能な手法であり、この成績は適正なエンピリック治療を可能とし、院内感染制御のみならず世界的パンデミックを制御する可能性も秘めている。

本研究は、ESBL 産生大腸菌において世界的に蔓延している BS-ST131 株を迅速同定するための、バイオマーカー蛋白 YahO protein E34A アミノ酸置換を発見し、その株の迅速同定法を開発した価値ある業績であると認める。よって本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があるものと認める。