

機関番号：36301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790432

研究課題名 (和文) *Acinetobacter baumannii* の未解析多剤排出ポンプの機能解析研究課題名 (英文) Study of uncharacterized multidrug efflux pumps of *Acinetobacter baumannii*

研究代表者

関谷 洋志 (SEKIYA HIROSHI)

松山大学 薬学部 助教

研究者番号：70454890

研究成果の概要 (和文)：多剤排出ポンプはグラム陰性菌の多剤耐性機構において、重要な役割を果たしている。この研究では、*Acinetobacter baumannii* で推定される多剤排出ポンプ、特に RND 型多剤排出ポンプの多剤耐性への寄与を調べた。*A. baumannii* ATCC19798 株において、RND 型多剤排出ポンプと推定される 8 つの遺伝子群を見いだした。これらの遺伝子群の中で、Membrane fusion タンパク質をコードしていると推定される *AIS 2304*、RND 型多剤排出タンパク質と類似性の高い *AIS 2305*、外膜タンパク質と推定される *AIS 2306* を含む遺伝子群が色素系抗菌薬に対する耐性に関与していることがわかった。

研究成果の概要 (英文)：Multidrug efflux pumps plays an important role in the multidrug-resistant mechanism of gram-negative bacteria. In this study, I examined the role of multidrug efflux pumps with *Acinetobacter baumannii*, especially RND family multidrug efflux pumps. In the *A. baumannii* ATCC19798, eight gene clusters presumed to be RND type multidrug efflux pumps were found. It has been understood that the gene cluster including *AIS 2304* presumed to be coding membrane fusion protein, *AIS 2305* presumed to be coding RND type multidrug efflux protein and *AIS 2306* presumed to be coding outer membrane protein takes part in the acriflavine resistance.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：細菌学 (含真菌学)

キーワード：アシネトバクター、多剤排出ポンプ、院内感染、多剤耐性菌、抗生物質

1. 研究開始当初の背景

Acinetobacter baumannii (以下、アシネトバクターとする) は、環境や土壌中に広く分布するグラム陰性桿菌である。本菌は新生

児、高齢者、術後患者等の易感染者に対して、日和見感染を引き起こす原因菌であり、肺炎、髄膜炎や敗血症を引き起こす。研究当初、アシネトバクターによる院内感染は、特に欧州

を中心に問題となっていた。しかし、国内でもアシネトバクターによる院内感染が報告され始めていた。

アシネトバクターは、臨床現場において、院内感染の起原因菌のひとつとして重要視されている菌である。しかし、アシネトバクターの持っている下記のような性質が、院内感染のコントロールを困難にしている。

- (1) 常在菌であるアシネトバクターは、低栄養状態でも生存可能である。そのため、医療施設、入院患者、医療従事者、医療機器などから広く検出され、アシネトバクターを完全に排除することは困難である。
- (2) アシネトバクターは多くの消毒薬や抗菌薬に抵抗性を示し、さらに、プラスミドやトランスポゾンを獲得しやすい性質を持っている。そのため、アシネトバクター感染症の治療に用いられるβ-ラクタム系抗菌薬、アミノグリコシド系抗菌薬に対して、高度に耐性を示す菌の出現が問題となっている。
- (3) さらに、複数の抗菌薬に同時に耐性を示す多剤耐性アシネトバクターによる院内感染が急激に増えている。この多剤耐性アシネトバクターは、その治療を困難とすることから医療施設の大きな脅威となっており、対策が必要とされている。

2. 研究の目的

これまでの大腸菌や緑膿菌などにおける研究により、グラム陰性菌の多剤耐性機構として最も重要な役割を担っている機構は多剤排出ポンプであると考えられている。多剤排出ポンプは、構造や作用機序が異なる複数の抗菌薬を細胞外に排出することができる。同じグラム陰性菌であるアシネトバクターにおいても多剤排出ポンプは多剤耐性に大きく寄与していることが考えられる。この多剤排出機構を明らかにし、抗菌薬の排出を阻害することができれば、既存の抗菌薬にも感受性となり、多剤耐性緑膿菌感染症の治療に新たな道が開かれることが期待される。

- (1) アシネトバクターにおいては、AdeABC、AdeDE、AdeIJK、AdeXYZ、AbeM、CraS の6つの多剤排出ポンプの遺伝子がクローニングされ、β-ラクタム系抗菌薬、アミノグリコシド系抗菌薬、キノロン系抗菌薬等の様々な抗菌薬耐性に関与することが報告されている。しかし、ゲノムシーケ

ンス解析の結果から、アシネトバクターには、上記以外にも多剤排出ポンプと推定される遺伝子が40個以上も存在している。大腸菌や緑膿菌における解析結果から考えると、未解析の多剤排出ポンプの多くがアシネトバクターの多剤耐性に寄与していると考えられる。本研究では、アシネトバクターの未解析多剤排出ポンプ遺伝子をクローニングし、その産物の多剤耐性への寄与を明らかにすることを第一の目的とする。特に、アシネトバクターの多剤耐性への寄与度が高いと考えられる RND 型多剤排出ポンプを優先的に解析し、多剤耐性への寄与を明らかにする。

- (2) また、医療施設では、人工呼吸器や血管カテーテル内でバイオフィームを形成したアシネトバクターの分離が多数報告されている。このバイオフィームを形成する性質が、アシネトバクターによる院内感染の蔓延や難治化にも関与していると考えられる。同じグラム陰性菌である大腸菌や緑膿菌における研究で、バイオフィーム形成にクオラムセンシング機構が関与することが明らかになっている。さらに、多剤排出ポンプがクオラムセンシング機構を介してバイオフィーム形成に関与していることも示唆されている。このことから、アシネトバクターも同様のメカニズムを有していると考えられる。しかし、アシネトバクターにおいては、多剤排出ポンプとクオラムセンシング機構およびバイオフィーム形成メカニズムとの関係は全く明らかになっていない。本研究では、アシネトバクターの多剤排出ポンプとクオラムセンシング機構との関係を明らかにすることを第二の目的とする。

3. 研究の方法

- (1) RND 型多剤排出ポンプと推定される遺伝子領域の特定

RND 型多剤排出ポンプは、内膜タンパク質と外膜タンパク質および連結タンパク質が複合体を形成し、排出ポンプとして機能する。しかし、その本質は、内膜タンパク質である RND 型多剤排出タンパク質である。そこで、ゲノムプロジェクトが進んでいるアシネトバクター ATCC17978 株において、これまでに解析が進んでいる大腸菌の RND 型多剤排出タンパク質 AcrB、AcrD、緑膿菌の RND 型多剤

排出タンパク質 MexB、MexY、およびアシネトバクターで既に報告されている RND 型多剤排出タンパク質である AdeB、AdeE、AdeJ、AdeY と類似性の高いタンパク質をコードする遺伝子領域を BLAST search を用いて検索した。

(2) RND 型多剤排出ポンプと推定される遺伝子のクローニング

RND 型多剤排出ポンプと推定される遺伝子は、pUC18 の *lac promoter* の下流に PCR 法を用いて遺伝子クローニングした。また、RND 型多剤排出ポンプと推定される遺伝子の前後の領域に連結タンパク質や外膜タンパク質をコードしていると推定される遺伝子がある遺伝子については、それらを含めた遺伝子群を遺伝子クローニングした。得られたプラスミドを抗菌薬高感受性大腸菌 KAM32 株 ($\Delta acrB$ 、 $\Delta ydhE$) に導入し、キノロン系、エリスロマイシン、カナマイシン、クロラムフェニコール、テトラサイクリン、色素系抗菌薬など各種抗菌薬に対する最小生育阻止濃度 (MIC) を調べた。

(3) アシネトバクターにおける外膜タンパク質の遺伝子クローニング

また、アシネトバクター ATCC17978 株において、大腸菌、緑膿菌の代表的な外膜タンパク質である TolC、OprM と類似性の高い遺伝子についても BLAST search を用いて検索し、pSTV28 の *lac promoter* の下流に遺伝子クローニングをした。このプラスミドを導入した KAM32 株についても、各種抗菌薬に対する MIC の変化を調べた。

4. 研究成果

(1) 既知の RND 型多剤排出タンパク質との類似性を調べた結果、A1S 1750、2305、2660、2736、2818、2932、3217、3445、3446 などの高い類似性を示す遺伝子群をアシネトバクター ATCC17978 株より見いだした。

それらの遺伝子の中で、A1S 1750 は AdeB、A1S 2736 は AdeJ など、アシネトバクターで既に報告のある RND 型多剤排出タンパク質をコードしていた。AdeY については AdeJ のホモログと考えられた。一方、ATCC17978 株においては、AdeE をコードしている遺伝子はみられなかった。また、A1S 3445、3446 は同一オペロン上存在する遺伝子であった。それらの遺伝子の中で、A1S 2305、2660、2818、2932、3217、3445、3446 のコードする遺伝子産物に

ついては未解析であり、その機能は明らかになっていなかった。

次に、RND 型排出タンパク質と類似性の高い遺伝子の前後領域の配列を調べた。その結果、A1S 2660 以外の遺伝子は上流に MFP と類似性の高い遺伝子をコードしていた。また、A1S 2305、2736 の下流には外膜タンパク質と類似性の高い遺伝子をコードしていた。さらに、A1S 1750、2305 の上流には、regulator gene がみられた。これらの推定の RND 型多剤排出ポンプがアシネトバクターの抗菌薬耐性に寄与している可能性が考えられた。

(2) アシネトバクター ATCC17978 株から、RND 型多剤排出ポンプと類似性の高い遺伝子を含む領域を PCR クローニングし、大腸菌 KAM32 株 (抗菌薬高感受性株) に導入して MIC の測定を行った。その結果、KAM32/p2304-06 において、色素系抗菌薬 acriflavine に 4 倍の MIC の上昇がみられた。このプラスミド p2304-06 には、Membrane fusion タンパク質と推定される ORF (A1S 2304)、RND 型多剤排出タンパク質と類似性の高い ORF (A1S 2305)、外膜タンパク質と推定される ORF (A1S 2306) が含まれていた。一方、抗菌薬感受性に変化がみられなかった遺伝子群の多くは、外膜タンパク質と推定される遺伝子を含んでいなかった。

大腸菌 KAM32 株は外膜タンパク質を発現している。しかし、この結果からは抗菌薬感受性の変化にはアシネトバクター由来の外膜タンパク質の有無が関与していると考えられた。そこで、アシネトバクター由来の外膜タンパク質の影響を調べるため、アシネトバクター ATCC17978 株から外膜タンパク質 TolC、OprM などと類似性の高い遺伝子 (A1S 255、535、1241、1769、2306、2737) をクローニングし、排出ポンプをコードする遺伝子とともに KAM32 株に導入した。その結果、A1S 2305 を含む遺伝子群を導入した株において、色素系抗菌薬等に対して感受性の低下がみられた。しかし、それら以外の遺伝子群では大きな差はみられなかった。これらの外膜タンパク質の遺伝子は、アシネトバクターの多剤耐性への関与が報告されている A1S 1750 (*adeB*) とともに大腸菌に導入したが、抗菌薬感受性の変化は見られなかった。この結果には、*adeB* の上流にある MFP が 2 つに分かれており、完全な形でないことも影響していると考えられた。

今回、大腸菌を宿主として解析を行ったが、アシネトバクターを宿主とした機能解析を行うことで、本来の機能が明らかにできるのではないかと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[学会発表] (計2件)

①発表者：関谷 洋志

発表表題：*Acinetobacter baumannii*におけるRND型多剤排出ポンプの解析

学会等名：第131年会 日本薬学会

発表年月日：平成23年3月30日

発表場所：静岡

②発表者：関谷 洋志

発表表題：*Acinetobacter baumannii*における未解析多剤排出ポンプの解析

学会等名：第130年会 日本薬学会

発表年月日：平成21年3月30日

発表場所：岡山

6. 研究組織

(1)研究代表者

関谷 洋志 (SEKIYA HIROSHI)

松山大学・薬学部・助教

研究者番号：70454890

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし