

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：82603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2015

課題番号：25713017

研究課題名(和文)多剤耐性細菌のVI型分泌機構を標的とした抗菌薬の開発

研究課題名(英文)Analysis of the type VI secretion system in *Acinetobacter baumannii*

研究代表者

鈴木 仁人 (Suzuki, Masato)

国立感染症研究所・その他部局等・研究員

研究者番号：70444073

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：高度に進化を遂げた多剤耐性菌のモデルとして *Acinetobacter baumannii* (Ab) に注目し、国内医療機関から収集した株のゲノム解析を行った。大規模な比較解析の結果、Ab流行株ST2株に特異的に存在するDNA領域にVI型分泌機構(T6SS)依存的に分泌する抗菌エフェクターTseXとその抗菌活性を阻害する免疫タンパク質TsiXをコードする遺伝子対を発見した。SNPを用いた系統樹解析から、ST2株は複数のcladeに細分類可能で、tseXとtsiX遺伝子のオペロンがコードされたDNA領域はclade毎で多様性があり、個々のエフェクターは異なる抗菌活性を有していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Whole genome sequencing of clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* collected in Japan was performed. Comparative genome-wide association studies using *A. baumannii* isolates collected and isolates in public databases was performed to identify genetic traits of the pandemic lineages. Most of the pandemic lineages conserved an intact type VI secretion system (T6SS) gene cluster, whereas drug-susceptible non-epidemic isolates frequently lacked the gene clusters. Whole-genome single nucleotide polymorphism-based phylogenetic analysis revealed that pandemic international clone II (IC2) isolates are further divided into several distinct genetic clades. Comparative genomic analysis between IC2 isolates identified that each IC2 clade harbors own specific antibacterial T6SS substrates. Given that T6SS-mediated bacterial competition is known to affect conjugative transfer of drug resistance genes-carrying plasmids, T6SS could be an important key factor for development of high-risk clones.

研究分野：細菌学

キーワード：薬剤耐性

### 1. 研究開始当初の背景

近年、抗菌薬に対して耐性を有する薬剤耐性菌が惹起する難治性の感染症が問題となっている。一般にグラム陰性菌では、臨床上演用性の高いカルバペネム系、フルオロキノロン系、およびアミノグリコシド系の三系統の抗菌薬に対して耐性を示すことを「多剤耐性」と定義され、2000年代に急激に増加してきた多剤耐性菌による院内感染は極めて大きな問題となっている。

アシネトバクター・バウマニは自然環境から頻りに分離される弱毒性のグラム陰性菌で、2000年代から広範な抗菌薬に耐性を獲得した多剤耐性株が臨床検体から分離されるようになり、医療現場では院内感染の起原菌として極めて重大な関心事となっている。近年、欧米・アジアを含む世界の医療機関において多剤耐性アシネトバクターによる院内感染アウトブレイクが頻発しており、日本の医療機関においても本新興感染症の院内感染アウトブレイクが継続的に報告されている。本菌のハウスキーピング遺伝子配列を用いた MLST (multilocus sequence typing) による分子疫学的解析により、世界の医療機関で急速に広がった多剤耐性株は、仏パスツール研究所の MLST 分類において主に ST2 (sequence type 2) の遺伝型に分類可能であり、日和見感染症ながら同菌株はパンデミック (世界的流行) を引き起こしていることが明らかとなっている。

### 2. 研究の目的

多剤耐性アシネトバクターや多剤耐性緑膿菌など既存の抗菌薬が効かない病原細菌は国境を越えて伝播し、多剤耐性グラム陰性菌による院内感染は国際的な公衆衛生の問題となっている。現在、グラム陰性菌に対して新規の作用点を有する抗菌薬候補はほとんど存在しない。将来の感染症対策のためにも、細菌学者の叡智を結集し、革新的な着想を用いた抗菌薬開発の知的基盤を築くことが急務である。本研究ではグラム陰性菌に広く保存され、細菌-細菌間での生存競争の競合に重要な役割を果たしている VI 型分泌機構を標的とした全く新しい抗菌薬の創成を企図した。

### 3. 研究の方法

アシネトバクター流行株の VI 型分泌機構による殺菌作用に対して自己免疫を担う免疫タンパク質を、流行株のゲノム断片を組み込んだ大腸菌ライブラリーを用いたスクリーニングにより同定し、更に免疫タンパク質と対となる抗菌エフェクターも同定する。抗菌エフェクターの活性部位を詳細に解析して、抗菌活性は無いが免疫タンパク質と結合可能な点突然変異体を作製する。β-ガラクトシダーゼの N 末端と C 末端のそれぞれを抗菌エフェクター変異体と免疫タンパク質に

結合させ、両者が結合している場合にのみ β-ガラクトシダーゼの酵素活性が発揮される Enzyme Fragment Complementation Assay の系を大腸菌にて構築し、両者の結合を阻害するが、菌生育は阻害しない化合物を公的化合物ライブラリーにて探索する。導き出された抗菌薬のリード化合物候補の結合阻害効果を確認し、種々の院内感染菌の流行株に作用させ、殺菌効果を評価する。

### 4. 研究成果

高度に進化を遂げた多剤耐性菌のモデルとしてアシネトバクター・バウマニ (Ab: *Acinetobacter baumannii*) に注目し、国内医療機関から収集した 152 株のゲノム解析を行った。さらに公共データベース (PATRIC) から海外医療機関由来の 150 株のゲノム配列を加え、計 302 株を用いた大規模な比較ゲノム解析を行った。Ab 流行株 ST2 株の完全ゲノム配列をリファレンスに用いた BLASTatlas 解析から、Ab 流行株 ST2 株に特異的に存在する DNA 領域に VI 型分泌機構 (T6SS) 依存的に分泌する抗菌エフェクター TseX とその抗菌活性を阻害する免疫タンパク質 TsiX をコードする遺伝子対を発見した。SNP を用いた系統樹解析から、Ab ST2 株は複数の clade に細分類可能で、tseX と tsiX 遺伝子のオペロンがコードされた DNA 領域は clade 毎で多様性があり、個々のエフェクターは異なる抗菌活性を有していることが明らかとなった。また、国内医療機関または農場から分離された緑膿菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) 40 株と GenBank に登録された緑膿菌の海外臨床分離株について比較ゲノム解析を行い、T6SS 抗菌エフェクター Tse1 とその免疫タンパク質 Tsi1 はほとんど全ての菌株に保存されていることを確認した。そのため、Tse1-Tsi1 複合体は緑膿菌に対する抗菌薬開発のよい標的と考えられ、*in silico* スクリーニングを経て、阻害化合物候補を同定した。さらに緑膿菌流行株 ST235 株に特異的に存在する DNA 領域に新規の T6SS エフェクター候補遺伝子を発見した。BLAST によるホモロジー解析では、同遺伝子は緑膿菌流行株でのみ存在することから、流行株の迅速な診断法にも応用可能であり、ST235 株を標的とした抗菌薬開発ではよい標的となることが予想された。

### 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)

[雑誌論文](計 23 件)

1. Segawa T, Matsui M, Suzuki M, Tsutsui A, Kuroda M, Shibayama K, Suzuki S. Utilizing the Carba NP test as an indicator of expression level of carbapenemase genes in

- Enterobacteriaceae. **J Microbiol Methods**. 2017 133:35-39.
2. Hayashi M, Kawamura K, Matsui M, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K, Arakawa Y. Reduction in chlorhexidine efficacy against multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii* international clone II. **J Hosp Infect**. 2017 95(3):318-323.
  3. Tran DN, Tran HH, Matsui M, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K, Pham TD, Van Phuong TT, Dang DA, Trinh HS, Loan CT, Nga LT, van Doorn HR, Wertheim HF. Emergence of New Delhi metallo-β-lactamase 1 and other carbapenemase-producing *Acinetobacter calcoaceticus-baumannii* complex among patients in hospitals in Ha Noi, Viet Nam. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**. 2017 36(2):219-225.
  4. Suzuki M, Shibayama K, Yahara K. A genome-wide association study identifies a horizontally-transferred bacterial surface adhesin gene associated with antimicrobial resistant strains. **Sci Rep**. 2016 6:37811.
  5. Oinuma KI, Suzuki M, Sato K, Nakaie K, Niki M, Takizawa E, Niki M, Shibayama K, Yamada K, Kakeya H, Kaneko Y. Genome Sequence of an *Acinetobacter baumannii* Strain Carrying Three Acquired Carbapenemase Genes. **Genome Announc**. 2016 4(6): e01290-16.
  6. Matsui H, Takahashi T, Murayama SY, Uchiyama I, Yamaguchi K, Shigenobu S, Suzuki M, Rimbara E, Shibayama K, Ørverby A, Nakamura M. Draft Genome Sequence of *Helicobacter suis* Strain SNTW101, Isolated from a Japanese Patient with Nodular Gastritis. **Genome Announc**. 2016 4(5):e00934-16.
  7. Teramoto M, Zhai Z, Komatsu A, Shibayama K, Suzuki M. \* Genome Sequence of the Psychrophilic Bacterium *Tenacibaculum ovolyticum* Strain da5A-8 Isolated from Deep Seawater. **Genome Announc**. 2016 4(3):e00644-16.
  8. Uchiyama J, Suzuki M, Nishifuji K, Kato S, Miyata R, Nasukawa T, Yamaguchi K, Takemura-Uchiyama I, Ujihara T, Shimakura H, Murakami H, Okamoto N, Sakaguchi Y, Shibayama K, Sakaguchi M, Matsuzaki S. Analyses of Short-Term Antagonistic Evolution of *Pseudomonas aeruginosa* Strain PA01 and Phage KPP22 (Myoviridae Family, PB1-Like Virus Genus). **Appl Environ Microbiol**. 2016 82(15):4482-91.
  9. Suzuki M, Nishio H, Asagoe K, Kida K, Suzuki S, Matsui M, Shibayama K. Genome sequence of a carbapenem-resistant strain of *Ralstonia mannitolilytica*. **Genome Announc**. 2015 3(3):e00405-15.
  10. Suzuki M, Daniilchanka O, Mekalanos JJ. *Vibrio cholerae* T3SS effector VopE modulates mitochondrial dynamics and innate immune signaling by targeting Miro GTPases. **Cell Host Microbe**. 2014 16(5):581-91.
  11. Nakano R, Nakano A, Hikosaka K, Kawakami S, Matsunaga N, Asahara M, Ishigaki S, Furukawa T, Suzuki M, Shibayama K, Ono Y. First report of metallo-β-lactamase NDM-5 producing *Escherichia coli* in Japan. **Antimicrob Agents Chemother**. 2014 58(12):7611-2.
  12. Suzuki S, Mimuro H, Kim M, Ogawa M, Ashida H, Toyotome T, Franchi L, Suzuki M, Sanada T, Suzuki T, Tsutsui H, Núñez G, Sasakawa C. The *Shigella* IpaH7.8 E3 ubiquitin ligase targets Glomulin and activates inflammasomes to demolish macrophages. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2014 111(40):E4254-63.
  13. Kiga K, Mimuro H, Suzuki M, Shinozaki-Ushiku A, Kobayashi T, Sanada T, Kim M, Ogawa M, Iwasaki YW, Kayo H, Fukuda-Yuzawa Y, Yashiro M, Fukayama M, Fukao T, Sasakawa C. Epigenetic silencing of miR-210 increases the proliferation of

- gastric epithelium during chronic *Helicobacter pylori* infection. **Nat Commun.** 2014 5:4497.
14. Hagiya H, Murase T, Suzuki M, Otsuka F, Shibayama, K. An emergence of third-generation cephalosporin-resistant Enterobacteriaceae at a Japanese critical care setting. **Acute Med Surg.** 2014 1(4):256-8.
  15. Matsui M, Suzuki S, Yamane K, Suzuki M, Konda T, Arakawa Y, Shibayama K. Distribution of carbapenem resistance determinants among epidemic and non-epidemic types of *Acinetobacter* species in Japan. **J Med Microbiol.** 2014 63(6):870-7.
  16. Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. A subclass B3 metallo-β-lactamase found in *Pseudomonas alcaligenes*. **J Antimicrob Chemother.** 2014 69(5):1430-2.
  17. Hagiya H, Murase T, Suzuki M, Shibayama K, Kokumai Y, Watanabe N, Maki M, Otsuka F. *Chromobacterium violaceum* nosocomial pneumonia in two Japanese patients at an intensive care unit. **J Infect Chemother.** 2013 20(2):139-42.
  18. Wachino J, Matsui M, Tran HH, Suzuki M, Suzuki S, Shibayama K. Evaluation of a double-disk synergy test with a common metallo-β-lactamase inhibitor, mercaptoacetate, for detecting NDM-1-producing Enterobacteriaceae and *Acinetobacter baumannii*. **Jpn J Infect Dis.** 2014 67(1):66-8.
  19. Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. Genome sequence of a strain of the human pathogenic bacterium *Pseudomonas alcaligenes* that caused bloodstream infection. **Genome Announc.** 2013 1(5):e00919-13.
  20. Rimbara E, Matsui M, Mori S, Suzuki S, Suzuki M, Kim H, Sekizuka T, Kuroda M, Shibayama K. Draft genome sequence of *Helicobacter fennelliae* MRY12-0050 isolated from a bacteremia patient. **Genome Announc.** 2013 1(4):e00512-13.
  21. Suzuki M, Matsui M, Suzuki S, Rimbara E, Asai S, Miyachi H, Takata T, Hiraki Y, Kawano F, Shibayama K. Genome sequences of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* strains from nosocomial outbreaks in Japan. **Genome Announc.** 2013 1(4):e00476-13.
  22. Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Arakawa Y, Shibayama K. Rapid discrimination of *Acinetobacter baumannii* international clone II lineage by pyrosequencing SNP analyses of *bla*OXA-51-like genes. **J Microbiol Methods.** 2013 94(2):121-4.
  23. Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, Sugita A, Kosuge Y, Kodama N, Ichise Y, Shibayama K. Detection of TMB-2 metallo-β-lactamase, a variant of *bla*TMB-1, in clinical isolates of *Acinetobacter* spp. in Japan. **J Antimicrob Chemother.** 2013 68(6):1441-2.
- 〔学会発表〕(計 24 件)
1. J-GRID 拠点と連携したカルバペネム耐性腸内細菌科細菌の解析  
鈴木 仁人、柴山 恵吾、明田 幸宏、坂本 典子、朝野 和典、浜田 茂幸  
新興・再興感染症制御プロジェクト 新興再興事業・J-GRID 合同シンポジウム –感染症研究連携のフロンティア–  
国立感染症研究所 (東京都新宿区)  
2016 年 3 月 25 日
  2. 緑膿菌 PA01 株とファージ KPP22 の短期間進化的軍拡競走の解析  
那須川 忠弥、内山 淳平、鈴木 仁人、宮田 玲奈、山口 琴絵、内山 伊代、阪口 義彦、柴山 恵吾、阪口 雅弘、松崎 茂展  
第 89 回日本細菌学会総会  
大阪国際交流センター (大阪府大阪市)  
2016 年 3 月 23-25 日
  3. Prevalence and characteristics of colistin-resistant *Klebsiella pneumoniae* isolated in Japan.  
島 綾香、鈴木 里和、松井 真理、鈴木 仁人、柴山 恵吾  
第 89 回日本細菌学会総会

大阪国際交流センター（大阪府大阪市）  
2016年3月23-25日

4. アシネトバクター・バウマニおよび緑膿菌の流行株の解析

鈴木 仁人  
第50回緑膿菌感染症研究会  
ヒルトン東京お台場（東京都港区）  
2016年2月4-6日

5. 国内分離アシネトバクター属菌のカルバペナム耐性機構に関する検討

松井 真理、鈴木 里和、筒井 敦子、鈴木 仁人、柴山 恵吾  
第27回日本臨床微生物学会総会・学術集会  
仙台国際センター展示棟（宮城県仙台市）  
2016年1月29-31日

6. TMB型メタロ-β-ラクタマーゼ遺伝子の進化と拡散

鈴木 仁人、松井 真理、平山 隆一郎、瀬川 孝耶、鈴木 里和、柴山 恵吾  
第44回薬剤耐性菌研究会  
ホテル松島大観荘（宮城県宮城郡松島町）  
2015年10月29-30日

7. 厚生労働省院内感染対策サーベイランス事業検査部門におけるカルバペナム腸内細菌科細菌の集計とアシネトバクター属・緑膿菌のコリスチン感受性結果について

筒井 敦子、鈴木 里和、松井 真理、鈴木 仁人、瀬川 孝耶、柴山 恵吾  
第44回薬剤耐性菌研究会  
ホテル松島大観荘（宮城県宮城郡松島町）  
2015年10月29-30日

8. 国内で分離されたblaIMP保有菌株に対するCarba NP testとSMAテストの比較検討

瀬川 孝耶、鈴木 里和、松井 真理、鈴木 仁人、筒井 敦子、柴山 恵吾  
第44回薬剤耐性菌研究会  
ホテル松島大観荘（宮城県宮城郡松島町）  
2015年10月29-30日

9. Evaluation of Carba NP Test for Imipenem Susceptible Carbapenemase-producing Enterobacteriaceae

Segawa T, Suzuki S, Matsui M, Suzuki M, Tsutsui A, Shibayama K.  
ICAAC 2015  
San Diego Convention Center (San Diego, USA)  
2015年9月17-21日

10. 細菌の"株"特異的な病原因子とその多様性

鈴木 仁人  
日本細菌学会関東支部インターラボセミナー  
国立国際医療研究センター研究所（東京都

新宿区）  
2015年8月6日

11. VI型分泌エフェクター・免疫蛋白質の進化と多様性

鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、関塚 剛史、黒田 誠、柴山 恵吾  
第88回日本細菌学会総会  
長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）  
2015年3月26日-28日

12. IMP-1メタロ-β-ラクタマーゼ保有プラスミドの全塩基配列解読で判明した多菌種の腸内細菌科細菌の院内感染

松井 真理、鈴木 里和、関塚 剛史、山下 明史、鈴木 仁人、黒田 誠、柴山 恵吾  
第88回日本細菌学会総会  
長良川国際会議場（岐阜県岐阜市）  
2015年3月26日-28日

13. 病原細菌における細菌間競合と進化

鈴木 仁人  
感染症国際研究センター・全国共同利用共同研究拠点ジョイントシンポジウム  
東京大学医科学研究所（東京都港区）  
2015年2月18日

14. 国内78医療機関で分離されたアシネトバクター属菌の分子免疫学解析

松井 真理、鈴木 里和、鈴木 匡弘、八柳 潤、綿引 正則、鈴木 仁人、平木 洋一、河野 文夫、柴山 恵吾  
第26回臨床微生物学会総会  
京王プラザホテル（東京都新宿区）  
2015年1月31日 2月1日

15. ダプトマイシン非感性MRSA株のゲノム解析

鈴木 仁人、福井 康雄、梅田 豊、林 寿朗、松井 真理、鈴木 里和、柴山 恵吾  
第43回薬剤耐性菌研究会  
加賀観光ホテル（石川県加賀市）  
2014年10月31日-11月1日

16. Genomic epidemiology of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* isolates in Japan

Masato Suzuki  
The 11th Taiwan-Japan Symposium: New Technologies Applied to Public Health Including Foodborne Diseases and Drug Resistance  
Centers for Disease Control, ROC (Taipei, Taiwan)  
2014年9月11日-12日

17. Molecular epidemiology of *Acinetobacter* spp. and distribution of *Acinetobacter baumannii* international clone II in Japan

Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Shibayama K.  
ICAAC 2014  
Walter E. Washington Convention Center  
(Washington, D.C., USA)  
2014年9月5日-9日

18. A subclass B3 metallo-β-lactamase  
found in *Pseudomonas alcaligenes*  
Suzuki M, Suzuki S, Matsui M, Hiraki Y,  
Kawano F, Shibayama K.  
ECCMID 2014  
Centre de Convencions Internacional de  
Barcelona (Barcelona, Spain)  
2014年5月10日-13日

19. アシネトバクターの薬剤耐性と拡散メ  
カニズム  
鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、関塚 剛  
史、黒田 誠、柴山 恵吾  
第 87 回日本細菌学会総会  
タワーホール船堀 (東京都江戸川区)  
2014年3月26日-28日

20. 日本で分離されたアシネトバクター流  
行株と非流行株の分子疫学的特徴の比較  
松井 真理、鈴木 里和、鈴木 仁人、荒川 宜  
親、柴山 恵吾  
第 87 回日本細菌学会総会  
タワーホール船堀 (東京都江戸川区)  
2014年3月26日-28日

21. アシネトバクター・バウマニと緑膿菌の  
細菌間競合  
鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、柴山 恵  
吾  
第 48 回緑膿菌感染症研究会  
長崎県医師会館 (長崎県長崎市)  
2014年1月24日-25日

22. 薬剤耐性菌流行株の分子遺伝学的解析  
鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、柴山 恵  
吾  
第 36 回日本分子生物学会年会  
神戸国際会議場 (兵庫県神戸市)  
2013年12月3日-6日

23. 新規メタロ-β-ラクタマーゼ産生  
*Pseudomonas pseudoalcaligenes* の解析  
鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、平木 洋  
一、河野 文夫、柴山 恵吾  
第 42 回薬剤耐性菌研究会  
ホテルニューさがみや (静岡県熱海市)  
2013年10月17日-18日

24. Molecular characterization of  
epidemic and non-epidemic type  
*Acinetobacter* spp. isolated in Japan  
Matsui M, Suzuki S, Suzuki M, Arakawa Y,  
Shibayama K.  
9th International Symposium on the Biology

of *Acinetobacter*  
Cocs GmbH (Cologne, Germany)  
2013年6月19日-21日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 3 件)

名称: 重合体、抗菌剤、殺菌剤、抗菌材料、  
殺菌材料、抗菌方法及び殺菌方法  
発明者: 鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、  
柴山 恵吾、一久 和弘、成瀬 秀則、井本 裕  
顕、伊藤 淳史、下川 努  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2015-242866  
出願年月日: 2015年12月14日  
国内外の別: 国内

名称: 抗菌剤、殺菌剤、抗菌材料、殺菌材料、  
抗菌方法及び殺菌方法  
発明者: 鈴木 仁人、松井 真理、鈴木 里和、  
柴山 恵吾、一久 和弘、成瀬 秀則、井本 裕  
顕、伊藤 淳史、下川 努  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-151608  
出願年月日: 2014年7月25日  
国内外の別: 国内

名称: *Acinetobacter baumannii* の検出  
発明者: 松井 真理、鈴木 仁人、鈴木 里和、  
柴山 恵吾、曾家 義博  
権利者: 同上  
種類: 特許  
番号: 特願 2014-014286  
出願年月日: 2014年1月29日  
国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 仁人 (SUZUKI, Masato)  
国立感染症研究所・薬剤耐性研究センタ  
ー・主任研究官  
研究者番号: 70444073