Journal of Environmental Biotechnology
（環境バイオテクノロジー学会誌）
Vol. 18, No. 1, 3–7, 2018

総　　説（特集）

病原細菌の VI 型分泌機構を介した拡散機構

The Role of Type VI Secretion System in Dissemination of Pathogenic Bacteria

鈴木　仁人
Masato Suzuki

国立感染症研究所 薬剤耐性研究センター　〒 189–0002　東京都東村山市青葉町 4–2–1
AMR Research Center, National Institute of Infectious Diseases, 4–2–1 Aobacho, Higashimurayama, Tokyo 189–0002, Japan

キーワード：薬剤耐性，病原性，VI 型分泌機構
Key words: antimicrobial resistance, pathogenesis, type secretion system (T6SS)

（原稿受付　2018 年 5 月 18 日／原稿受理　2018 年 5 月 21 日）

1. はじめに

近年，薬剤耐性菌による難治性の感染症が世界的な公衆衛生上の重大な問題となってきており，感染症の治療が困難な *Enterococcus faecium*（エンテロコッカス・フェシウム），*Staphylococcus aureus*（黄色ブドウ球菌），*Klebsiella pneumoniae*（肺炎桿菌），*Acinetobacter baumannii*（*A. baumannii*），*Pseudomonas aeruginosa*（緑膿菌），*Escherichia coli*（大腸菌）／ *Enterobacter* spp.（エンテロバクター属菌）は，その頭文字を取り，“ESKAPE” 細菌と称されている。特に 2000 年代に急激に進化を遂げた多剤耐性のグラム陰性菌は，感染症の治療に有効な抗菌薬がほとんど無く，人類は危機的な状況に置かれている。MLST（multilocus sequence typing）による分子疫学的分類において，*A. baumannii* の ST2（sequence type 2）株，緑膿菌の ST235 株，大腸菌の ST131 株などは日和見感染症の起因菌ながら同一クローンが世界中に拡散していることが明らかとなっている [1]。流行株はしばしば伝達性プラスミドなどの可動性遺伝因子によって “多剤耐性” を獲得しており，感染症の治療が難しい。そのため，現時点での臨床における細菌感染症を真に理解するためには，実際に問題となっている “high-risk clone” の遺伝的特性を詳細に解析することが重要である。

2. *A. baumannii* 流行株のゲノム解析

病原細菌の流行株が生まれる分子メカニズムは長く不明であったが，我々は *A. baumannii* において，細菌ゲノムデータベースである PATRIC（Pathosystems Resource Integration Center）[2] の薬剤耐性株と薬剤感性株のゲノム配列を用いてゲノムワイド関連解析（GWAS: genome-wide association study）を行い，薬剤耐性株に特異的に存在する獲得性遺伝子を同定した [3]。病原細菌において，菌種・菌株毎に保存性が異なる病原遺伝子は，菌株間のビルレンスの差違や菌株の地域・人種特異性などの原因となる可能性があり，極めて重要である。本研究では，我々は *A. baumannii* において，同菌種の主要な流行株である IC2 株（international clone II，MLST では ST2 に属する）の生物学的優位性を生み出す遺伝的特性を詳細に明らかにすることを目的に，国内外で同菌種の臨床分離株を収集し，Illumina 社および Pacific Biosciences 社の次世代シークエンサーを用いて配列解読を行い，細菌ゲノムデータベースを含めた大規模な比較ゲノム解析を行った。

ゲノム配列内の SNPs（single nucleotide polymorphisms）を基にした系統樹解析を行ったところ，本解析で用いた *A. baumannii* 臨床分離株のサンプルセットでは，流行株（IC2 株）は全体の 4 割程度占めていた（図 1）。薬剤耐性遺伝子の検出ツールである ResFinder [4] により獲得性耐性遺伝子および染色体上のキノロン耐性決定領域（QRDR: quinolone resistance determining region）内の変異の有無を検出した結果，ほぼ全ての菌株において，本菌種特異的に存在することが知られている $bla_{\text{OXA-51-like}}$ 遺伝子や $bla_{\text{ADC-like}}$ 遺伝子が共通して検出された。IC2 株では，その他の薬剤耐性遺伝子がゲノム上に数多く集積しており，全ての IC2 株において QRDR 内の *gryA* 遺伝子および *parC* 遺伝子上にキノロン耐性に寄与する変異を有していた（図 1）。また，微量液体希釈法により各種抗菌薬を用いた薬剤感受性試験を行ったところ，IC2 株は実際に数多くの抗菌薬に耐性を示し，多剤耐性化していた（図 1）。

次に，BLASTatlas [5] による *A. baumannii* 臨床分離株の比較ゲノム解析を行った。同解析では，中国で臨床分離された流行株（IC2 株）である BJAB07104 株のゲノム配列をリファレンスとし，ゲノム配列内の遺伝子を抽出し，それらに対して他の臨床分離株のゲノム配列から抽出した遺伝子を用いた BLAST ホモロジー検索を総当たりで行った。その結果，IC2 株同士の比較では，リファレンス株特異的に存在するプロファージ領域以外の遺伝子は高度に保存されていたが，IC2 株と IC2 以外の

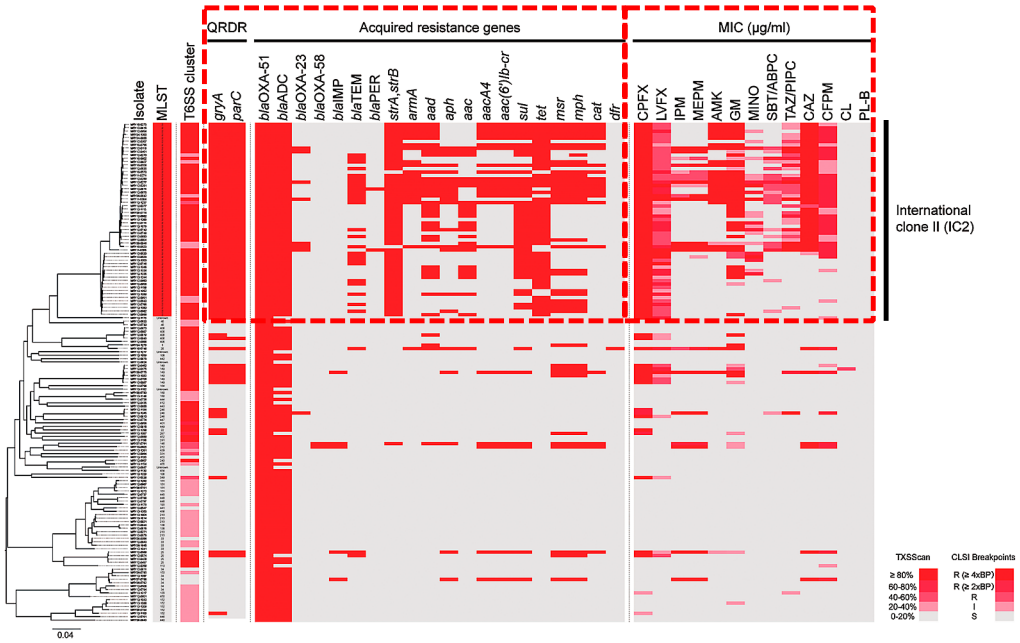

図 1. *A. baumannii* 臨床分離株の系統樹，薬剤耐性遺伝子，薬剤感受性の解析

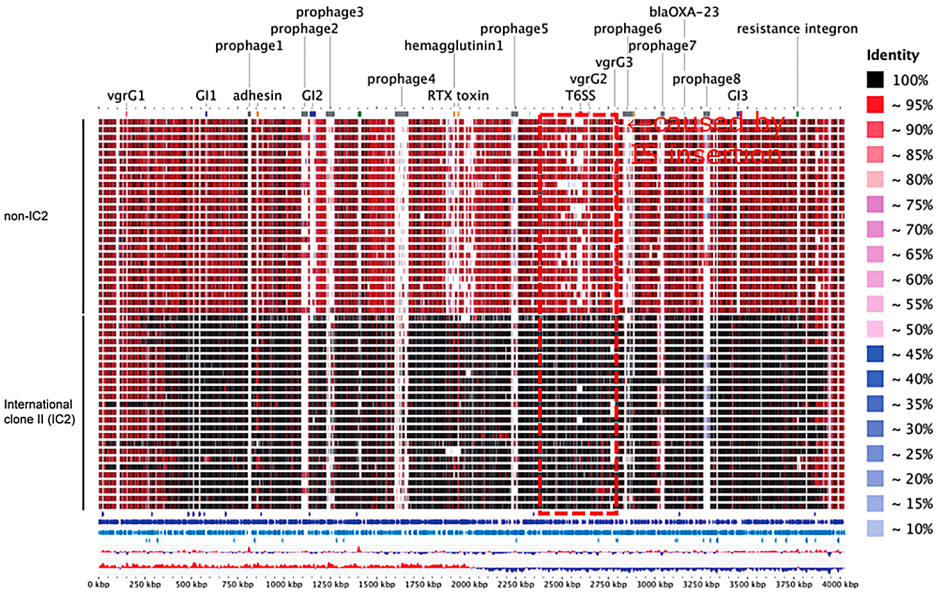

図 2. *A. baumannii* 臨床分離株の BLASTatlas による比較ゲノム解析

株（non-IC2 株）との比較においては，プロファージ領域に加えて，薬剤耐性遺伝子群，病原性に関係があると考えられる細菌毒素遺伝子および VI 型分泌機構（T6SS: type VI secretion system）関連遺伝子群（T6SS island）などが IC2 株にほぼ特異的に保存されていることが示唆された（図 2）。一方で，non-IC2 株では，しばしば挿入配列（IS: insertion sequence）の挿入による T6SS island の欠損が認められた（図 2）。

3. VI 型分泌機構（T6SS）

T6SS は，バクテリオファージの細菌に対する DNA 注入機構を起源としていると考えられており，分泌装置を標的細胞へ物理的に注入して分泌基質を注入するため，真核細胞と細菌の双方を標的とする [6]（図 3）。VI 型分泌タンパク質の原核細胞における標的としては細菌細胞壁を構成するペプチドグリカン，細胞膜を構成するリン脂質，DNA などが報告されている [6]。T6SS 陽性菌は，自身にとっても細胞障害性のある分泌タンパク質を有する場合には，その活性を阻害する免疫タンパク質を同時に有しており，自己同士または遺伝的に近いクローン同士は共通する免疫タンパク質を有しているため，T6SS を介しては競合しない。

細菌の VI 型分泌装置は，バクテリオファージの尾部構造と類似した鞘状構造を細胞質内に形成しており，ATP をエネルギー源とする伸縮運動によって，同構造

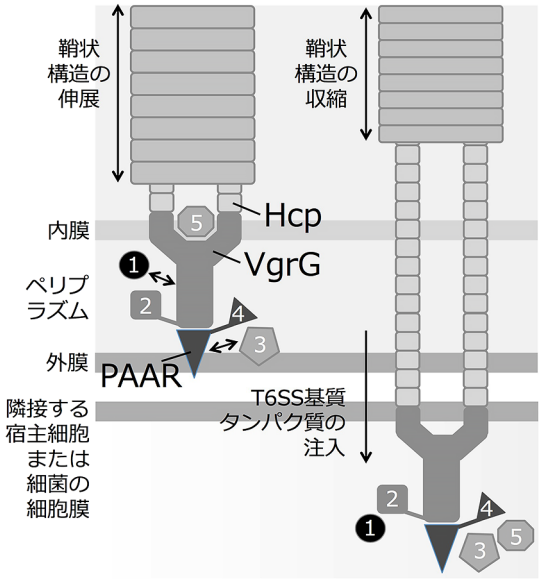

図 3.　細菌細胞内 VI 型分泌装置の伸縮運動と VI 型分泌基質の隣接細胞への注入

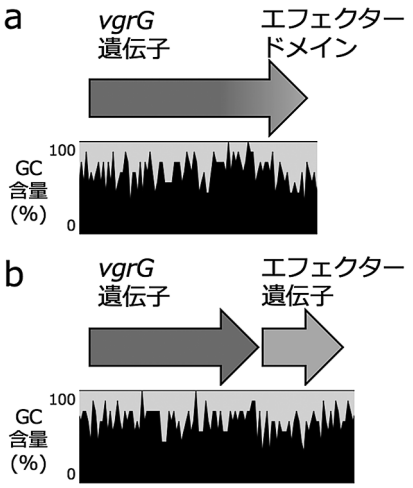

図 4.　*vgrG* 遺伝子と VI 型分泌基質遺伝子（VI 型エフェクター遺伝子）

の内部に収められたシリンジ状構造を隣接する細菌または宿主細胞へ物理的に注入する（図 3）。同構造は Hcp タンパク質がリング状に重合して形成されており，その先端には別のトランスロケーターである VgrG タンパク質と PAAR タンパク質がスパイク状構造を形成している（図 3）。VI 型分泌タンパク質の分泌経路として，「1. VgrG との結合」，「2. VgrG との融合」，「3. PAAR との結合」，「4. PAAR との融合」，「5. Hcp シリンジ管腔への取り込み」などが明らかとなっている（図 3）。T6SS は，細菌の他のタンパク質分泌機構である T1SS，T2SS，T3SS，T4SS などと異なり，基質タンパク質に分泌シグナルが存在することが知られておらず，アミノ酸の配列情報のみで基質か否かを推測することは難しい。

今までに報告された VI 型分泌タンパク質の分泌経路の多くは，「1. VgrG との結合」または「2. VgrG との融合」であり（図 3），前者の場合には，*vgrG* 遺伝子と酵素活性を有する基質タンパク質をコードする遺伝子はしばしばオペロンを形成しており，後者の場合には，*vgrG* 遺伝子の C 末端側に酵素活性ドメインが融合している（図 4）。*vgrG* 遺伝子下流の酵素活性をコードする DNA 領域は，細菌が水平伝播（HGT: horizontal gene transfer）で獲得したものと考えられ，染色体上の他の DNA 領域と比較して GC 含量が低いことが多い（図 4）。我々は，*A. baumannii* 流行株（IC2 株）は染色体上に 3 コピーの *vgrG* 遺伝子を有しており，そのうち 1 個の *vgrG* 遺伝子の下流の遺伝子産物において，新規の抗菌活性を有する VI 型分泌タンパク質を見出した（data not shown）。

4.　薬剤耐性と T6SS を介した細菌間競合

A. baumannii 臨床分離株のゲノム配列において，細菌のタンパク質分泌機構を構成する遺伝子群の検出ツールである TXSScan [7] による T6SS 構成遺伝子群（T6SS island）の検出を行ったところ，先の BLASTatlas による比較ゲノム解析の結果（図 2）と一致して，流行株（IC2 株）を含む幾つかのクラスターに含まれる菌株では，T6SS island が高度に保存されており，細菌間競合に強いことが示唆された。事実，我々の実験的検証では，*A. baumannii* 流行株は，同種間（non-IC2）および異種間（緑膿菌，大腸菌，肺炎桿菌, *A. nosocomialis*, *A. nosocomialis*，*A. pittii* など他のアシネトバクター属菌）との競合に強いことが明らかとなった。同種間の混合培養系において，伝達性プラスミドが効率よく細菌間で伝播する，即ち，接合伝達が効率よく惹起されるためには，個々の菌株同士が共存できることが重要であった。*A. baumannii* の IC2 株間では，薬剤耐性プラスミドの接合伝達が効率的に行われたが，IC2 株と non-IC2 株（T6SS island を欠損し，IC2 株と共通の T6SS を介した殺菌＆防御機構がない株）の間では，薬剤耐性プラスミドの接合伝達がほとんど行われなかった。しかし，T6SS の必須遺伝子を欠損させた IC2 株と non-IC2 株の間では，薬剤耐性プラスミドの接合伝達が効率的に行われることが観察された（data not shown）。

A. baumannii 臨床分離株において，QRDR 内の *gryA* 遺伝子のキノロン耐性変異（S83L 変異）と TXSScan で検出した T6SS 陽性のパターンは非常によく相関しており（図 5），ほぼ全ての流行株（IC2 株）では，キノロン耐性，T6SS 陽性であった。即ち，T6SS 陽性のクローンを先祖として現在臨床で問題となっている薬剤耐性流行株が形成されたものと考えられる。T6SS 陽性菌は，細菌間競合に強く，隣接細菌を殺菌することが可能である。アシネトバクター属菌は自然形質転換（natural transformation）の能力が高いため，同菌種は，T6SS を介して殺菌した隣接細菌から放出される DNA を自然形質転換にて積極的に取り込むことが報告されている [8]。そのため，*A. baumannii* 流行株は，T6SS を介して共存する細菌から薬剤耐性遺伝子や細菌毒素遺伝子など有用な遺伝子を奪い，自らのゲノム上に集積させてきた可能性が示唆された。本研究から，同菌種の多剤耐性流行株に関して以下のような進化モデルが考えられる。

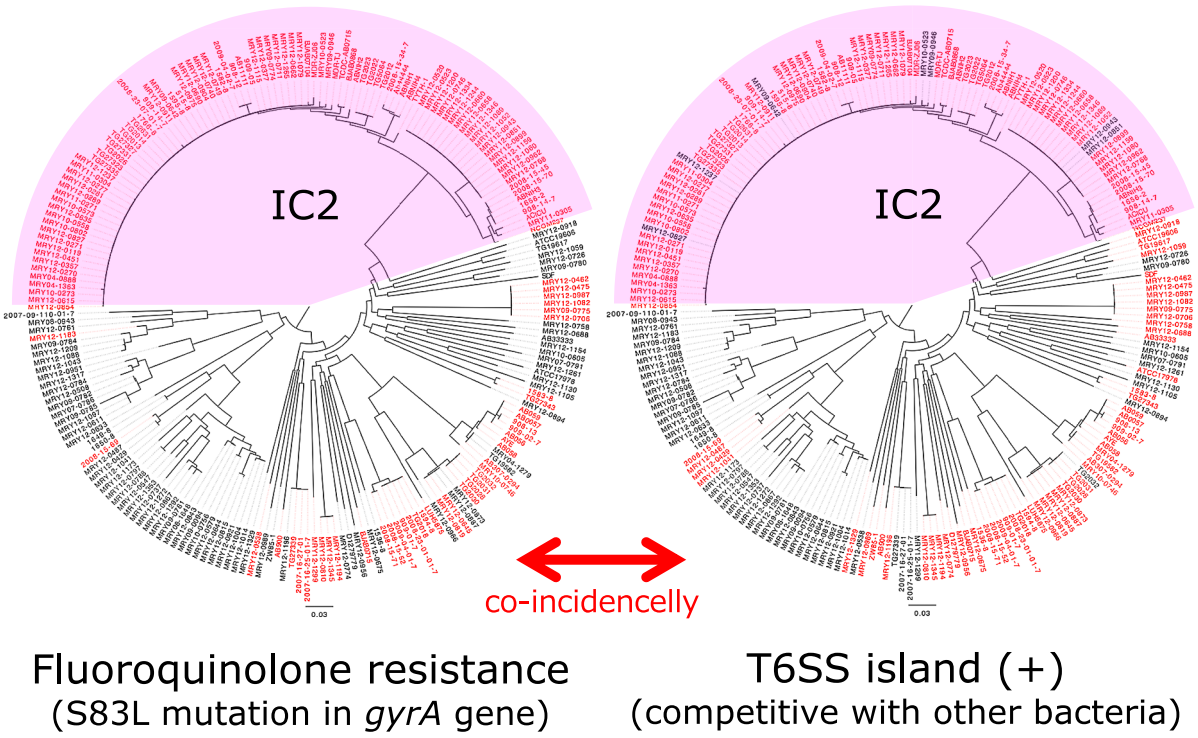

図 5. *A. baumannii* 臨床分離株におけるキノロン耐性変異と T6SS 陽性の相関

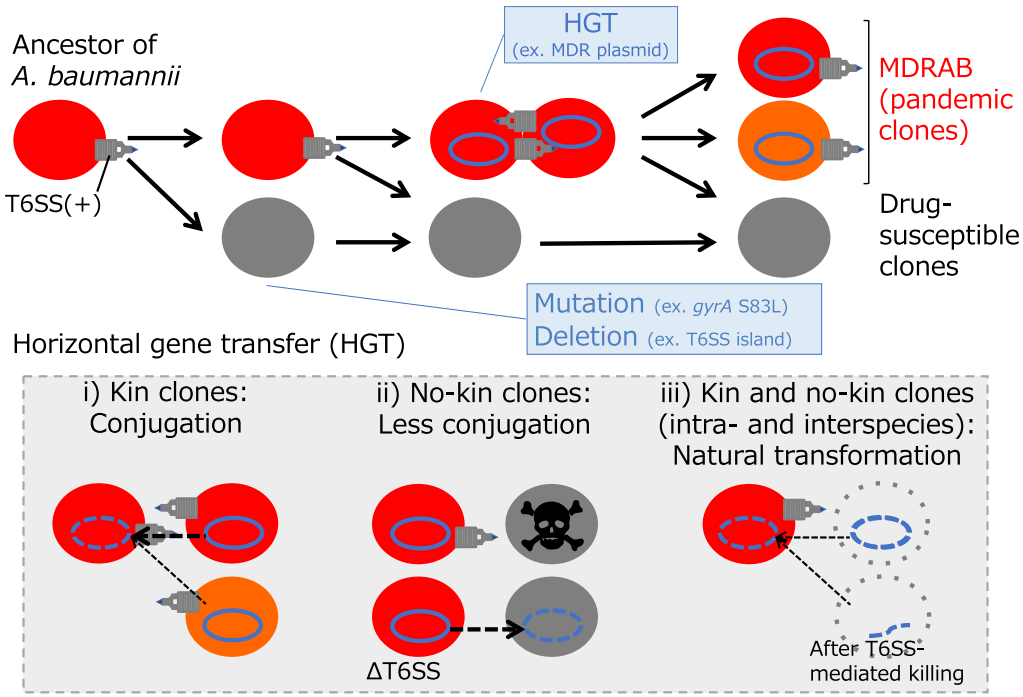

図 6. *A. baumannii* とその多剤耐性流行株の進化モデル

5. ま と め

現在の *A. baumannii* の先祖は T6SS 陽性であり，伝達性プラスミドの接合伝達および T6SS と自然形質転換による非自己細菌から DNA の略奪などを介して，水平伝播（HGT）による遺伝的変化を加速させ，効率よく進化してきたと考えられる（図 6）。分泌装置の伸縮運動と連動した T6SS によるタンパク質の分泌には膨大な ATP エネルギーを必要とするため，菌密度が低く，栄養面で競合的ではない環境下の菌株，または抗菌物質などによる選択圧がなく，HGT を推進する必要性が少ない環境下の菌株の一部は，T6SS island を欠損してしまったことが考えられる（図 6）。そのため，T6SS の機能的阻害を目的とした創薬では，病原細菌の非自己細菌との競合

性や宿主への病原性を低下させ，薬剤耐性遺伝子の伝播などの HGT を抑制する効果が期待できるかもしれない。

謝　辞

本研究は，国立感染症研究所薬剤耐性研究センター，細菌第二部，および病原体ゲノム解析研究センターの協力にて為されたものである。細菌第二部部長柴山恵吾先生を始めとする共同研究者の先生方に感謝したい。また本研究は，科学研究費助成事業・若手研究（A）「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」，基盤研究（C）「薬剤耐性菌流行株の拡散機構の解明」，および日本医療研究開発機構（AMED）新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業「薬剤耐性菌サーベイランスの強化及びゲノム解析の促進に伴う迅速検査法開発に関する研究」の研究助成にて為されたものである。

文　献

1) Woodford, N., J. F. Turton, and D. M. Livermore. 2011. FEMS Microbiol. Rev. 35(5): 736–755.
2) Wattam, A. R., D. Abraham, O. Dalay, T.L. Disz, T. Driscoll, J.L. Gabbard, J.J. Gillespie, R. Gough, D. Hix, R. Kenyon, D. Machi, C. Mao, E.K. Nordberg, R. Olson, R. Overbeek, G.D. Pusch, M. Shukla, J. Schulman, R.L. Stevens, D.E. Sullivan, V. Vonstein, A. Warren, R. Will, M.J. Wilson, H.S. Yoo, C. Zhang, Y. Zhang, and B.W. Sobral. 2014. Nucleic. Acids Res. 42: D581–D591.
3) Suzuki, M., K. Shibayama, and K. Yahara. 2016. Sci. Rep. 6: 37811.
4) Zankari, E., H. Hasman, S. Cosentino, M. Vestergaard, S. Rasmussen, O. Lund, F.M. Aarestrup, and M.V. Larsen. 2012. J. Antimicrob. Chemother. 67(11): 2640–2644.
5) Hallin, P.F., T.T. Binnewies, and D.W. Ussery. 2008. Mol. Biosyst. 4(5): 363–371.
6) Russell, A.B., S.B. Peterson, and J.D. Mougous. 2014. Nat. Rev. Microbiol. 12(2): 137–148.
7) Abby, S.S., J. Cury, J. Guglielmini, B. Néron, M. Touchon, and E.P. Rocha. 2016. Sci. Rep. 6: 23080.
8) Cooper, R.M., L. Tsimring, and J. Hasty. 2017. eLife. 6: e25950.