

図4. 小児の疾患別にみた6菌種・PCRの陽性率

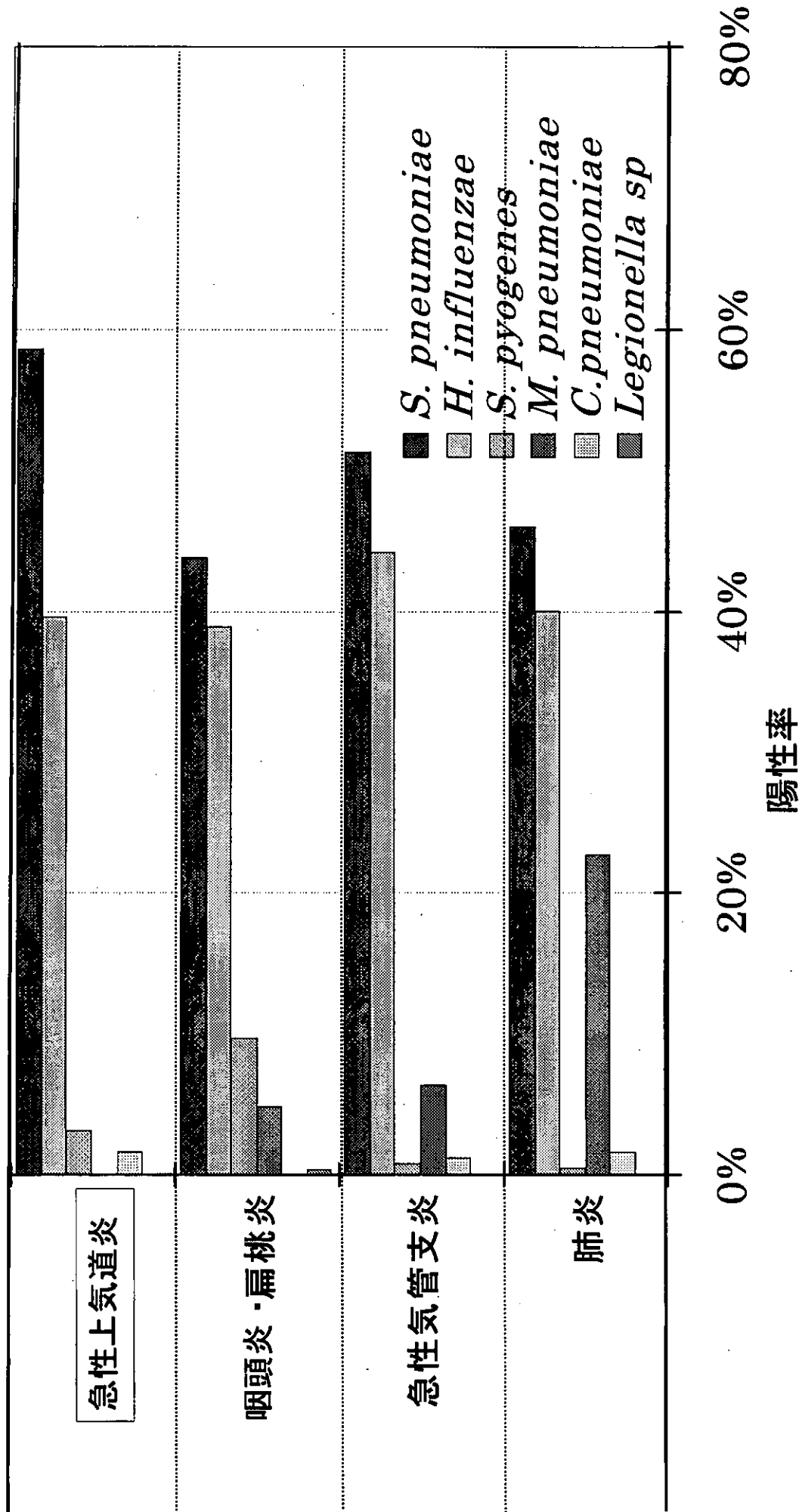
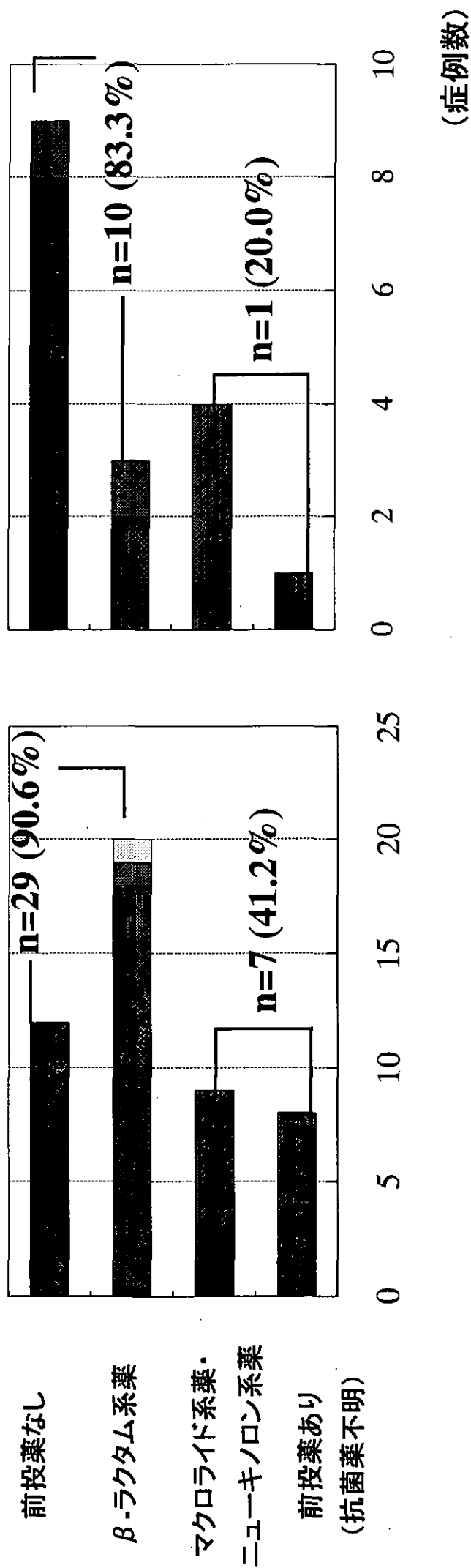


図5. PCRによる*M.pneumoniae*陽性率と前投薬および抗体価との関係(PA・CF法)

PA法 (n=49)

CF法 (n=17)



■ PCR (+)・抗体価 (+) ■ PCR (-)・抗体価 (+) ■ PCR (+)・抗体価 (-) 1例 ■ PCR (-)・抗体価 (-)

平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業

「新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・

簡便検出法に関する研究」

分担：「カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究」報告書

平成 16 年 3 月

後藤正文

熊本大学大学院医学薬学研究部

構造機能物理化学分野

目次		
第1章	緒言	1
第2章	実験方法	3
第1節	<i>Serratia marcescens</i> 由来メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) の調製と精製	3
第1項	<i>E.coli</i> BL21 (DE3) (pET9a / d-IMP) からの IMP-1 の抽出と精製	3
第2項	加水分解活性の検定	3
第3項	IMP-1 の定量	3
第2節	本研究で用いた蛍光剤の DansylCnSH (n = 2-6) の合成	3
第3節	メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼによる蛍光剤の蛍光特性の変化	5
第4節	DansylCnSH (n = 2-6)、DansylSH とメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) との解離定数の決定	5
第5節	DansylCnSH (n = 2-6) による IMP-1 阻害の検討	6
第6節	メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) と DansylC4SH との複合体の X 線結晶構造解析	7
第1項	結晶化	7
第2項	X 線結晶構造解析	8
第3章	結果と考察	9
第1節	メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) による蛍光剤の蛍光特性の変化	9
第1項	IMP-1 共存下の DansylCnSH (n = 2-6)、DansylSH の蛍光スペクトル変化	10
第2項	DansylCnSH (n = 2-6)、DansylSH と IMP-1 との解離定数の決定	11
第2節	DansylCnSH (n = 2-6) による IMP-1 阻害の検討	12
第3節	IMP-1 と DansylC4SH との複合体の X 線結晶構造解析	14
第4章	総括	15
引用文献		17

## 第二章 実験方法

### 第1節 *Serratia marcescens* 由来メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の調製と精製

#### 第1項 *E. coli* BL21 (DE3) (pET9a / d-IMP) からの IMP-1 の抽出と精製

*Serratia marcescens* TN9106 株由来のシグナルペプチドが除かれた pET9a / d-IMP で形質転換した *E. coli* BL 21 (DE3) からメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) を既に報告されている方法に従って抽出・精製した<sup>16)</sup>。ただし、プラスミド pET9a ベクターは T7 プロモーターをもつため培養過程で Isopropyl-β-D-thiogalactopyranoside (IPTG) を添加した。10 L の培養液から約 144 mg の精製酵素を得ることができた。

精製された IMP-1 の純度検定は SDS-PAGE を用いて行った。分子量マーカーのバンドの位置から酵素の分子量は約 25,000 Dalton であること、及び単一バンドを示していることから確認した。

#### 第2項 加水分解活性の検定

酵素活性の評価は、分光光度法によって行った。100 μM セファロリジンを含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl) 緩衝液 3.1 mL を UV 測定用セルに入れ混合し、30 °C で 5 分間インキュベートし、約 0.4 μM 酵素溶液 10 μL を添加しすばやく振り混ぜた後、260 nm の吸光度の減少を 3 分間経時的に測定し吸光度の減少から初速度を求めた。

#### 第3項 IMP-1 の定量

IMP-1 の濃度は分光光度法により求めた。すなわち、IMP-1 のモル吸光係数を  $\epsilon_{280} = 49,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$  とし、IMP-1 溶液の 280 nm における吸光度から濃度を算出した。

### 第2節 本研究で用いた蛍光剤 DansylCnSH (n = 2 – 6) の合成

溶媒として、酢酸エチルを用いて、ダンシルエチレンジアミン、ダンシルプロピルジアミン、ダンシルブチルジアミン、ダンシルペンチルジアミン、ダンシルヘキシルジアミンを各々 3-メルカプトプロピオン酸と DCC 法により縮合し、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (φ 30 mm × 17 cm, 溶出液; 20 % メタノール-クロロホルム) により分離、精製を行い、いずれも油状物として得た。

#### *N*[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)ethyl]-3-mercaptopropionamide

(DansylC2SH). 収率 77 %. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>): δ 1.51 (t, 1H), 2.29 (t, 2H), 2.66 (q, 2H), 2.89 (s, 6H), 3.06 (q, 2H), 3.32 (q, 2H), 5.80 (t, 1H), 6.20 (t, 1H), 7.19 (d, 1H, *J* = 7.32 Hz), 7.52 (t, 1H, *J* =

7.32 Hz), 7.57 (t, 1H,  $J = 7.93$  Hz), 8.23 (d, 1H,  $J = 8.55$  Hz), 8.28 (d, 1H,  $J = 8.54$  Hz), 8.55 (d, 1H,  $J = 8.54$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.31, 39.40, 40.08, 43.09, 45.41, 115.37, 118.60, 123.25, 128.63, 129.50, 129.68, 129.98, 130.75, 134.35, 152.18, 171.67. HRFABMS:  $m/z$  381.1213 [calcd for  $\text{C}_{17}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$  381.1181].

***N*[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)propyl]-3-mercaptopropionamide**

(DansylC3SH). 収率 62 %.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.33 (t, 1H), 1.49 (q, 2H), 2.29 (t, 2H), 2.59 (q, 2H), 2.81 (s, 6H), 2.85 (q, 2H), 3.19 (q, 2H), 5.89 (t, 1H), 6.00 (t, 1H), 7.11 (d, 1H,  $J = 7.94$  Hz), 7.43 (t, 1H,  $J = 4.27$  Hz), 7.49 (t, 1H,  $J = 4.27$  Hz), 8.13 (d, 1H,  $J = 6.10$  Hz), 8.24 (d, 1H,  $J = 8.55$  Hz), 8.45 (d, 1H,  $J = 8.55$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  19.35, 28.56, 34.99, 39.00, 39.15, 44.41, 114.30, 117.93, 122.18, 127.39, 128.20, 128.54, 128.89, 129.37, 134.09, 150.94, 170.66. HRFABMS:  $m/z$  396.1463 [calcd for  $\text{C}_{18}\text{H}_{25}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$  ( $M + \text{H}^+$ ) 396.1415].

***N*[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)butyl]-3-mercaptopropionamide**

(DansylC4SH). 収率 31 %.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.47 (q, 2H), 1.47 (q, 2H), 1.56 (t, 1H), 2.42 (t, 2H), 2.77 (q, 2H), 2.90 (s, 6H), 2.91 (q, 2H), 3.16 (q, 2H), 5.12 (t, 1H), 5.68 (t, 1H), 7.19 (d, 1H,  $J = 7.93$  Hz), 7.53 (t, 1H,  $J = 7.63$  Hz), 7.56 (t, 1H,  $J = 8.24$  Hz), 8.24 (d, 1H,  $J = 7.33$  Hz), 8.30 (d, 1H,  $J = 8.54$  Hz), 8.55 (d, 1H,  $J = 8.55$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.45, 26.54, 26.81, 38.84, 40.36, 42.86, 45.43, 115.25, 118.71, 123.23, 128.46, 129.65, 129.65, 129.95, 130.51, 134.66, 152.11, 170.84. HRFABMS:  $m/z$  410.1616 [calcd for  $\text{C}_{19}\text{H}_{27}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$  ( $M + \text{H}^+$ ) 410.1572].

***N*[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)pentyl]-3-mercaptopropionamide**

(DansylC5SH). 収率 46 %.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.25 (q, 2H), 1.34 (q, 2H), 1.42 (q, 2H), 1.58 (t, 1H), 2.44 (t, 2H), 2.78 (q, 2H), 2.89 (s, 6H), 2.89 (q, 2H), 3.13 (q, 2H), 5.14 (t, 1H), 5.79 (t, 1H), 7.19 (d, 1H,  $J = 7.32$  Hz), 7.52 (t, 1H,  $J = 8.24$  Hz), 7.56 (t, 1H,  $J = 8.24$  Hz), 8.23 (d, 1H,  $J = 7.32$  Hz), 8.32 (d, 1H,  $J = 8.55$  Hz), 8.54 (d, 1H,  $J = 8.54$  Hz).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.51, 23.38, 28.75, 28.90, 39.07, 39.07, 40.39, 42.90, 45.43, 115.25, 118.77, 123.22, 128.41, 129.55, 129.67, 129.95, 130.43, 134.85, 152.06, 170.88. HRFABMS:  $m/z$  424.1757 [calcd for  $\text{C}_{20}\text{H}_{29}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$  ( $M + \text{H}^+$ ) 424.1728].

***N*[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)hexyl]-3-mercaptopropionamide**

(DansylC6SH). 収率 55%.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.19 (q, 2H), 1.19 (q, 2H), 1.36 (q, 2H), 1.37 (q, 2H), 1.58 (t, 1H), 2.45 (t, 2H), 2.78 (q, 2H), 2.89 (q, 2H), 2.89 (s, 6H), 3.16 (q, 2H), 4.97 (t, 1H), 5.73 (t, 1H), 7.19 (d, 1H,  $J=7.32$  Hz), 7.52 (t, 1H,  $J=4.28$  Hz), 7.56 (t, 1H,  $J=8.24$  Hz), 8.24 (d, 1H,  $J=6.10$  Hz), 8.31 (d, 1H,  $J=8.55$  Hz), 8.54 (d, 1H,  $J=8.54$  Hz).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.53, 25.69, 25.88, 29.26, 29.34, 39.13, 40.45, 42.96, 45.43, 115.22, 118.77, 123.22, 128.38, 129.51, 129.67, 129.95, 130.38, 134.94, 150.06, 170.73. HRFABMS:  $m/z$  438.1843 [calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_3\text{S}_2$  ( $M+H^+$ ) 438.1885]

### 第3節 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼによる蛍光剤の蛍光特性の変化

蛍光スペクトル測定は 25 °C、スリット幅 5.0 nm の条件下、励起波長 340 nm (測定波長 : 350 nm から 800 nm)、280 nm (測定波長 : 290 nm から 800 nm) としてメタノール 10 % を含む 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl) 緩衝液を用いて行った。

蛍光剤として DansylCnSH ( $n=2-6$ )、DansylSH (4-Dimethylamino-naphtalene-1-sulfonic acid (2-mercaptoethyl)amide) を用い、各々の蛍光剤の濃度が 100  $\mu\text{M}$  になるようにメタノール (紫外部吸収スペクトル用) で調製し、測定の際はこの溶液を 30  $\mu\text{L}$  とり全量 3 mL にして、測定溶液中 1  $\mu\text{M}$  の濃度になるようにした。

### 第4節 DansylCnSH ( $n=2-6$ )、DansylSH とメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ(IMP-1)との解離定数の決定

1  $\mu\text{M}$  の DansylCnSH ( $n=2-6$ ) 溶液に酵素 (IMP-1、VIM-2) 濃度が測定溶液中 0.1 から 10  $\mu\text{M}$  になるように酵素溶液を適宜加えていき、励起波長 340 nm として蛍光スペクトルを測定した。蛍光剤 DansylSH は IMP-1 を用いて測定を行った。

さらに、535 nm における蛍光強度を酵素濃度に対してプロットし (6) 式の回帰曲線にあてはめ、解離定数  $K_d$  を求めた。



(1)より

$$K_d = \frac{[\text{DansylCnSH}][\text{IMP}\cdot 1]}{[\text{DansylCnSH}\cdot\text{IMP}\cdot 1]} \quad (2)$$

$$[\text{DansylCnSH}]_{\text{tot}} = [\text{DansylCnSH}]_{\text{free}} + [\text{DansylCnSH}\cdot\text{IMP}\cdot 1] \quad (3)$$

$$[\text{IMP-1}]_{\text{tot}} = [\text{IMP-1}]_{\text{free}} + [\text{DansylCnSH} \cdot \text{IMP-1}] \quad (4)$$

$$\text{FI} = a \frac{[\text{DansylCnSH} - \text{IMP-1}]}{[\text{DansylCnSH}]_{\text{tot}}} + b \frac{[\text{DansylCnSH}]_{\text{free}}}{[\text{DansylCnSH}]_{\text{tot}}} \quad (5)$$

ただし、

FI : 蛍光強度

a : 十分量の IMP-1 存在下における DansylCnSH (n = 2-6) の蛍光強度

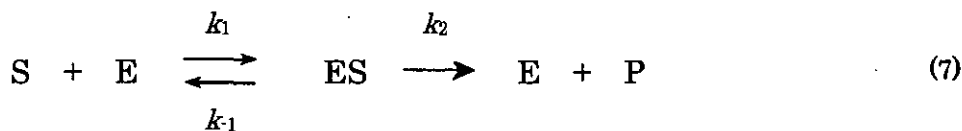
b : IMP-1 非存在下における DansylCnSH (n = 2-6) の蛍光強度

(2), (3), (4), (5) より、

$$\text{FI} = a \frac{K_d + [\text{IMP-1}]_{\text{tot}} + 1 - \sqrt{(K_d + [\text{IMP-1}]_{\text{tot}} + 1)^2 - 4[\text{IMP-1}]_{\text{tot}}}}{2} - b \frac{1 - K_d - [\text{IMP-1}]_{\text{tot}} + \sqrt{(K_d + [\text{IMP-1}]_{\text{tot}} + 1)^2 - 4[\text{IMP-1}]_{\text{tot}}}}{2} \quad (6)$$

#### 第5節 DansylCnSH (n = 2-6) による IMP-1 阻害の検討

所定の濃度となるようにメタノールで調製した DansylCnSH (n = 2-6) 溶液 0.1 mL と 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl) 緩衝液で調製した 310 nM の IMP-1 溶液 10 μL を UV 測定用セルに入った 50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5 M NaCl) 緩衝液 2.9 mL に加え全量 3.0 mL とした。30 °C で 10 分間インキュベートした後、この溶液に 3.1 mM ニトロセフィンの DMSO 溶液 0.1 mL を加え混合し 491 nm における吸光度変化を経時的に 3 分間測定した。コントロールとして、DansylCnSH (n = 2-6) の代わりにメタノール 0.1 mL を用いて同様に測定した。得られた各初速度より見かけの分子活性  $k_2 / \text{min}^{-1}$  を求め、DansylCnSH (n = 2-6) の濃度に対してプロットした。これより  $\text{IC}_{50}$  を求め、さらに (10) 式の拮抗阻害の回帰曲線より阻害定数  $K_i$  値を求めた。



ただし、



S: 基質 (ニトロセフィン), E: 酵素 (IMP-1), P: 生成物

I: 阻害剤 (DansylCnSH (n = 2-6))

(9)より、

$$K_i = \frac{[E][I]}{[EI]} \quad (9)$$

(8), (9)より、

$$v = \frac{V_{\max}[S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (10)$$

ただし、

v: 見かけの反応速度,  $V_{\max}$ : 最大速度

$K_m$ : ミカエリス定数 (20  $\mu$ M for Nitrocefin)

[S]: ニトロセフィンの濃度 (100  $\mu$ M)

[I]: DansylCnSH (n = 2-6) の濃度

## 第6節 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) と DansylC4SH との複合体の X線結晶構造解析

### 第1項 結晶化

IMP-1 溶液をセントリコンで濃縮し、20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 緩衝液に変換した後、500  $\mu$ M (10 mg/mL) まで濃縮した。その後メンブレンフィルターに通し、結晶化用のタンパク溶液とした。

リザーバ溶液は、2.0 g の PEG 4000 を 10 mL のメスフラスコに入れ、0.2 M 酢酸ナトリウム-0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 6.5) を調製、メスアップし、この溶液をメンブレンフィルターに通した。

DansylC4SH は濃度が約 10 mM となるようにメタノールに溶かし、その後メンブレンフィルターに通し、結晶化用の蛍光試薬溶液とした。

結晶化は 20  $^{\circ}$ C において蒸気平衡法 (hanging drop) で行った。30  $\mu$ L のタンパク溶液と 30  $\mu$ L のリザーバ溶液を混ぜ、そこに 15  $\mu$ L の蛍光試薬溶液を加え氷上で一晩放置した。その後遠心 (12000 rpm, 10 min) し、その上清 6  $\mu$ L を 1 Drop とした。350  $\mu$ L のリザーバ液で 2, 3 日放置すると板状の結晶 (0.2  $\times$  0.2  $\times$  0.2 mm) が十数個成長した。結晶は空間群 (space group) が  $P2_12_12_1$  で斜方晶系に属し、格子

定数 (unit cell dimensions) は  $a = 37.905 \text{ \AA}$ 、 $b = 55.896 \text{ \AA}$ 、 $c = 59.445 \text{ \AA}$  であり、非対称単位中に結晶学的に独立なタンパク質分子が 2 つ存在した。

## 第2項 X線結晶構造解析

2.4  $\text{\AA}$  の分解能の回折データは、SPring-8 のビームライン BL38B1 において、1.00  $\text{\AA}$  の X 線で ADSC CCD カメラを detector として 100 K で測定した。測定時間 30 秒、振動角  $0.5^\circ$  で 360 枚データを集めた。また結晶-detector 距離は 220 mm にした。結晶は結晶化溶液である Drop を 25 % PEG-4000 を含む 0.2 M 酢酸ナトリウム-0.1 M クエン酸ナトリウム (pH 6.5) 2  $\mu\text{L}$  ずつで数回置換し cryoprotected した。これらのデータは DENZO / SPACEPACK<sup>26)</sup> を使って、integrating、merging、scaling した。Table 1 に測定条件と結晶データ、回折データをまとめた。

Table 1. X-ray Data collection.

(a) Measurement condition	
X-ray source	SPring-8 BL38B1
Wave length	1.00 $\text{\AA}$
camera type	ADSC CCD camera
camera distance	220 mm
crystal size	0.2 $\times$ 0.2 $\times$ 0.2 mm
Temperature	100 K

(b) Crystallographic data		(c) Diffraction data	
Space group	$P2_12_12_1$	resolution	2.4 $\text{\AA}$
Cell constant	$a = 37.905 \text{ \AA}$	no. of obserbed reflections	133304
	$b = 55.896 \text{ \AA}$	no. of unique reflections	19464
	$c = 59.445 \text{ \AA}$	completeness	97.6 %
Z	8	$R$ -merge	0.055
$V_m$	2.51 $\text{\AA}^3/\text{Dalton}$	I / Sigma	23.8

DansylC4SH と IMP-1 との複合体の構造は分子置換法によって決定した。2000 年に Concha 等によって報告されている *P. aeruginosa* 由来の IMP-1 (PDB file, 1DD6)<sup>27)</sup> を search model として使用した。プログラムは CCP-4 の AMoRe<sup>28)</sup>を用いた。グラフィックプログラム O<sup>28)</sup> でモデルを修正し、プログラム CNS<sup>30)</sup> で構造の精密化を行った。精密化には結晶学的に独立な 2 つのタンパク質分子が同一構造を持つという制限 (noncrystallographic symmetry, NCS) を用いて行った。また DansylC4SH の構造は新規な構造だったので、

<http://www.alpha2.bmc.uu.se/hicup>

にある既存の化合物の parameter と topology から DansylC4SH の parameter と topology を作成し、DansylC4SH の構造の精密化に用いた。Table 2 に精密化で得られたデータをまとめた。

Table 2. Refinement data.

Refinement data	
<i>R</i>	0.208
<i>R</i> <sub>free</sub>	0.247
no. of used reflection ( <i>F</i> ≠ 0)	19418
no. of atoms in asymmetric unit	
Protein	3388
Ligand	54
Solvent	220
rms deviation from ideal	
bond lengths (Å)	0.01
bond angles (deg)	1.6

### 第三章 結果と考察

#### 第1節 メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) による蛍光剤の蛍光特性の変化

当研究室より低分子量チオール化合物がメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) を阻害することが既に報告されている<sup>26)</sup>。このことを基にして、蛍光発色団としてダンシル基を有したチオール化合物がメタ

ロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) に対して有効な蛍光剤になると考え、メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) による蛍光特性について検討を行った。

#### 第1項 IMP-1 共存下の DansylCnSH (n = 2-6)、DansylSH の蛍光スペクトル変化

DansylCnSH (n = 2-6)、DansylSH は 340 nm で極大吸収を示す。そこで 340 nm で励起して、IMP-1 非存在下及び存在下における各々の蛍光剤の蛍光スペクトルを Fig. 2 に示した。また、測定結果より、IMP-1 存在下及び非存在下における 533 nm での蛍光強度比を求めた (Fig. 3)。

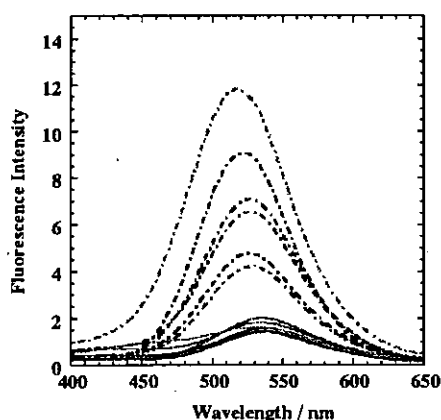


Fig. 2. Fluorescence emission spectra (excitation 340 nm) of 1  $\mu$ M Dansyl derivatives in the absence (solid line) or in the presence (dashed line) of equimolar IMP-1. Black, DansylC2SH; pink, DansylC3SH; blue, DansylC4SH; green, DansylC5SH; red, DansylC6SH; orange, DansylSH. These spectra were measured at 25  $^{\circ}$ C, in 50 mM Tris-HCl Buffered solution (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 10 % methanol.

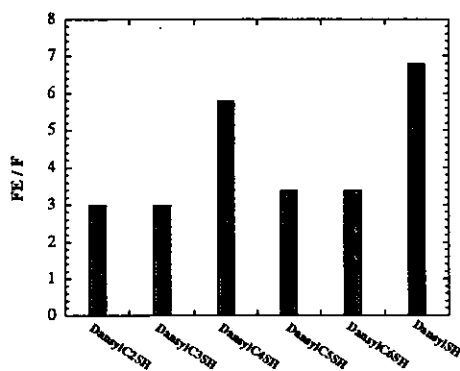


Fig. 3. Ratio of fluorescence intensity. FE is the fluorescence intensity of Dansyl derivatives in the presence of IMP-1 and F is the fluorescence intensity in the absence of IMP-1.

Fig. 2 より 340 nm で励起すると 1  $\mu$ M の蛍光剤のみでは極大波長約 535 nm を示す蛍光スペクトルを得た。等モルの IMP-1 存在下では蛍光強度は増大し、各々の極大波長は DansylC2SH のとき 526 nm、DansylC3SH のとき 528 nm、DansylC4SH のとき 522 nm、DansylC5SH のとき 527 nm、DansylC6SH のとき 527 nm、DansylSH のとき 517 nm となり、いずれも短波長側へシフトした。ここで、図には示していないが DansylCnSH (n = 2-6) に亜鉛(II)を添加すると 535 nm における蛍

光は消光し、DansylSH の場合は蛍光強度が増大する。

IMP-1 存在下及び非存在下における蛍光強度比を求めた (Fig. 3)。各々の蛍光強度比は 3.0 (DansylC2SH)、3.0 (DansylC3SH)、5.8 (DansylC4SH)、3.4 (DansylC5SH)、3.4 (DansylC6SH)、6.8 (DansylSH) となった。以上より、等モルの IMP-1 存在下では DansylSH 次いで DansylC4SH のときに蛍光強度は大きく増大した。

## 第2項 DansylC<sub>n</sub>SH (n = 2-6)、DansylSH と IMP-1 との解離定数の決定

IMP-1 存在下では DansylC<sub>n</sub>SH (n = 2-6)、DansylSH の蛍光強度は増大することが分かったので、その蛍光強度の増大に及ぼす IMP-1 の濃度依存性について検討を行った。DansylC4SH の結果を Fig. 4 に示す。得られた蛍光スペクトルより、535 nm における蛍光強度を IMP-1 濃度に対してプロットした (Fig. 4)。それぞれについて DansylC<sub>n</sub>SH-IMP-1  $\rightleftharpoons$  DansylC<sub>n</sub>SH + IMP-1 から求めた (7) 式の回帰曲線にあてはめて解離定数  $K_d$  を求めた (Table 3)。

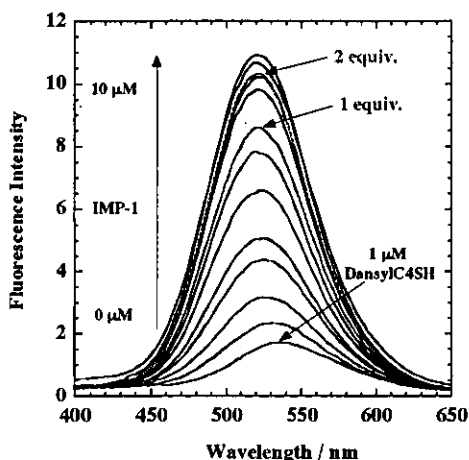


Fig. 4. Fluorescence emission spectra (excitation 340 nm) of 1  $\mu$ M DansylC4SH with increasing concentration of IMP-1 ranging from 0 to 10  $\mu$ M or 8  $\mu$ M. Blue, 1 equiv. of IMP-1; red, 2 equiv. of IMP-1. These spectra were measured at 25  $^{\circ}$ C, in 50 mM Tris-HCl Buffered solution (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl and 10 % methanol.

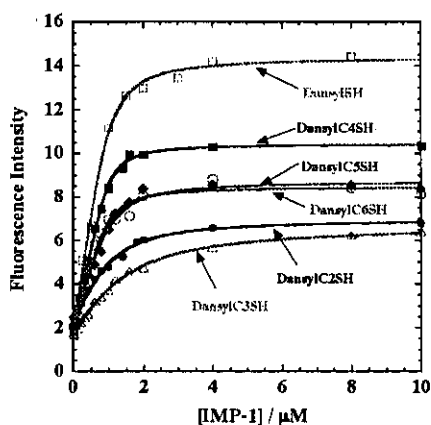


Fig. 5 Dependency of fluorescence intensity at 535 nm of Dansyl derivatives

Fig. 4より1  $\mu\text{M}$ のDansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ )、DansylSHにIMP-1を段階的に添加していくと、IMP-1の濃度の増加と共に蛍光強度は増大し、極大波長は約535 nmからそれぞれDansylC2SHのとき525 nm、DansylC3SHのとき523 nm、DansylC4SHのとき519 nm、DansylC5SHとDansylC6SHのとき527 nm、DansylSHのとき516 nmへとシフトし、いずれも低波長側へシフトした (Table 3)。特に、DansylSHは蛍光強度が約16まで増大した。

そこで535 nmにおける蛍光強度をIMP-1の濃度に対してプロットした (Fig. 5)。すると、いずれの蛍光剤においてもIMP-1濃度が1  $\mu\text{M}$ までは濃度の増加と共に蛍光強度は急激に増大し、それ以降は次第に飽和する現象が観測された。これは、 $\text{DansylC}_n\text{SH} + \text{IMP-1} \rightleftharpoons \text{DansylC}_n\text{SH} \cdot \text{IMP-1}$ として解析することができ、これより求められた (6) 式の回帰曲線から解離定数  $K_d$  を求めた (Table 3)。各々の解離定数  $K_d$  は356 nM (DansylC2SH)、975 nM (DansylC3SH)、67 nM (DansylC4SH)、154 nM (DansylC5SH)、105 nM (DansylC6SH)、111 nM (DansylSH)となった。これよりDansylC4SHが最も解離定数  $K_d$  の値が小さくIMP-1に結合しやすいことが分かった。

Table 3. Dissociation constants and  $\lambda_{\text{max}}$  of Dansyl derivatives with IMP-1.

Dansyl derivatives	$K_d$ / nM	$\lambda_{\text{max}}$ / nm
DansylC2SH	356 $\pm$ 66	525
DansylC3SH	975 $\pm$ 110	523
DansylC4SH	67 $\pm$ 14	519
DansylC5SH	154 $\pm$ 41	527
DansylC6SH	105 $\pm$ 42	527
DansylSH	111 $\pm$ 32	516

## 第2節 DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ) によるIMP-1阻害の検討

緒論でも述べたように、低分子量チオール化合物がIMP-1の活性中心の亜鉛(II)に配位することでIMP-1を阻害することが分かっており、例えば3-メルカプトプロピオン酸は阻害定数  $K_i = 1.2 \mu\text{M}$ 、メルカプト酢酸は  $K_i = 0.23 \mu\text{M}$  で阻害する。そこでチオール基をもつ本蛍光剤 DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ) についてもIMP-1の活性を阻害すると期待される。そこで、それぞれのDansylC $n$ SH ( $n = 2-$

6) の濃度に対して見かけの分子活性  $k_2 / \text{min}^{-1}$  をプロットし、IMP-1 に対する  $\text{IC}_{50}$  (酵素活性を 50% 阻害する濃度) と (10) 式の拮抗阻害の回帰曲線より阻害定数  $K_i$  値を求めた。DansylC4SH 濃度に対しての見かけの分子活性  $k_2 / \text{min}^{-1}$  のプロットを Fig. 6 に、それぞれの  $\text{IC}_{50}$  と阻害定数  $K_i$  を Table 4 に示す。

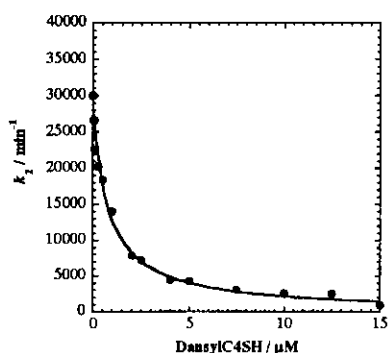


Fig. 6. Plot of apparent activity  $k_2$  against the concentration of DansylC4SH. The curve was obtained by nonlinear least-squares fitting of competitive inhibition mode. Activity was measured by hydrolysis of nitrocefin at 30 °C, in 50 mM Tris-HCl Buffered solution (pH 7.4) containing 0.5 M NaCl.

Table 4.  $\text{IC}_{50}$  and  $K_i$  of DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ).

DansylC $n$ SH	$\text{IC}_{50} / \mu\text{M}$	$K_i / \text{nM}$
DansylC2SH	5.2	1100 ± 60
DansylC3SH	7.2	1300 ± 100
DansylC4SH	0.7	140 ± 10
DansylC5SH	1.6	280 ± 10
DansylC6SH	1.0	160 ± 10

Table 4 より DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ) は IMP-1 の活性を阻害することが分かった。各々の  $\text{IC}_{50}$  は 5.2  $\mu\text{M}$  (DansylC2SH)、7.2  $\mu\text{M}$  (DansylC3SH)、0.7  $\mu\text{M}$  (DansylC4SH)、1.6  $\mu\text{M}$  (DansylC5SH)、1.0  $\mu\text{M}$  (DansylC6SH) となった。また拮抗阻害として解析することができその回帰曲線から各々の阻害定数  $K_i$  は 1100 nM (DansylC2SH)、1300 nM (DansylC3SH)、140 nM (DansylC4SH)、280 nM (DansylC5SH)、160 nM (DansylC6SH) となり、蛍光スペクトルから求めた解離定数  $K_d$  値 (Table 3) とほぼ一致する結果となった。以前報告された 3-メルカプトプロピオン酸 は IMP-1 に対して阻害定数  $K_i = 1.2 \mu\text{M}$  を示す。これに比べると DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ) はより有効な阻害剤として働くことが分かった。その中でも、DansylC4SH は  $K_i = 140 \text{ nM}$  で IMP-1 の活性を最も強く阻害することが分かった。以上の結果より DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ) は IMP-1 の活性中心に結合すると考えられる。

### 第3節 IMP-1 と DansylC4SH との複合体の X 線結晶構造解析

IMP-1 と DansylC4SH との複合体は *P. aeruginosa* 由来の IMP-1 (PDF file, 1DD6)<sup>23)</sup> を search model として用い分子置換法によって決定され、分解能 2.4 Å で結晶格子に 2 個の独立した構造が存在していた。それぞれ 2 個の亜鉛(II)と 1 個の DansylC4SH を含んでいた。モデル構造の妥当性を表す  $R$  は 0.208 で、 $R_{\text{free}}$  は 0.247 であった。理想の結合角、結合距離からの root-mean-square deviation (rmsd) はそれぞれ 1.6°、0.010 Å であった。Fig.7 にその全体の構造を、Fig. 8 に活性中心部位の構造を示した。



Fig. 7. Structure of the complex of IMP-1 with DansylC4SH.

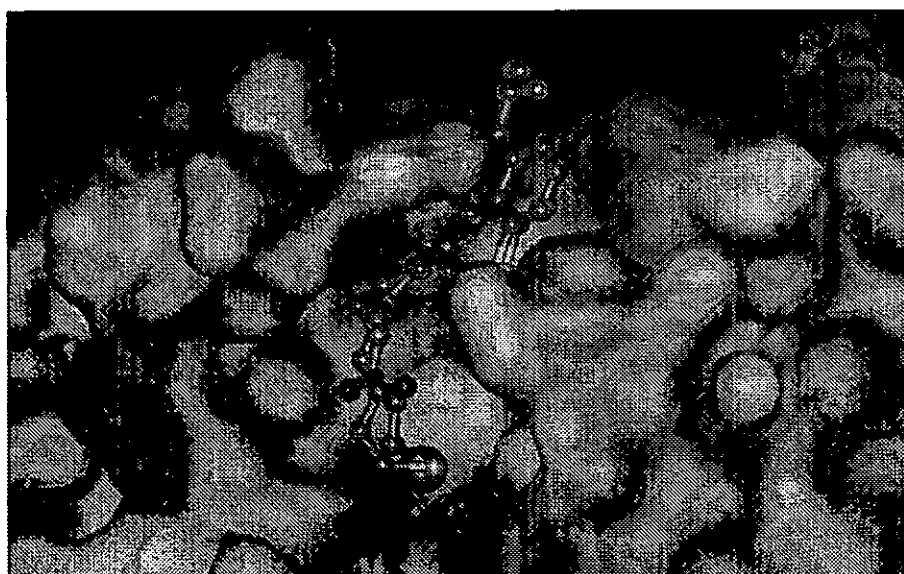


Fig. 8. Molecular surface representation model of the complex of IMP-1 with DansylC4SH.



DansylC4SH のチオール基は IMP-1 の活性中心に存在する 2 個の亜鉛(II)に架橋した形で配位しており、それぞれの距離は 2.11 Å (DansylC4SH-Zn1)、2.77 Å (DansylC4SH-Zn2) であった。メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの活性中心構造の特徴として、水又はヒドロキシアニオンが架橋配位子として 2 個の亜鉛(II)に架橋していることが挙げられる。しかし、この IMP-1 と DansylC4SH の複合体では確認されず、DansylC4SH のチオール基と置き換わったと考えられる。IMP-1 には 28 位のトリプトファンを含むアンチパラレル $\beta$ シート上の 22-31 位のアミノ酸残基から構成されるフラップがありフレキシブルで基質や阻害剤が結合する際に重要と考えられている。DansylC4SH が IMP-1 に結合すると、トリプトファンのインドール環は活性中心の方へ大きく向きが変わり、DansylC4SH のダンシル基と edge-to-face で相互作用しているのが分かる。DansylC4SH のダンシル基とチオール基の間のスペーサー部は IMP-1 のアミノ酸残基のいずれとも相互作用しておらず、2 つの構造のいずれかをとっているオルタネートの状態になっていることが分かった。

本研究で用いた DansylC<sub>n</sub>SH (n = 2-6) の中でも DansylC4SH の構造は、チオール基が亜鉛(II)に配位しダンシル基が 28 位のトリプトファンと相互作用するのに最適な長さであり、結果として IMP-1 による DansylC4SH の蛍光強度の変化が DansylC<sub>n</sub>SH (n = 2, 3, 5, 6) と比べ大きくなったのだろう。また蛍光スペクトルから得られた解離定数  $K_d$  や基質加水分解活性より求めた阻害定数  $K_i$  にも反映され、DansylC<sub>n</sub>SH (n = 2-6) の中でも最も小さい値をとったと考えられる。

以上のことより、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的かつ高感度な蛍光剤の条件として、(1) 活性中心に存在する亜鉛(II)に配位することのできるチオール基が存在すること、(2) フラップ上部に存在する 28 位のトリプトファンと相互作用できる蛍光発色団があること、(3) チオール基と蛍光発色団との間に適切な長さがあることの 3 点が挙げられる。

#### 第 4 章 総括

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼはカルバペネム薬を含む幅広い $\beta$ -ラクタム剤を加水分解し、临床上用いることのできる阻害剤に感受性がなく、これを産生する病原菌の蔓延が危惧されている。そのため感染菌のメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの産生の有無を初期段階で確認することは化学療法において非常に重要である。そこでメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ群に特異的な蛍光剤を目標として、蛍光発色団としてダンシル基をもち末端にチオール基を有する新規蛍光剤 DansylC<sub>n</sub>SH (n = 2-6) を合成した。まず、DansylC<sub>n</sub>SH

( $n = 2-6$ ) を含むダンシル誘導体とメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) との結合相互作用を蛍光スペクトルにより検討を行い、さらに DansylC4SH については IMP-1 との複合体の X 線結晶構造解析を行った。

DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ )、DansylSH は 340 nm で励起すると 535 nm で発光した。そこへ IMP-1 を加えると蛍光強度は増大し、極大波長は 520 nm 付近にシフトした。これより、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) に特異的な蛍光剤には、DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ) のようにダンシル基とチオール基の間にある程度の長さが必要であることが分かった。DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ) と IMP-1 は 1 対 1 で結合するとして解析でき、その解離定数  $K_d$  は 70 から 980 nM となり、基質加水分解活性より求めた阻害定数  $K_i$  とほぼ一致した。その中でも、DansylC4SH は最も IMP-1 と強く結合する。

蛍光スペクトルにより、DansylC4SH が最も IMP-1 と結合しやすいことが分かったので、DansylC4SH と IMP-1 との複合体の X 線結晶構造解析を行った。すると DansylC4SH のチオール基は活性中心の 2 個の亜鉛(II)に架橋した形で配位しており、ダンシル基は 28 位のトリプトファンのインドール基と edge-to-face で相互作用していることが分かった。ダンシル基とチオール基の間のスペーサー部は IMP-1 のどのアミノ酸残基とも相互作用をしておらず alternate の状態となっていた。

以上のことより、DansylC $n$ SH ( $n = 2-6$ ) はメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を簡便かつ高感度な方法で判別することが期待される。また、IMP-1 と DansylC4SH との複合体の X 線の結晶構造解析を深めることにより、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) に対しさらに有効な蛍光剤及び阻害剤の開発に結びつけることができるだろう。

引用文献

- 1) Knowles J. R., *Acc. Chem. Res.*, **18**, 97-104 (1985).
- 2) Wang Z., Fast W., Valentine A. M., Benkovic S. J., *Curr. Opin. Chem. Biol.*, **3**, 614-622 (1999).
- 3) Page M. I., Laws A. P., *Chem. Commun.*, 1609-1617 (1998).
- 4) Page M. I., *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 895-913 (1999).
- 5) Cricco J. A., Vila A. J., *Curr. Pharm. Des.*, **5**, 915-927 (1999).
- 6) Ambler R. P., *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B.*, **289**, 321-331 (1980).
- 7) Sabath L. D., Abraham E. P., *Biochem. J.*, **98**, 11c-13c (1966).
- 8) Kuwabara S., Abraham E. P., *Biochem. J.*, **103**, 27c-30c (1967).
- 9) Davies R. B., Abraham E. P., *Biochem. J.*, **143**, 115-127 (1974).
- 10) Cuchural G. J., Jr., Malamy M. H., Tally F. P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **30**, 645-648 (1986).
- 11) Rasmussen B. A., Gluzman Y., Tally F. P., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **34**, 1590-1592 (1990).
- 12) Bandoh K., Muto Y., Watanabe K., Katoh N., Ueno K., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **35**, 371-372 (1991).
- 13) Massidda O., Rossolini G. M., Satta G., *J. Bacteriol.*, **173**, 4611-4617 (1991).
- 14) Walsh T. R., Hall L., Assinder S. J., Nichols W. W., Cartwright S. J., MacGowan A. P., Bennett P. M., *Biochim. Biophys. Acta*, **1218**, 199-201 (1994).
- 15) Crowder M. W., Walsh T. R., Banovic L., Pettit M., Spencer J., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **42**, 921-926 (1998).
- 16) Osano E., Arakawa Y., Wacharotayankun R., Ohta M., Horii T., Ito H., Yoshimura F., Kato N., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **38**, 71-78 (1994).
- 17) Ito H., Arakawa Y., Ohsuka S., Wacharotayankun R., Kato N., Ohta M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, **39**, 824-829 (1995).
- 18) Payne R. J., Du W., Bateson J. H., *Exp. Opin. Invert. Drugs*, **9(2)**, 247-261 (2000).

- 19) Bush K., Jacoby G. A., Medeiros A. A., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1211-1233 (1995).
- 20) Arakawa Y., Murakami M., Suzuki K., Ito H., Wacharotayankun R., Ohsuka S., Kato N., Ohta M., *Antimicrob. Agents Chemother.*, 39, 1612-1615 (1995).
- 21) Cornaglia G., Riccio M. L., Mazzariol A., Lauretti L., Fontana R., Rossolini G. M., *Lancet*, 353, 899-900 (1999).
- 22) Senda K., Arakawa Y., Ichiyama S., Nakashima K., Ito H., Ohsuka S., Shimokata K., Kato N., Ohta M., *J. Clin. Microbiol.*, 34, 2909-2913 (1996).
- 23) Arakawa Y., Shibata N., Shibayama K., Kurokawa H., Yagi T., Fujiwara H., Goto M., *J. Clin. Microbiol.*, 38, 40-43(2000).
- 24) National committee for Clinical Laboratory Standards, 1997.
- 25) Goto M., Takahashi T., Yamashita F., Koreeda A., Mori H., Ohta M., Arakawa Y., *Biol. Pharm. Bull.*, 20, 1136-1140 (1997).
- 26) Otwinowski Z., Minor W., "*Methods Enzymol*", 276, 307-326 (1996).
- 27) Concha N. O., Janson C. A., Rowling P., Pearson S., Cheever C. A., Clarke B. P., Lewis C., Galleni M., Frère J-M., Payne D. J., Bateson J. H., Abdel-Meguid S. S., *Biochemistry*, 39, 4288-4298 (2000).
- 28) Collaborative Computational Project, Number 4. 1994. "The CCP4 Suite: Programs for Protein Crystallography". *Acta Crystllogrt. D50*, 760-763 (1994).
- 29) Brunger A. T., Adams P. D., Clore M., DeLano W. L., Gros P., Gross-Kunstelev R. W., Jian J-S., Kruszewski J., Nilges M., Pannu N.S., Read R.J., Rice L.M., Simonson T., Warren G. L., *Acta Crystallogr.*, D54, 905-921 (1998).
- 30) Jones T.A., Zou J. Y., Cowan S. W., Kjeldgaard M., *Acta Crystallogr.*, A47, 110-119 (1991).