

性気道感染症より分離された A 群溶血レンサ球菌の薬剤感受性と T 型別. 日本化学療法学会雑誌, 8:401-407, 2004.

3. 長谷川 恵子, 千葉 菜穂子, 小林 玲子, 諸角 美由紀, 岩田 敏, 砂川 慶介, 生方 公子: 化膿性髄膜炎例から分離された *Haemophilus influenzae* の疫学解析 - 1999 年から 2003 年の分離株について -. 感染症学雑誌. 78(9):835-845, 2004.

4. M. Morozumi, K. Hasegawa, R. Kobayashi, N. Inoue, S. Iwata, H. Kuroki, N. Kawamura, E. Nakayama, T. Tajima, K. Shimizu, and K. Ubukata. Emergence of macrolides-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49: (印刷中), 2005

5. M. Morozumi, A Ito, S. Murayama, K. Hasegawa, R. Kobayashi, S. Iwata, N. Kawamura, H. Kuroki, E. Nakayama, T. Tajima, and K. Ubukata. Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae pneumonia* in pediatric patients. *Journal Applied Microbiology*. (投稿中)

図-1. Molecular beacon を用いた real-time PCR 法

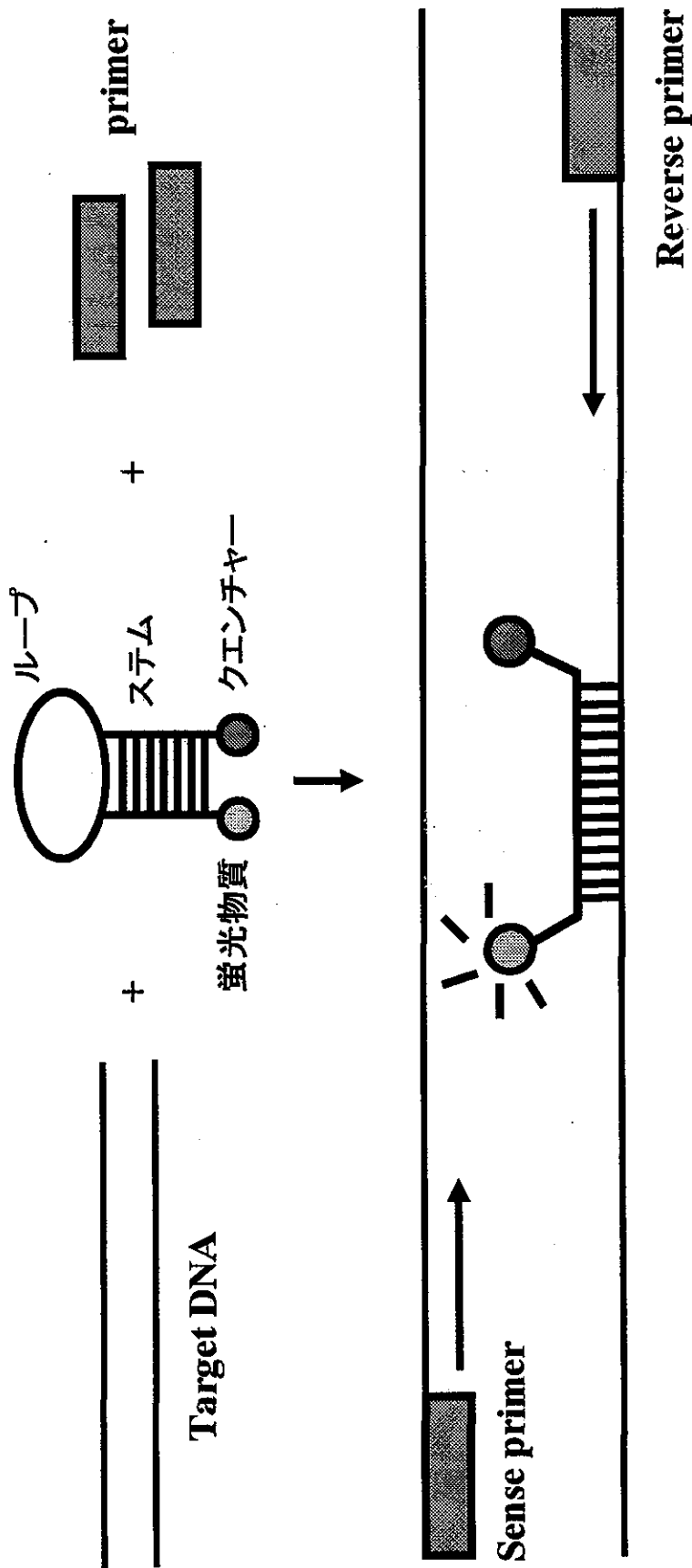


図-2. Real-time PCR法での*M. pneumoniae*の検量線

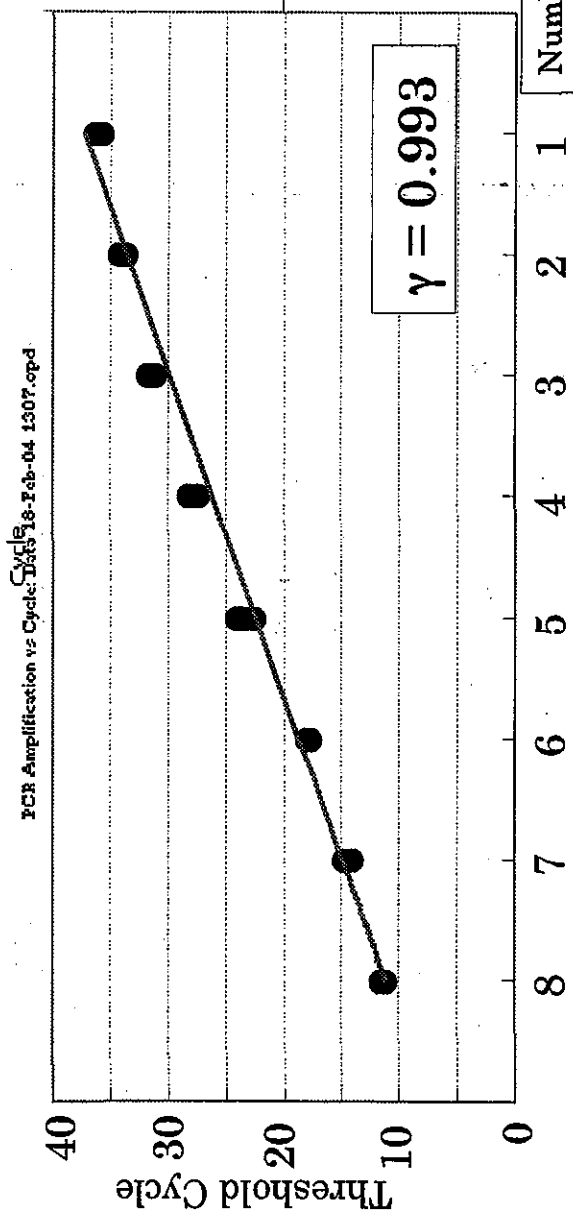
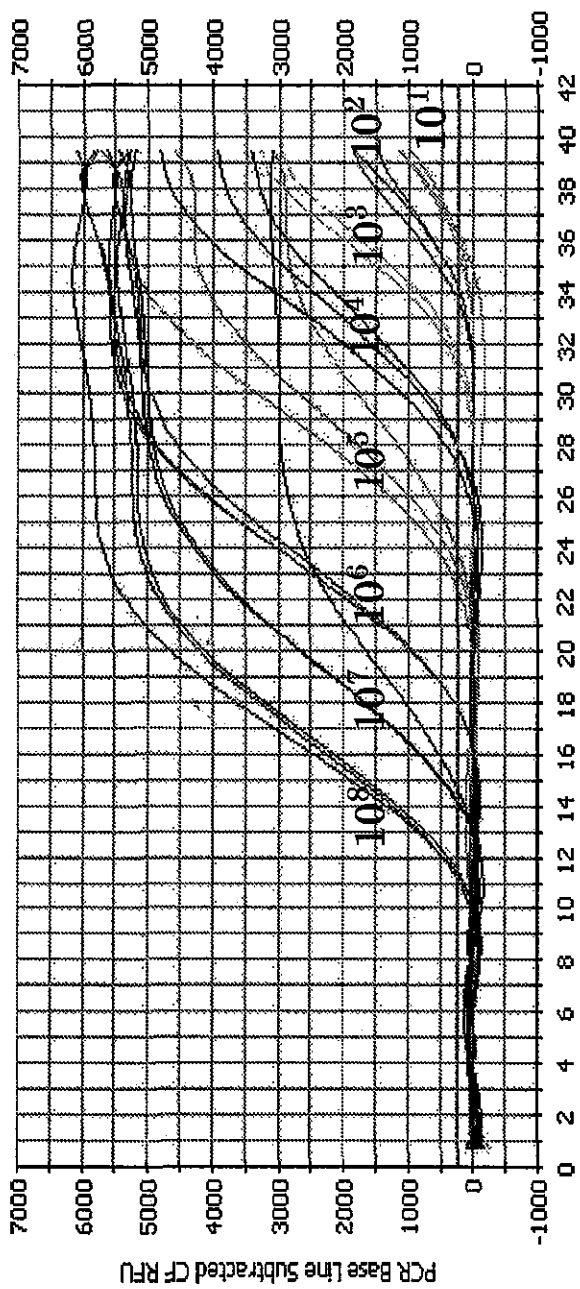


図-3. Real-time PCR法での肺炎球菌の検量線

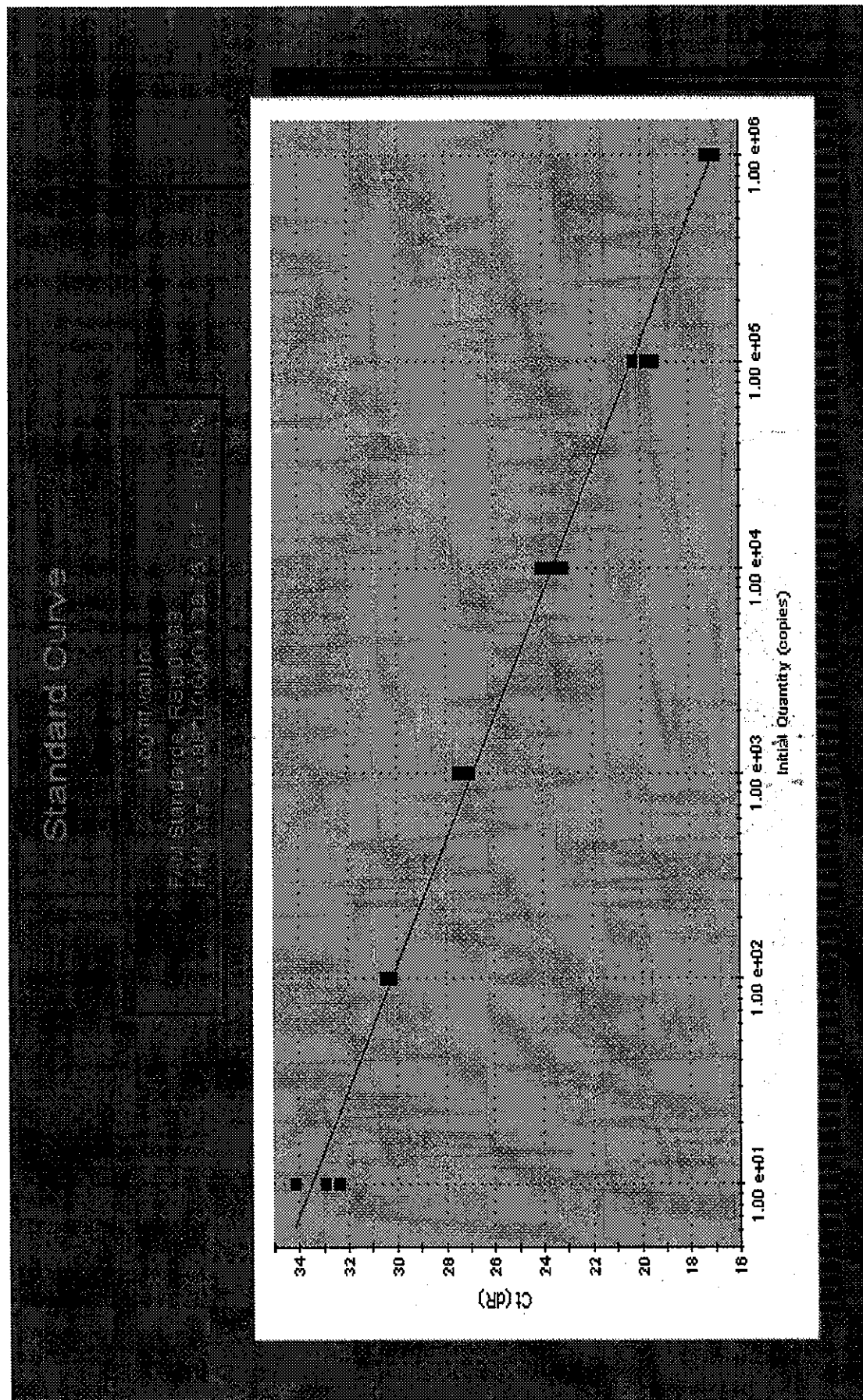


図4. Real-Time PCRによる肺炎例の*M. pneumoniae*陽性例

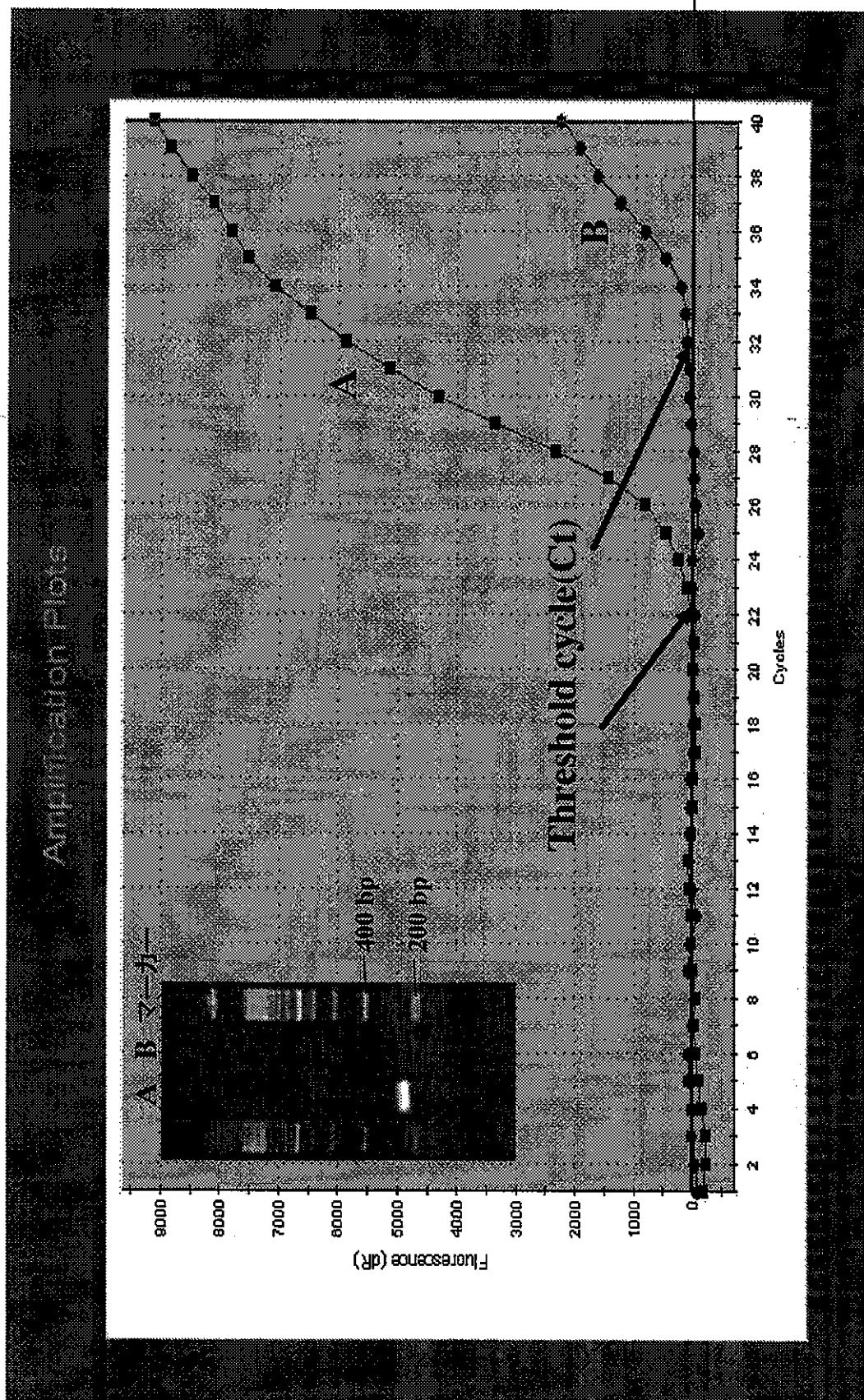


図-5. 細菌/ウイルスの迅速検索プロトコール

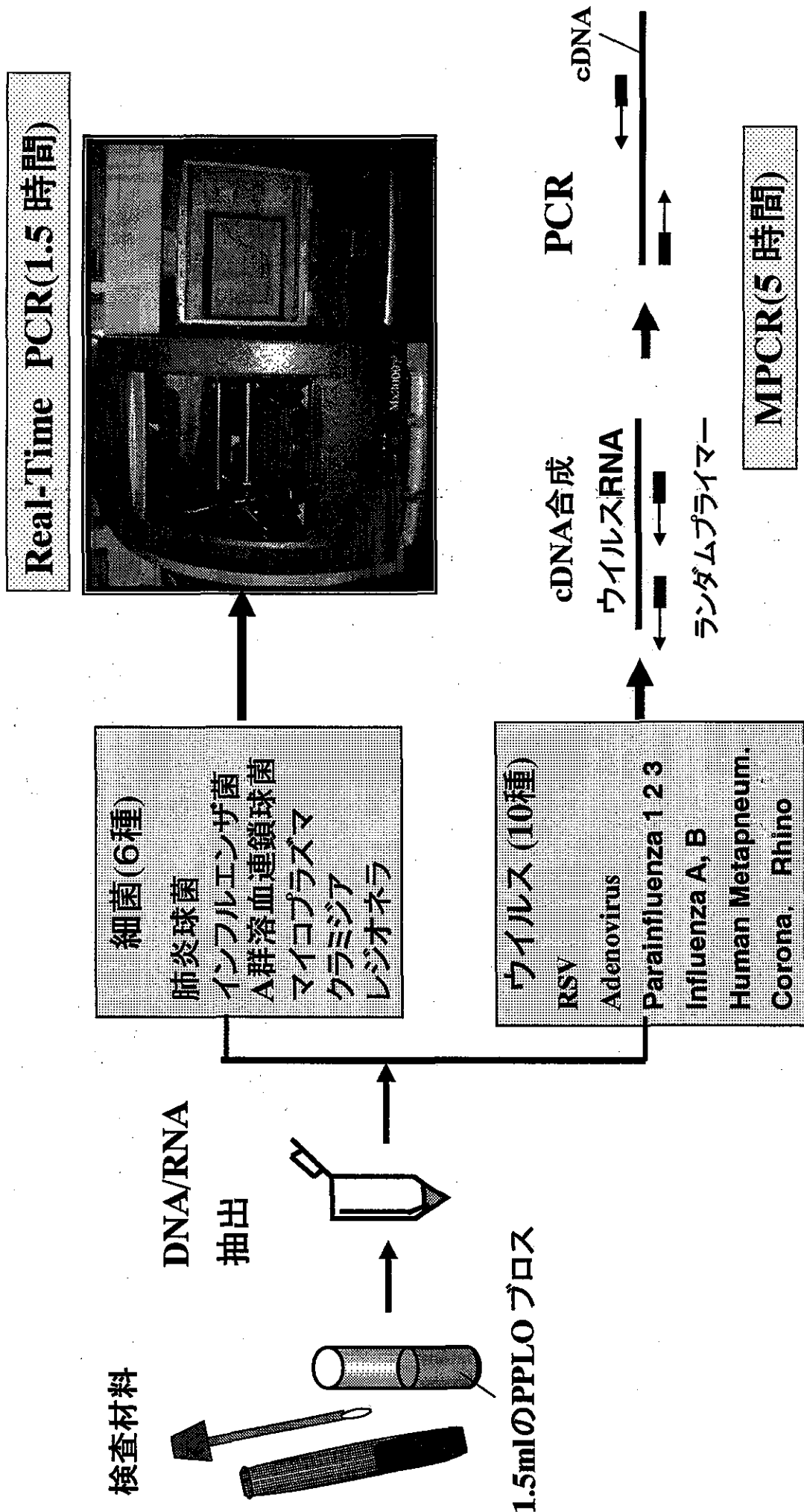
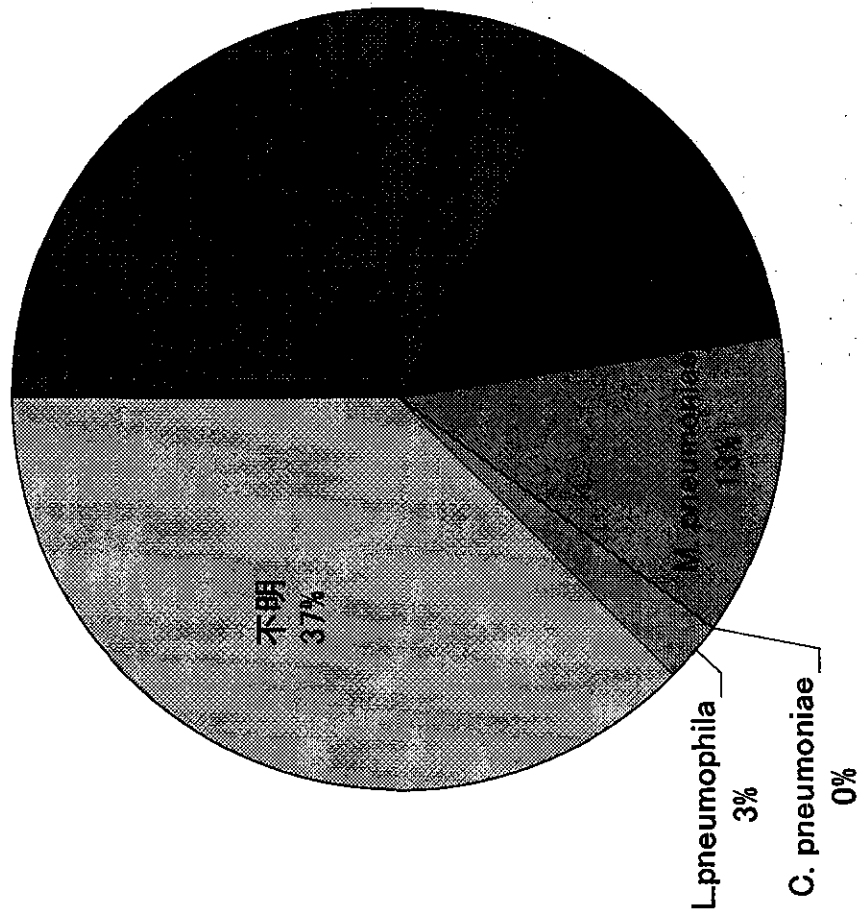
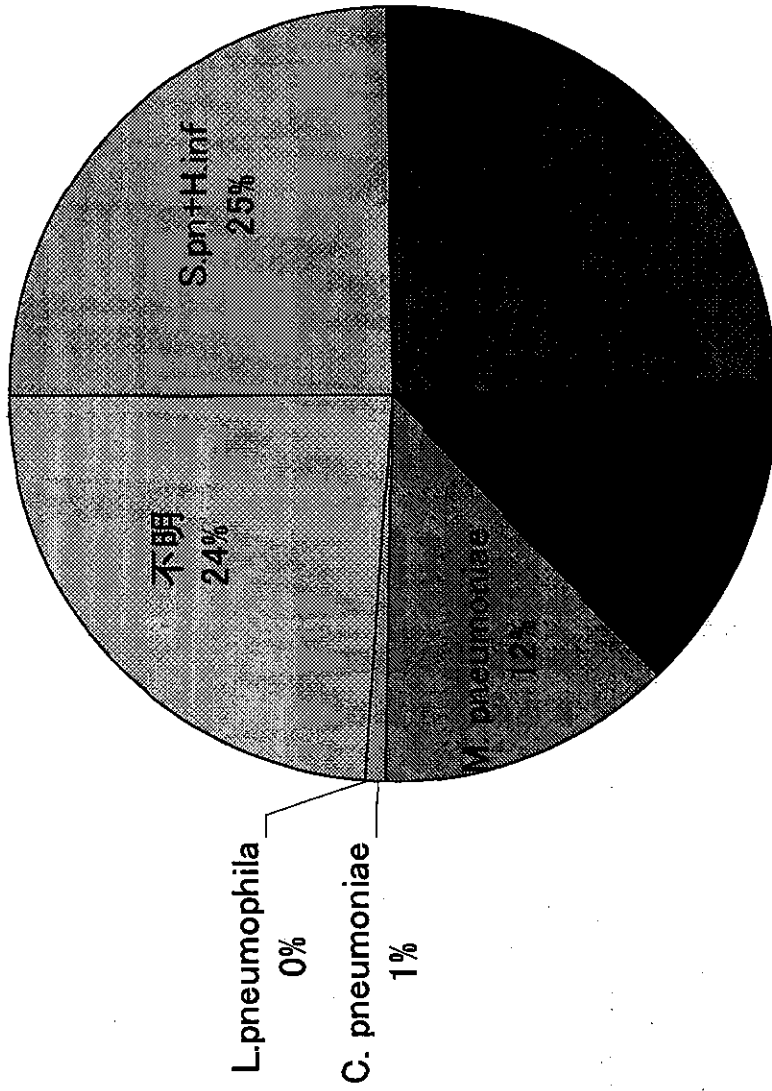


図-6. Real-time PCRによる陽性例



成人



小児

図-7. 成人(20歳, 女性)肺炎例1: Real-time PCRの成績

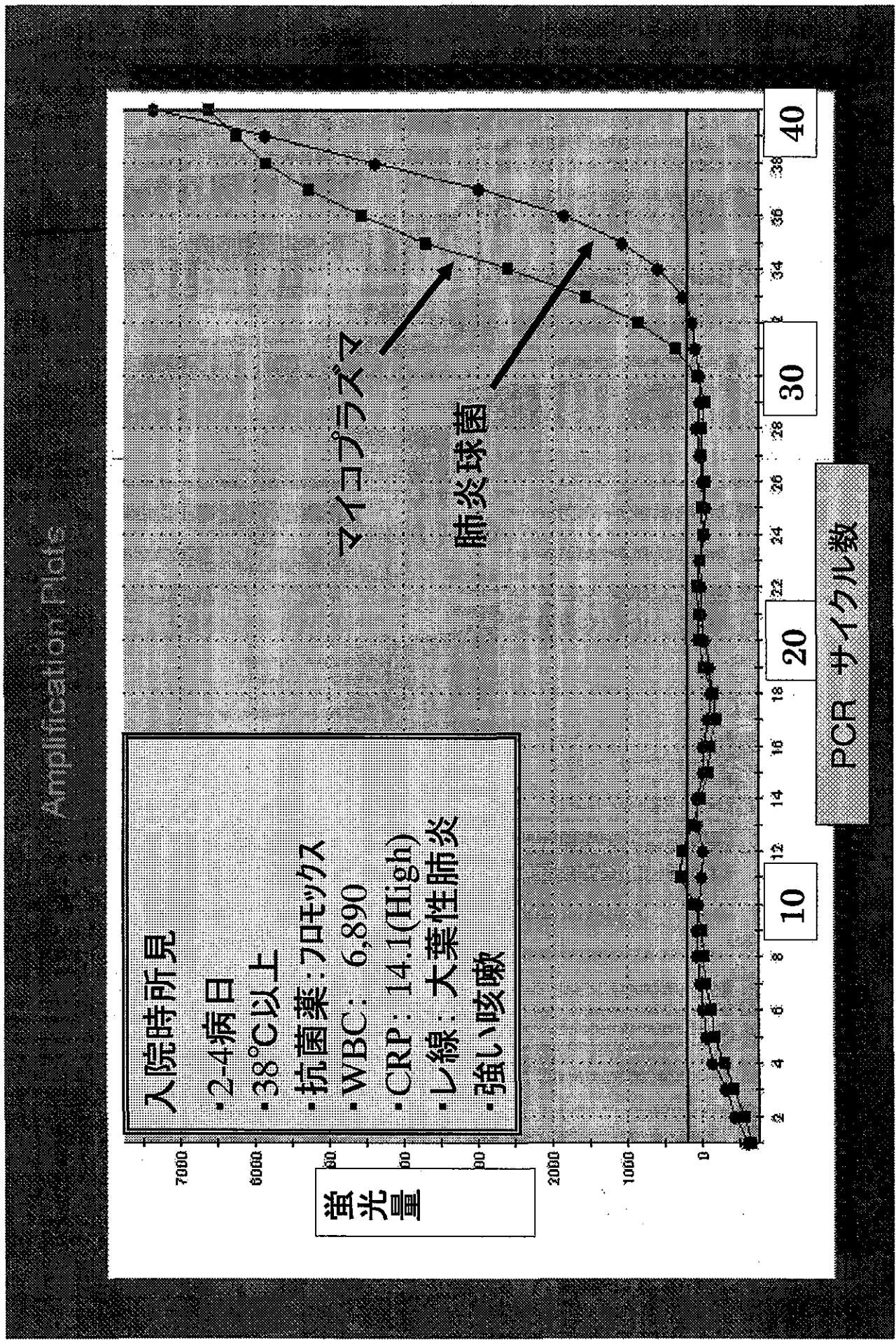


表-1. 成人と小児肺炎例に対するreal-time PCRの成績

成人例:n=40, 小児例:n=97

菌種	<i>S. pneumoniae</i>		<i>H. influenzae</i>		<i>M. pneumoniae</i>		<i>L. pneumophila</i>		<i>C. pneumoniae</i>	
	PCR	Culture	PCR	Culture	PCR	Culture	PCR	Culture	PCR	Culture
成人陽性例	13	10	6	6	5	4	1	0	0	0
(%)	32.5	25	15	15	12.5	10	2.5			ND
小児陽性例	48	47	37	37	12	10	0	0	1	ND
(%)	49.5	48.5	38.1	38.1	12.4	10.3			1.0	

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症事業）

「新型の薬剤耐性菌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」

分担研究課題：カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究

分担研究者：黒崎博雅；協力研究者：山口佳宏

熊本大学大学院医学薬学研究部 構造機能物理化学分野

研究要旨：メタロ-β-ラクタマーゼの有効な阻害剤のスクリーニングを目的とし、二つの化合物群、2-ω-phenylalkyl-3-mercaptopropionic acid (PhenylCnSH (n = 1-4)) と N-[(7-chloro-quinolin-4-ylamino)-alkyl]-3-mercapto-propionamide (QuinolineCnSH (n = 2-6)), ここでnはアルキル鎖の炭素数を示す)のメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1 および VIM-2) に対する阻害活性について検討を行った。これらの阻害剤は異なったメチレン鎖によって結合した疎水性基並びにチオール基を有している。PhenylCnSH (n = 1-4)は IMP-1 および VIM-2 の両方に対し阻害することがわかった。中でも PhenylC4SH は最も強く IMP-1 (IC₅₀ = 1.2 μM)並びに VIM-2 (IC₅₀ = 1.1 μM)を阻害した。QuinolineCnSHでは、メチレン鎖の数を変化させたとき QuinolineC4SHが最も強く IMP-1 (IC₅₀ = 2.5 μM)並びに VIM-2 (IC₅₀ = 2.4 μM)を阻害することがわかった。また、IMP-1 存在下 QuinolineCnSH の蛍光スペクトルを測定した結果、蛍光の消光が観測されたことからメタロ-β-ラクタマーゼの蛍光検出試薬としては有効でないことがわかった。

はじめに

現在臨床において感染症の治療で最もよく使われている抗生物質はβ-ラクタム剤である。しかし、細菌はこれらの薬剤に対し自己を守るため耐性を獲得し、薬剤耐性菌として日和見感染症や院内感染の起炎菌として社会的にも問題となっている。薬剤耐性菌の主な耐性機構として薬剤不活化酵素β-ラクタマーゼの産生が挙げられる。

β-ラクタマーゼはβ-ラクタム環の C-N 結合を加水分解することによりβ-ラクタム剤を不活化し、抗菌活性を消失させる。(1)

β-ラクタマーゼは、Ambler 等によってアミノ酸配列の相同性に基づき四つのクラス A~D に分類された。(2)クラス A, C, D は活性中心にセリン残基をもつセリン-β-ラクタマーゼであり一方、クラス B は活性中心に亜鉛イオンを含有したメタロ-β-ラクタマーゼでカルバペネムを含むほとんど全てのβ-ラクタム剤を加水分解する。また、現在臨床で使われているクラブラン酸やスルバクタム等のβ-ラクタマーゼ阻害剤に対して感受性を示さない。

メタロ-β-ラクタマーゼはさらに三つの Subclasses に分類されている。(3)その中でも SubclassB1 に分類されている IMP-1 や VIM-2 を発現する bla_{IMP-1} 遺伝子(bla_{VIM-2})(4)は、伝達性プラスミド上に存在し、菌種を超えた伝播が可能で世界的な蔓延が進行しつつある。従って、これらの酵素に対する阻害剤の開発が急がれている。

本研究では、主として以下の2点について研究を行った。

- 1) 蛍光発色団キノリン基を有する新規化合物 QuinolineCnSH (n = 2-6), 図1を合成し、メタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-1, VIM-2)に対する蛍光特性並びに阻害作用の検討を行った。
- 2) Park 等(5)は亜鉛含有酵素 Carboxypeptidase A に

ついてチオール阻害剤 PhenylCnSH (図1)の合成と阻害作用の検討を報告している。我々は、この PhenylCnSH がメタロ-β-ラクタマーゼに対する阻害剤となり得ると考え、Park 等の方法に従い合成し IMP-1 および VIM-2 に対する活性阻害効果について検討した。さらに、VIM-2 と阻害剤 (PhenylC3SH, n = 3)との複合体の X線結晶構造解析を行い結合様式を明らかにした。

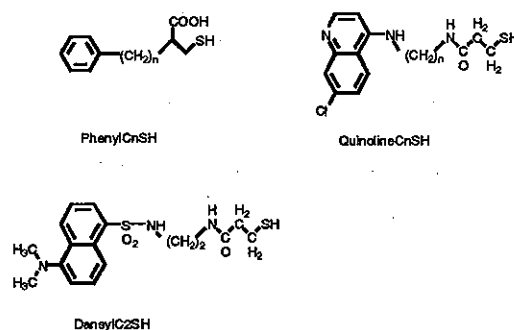


Fig. 1. Chemical Structures of Inhibitors Used in This Study

実験

(1)菌株

IMP-1(Wild Type: *Escherichia coli* BL21(DE3)/pET9a/d-IMP) *Serratia marcescens* TN9106 株 (イミペネムに対する最小有効阻止濃度 MIC 32 μg/mL)は愛知県下の病院から出た尿路感染症患者由来の菌株である。この菌株よりあらかじめクローニングされた M13 mp18 から IMP-1 遺伝子 bla_{IMP} をサブクローニングして pKF-IMP を得た。さらに、この IMP-1 遺伝子 bla_{IMP} からシグナルペプチドを除いた d-IMP-1 gene をプラスミド pET9a ベクターに組み換え pET9a/d-IMP を得た。このプラスミドは T7 プロモーターをもつ

ている。この pET9a / d-IMP を発現用の *E. coli* BL21 (DE3) に形質転換し目的の IMP-1 が発現していることを SDS-PAGE によって確認した。

VIM-2 (*E. coli* NCB326-1B2 harboring pBC-BamHI/VIM-2) 国立感染症研究所の荒川宜親氏から提供して戴いた。

(2) 培養と精製

IMP-1 : *S. 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* BL21 (DE3) からメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) を既知の方法に従って抽出・精製した。

(6) 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、および単一バンドを示していることを確認した。

VIM-2 : *E. coli* NCB326-1B2 harboring pBC-BamHI / VIM-2 から VIM-2 を既に報告されている方法に従って抽出・精製した。(7)

(3) 阻害剤の合成

PhenylC_nSH (n = 1-4) : Park 等の方法(5)に従って合成した。

QuinolineC_nSH (n = 2-6) : QuinolineC_nSH (n = 2-6) の合成ルートをチャート 1 に示す。

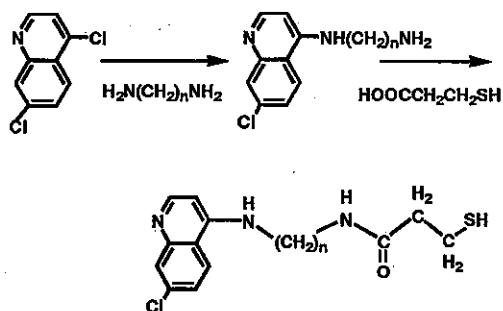


Chart 1. Synthetic Route of QuinolineC_nSH (n = 2-6)

また、例として QuinolineC3SH (N-[3-(7-Chloroquinolin-4-ylamino)-propyl]-3-mercapto-propionamide) の合成法について述べる。

(i) 4,7-ジクロロキノリン 1.64g (0.0083mol) を 1,3-ジアミノプロパン 6.15g (0.083mol) に加え、100°C で 4 時間還流した。反応液を濃縮し、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: メタノール: クロロホルム: 28%アンモニア水=40: 360: 1) で分離・精製し黄色の固体を得た。収量 1.65 g (84.5%)。

(ii) クロロホルム 150mL に (i) で得られたキノリンプロパンジアミン 1.54 g (0.0065 mol) を溶解させ、これに BPO 試薬 2.88 g (0.0065 mol) を加えた。

3-メルカプトプロピオン酸 0.69g (0.0065mol) とトリエチルアミン 1.76 g (0.017 mol) を順に加え Ar 下で一晩攪拌した。反応液を濃縮後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィー(溶出液: メタノール: クロロホルム: 28%アンモニア水=20: 180: 1) で分離・精製を行い目的物の QuinolineC3SH を白色の固体として得た。

収量 0.714 g (33.9%)。

上述の方法に従って QuinolineC_nSH (n = 2, 4-6) は、それぞれ 1,2-ジアミノエタン, 1,4-ジアミノブタン, 1,5-ジアミノペンタンおよび 1,6-ジアミノヘキサンを用いた。

QuinolineC2SH

(N-[2-(7-chloro-quinolin-4-ylamino)-ethyl]-3-mercapto-propionamide) 収率 13.8%。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.24 (t, 1H), 2.59 (t, 2H), 2.78 (t, 2H), 3.64 (t, 2H), 3.7 (q, 2H), 6.7 (d, 1H), 7.58 (d, 1H), 7.73 (s, 1H), 8.12 (d, 1H), 8.19 (d, 1H). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 38.04, 39.52, 45.62, 47.29, 98.46, 115.33, 119.58, 124.12, 127.98, 138.63, 140.00, 142.76, 155.78, 174.

QuinolineC3SH

(N-[3-(7-chloro-quinolin-4-ylamino)-propyl]-3-mercapto-propionamide) 収率 28.6%。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.26 (t, 1H), 1.92 (q, 2H), 2.18 (s, 1H), 2.57 (t, 2H), 2.82 (t, 2H), 3.38 (t, 2H), 3.51 (t, 2H), 6.57 (d, 1H, J = 6.71 Hz), 7.47 (d, 1H, J = 1.83 Hz), 7.74 (s, 1H), 8.13 (d, 1H, J = 9.15 Hz), 8.23 (d, 1H, J = 6.71 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 20.48, 27.97, 36.55, 40.08, 40.39, 98.55, 116.37, 122.35, 123.68, 127.10, 138.41, 142.37, 145.79, 154.04, 173.15.

QuinolineC4SH

(N-[4-(7-chloro-quinolin-4-ylamino)-butyl]-3-mercapto-propionamide) 収率 27.1%。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.22 (t, 1H), 1.54 (q, 2H), 1.74 (q, 2H), 2.48 (t, 2H), 2.78 (t, 2H), 3.24 (t, 2H), 3.30 (t, 2H), 6.38 (d, 1H, J = 5.49 Hz), 7.34 (d, 1H, J = 7.33 Hz), 7.86 (s, 1H), 7.87 (d, 1H, J = 4.88 Hz), 8.39 (d, 1H, J = 5.5 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 20.51, 26.61, 29.48, 39.27, 40.31, 43.01, 98.85, 117.45, 122.09, 125.37, 127.59, 135.36, 148.65, 150.85, 151.45, 171.72.

QuinolineC5SH

(N-[5-(7-chloro-quinolin-4-ylamino)-pentyl]-3-mercapto-propionamide) 収率 57.3%。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.20 (t, 1H), 1.51 (q, 2H), 1.61 (q, 2H), 1.80 (q, 2H), 2.48 (t, 1H), 2.76 (t, 2H), 3.24 (t, 2H), 3.37 (t, 1H), 3.38 (t, 2H), 6.49 (d, 1H, J = 5.49 Hz), 7.40 (d, 1H, J = 9.16 Hz), 7.80 (s, 1H), 8.09 (d, 1H, J = 9.15 Hz), 8.33 (d, 1H, J = 5.49 Hz). ¹³C NMR (CDCl₃): δ 20.84, 24.95, 28.50, 29.75, 39.74, 40.64, 43.68, 99.19, 117.99, 123.73, 126.01, 136.55, 147.89, 150.63, 152.73, 173.13.

QuinolineC6SH

(N-[6-(7-chloro-quinolin-4-ylamino)-hexyl]-3-mercapto-propionamide) 収率 50.4%。

¹H NMR (CDCl₃): δ 1.24 (t, 1H), 1.48 (q, 2H), 1.52 (q, 2H), 1.66 (q, 2H), 1.78 (q, 2H), 2.50 (t, 2H), 2.79

(t, 2H), 3.29 (t, 2H), 3.35 (t, 2H), 6.39 (d, 1H, $J = 6.10$ Hz), 7.35 (d, 1H, $J = 6.71$ Hz), 7.83 (s, 1H), 7.97 (d, 1H, $J = 8.55$ Hz), 8.34 (d, 1H, $J = 5.5$ Hz). ^{13}C NMR (CDCl_3): δ 19.44, 25.38, 25.54, 27.41, 28.41, 35.71, 38.20, 39.24, 41.94, 97.78, 116.38, 121.02, 124.30, 126.52, 134.29, 147.58, 149.78, 150.38, 170.65.

(4) QuinolineC6SH, PhenylCnSH による IMP-1 および VIM-2 阻害

所定の濃度となるようにメタノールで調製した QuinolineCnSH ($n = 2-6$) または PhenylCnSH ($n = 1-4$) 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 31 nM の IMP-1 または VIM-2 溶液 0.1 mL 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 2.8 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、阻害剤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/min^{-1} を求め、阻害剤の濃度に対してプロットした。これより IC_{50} (酵素活性を 50% 阻害する濃度) を求め、さらに実測データを (1) 式の拮抗阻害を用い非線形最小二乗法により阻害定数 K_i を求めた。

$$k_2 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m \left(1 + \frac{[I]}{K_i} \right) + [S]} \quad (1)$$

ここで、 k_2 : 分子活性; V_{\max} : 最大速度; K_m : ミカエリス定数 (20 μM for Nitrocefin to IMP-1 and 22.5 μM for Nitrocefin to VIM-2); $[S]$: ニトロセフィンの濃度 (100 μM); $[I]$: 阻害剤濃度を表す。

(5) QuinolineCnSH ($n = 2-6$) の IMP-1 による蛍光強度変化の測定: 黒崎らの方法に方法に従い検討を行った。(8) 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) 緩衝液を用いて測定した。蛍光剤として QuinolineCnSH ($n = 2-6$) を用い、各々の蛍光剤の濃度が 100 μM になるようにメタノール (紫外外部吸収スペクトル用) で調製した。測定の際はこの溶液を 30 μL とり全量 3 mL, 測定溶液中 1 μM の濃度になるようにした。

(6) メタロ- β -ラクタマーゼ (VIM-2) と PhenylC3SH との複合体の X 線結晶構造解析

結晶化: VIM-2 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 μM (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、6.0 g の 50% Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 5000 を 10 mL のメスフラスコに入れた後 0.1 M MES-NaOH, 0.2 M Ammonium Sulfate (pH 6.5) 溶液になるように調製した。この溶液をさらにメンブレンフィルターに通した。PhenylC3SH 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阻害剤溶液とした。

結晶化は 20°C において蒸気平衡法 (hanging drop) で行った。2 μL のタンパク溶液と 2 μL のリザーバ溶液を混ぜ、そこに 1 μL の阻害剤溶液を加え 5 μL を 1 Drop とした。350 μL のリザーバ液で約 2 ヶ月放置すると板状の結晶 (0.4 \times 0.4 \times 0.2 mm) が数個成長した。

結晶は空間群 (space group) $P2_12_12_1$ で斜方晶系に属し、格子定数 (unit cell dimensions) は $a = 45.2$ Å, $b = 90.8$ Å, $c = 129.0$ Å 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 つ存在することがわかった ($Z = 8$, $V_m = 2.23$ Å³/Dalton)。

X 線結晶構造解析: PhenylC3SH と VIM-2 との複合体の構造は多波長異常分散法 (MAD 法) によって決定した。分解能が 2.55 Å の MAD 法のデータセットは、SPring-8 のビームライン BL40B2 において、亜鉛(II)の吸収端である edge (1.2826 Å), peak (1.2817 Å), remote (1.2906 Å) について CCD カメラ (ADSC Quantum 4R, 結晶-detector 距離は 170 mm) を detector として 100 K で測定した。測定時間 20 秒, 振動角 0.5° で 360 枚データを集めた。また、分解能が 2.3 Å のデータは、SPring-8 のビームライン BL41XU において 1.00 Å の波長で CCD カメラ (marCCD165, 結晶-detector 距離は 170 mm) を detector として 100 K で測定した。測定時間 10 秒, 振動角 0.5° で 360 枚データを集めた。これらのデータは HKL2000 を使って、integrating, merging, scaling した。表 1 に回折データを示す。

MAD 法による位相付けはプログラム SOLVE(9) で行い電子密度の構築と簡単な modeling はプログラム RESOLVE(10) で行った。modeling, re-modeling はグラフィックプログラム O(11) で行い、プログラム CNS(12) 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もつという制限 (noncrystallographic symmetry, NCS) を用いて行った。また、PhenylC3SH の構造は MOE で構造を作成し最適化をした後 <http://davapc1.bioch.dundee.ac.uk/programs/prodrg/prodrg.html> の PRODRG(13) で topology と parameter を作成し、PhenylC3SH の構造の精密化に用いた。

最終の精密化は分解能 2.3 Å のデータを用いて行った。表 2 に精密化で得られたデータを示す。

Table 1. X-ray Data Collection

Dataset	final	edge	peak	remote
Wavelength (Å)	1.00	1.2826	1.2817	1.2906
Resolution (Å)	2.30	2.55	2.55	2.55
Completeness	99.6	99.2	99.1	99.0
R_{merge} (%)	0.066	0.047	0.050	0.046
No. of Observed Reflection	163206	123781	122809	121255
No. of Unique Reflection	24156	18155	18121	17742
I/Sigma	12.4	22.7	24.1	21.9

Table 2. Refinement Data

R	0.207
R_{free}	0.268
No. of atom in asymmetric unit	
Protein	3392
Ligand	50
Solvent	245
rms deviation from ideal	
Bond length (Å)	0.0060
Bond angles (deg)	1.36

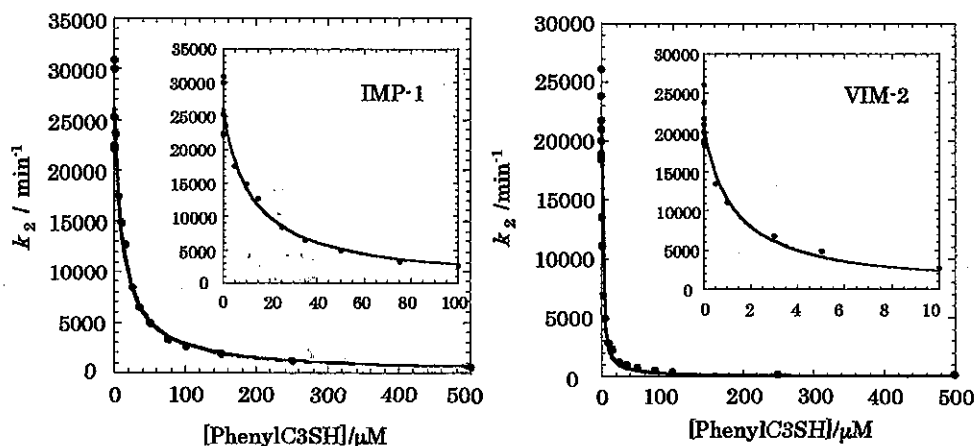


Fig. 2. Typical Plots of Molecular Activity of IMP-1 (Left) and VIM-2 (Right) against the Concentration of PhenylC3SH

結果

IMP-1 および VIM-2 に対する IC_{50} (酵素活性を 50% 阻害する濃度) と K_i (阻害定数) : 基質としてニトロセフィンを用い, 阻害剤 (PhenylCnSH ($n = 1-4$) または QuinolineCnSH ($n = 2-6$)) の濃度を変化させ, 見かけの分子活性 k_2/min^{-1} を初速度法から求めた。さらに, それらの分子活性を各阻害剤濃度に対しプロットした。PhenylC3SH および QuinolineC3SH の場合を図 2 に示す。IMP-1 と VIM-2 に対する IC_{50} は図 2 に示す濃度レスポンスカーブから決定した。阻害定数 K_i は実測データを拮抗阻害式(1)にあてはめ非線形最小二乗法により求めた。

PhenylCnSH ($n = 1-4$) による IMP-1, VIM-2 阻害効果 : PhenylCnSH の IMP-1 並びに VIM-2 に対する IC_{50} 並びに K_i 値をそれぞれ表 3 と図 3 に示す。

IMP-1 に対する IC_{50} および K_i はそれぞれ

1.2 μM (PhenylC4H)–16.4 μM (PhenylC1SH) , 0.21 μM (PhenylC4H)–2.78 μM (PhenylC1SH) の濃度範囲内にあることがわかった。メチレン鎖長を変化させたとき PhenylCnSH の中で PhenylC4SH が最も強く IMP-1 を阻害することがわかった。

以前に 3-メルカプトプロピオン酸が IMP-1 の阻害剤 ($K_i = 1.2 \mu\text{M}$) であることを報告した。(14)3-メルカプトプロピオン酸の K_i 値との比較から PhenylC4SH はより有効な阻害剤であることがわかった。

VIM-2 に対する IC_{50} および K_i はそれぞれ 1.1 μM (PhenylC4H)–14.3 μM (PhenylC1SH) , 0.19 μM (PhenylC4H)–2.36 μM (PhenylC1SH) の濃度範囲内にあることがわかった。この結果から PhenylCnSH は IMP-1 同様に VIM-2 に対しても阻害することがわかった。さらに, PhenylC3SH と PhenylC4SH は VIM-2 をより強く阻害することも明らかになった。

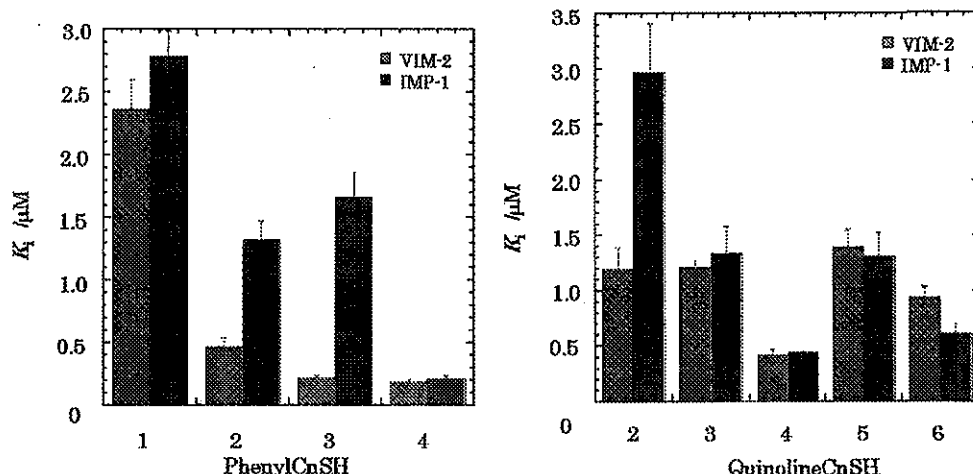


Fig. 3. Variation of Inhibition Constants of IMP-1 and VIM-2 with n, for PhenylCnSH (Left) and QuinolineSH (Right)

メチレン鎖長 (即ち炭素数) の違いによる阻害効果は VIM-2 と IMP-1 では異なることがわかった. 図 3 からわかるように, PhenylC4SH は IMP-1, VIM-2 とともに強く阻害し, 一方 PhenylC1SH では阻害能が低いことがわかった. VIM-2 では, メチレン鎖が $n=2$ から 3 ないしは 4 と長くなるに従って阻害が強くなるのに対し, IMP-1 では $n=4$ のみ強いという結果となった.

Table 3. IC_{50} Values for PhenylCnSH ($n=1-4$) and QuinolineCnSH ($n=2-6$) to IMP-1 and VIM-2

Inhibitors	$IC_{50}/\mu\text{M}$	
	IMP-1	VIM-2
PhenylC1SH	16.4	14.3
PhenylC2SH	7.4	2.6
PhenylC3SH	9.7	1.3
PhenylC4SH	1.2	1.1
QuinolineC2SH	14.2	6.3
QuinolineC3SH	6.6	6.5
QuinolineC4SH	2.5	2.4
QuinolineC5SH	6.7	7.6
QuinolineC6SH	3.4	4.9

QuinolineCnSH ($n=2-6$)による IMP-1, VIM-2 阻害効果: 以前我々が報告した DansylC2SH(*N*-[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)ethyl]-3-mercaptopropionamide) (図 1) は IMP-1 の添加により蛍光強度が増大することを報告した(8). 一方, 今回合成した QuinolineCnSH は IMP-1 を加えると DansylC2SH とは反対に蛍光の消光が観察された. QuinolineCnSH と DansylC2SH との構造の比較から, QuinolineCnSH では蛍光発色団として働く Quinoline 基と HN 基の間から sulfonyl 基が除かれ蛍光発色団の立体と電子的構造の違いが蛍光消光の主な原因であると考えられる.

QuinolineCnSH の IMP-1 並びに VIM-2 に対する

IC_{50} 並びに K_i をそれぞれ表 3 と図 3 に示した. QuinolineCnSH ($n=2-6$) は IMP-1 および VIM-2 に対して有効な阻害剤として働くことがわかった. IMP-1 に対する IC_{50} および K_i はそれぞれ $2.5\mu\text{M}$ (QuinolineC4SH)- $14.2\mu\text{M}$ (QuinolineC2SH), $0.44\mu\text{M}$ (QuinolineC4SH)- $2.97\mu\text{M}$ (QuinolineC2SH) の濃度範囲内にあることがわかった.

VIM-2 に対する IC_{50} および K_i はそれぞれ $2.4\mu\text{M}$ (QuinolineC4SH)- $7.6\mu\text{M}$ (QuinolineC5SH), $0.42\mu\text{M}$ (QuinolineC4SH)- $1.39\mu\text{M}$ (QuinolineC5SH) の濃度範囲内にあることがわかった. 図 3 からわかるようにメチレン鎖の長さを変化させたとき, IMP-1 および VIM-2 に対して QuinolineC4SH が最も強く阻害することがわかった. 興味深いことに K_i 値は IMP-1 については $n=2$ から 4 へ行くに従って著しく減少した. 一方, VIM-2 では IMP-1 で観られた変化は観測されなかった.

PhenylC3SH と VIM-2 との複合体の X 線結晶構造解析: PhenylC3SH と PhenylC4SH は VIM-2 の活性を最も強く阻害することから, VIM-2 の三次元構造および PhenylC3SH との結合様式を調べるため, VIM-2 と PhenylC3SH との複合体の X 線結晶構造解析を行った. VIM-2 と PhenylC3SH との複合体は分解能 2.3\AA で結晶格子に 2 個の独立した構造が存在していた (ここで Molecule A および B とする). モデル構造の信頼度因子 R および R_{free} はそれぞれ $0.207, 0.268$ であった. 理想的な結合角, 結合距離からの root-mean-square deviation (rmsd) はそれぞれ $1.36^\circ, 0.0060\text{\AA}$ であった. 複合体の全体構造を図 4 左に示した. VIM-2 の三次元構造は既知のメタロ- β -ラクタマーゼで見られる $\alpha\beta/\beta\alpha$ のサンドイッチ構造をとっていることがわかった. 一つの VIM-2 の構造中には 2 個亜鉛(II) と PhenylC3SH の一分子が存在することがわかった.

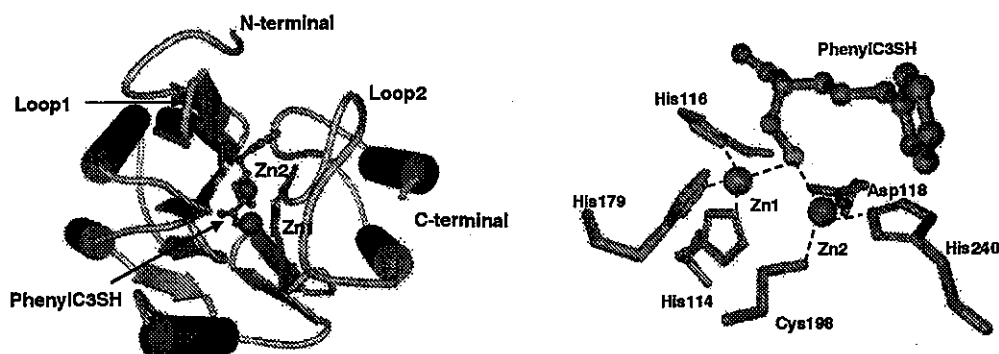


Fig. 4. The Overall Structure (Left) and the Active Site (Right) of the Complex of VIM-2 with PhenylC3SH

Table 4. Bond Distances (Å) around Zn Coordination Site

	A ^{a)}	B ^{a)}
Zn1-His114NE2	2.0	2.0
Zn1-His116ND1	1.9	2.0
Zn1-His179NE2	2.1	2.1
Zn1-S (inhibitor)	2.5	2.5
Zn2-Asp118OD1	1.9	1.9
Zn2-Cys198SG	2.2	2.2
Zn2-His240NE2	2.1	2.1
Zn-2S (inhibitor)	2.5	2.1

^{a)} A and B denote molecules A and B, respectively

Table 5. Bond Angles (°) around Zn Coordination site

Ligand-Zn-Ligand	A ^{a)}	B ^{a)}
His114NE2-Zn-His116ND1	105	105
His114NE2-Zn1-His179NE2	118	115
His114-Zn1-S (inhibitor)	123	126
His116ND1-Zn1-His179NE2	97	102
His116-ND1-ZN1-S (inhibitor)	97	109
His179NE2-Zn1-S (inhibitor)	110	
Asp118OD1-Zn2-Cys198SG	114	117
Asp118OD1-Zn2-His240NE2	90	90
Asp118OD1-Zn2-S (inhibitor)	92	106
Cys198SG-Zn2-His240NE2	105	106
Cys198Zn2-S (inhibitor)	132	122
His240NE2-S (inhibitor)	117	112

^{a)} A and B denote molecules A and B, respectively

PhenylC3SH-VIM-2 複合体の活性中心付近を図4右に示した。第一の亜鉛(II)サイトには His114, His116, His179 の3つの His が配位し、第二のサイトの亜鉛(II)には Asp118, Cys198, His240 の3つの残基が配位していた。阻害剤 PhenylC3SH のチオールは二つの亜鉛(II)に架橋して配位していることがわかった。表4に活性中心の亜鉛(II)周りの結合距離を示した。また、亜鉛(II)と配位しているアミノ酸残基並びに阻害剤の結合角を表5に示した。結合角を考慮すると第1の亜鉛(II)は3つの His と阻害剤のチオールと配位結合し

た四面体を形成していると考えられる。一方、今回のX線結晶構造解析結果では第2の亜鉛(II)は Cys と His, 阻害剤のチオールおよび Asp の酸素が配位している。しかしながら、それらの結合角を考慮すると Cys と His, 阻害剤のチオール基が三角平面を形成し(即ち亜鉛(II)へエクアトリアル側から配位している)、その平面に対しアクシヤル位から Asp の酸素が亜鉛(II)へ配位していると考えられる。このことから、X線結晶構造解析では locate されていない H₂O が Asp の酸素原子に対しトランス位からさらに亜鉛(II)に配位した五配位三角両錐型構造を形成していると考えられる。

考察

メタロ-β-ラクタマーゼに対する PhenylC_nSH(n = 1-4)または QuinolineC_nSH(n = 2-6)の阻害活性評価：本研究において PhenylC_nSH(n = 1-4)または QuinolineC_nSH(n = 2-6)はメタロ-β-ラクタマーゼの有効な阻害剤であることがわかった。PhenylC_nSH(n = 1-4)は IMP-1 および VIM-2 に対して次のような相互作用が予想された：a)チオール基は活性中心の二つの亜鉛(II)に架橋している水と置換し亜鉛に結合し、b)フェニル基はメタロ-β-ラクタマーゼの疎水ポケットに結合し、c)カルボキシル基の酸素はメタロ-β-ラクタマーゼ中のアミノ酸残基と相互作用するか、DHC サイト中の第2の亜鉛(II)へ配位している水と置換する。

まず、a)の PhenylC_nSH のチオール基がメタロ-β-ラクタマーゼの活性中心の亜鉛(II)へ結合する点については、今回の PhenylC3SH と VIM-2 との複合体の X 線結晶構造解析の結果から支持された。

次に、b)活性中心付近の疎水性が高い部位と PhenylC_nSH(n = 1-4)のフェニル基がちょうど相互作用する位置にくると考えられた。このことは PhenylC4SH が IMP-1 と VIM-2 を最も強く阻害することから、メチレン鎖の数が n = 4 のとき、疎水ポケットと最も相互作用しやすい距離にある

と考えられた。PhenylC3SH と PhenylC4SH がともに VIM-2 を最も強く阻害し、PhenylC2SH も VIM-2 が IMP-1 より強く阻害されたことから、VIM-2 の疎水ポケットは IMP-1 よりもっと広く、亜鉛(II)付近にあると考えられた。

一方、PhenylC1SH は IMP-1、VIM-2 に対して弱い阻害しか示さなかった。これは亜鉛(II)結合部位とフェニル基が近過ぎるためであると考えられる。メチレン基の数が $n = 3$ と 4 の長さが VIM-2 の疎水ポケットへの結合に適切な距離と考えられる。

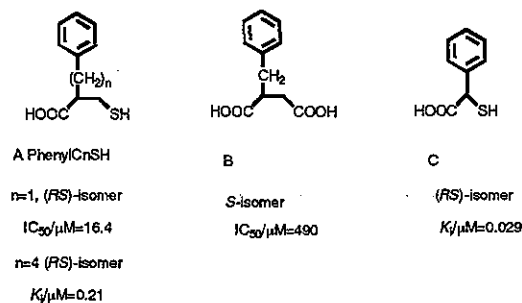


Fig. 5. Relation of Inhibitor Effect versus Structures, for Several Inhibitors of IMP-1

IMP-1 に対する類似阻害剤の阻害能の比較: 合成した PhenylCnSH は他の類似しているチオール阻害剤と IMP-1 に対する阻害活性について比較した。図 5 より、本研究で合成した阻害剤 PhenylC1SH と Toney より報告された阻害剤 B(15)の構造を比べると、チオール基とカルボキシル基だけが違うが IMP-1 に対しての阻害作用はニトロセフィン を基質としたとき、PhenylC1SH は $IC_{50} = 16.4 \mu M$, B は $IC_{50} = 490 \mu M$, 前者は後者の 1/30 であった。PhenylC4SH ($K_i = 210 \text{ nM}$) は PhenylCnSH 化合物中で IMP-1 に対して最も強い阻害作用を有するが、Mollard 等より報告された阻害剤 C(16) はさらに 1/10 低かった。阻害剤 C のチオール基は亜鉛(II)と結合し、カルボキシル基はコハク酸の類似体と IMP-1 酵素との構造に見られるように亜鉛(II)の一つと結合するか、または、アミノ酸残基の Lys の N と相互作用する可能性が考えられた。

QuinolineCnSH 蛍光特性: QuinolineCnSH は DansylC2SH とは異なり蛍光の消光が起こりメタロ- β -ラクタマーゼの蛍光検出試薬として期待はできなかった。しかしながら、本研究で用いた IMP-1 並びに VIM-2 を阻害したことからメタロ- β -ラクタマーゼの有効な阻害剤であることがわかりより有効な阻害剤を設計するための基礎的知見が得られたと考えられる。

PhenylC3SH-VIM-2 複合体の X 線結晶構造

阻害剤の結合様式: 今回 PhenylC3SH は R,S のラセミ体を使用した。しかし得られた X 線結晶構

造中には S 体が存在していることがわかった。これは Asn210 との立体障害により R 体では VIM-2 と結合できなかったと考えられる。PhenylC3SH のチオール基は活性中心に存在する 2 個の亜鉛(II)に架橋して配位し、それぞれの結合距離は PhenylC3SH-Zn1 では 2.5 \AA , PhenylC3SH-Zn2 では 2.5 \AA であった。PhenylC3SH のチオール基はプロトンが解離しチオレートとして亜鉛(II)に配位していることがわかった。これは 2 個の亜鉛(II)に架橋した水またはヒドロキシアニオンとの置換によるものと考えられる。このことは予想していたことと一致した。

PhenylC3SH のフェニル環は、VIM-2 の β シート上の 59-69 のアミノ酸残基から構成されるフラップ上にある Tyr67(Loop1 62-67 の根元)と face-to-face (3.6 \AA の距離)で π - π スタッキング相互作用していることがわかった。さらに、Loop1 にある Phe62 は PhenylC3SH のメチレン鎖と CH- π 相互作用していることがわかった。

Phe62 のフェニル基は活性中心と PhenylC3SH の上部に位置し、この Phe62 は阻害剤または基質と相互作用することで活性中心に阻害剤または基質を Trap する役割を担っていることが X 線結晶解析結果から示唆された。

PhenylCnSH ($n = 1-4$)の中で、PhenylC3SH と PhenylC4SH の構造は、チオール基が亜鉛(II)に配位し、フェニル基が VIM-2 の疎水性残基 Tyr67 と相互作用するのに最適な長さと考えられた。結果として、基質加水分解活性より求めた阻害定数 K_i に反映され VIM-2 に対する PhenylC3SH と PhenylC4SH の阻害能が PhenylCnSH ($n = 1,2$)と比べ大きくなったと考えられる。

しかしながら、c)の予想(カルボキシル基の酸素がメタロ- β -ラクタマーゼ中のアミノ酸残基と相互作用すること)に反して PhenylC3SH のカルボキシル基は VIM-2 のどのアミノ酸とも相互作用していなかった。この原因については IMP-1 の loop2 上に存在する Lys161 のような水素結合に関するアミノ酸残基がないことが挙げられる。

結論

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

- (I) Quinoline は IMP-1 並びに VIM-2 の両方のメタロ- β -ラクタマーゼを阻害した。メチレン鎖長 $n = 4$ のとき、阻害能が最も高いことがわかった。このことから疎水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わかった。
- (II) Quinoline は IMP-1 共存下、蛍光の消光が起こることが明らかとなった。
- (III) PhenylCnSH は強く IMP-1 と VIM-2 を阻害したが、メチレン鎖長 n に強く依存した。
- (V) X 線結晶構造解析により、PhenylC3SH-VIM-2

複合体の構造を決定した。この結果から、VIM-2の有効な阻害剤の開発に当って亜鉛(II)に配位しloop1並びにloop2のアミノ酸残基と相互作用する置換基を有する阻害剤の分子設計が必要であることが本研究で明らかとなった。

研究発表論文

Jin, W., Arakawa, Y., Yasuzawa, H., Taki, T., Hashiguchi, R., Mitsutani, K., Shoga, A., Yamaguchi, Y., Kurosaki, H., Shibata, N., Ohta, M., and Goto, M. (2004) *Biol. Pharm. Bull.* 27(6), 851-856

参考論文

1. Page, M. I. (1999) *Curr. Pharm. Des.* 5(11), 895-913
2. Ambler, R. P. (1980) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 289(1036), 321-331
3. Zervosen, A., Valladares, M. H., Devreese, B., Prosperi-Meys, C., Adolph, H. W., Mercuri, P. S., Vanhove, M., Amicosante, G., van Beeumen, J., Frere, J. M., and Galleni, M. (2001) *Eur. J. Biochem.* 268(13), 3840-3850
4. Arakawa, Y., Murakami, M., Suzuki, K., Ito, H., Wacharotayankun, R., Ohsuka, S., Kato, N., and Ohta, M. (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39(7), 1612-1615
5. Park J. D., and H., K. D. (2002) *J. Med. Chem.* 45(4), 911-918
6. Osano, E., Arakawa, Y., Wacharotayankun, R., Ohta, M., Horii, T., Ito, H., Yoshimura, F., and Kato, N. (1994) *Antimicrob. Agents Chemother.* 38(1), 71-78
7. Poirel, L., Naas, T., Nicolas, D., Collet, L., Bellais, S., Cavallo, J. D., and Nordmann, P. (2000) *Antimicrob. Agents Chemother.* 44(4), 891-897
8. Kurosaki, H., Yasuzawa, H., Yamaguchi, Y., Jin, W., Arakawa, Y., and Goto, M. (2003) *Org. Biomol. Chem.* 1(1), 17-20
9. Terwilliger, T. C., and Berendzen, J. (1999) *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 55 (Pt 4), 849-861
10. Terwilliger, T. C. (2000) *Acta Crystallogr., Sect. D: Biol. Crystallogr.* 56 (Pt 8), 965-972
11. Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr.* A47, 110-119
12. Brünger, A. T., Adams, P. D., Clore, G. M., DeLano, W. L., Gros, P., Grosse-Kunstleve, R. W., Jiang, J.-S., Kuszewski, J., Nilges, M., Pannu, N. S., Read, R. J., Rice, L. M., Simonson, T., and Warren, G. L. (1998) *Acta Crystallogr.* D54, 905-921
13. van Aalten, D. M., Bywater, R., Findlay, J. B., Hendlich, M., Hooft, R. W., and Vriend, G. (1996) *J. Comput. Aided Mol. Des.* 10(3), 255-262
14. Goto, M., Takahashi, T., Yamashita, F., Koreeda, A., Mori, H., Ohta, M., and Arakawa, Y. (1997) *Biol. Pharm. Bull.* 20(11), 1136-1140
15. Toney, J. H., Hammond, G. G., Fitzgerald, P. M., Sharma, N., Balkovec, J. M., Rouen, G. P., Olson, S. H., Hammond, M. L., Greenlee, M. L., and Gao, Y. D. (2001) *J. Biol. Chem.* 276(34), 31913-31918
16. Mollard, C., Moali, C., Papamicael, C., Damblon, C., Vessilier, S., Amicosante, G., Schofield, C. J., Galleni, M., Frère, J. M., and Roberts, G. C. (2001) *J. Biol. Chem.* 276(48), 45015-45023

緑膿菌の抗菌薬多剤耐性化に機能する排出システムの性状の解析 と簡便検出法の考案

分担研究者: 後藤 直正; 研究協力者: 門野愛美、尾崎 徹
京都薬科大学・微生物学教室

緑膿菌の染色体上の多剤排出システムオペロンの発現は、抗菌薬耐性や病原性の発揮に寄与する。本年度の研究によって次の成果を得た。1) *mexCD-oprJ* オペロンはキノロン薬や一部のベータラクタムの排出のみならず、細胞壁ペプチドグリカンの構成成分であるムロペプチドの排出する。この結果、*mexCD-oprJ* 発現株では染色体性 AmpC β -lactamase の誘導が抑制され、imipenem などの一部のベータラクタムに対する高感受性化が起こる。2) *mexAB-oprM* 高発現株の検出法を開発し、臨床分離株に適応したところ、*mexAB-oprM* 高発現に起因したキノロン耐性株を簡便に検出できることが分かった。

A. 研究目的

異物(抗菌薬)排出システムは生物界に広く分布し、環境中に存在する有機溶媒、重金属、細胞障害性化合物などの有害な化学物質や Quorum sensing に関与する化合物などの細胞代謝産物などをエネルギー依存的に細胞内から細胞外へ能動輸送(排出)する。細菌では主に抗菌薬を細胞外に排出する結果、抗菌薬耐性をもたらす抗菌薬排出システムの研究が現在までに行われてきた。細菌の排出タンパク質はその相同性と利用するエネルギー種から少なくとも 5 つのファミリーに分類されているが、ATP 駆動型排出タンパク質は数種のもが発見されているに過ぎず、ほとんどが、細胞膜の内外に形成されたプロトン(H⁺)勾配によるプロトン駆動力型である。

緑膿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)は院内感染症の原因菌として分離頻度の高いグラム陰性細菌である。本菌感染症は難治化す

ることが多く、その治療が困難な原因の一つは、本菌が種々の抗菌薬や消毒剤に高い抵抗性を示す点にあり、この原因のひとつが RND マルチコンポーネント型多剤排出システム(Mex システム)群の機能にあることが示唆されてきた。本システムの発現は構造的に類似性の無い多種の抗菌薬に対する耐性化に関与する。また緑膿菌のゲノム解析は、既知のものも含めて 12 種の RND 型多剤排出システムが染色体上にコードされていることを示唆している。

このように Mex システムの発現は緑膿菌に抗菌薬耐性を付与するが、Mex システムのひとつをコードする *mexCD-oprJ* の発現株では、キノロン薬、一部のベータラクタム薬、マクロライドやテトラサイクリンなどに対する耐性が観察されるが、奇妙なことに imipenem などのカルバペネムに対する高感受性化も観察される。メカニズムは不明であるが、*mexCD-oprJ* の発現によって imipenem などによる染色体性

AmpC β -lactamase の誘導能が低下することが原因であると考えられてきた。そこで、このメカニズムを解明することによって Mex システムの新たな機能を見出すことを試みた。

また、抗菌薬耐性緑膿菌の出現は本菌感染症の治療の障害となっている。このような耐性菌の出現のサーベイランスやそれを基にした耐性菌抑制法の考案が希求されている。グラム陰性菌における抗菌薬耐性は、抗菌薬作用標的の変異による親和性の低下、抗菌薬分解または修飾酵素の産生、外膜透過性の変化および能動的排出などの少なくとも 4 種類の機構によって起こる。能動的排出はその基質域の広さから一種の抗菌薬のみならず、多剤耐性化を引き起こすことが問題である。本研究では緑膿菌で構成的に発現し、本菌の抗菌薬耐性に重要な役割を果たしている MexAB-OprM システムの簡便検出法を考案した。

B. 研究材料と方法

1. β -lactamase 活性の測定: セファロチンを基質とした UV 法によって測定した。

2. 遺伝子欠損株の作成: すでに報告したようにクローン化した標的遺伝子中に欠失部分を作成し、その変異遺伝子を用いた相同的組換えにより、目的遺伝子を欠失させた。

3. ムロペプチドの蓄積量の測定: *Enterobacter cloacae* 由来の *ampR-ampC* オペロンを含むプラスミドと *P. aeruginosa* 由来の *mexCD-oprJ* オペロンを含むプラスミドを保持した *E. coli* 細胞を [³H]diaminopimelate を含む培地中で培養することによって、細胞壁ペプチドグリカンを標識した。その後、imipenem などの抗菌薬の作用によって遊離したムロペプチドの量を放

射活性の強さで比較した。

4. Mex システム簡便検出法: 希釈した試験株を培養液を寒天平板培地上に塗抹した。その平板上に、市販のレボフロキサシン・ディスクと Phe-Arg- β -naphthylamide 塩酸 (ジアミン EPI) を含む紙製ろ紙を貼り付けた。培養後に形成されたレボフロキサシン・ディスクの阻止円の形成に与えるジアミン EPI ディスクの影響を観察した。

C. 結果および考察

1. 多剤排出システム MexCD-OprJ の発現による AmpC β -lactamase 産生の抑制機構の解析

P. aeruginosa の β -lactamase 誘導産生機構がグラム陰性菌と同様であることを確認した。また、*nfxB* 変異株における β -lactamase 活性の減少は *nfxB* 遺伝子の変異によるものではなく、*nfxB* 変異の結果もたらされた *mexCD-oprJ* の発現によるものであることを確認した。

細胞内ムロペプチド蓄積量の測定は *Escherichia coli* 細胞で実験を行った。その結果、*mexCD-oprJ* の発現によりムロペプチド蓄積量の減少が観察され、同時に、*mexCD-oprJ* の発現により β -lactamase 活性の低下が観察された。これらのことから *mexCD-oprJ* は細胞内に蓄積したムロペプチドを排出することにより、 β -lactamase 活性の低下を引き起こすことが明らかとなった。さらに *P. aeruginosa* 細胞での *nagZ* の高発現は、*mexCD-oprJ* の発現による β -lactamase 産生の抑制を解消させることが分かった。これは *mexCD-oprJ* の発現によって GlcNAc-1,6-anhMurNAc pentapeptide が排出されることを示唆している (Fig. 1)。

今回の研究により MexCD-OprJ は抗菌薬や消毒薬の排出のみならず、ムロペプチドという自己代謝産物をも排出するという生理的な機能を持つことを明らかにすることができた。さらにはムロペプチドの中でも 1,6-anhMurNAc pentapeptide ではなく GlcNAc-1,6-anh-MurNAc pentapeptide を排出していることが

GlcNAc-1,6-anhMurNAc pentapeptide を排出していることが推測されたことから、MexCD-OprJ の基質認識に N-アセチルグルコサミン残基が非常に重要であることが示唆された。この情報は排出システムに排出される基質の特徴解明や、排出システム阻害薬の創製に有益な情報であると考えられる。

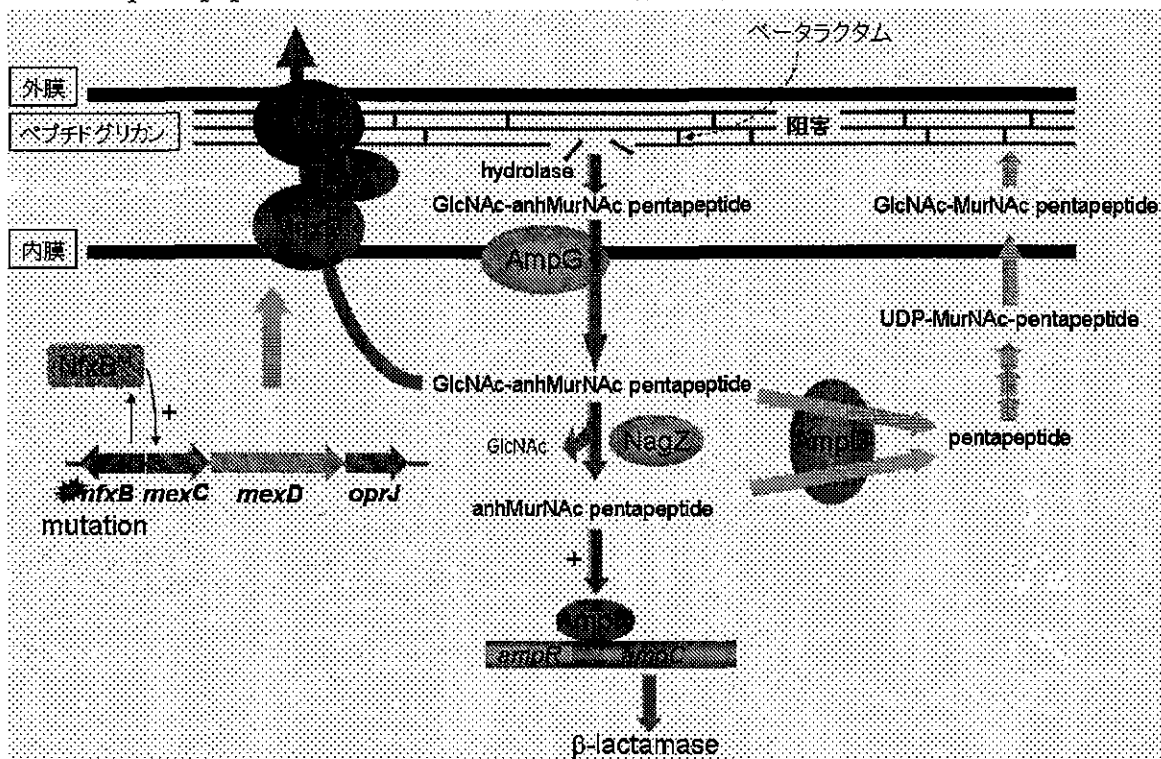


Fig. 1. MexCD-OprJ によるβ-lactamase 産生抑制モデル

推測されたことから、MexCD-OprJ の基質認識に N-アセチルグルコサミン残基が非常に重要であることが示唆された。この情報は排出システムに排出される基質の特徴解明や、排出システム阻害薬の創製に有益な情報であると考えられる。今回の研究により MexCD-OprJ は抗菌薬や消毒薬の排出のみならず、ムロペプチドという自己代謝産物をも排出するという生理的な機能を持つことを明らかにすることができた。さらにはムロペプチドの中でも 1,6-anhMurNAc pentapeptide ではなく

2. 抗菌薬排出システム MexAB-OprM 発現の簡便検出法の考案

本方法で MexAB-OprM の発現量の異なる実験室株を用いて阻止帯形成を観察したところ、MexAB-OprM の発現を簡便に検出することが可能であることが示唆された。そこで抗菌薬感受性が異なる 104 株の臨床分離 *P. aeruginosa* で本方法の実用性を試験したところ、MexB の高発現がなくても阻止帯の延長が観察された株も認められた。この原因を、定量的 RT-PCR 法やウェスタンイムノブロット法