

Table 1 セフェム薬耐性菌の検出状況

	<i>E. coli</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. mirabilis</i>	Total
分離株数	3929	1575	567	296	6367
耐性株数	172 (4.4%)	17 (1.1%)	30 (5.3%)	114 (38.5%)	333 (5.2%)
ESBLs	43 (1.1%)	7 (0.4%)	6 (1.1%)	114 (38.5%)	170 (2.7%)
pAmpC	9 (0.2%)	3 (0.2%)	—	—	12 (0.2%)
MBL	5 (0.1%)	4 (0.3%)	—	—	9 (0.1%)
Others	115 (2.9%, cAmpC)	3 (0.2%, unknown)	24 (4.2%, cOXY)	—	142 (2.2%)

Table 2 プラスミド性 β -ラクタマーゼ遺伝子の種類

ESBLs (170)	pAmpC (12)	MBL (9)
CTX-M = 135 (114*)	CMY = 3	IMP = 9
CTX-M & TEM = 15	DHA = 9	
TEM = 17		
TEM & SHV = 1		
SHV = 2		

* *P. mirabilis* 由来

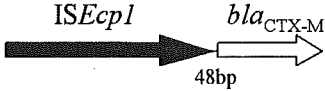

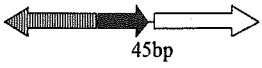
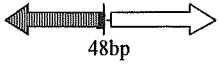
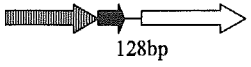
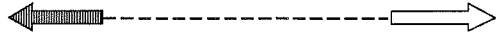
CTX-M (150) M-1 group = 7 M-2 group = 119 (114*) M-9 group = 24
--

Table 3 挿入配列およびインテグロンの保有状況

	ISEcp1	IS26	Int1	検出数
pAmpC (12)				
CMY	+	-	-	1
	+	+	-	2
DHA	-	+	-	9
ESBLs (141)				
CTX-M	+	-	-	54 (46*)
	+	+	-	25 (9*)
	+	+	+	59 (50*)
	-	+	+	1
	-	-	-	2

* *P. mirabilis* 由来

Table 4 *bla*_{CTX-M} 近傍領域の構造

<i>bla</i> _{CTX-M} 近傍領域	M-1g	M-2g	M-9g
A 	1	46(46*)	7
B 	2	64(59*)	15
C 	1	0	0
D 	1	0	0
E 	1	0	0
F 	1	0	2

* *P. mirabilis* 由来

分担研究課題：呼吸器感染症からの検査材料を用いた直接 PCR による原因菌の
迅速検索法の確立

北里大学北里生命科学研究所 感染情報学研究室 生方 公子

【研究要旨】 呼吸器感染症の主要な起炎菌において急速に進行している耐性菌増加の制御のためには、発症の初期診断においてその原因菌を迅速かつ正確に把握し、最も適切な抗菌薬を選択することが極めて重要である。その手法として、呼吸器感染症の主要な病原細菌を 2 時間程度で検索でき、しかも省力化できる *molecular beacon (MB) probe* を用いた *real-time PCR* 法の確立を企画した。菌種としては、市中から救命救急センター、あるいは外来受診から入院に至る症例の起炎菌を検索するという観点から、肺炎球菌、インフルエンザ菌、A 群溶血レンザ球菌、マイコプラズマ、クラミジア、レジオネラの 6 菌種を対象とした。特異的な *Mbprobe* と *primer* を設計し、成人や小児の喀痰や上咽頭ぬぐい液などの臨床検査材料を用い、培養法、従来の PCR 法、および *real-time PCR* 法の成績を比較し、その有用性を明らかにした。また、同手法を耐性菌検索用に応用し、臨床的に用いることが可能であることを証明した。

A. 目的 呼吸器感染症の主要な起炎菌において急速に進行している耐性菌増加の制御のためには、発症の初期診断においてその原因菌を迅速かつ正確に把握し、最も適切な抗菌薬を選択することが極めて重要である。その達成のためには、呼吸器感染症の主要な病原細菌を 2 時間程度で検索でき、しかも省力化できる *molecular beacon (MB) probe* を用いた *real-time PCR* 法の応用は臨床的有用性が高いと考えた。検索菌種としては、市中から救命救急センター、あるいは外来受診から入院に至る症例の起炎菌を検索するという意図のもと、肺炎球菌、インフルエンザ菌、A 群溶血レンザ球菌、マイコプラズマ、クラミジア、レジオネラの 6 菌種を対象とした。まず、それらに特異的な *MB* プローブとプライマーを設計し、成人や小児の喀痰や上咽頭ぬぐい液などの臨床検査材料を用い、培養法と *real-time PCR* 法の成績を比較し、その有

用性を検証し、臨床への応用の可能性を精査することを目的とした。

B. 材料と方法

1) *primer* と *MB probe* : 肺炎球菌は *lytA* 遺伝子、レジオネラは *mip* 遺伝子、他の 4 菌種は 16S rRNA 遺伝子上に *primer* と *MB probe* とを設計した。その詳細は表-1 に示したとおりである。これらを用いる原理は、図-1 に示したように、いわゆる従来法の PCR によって増幅される DNA 断片の内部に、さらに相同性を有する *probe* を設計するものである。つまり、非特異的な増幅がないように設計されているため、*probe* を蛍光標識しておき、DNA の増幅に伴う蛍光量を測定することによって、起炎菌が推定でき、なおかつ存在する菌量も測定できるというシステムである。臨床検査材料からの DNA 抽出には *ExtragenII kit*(TOSO 株式会社)を用い、20 分

で終了する。DNA 増幅用 PCR には Mx3000P 機器を使用した。DNA の抽出から結果を得るまでの所要時間は 2 時間以内である。菌量

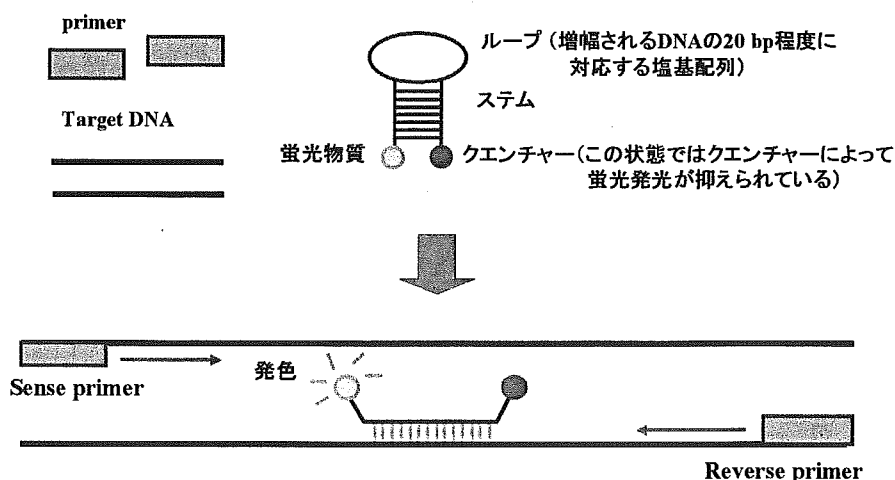
が多く存在すれば機器へセット後 30 分程度で陽性反応が検出できる。

表-1. Real-time PCRに用いたPrimerとProbe

Species, primer, and probe	Primer ^a or probe sequence	Amplicon size
<i>S. pneumoniae</i>		
Sense primer	5'-CAACCGTACAGAATGAAGCGG-3'	319
Reverse primer	5'-TTATTCGTGCAATACTCGTGCG-3'	
Probe	FAM-CGCGATCAGGTCTCAGCATTCCAACCGCCGATCGCG-BHQ1	
<i>H. influenzae</i>		
Sense primer	5'-TTGACATCCTAAGAAGAGCTC-3'	167
Reverse primer	5'-TCTCCTTTGAGTCCCGACCG-3'	
Probe	FAM-CGCGATCTGACGACAGCCATGCAGCAGATCGCG-BHQ1	
<i>S. pyogenes</i>		
Sense primer	5'-GAGAGACTAACGCATGTTAGTA-3'	317
Reverse primer	5'-TAGTTACCGTCACTTGGTGG-3'	
Probe	FAM-CGCGATCTCGGACGATACATAGCCGACCTGGATCGCG-BHQ1	
<i>M. pneumoniae</i>		
Sense primer	5'-GTAATACITTAGAGGCGAACG-3'	225
Reverse primer	5'-TACTTCTCAGCATAGCTACAC-3'	
Probe	FAM-CGCGATACCAACTAGCTGATATGGCGCAATCGCG-BHQ1	
<i>C. pneumoniae</i>		
Sense primer	5'-TGACAACCTGTAGAAATACAGC-3'	248
Reverse primer	5'-CTGTACTAACCAATTGTAGCAC-3'	
Probe	FAM-CGCGATCTCATCTCGCCTTCTCTGGTATCGCG-BHQ1	
<i>L. pneumophila</i>		
Sense primer	5'-ACCGAACAGCAAATGAAAGA-3'	144
Reverse primer	5'-AACGCCTGGCTTGTTTTGT-3'	
Probe	FAM-CGCGATCAGTACGCTTTGCCATCAAATCATCGCG-BHQ1	

^a *S. pneumoniae* :yfa gene, *L. pneumophila* :mip gene (Hayden et al. (14))
H. influenzae, *S. pyogenes*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae* :16S rRNA gene

図-1. Molecular Beacon Probeを用いたReal-time PCR



2) 対象とした検査材料：本方法の精度について検証するための検査材料は、小児科医によって組織されている「小児呼吸器感染症研

究会(ARD 研究会)」と成人マイコプラズマ研究会 (MIA 研究会)」を通じて収集された。小児由来は急性中耳炎由来の鼓膜切開液、急

性扁桃炎由来の咽頭ぬぐい液, 急性気管支炎, および肺炎由来の上咽頭ぬぐい液である。成人由来は、上咽頭ぬぐい液あるいは喀痰であった。小児由来は総計 429 検体、成人由来は

約 100 検体であった。これらの検査材料は定法に従って培養検査も行ない、さらに real-time PCR 法を実施した。

C. 結果

1) 標準菌株に対する検量曲線:6 菌種に対する感度は、表-2 ならびに図-2 に示すように、反応チューブ当り $10^1 \sim 10^6$ コピー数の範囲にあった。菌量と Ct 値の間には高い相関がみられ、肺炎球菌： $\gamma=0.9987$ 、インフルエンザ菌： $\gamma=0.9992$ 、A 群溶血レンサ球菌： $\gamma=$

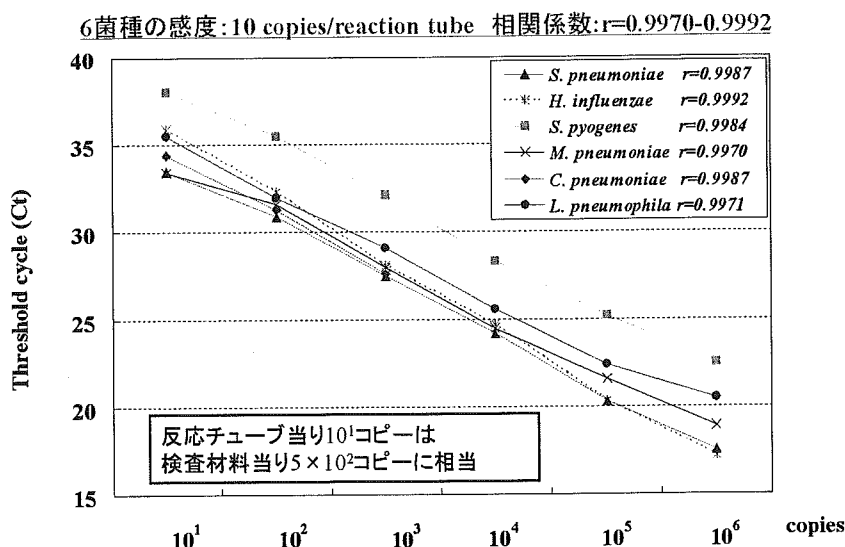
0.9984、マイコプラズマ： $\gamma=0.9970$ 、クラミジア： $\gamma=0.9987$ 、レジオネラ： $\gamma=0.997$ であった。また、設計したプライマーとプローブの特異性は高く、当研究室保有の口腔内および呼吸器系常在細菌には陽性反応を示さなかった。

表-2. Real-time PCRの感度

Copies / 50 μ l of reaction tube	Threshold cycle (Ct)					
	<i>S. pneumoniae</i> (ARD-2743) ^a	<i>H. influenzae</i> (ARD-3185) ^a	<i>S. pyogenes</i> (ARD-2957) ^a	<i>M. pneumoniae</i> (ARD-2700) ^a	<i>C. pneumoniae</i> (AR-39) ^b	<i>L. pneumophila</i> (TD-7) ^a
10^6	17.5	17.2	22.5	18.9	N.D. ^c	20.5
10^5	20.3	20.3	25.2	21.6	N.D. ^c	22.4
10^4	24.2	24.7	28.3	24.5	N.D. ^c	25.6
10^3	27.5	28.1	32.1	28.0	27.6	29.1
10^2	30.9	32.3	35.5	31.6	31.3	32.0
10^1	33.5	35.9	38	33.4	34.4	35.5
Correlation coefficient	0.9987	0.9992	0.9984	0.9970	0.9987	0.9971

^cNot determined

図-2. 6菌種の検量線:Ct値と目的遺伝子のコピー数の相関



2) 臨床検体材料の成績：429 症例から得られた臨床検査材料に対する肺炎球菌、インフルエンザ菌、A 群溶血レンサ球菌、マイコプラズマに対する real-time PCR の結果は、小児では、肺炎球菌 203 例、インフルエンザ菌 169 例、マイコプラズマ 49 例、クラミジア 3 例、A 群溶血レンサ球菌 3 例が陽性であった。成人 40 例では、肺炎球菌 14 例、インフルエンザ菌 4 例、マイコプラズマ 5 例、A 群溶血

レンサ球菌 1 例、レジオネラ 1 例が陽性であった。

検出された各菌種の感度と特異度は、表-3 に示した。それらの成績は肺炎球菌が 96.2% と 93.2%、インフルエンザ菌が 95.8% と 95.4%、A 群溶血レンサ球菌が 100% と 100%、マイコプラズマが 100% と 95.4%であった。

表-3. 培養成績と比較したReal-time PCRの感度と特異度

<i>S. pneumoniae</i>				<i>H. influenzae</i>			
Real-time PCR	Culture (%)		Total	Real-time PCR	Culture (%)		Total
	Positive	Negative			Positive	Negative	
Positive	202 (96.2)	15 (6.8)	217	Positive	161 (95.8)	12 (4.5)	173
Negative	8 (3.8)	204 (93.2)	212	Negative	7 (4.2)	249 (95.4)	256
Total	210	219	429	Total	168	261	429

Sensitivity:96.2% Specificity:93.2%

<i>S. pyogenes</i>				<i>M. pneumoniae</i>			
Real-time PCR	Culture (%)		Total	Real-time PCR	Culture (%)		Total
	Positive	Negative			Positive	Negative	
Positive	4 (100.0)	0 (0.0)	4	Positive	36 (100.0)	18 (4.6)	54
Negative	0 (0.0)	425 (100.0)	425	Negative	0 (0.0)	375 (95.4)	375
Total	4	425	429	Total	36	393	429

ちなみに、マイコプラズマの感度と特異度を抗体価上昇の有無と比較すると、表-4 に示したように、real-time PCR の感度と特異度は 90.2% と 97.9% となった。

クラミジアの培養は当研究室では実施していないが、real-time PCR で陽性であった 6 症例のクラミジア抗体価はいずれも有意に上昇していた。

レジオネラは、肺炎が疑われた成人患者の 1 例のみで real-time PCR で陽性であったが、抗菌薬が既に使用されていたため、培養は陰性であった。しかし、同時期の風呂水から本菌が検出された。

表-4. *M. pneumoniae*の抗体価とreal-time PCRとの比較

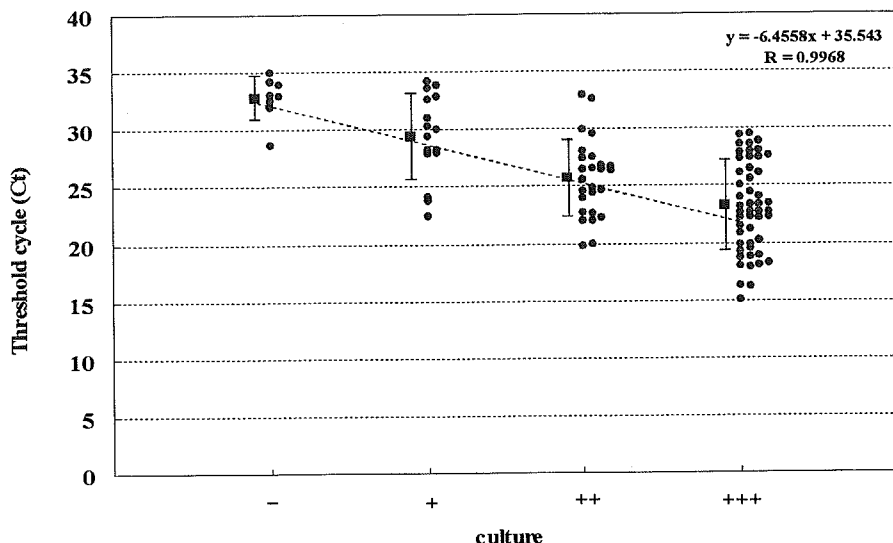
Real-time PCR	Serologic assay (%)		Total
	Positive	Negative	
Positive	46 (90.2)	8 (2.1)	54
Negative	5 (9.8)	370 (97.9)	375
Total	51	378	429

* マクロライド薬が使用されるとPCRでnegativeになりやすい。

なお、肺炎球菌 ($r=0.9910$)とインフルエンザ菌 ($r=0.9953$) について培養後の菌数と Ct

値との関係を見ると、その相関性は図-3 に示したように高かった。

図-3. 肺炎球菌のコロニー数とreal-time PCRのCt値の相関



3) 耐性菌識別への real time PCR 法の応用:
起炎菌の検索のみでなく、培地上に発育した肺炎球菌、あるいはインフルエンザ菌様コロニーについて、菌種の同定とβ-ラクタム系薬耐性遺伝子、およびマクロライド系薬の検索を行ない、臨床に直ちに報告できるシステムを構築した。用いた probe は表-5 に示したとおりである。これを用いて釣菌された肺炎球菌様コロニーについて real-time PCR を実施すると、図-4 に示したような画面となる。

図-4. Real-time PCRの判定画面 (Control)

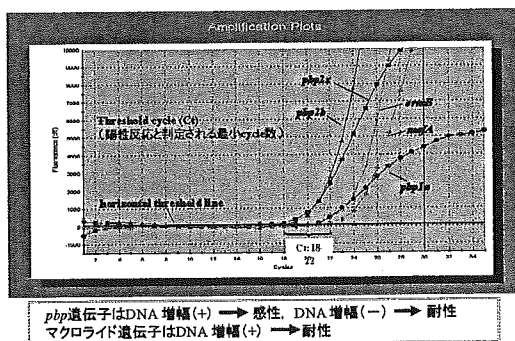


表-6. 耐性肺炎球菌識別のために設計したMB probe

Name (gene)	Sequence (5' to 3')	Position*	Primer Quest Tm Value
PBP 1A (<i>pfp1a</i>)	TGGGATAGGGGCTACTTTGG	2176-2195	56.3
PBP 2X (<i>pfp2x</i>)	TGACTGGTGGCAGAATGATG	1391-1410	55.1
PBP 2B (<i>pfp2b</i>)	TCGGCACCCAGCACTAGAGTCT	1626-1648	59.8
Macrolide efflux (<i>mefA</i>)	TCATACCCAGCACTCAATGCGG	354-376	61.5
Adenine methylase (<i>ermB</i>)	CGGCATACCACAGATGTCC	852-872	61.5

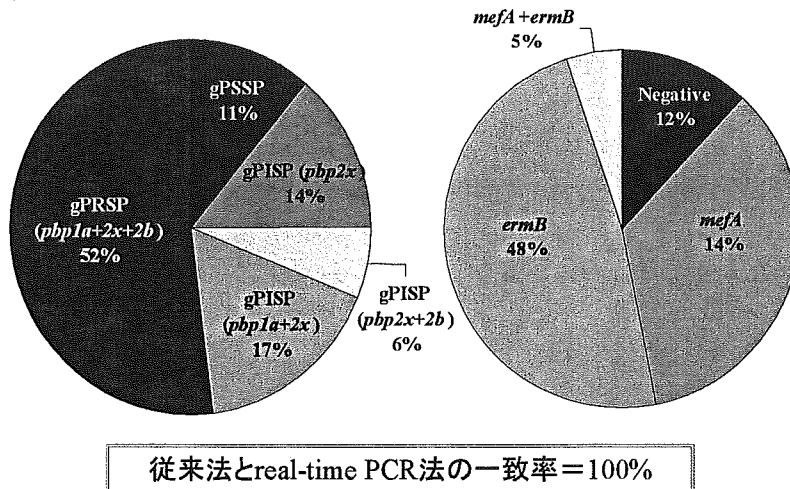
耐性遺伝子の場合、β-ラクタム系薬の耐性遺伝子については、感性菌側のDNAが増幅されるように設計されており、マクロライド系薬に対しては、耐性遺伝子が増幅されるように設計されている。コロニーを用いた場合には、おおよそ25サイクル前後で判定可能である。つまり1.5時間までには結果が判るといふ結果であった。

図-5には、従来の電気泳動によってDNAの増幅を確かめるいわゆる conventional

PCR 法と本 real-time PCR 法における成績の一致率を示す。β-ラクタム系薬の耐性とマクロライド系薬に分けて表示してあるが、いづれも従来法と 100%一致していた。

つまり、本方法を用いれば、短時間で結果が得られると同時に、省力化ができるということであった。

図-5. 対象菌株の耐性遺伝子の内訳 (n=100)



D. 考察

real-time PCR 法は、高い感度と特異度で細菌を検出することが可能であり、抗菌薬が前投与されていても直後であれば起炎菌の推定が可能である。私どもが構築した real-time PCR はひとつのモデルと考えているが、菌種をさらに増やすことによって有用性がさらに高まると考えている。特に、従来の PCR 法とは異なって、感度と特異度が一段と向上しており、加えて PCR 機器にセットした後は、機器そのものが蛍光量の変化を読み取るので、人手をほとんど必要としない。この点がルーチン検査に耐えうると考えている。

1 検体あたりのコストは 1400 円と積算された。

また、省力化できたことで、遺伝子検査が臨床検査室へも導入可能である。入院時に起炎菌が判明するということは、直ちに最も的確な抗菌薬を選択でき、投与できることになり、入院期間の短縮による医療費コストの削

減につながり、極めて有用であると結論された。

E. 研究業績

1) 論文

・M.Morozumi, E.Nakayama, S.Iwata, Y. Aoki, R. Kobayashi, K. Hasegawa, T. Tajima, and K. Ubukata: Simultaneous detection of causative pathogens of community-acquired pneumonia by real-time PCR using molecular beacon. *Journal Clinical Microbiology*, 44:1440-1446, 2006.

・M. Morozumi, R. Kobayashi, K. Hasegawa, N. Chiba, Itho, S. Y Murayama, and K. Ubukata: Assessment of real-time PCR for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. *Canadian J Microbiology*, 52:125-129, 2005.

・R. Saitho, Y.Misawa, K. Ubukata: Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *Journal of Medical Microbiology*, 54:1037-1041, 2005.

2) 学会発表

・千葉菜穂子, 小林玲子, 長谷川恵子, 諸角美由紀, 生方公子: 日本化学療法学会 2005

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

X 線結晶構造解析を用いた metallo- β -lactamase (IMP-1) の Asp120(81) の役割の検討

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

本研究では、すべての MBL の活性中心に保存されている Asp120 の詳細な役割を調べるために、IMP-1 の Asp-120(81)変異体 (D120(81)A と D120(81)E) を調製し、それら変異体の結晶化並びに X 線結晶構造解析を行った。D120(81)E の X 線結晶構造解析から、Asp120(81)の Zn₂ に配位していないカルボキシル基の酸素原子は、2つの Zn(II)イオンを架橋している OH₂ または OH⁻ と水素結合することが、触媒活性にとって必須であることがわかった。

以上の結果から、Asp120 の重要な役割は、 β -ラクタム環のカルボニル炭素を求核攻撃するために、2つの Zn(II)イオンを架橋している OH₂ または OH⁻ の方向付けをすることであり、また Zn(II)イオンと His263 の位置づけに重要であることがわかった。

1. 研究目的

メタロ- β -ラクタマーゼ (MBL) の活性中心には必ず Asp120 が保存されているが、その役割は詳細に解明されていない。MBL の活性中心にある Asp120 は、単核 Zn 酵素である BclII ではプロトンシャトルとして、複核 Zn 酵素である CcrA や L1 では Zn₁-OH₂-Zn₂ の求核攻撃の方向付けを行なうアミノ酸として加水分解機構に関わっていると提案されている(1,2)。

そこで、本研究は IMP-1 の Asp120(81)の詳細な役割を解明するために IMP-1 の Asp120(81)を Ala または Glu に置換した酵素の調製を行い、WT と同様に CcrA と L1 と IMP-1 変異体とを比較・検討することで MBL の活性中心に保存されている Asp120 の役割を詳細に解明することを目的とした。

2. 実験

2.1. IMP-1 変異体の調製

IMP-1 変異体 (D120(81)A と D120(81)E) は、サブクローニングされた pKF19k/IMP について Mutan-Super Express Km キット (TaKaRa) を用いて部位特異的変異を行った。pKF19k/IMP を鋳型に、変異用プライマー D120(81)A, (5'-CCgTgCTggCgCATA-3') と D120(81)E, (5'-ATTCCgCCCgTCCTgTCgCTATg-3')、Selection Primer (キット付属) と Mutagenic oligonucleotides を用いて PCR を行った (94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 4 min, 30 cycle)。ここで得られた PCR 産物をアガロース電気泳動で確認した後、*E. coli* MV1184 に形質転換した。生じたコロニーについて DNA を単離し、塩基配列を調べ、目的の変異導入プラスミドを得た。

部位特異的変異法によって得られた変異導入プラスミドは、*E. coli* JM109 株に形質転換したのち、IMP-1(WT)と同じ方法で精製した。精

製された IMP-1 変異体は、SDS-PAGE 電気泳動により単一バンドであることを確認し、この溶液を精製酵素として-80 °C で保存した。

2.2. IMP-1 変異体の Zn 含量の測定

それぞれの酵素を酵素濃度 2.0 μM ~ 4.0 μM を 0.2% HNO_3 で約 3 mL 調製し、フレイム式原子吸光分光計にて 213.8 nm の吸光度を測定し、Zn 標準溶液から求めた検量線 ($R = 0.9991$) より Zn 量を求めた。求めた Zn 量をモル吸光係数 $\epsilon_{280} = 49,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ を用いて算出した酵素濃度で除し、酵素 1 分子に対する Zn 量を求めた。

2.3. IMP-1 変異体の X 線結晶構造解析

IMP-1 変異体は限外ろ過(centricon YM-10)で濃縮され、Hepes-NaOH 緩衝液(20 mM, pH 7.5)に変換した後、15 mg/mL まで濃縮した。その後 0.45 μm のフィルターでろ過し、結晶化用のタンパク溶液とした。リザーバ溶液は、3.0 g の PEG 4000 を 10 mL のメスフラスコに入れ、0.2 M 酢酸-酢酸 Na-0.1 M クエン酸-クエン酸 Na 緩衝液 (pH 6.5) でメスアップし、この溶液を 0.45 μm のフィルターでろ過した。

結晶化は 20 °C、蒸気拡散法(hanging drop)で行った。結晶は 500 μL のリザーバ液で、drop は 5 μL のタンパク溶液と 5 μL のリザーバ溶液を混ぜて 3~6 週間放置すると、薄い板状の結晶が十数個成長した。それぞれの結晶は空間群が $P1$ で単斜晶系に属し、格子定数は D120(81)A は $a=49.7 \text{ \AA}$ 、 $b=73.0 \text{ \AA}$ 、 $c=82.5 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=85.4^\circ$ 、 $\beta=75.5^\circ$ 、 $\gamma=73.6^\circ$ 、D120(81)E は $a=49.2 \text{ \AA}$ 、 $b=73.1 \text{ \AA}$ 、 $c=80.9 \text{ \AA}$ 、 $\alpha=84.8^\circ$ 、 $\beta=76.1^\circ$ 、 $\gamma=74.0^\circ$ であり、非対称単位である単位胞 1 つ中に結晶学的に独立な酵素分子がそれぞれ 4 つ存在した。

D120(81)A の結晶は SPring-8 の BL41XU で MAR CCD カメラを detector として測定した。測定条件は 1.00 \AA の波長で 100 K、露光時間 10 秒、振動角 1.0°で 360 枚、結晶-detector 距離

を 155 mm とすることで 2.0 \AA の分解能で X 線回折データを収集することができた。また、D120(81)E の結晶は SPring-8 の BL40B2 で ADSC CCD カメラを detector として測定した。測定条件は 0.98 \AA の波長で 100 K、露光時間 15 秒、振動角 1.0°で 360 枚、結晶-detector 距離を 200 mm とすることで 3.0 \AA の分解能で X 線回折データを回収することができた。これらのデータは HKL2000 を使って、integrating、merging、scaling した(3)。

IMP-1 変異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)を search model として使った(4)。プログラム AMoRe で分子置換(5)を行い、プログラム CNS で精密化(6)した。グラフィックソフト O でモデル構築と修正(7)を行った。酢酸イオンと酸化された Cys の topology ファイルと parameter ファイルは HIC-UP(<http://x-ray.bmc.uu.se/hicup/>)を利用した(8)。D120(81)A と D120(81)E の構造は、それぞれ 1WUO、1WUP として Protein Data Bank に登録した。

3. 結果

3.1. Asp120(81) 変異体 (D120(81)A と D120(81)E) の構築

部位特異的変異法は、pKF19k/IMP を鋳型として、Mutan SuperTM Express Kit (TaKaRa)を使って行った。D120(81)A と D120(81)E の Zn(II)含量は原子吸光法により、酵素 1 分子当たりそれぞれ 2.2 と 2.3 であった。変異による Zn(II)イオンとの親和性の低下が期待されたが、大きな変化は見られなかった。

3.2. D120(81)A と D120(81)E の X 線結晶構造解析

D120(81)A と D120(81)E の結晶構造は、既知である IMP-1-阻害剤複合体 (PDB file, 1DD6) の IMP-1 構造を基にして分子置換法により決

定した(4)。両方とも空間群は $P1$ で、結晶格子に4つの独立した構造、A、B、C、Dが存在していた。回収したデータと精密化データは Table 1 でまとめた。D120(81)A と D120(81)E の構造は、それぞれ 2.0 \AA と 3.0 \AA で、 R_{working} 21.2%と 22.4%、 R_{free} 21.8%と 29.5%で精密化できた。

IMP-1 変異体の全体構造は、MBL によく保存されている $\alpha\beta/\beta\alpha$ ドメインで構成されており、WT の構造とほとんど同じであった。D120(81)A の4分子について以下のようなアミノ酸残基の位置を決定した：molecule A, Ser38(3)-Val61(25) と Gly65(29)-Lys298(221)；molecule B, Ser38(3)-Val61(25) と Gly65(29)-Lys298(221)；molecule C, Ser38(3)-Val61(25) と Val66(30)-Lys298(221)；molecule D, Ser38(3)-Asn62(26) と Gly65(29)-Lys298(221)。一方、D120(81)E の4分子は以下のようなアミノ酸残基が含まれていた：molecule A, Leu39(4)-Asn62(26) と Val66(30)-Ser297(220)；molecule B, Leu39(4)-Asn62(26) と Gly65(29)-Glu296(219)；molecule C, Ser38(3)-Gly63(27) と Val66(30)-Glu296(219)；molecule D, Ser38(3)-Gly63(27) と Gly65(29)-Glu296(219)。上記以外のアミノ酸残基は disorder していた。D120(81)A と D120(81)E の単位胞に含まれている非対称な4つの独立した構造の C- α の重ね合わせは、それぞれ 0.23 \AA と 0.49 \AA の root mean square deviations (r.m.s.d.) を与えた。IMP-1 変異体 (それぞれの molecule A を選んだ) と WT の C- α は、WT で disorder していた 62(26)-65(29) を除いて重ね合わせられ、WT と D120(81)A の間で 0.35 \AA の r.m.s.d.、WT と D120(81)E の間で 0.56 \AA の r.m.s.d. が得られた。IMP-1 変異体と WT との間で 1 \AA 以上動いたアミノ酸残基は以下の通りである；D120(81)A, Glu50(14)(1.8 \AA), Val61(25)(1.1 \AA), Glu210(150)(1.1 \AA),

His263(197)(1.2 \AA)；D120(81)E, Asp49(13)(1.1 \AA), Glu50(14)(2.2 \AA), Val61(25)(2.1 \AA), Pro68(32)(1.0 \AA), Val76(40)(1.2 \AA), Asp77(41)(1.2 \AA), Lys186(129)(1.0 \AA), Ile187(130)(1.1 \AA), Glu210(150)(1.1 \AA), His263(197)(1.3 \AA), Glu296(219)(1.5 \AA), Ser297(220)(2.9 \AA)。

IMP-1 変異体と WT の活性中心部位の構造を Fig. 1 に、Zn(II)イオン-ligand 距離を Table 2 に示した。D120(81)A の活性中心は、1つの Zn(II)イオンだけしか観察できず、His116(77)、His118(79)、His196(139)と酢酸イオンの2つの酸素原子が配位していた(Fig. 1B)。Zn2 に対応する位置に球の電子密度は観測できなかったが、Cys221(158)が酸化された cysteine-s-dioxide に対応した三角錐の電子密度が観測された。D120(81)E の活性中心は2つの Zn(II)イオン、(Zn1 と Zn2)を含んでいた。Zn1 には His116(77)、His118(79)、His196(139)が配位し、Zn2 には Glu120(81)、Cys221(158)、His263(197)と酢酸イオンの1つの酸素原子が配位していた(Fig. 1C)。CcrA で見られるような2つの Zn(II)イオンに架橋している OH_2 または OH や Zn2 に配位している水分子は両変異体の活性中心には見られなかった。WT において、WT の3次元構造では CcrA のように2つの Zn(II)イオンに架橋している OH_2 または OH は観測できなかったが、Asp120(81)O δ 1 は OH_2 または OH に水素結合を経由して結合していると考えられている。しかしながら、D120(81)E において Glu120(81)O ϵ 1 から Zn1 または Zn2 への距離はそれぞれ $2.5 \pm 0.6 \text{ \AA}$ と $2.5 \pm 0.3 \text{ \AA}$ であった (Table 2)。それ故に、この酸素原子は Fig. 14C で示すように2つの Zn(II)イオンに架橋して配位していると考えられる。さらに D120(81)E の Zn1 と Zn2 の間の距離は $3.6 \pm 0.1 \text{ \AA}$ で WT より 0.3 \AA 長くなっていることがわかった (Table 2)。

4. 考察

今回の研究で、すべての MBL の活性中心に保存され、酵素活性に重要な役割を担っていると考えられている Asp120 の機能を詳細に解析した。IMP-1 の Asp120(81)を部位特異的変異法で Ala と Glu に置換し、それぞれ D120(81)A と D120(81)E を調製ならびに結晶化を行い X 線結晶構造解析により構造学的な検討を行った。

IMP-1 変異体では、活性中心の部分的な構造は変化したが、全体構造は Asp120(81)に変異をかけたにもかかわらず保存されていた。IMP-1 変異体のアミノ酸 62(26)-65(29)のフラップ領域は WT と同様に disorder していた。WT と IMP-1 変異体の C- α の重ね合わせで、それぞれの C- α に対する r.m.s.d.が調べられた。r.m.s.d.が 1 Å 以上動いた残基は Asp49(13)、Glu50(14)、Val61(25)、Pro68(32)、Val76(40)、Asp77(41)、Lys186(129)、Ile187(130)、Glu210(150)であったが、これらは溶媒に曝されたヘアピンループに位置していた。また Glu296(219)と Ser297(220)は C 末端に位置していた。興味深いことに、His263(197)の C- α 原子は D120(81)A と D120(81)E の構造において WT と比べるとそれぞれ 1.2 Å と 1.3 Å ずれていることがわかった。さらに、D120(81)E の Zn-Zn 距離が WT と比べると 0.3 Å 長くなっていることもわかった (Table 2)。His263(197)はすべての MBL の活性中心に Zn₂ リガンドとして保存されている。Suárez らと Oelschlaeger らはそれぞれ基質と docking させた CcrA と IMP-1 を使って、molecular dynamics シミュレーションで Zn-Zn 距離がそれぞれ 4.5-5.0 Å、4.3-5.2 Å 増加することを報告している(9,10)。これは His263(197)がある程度の柔軟性をもち、この柔軟性が Zn-Zn 距離を増加させている可能性を示唆している。

D120(81)A と WT の活性中心を比較した。WT の活性中心には 2 つの Zn(II)イオンが含まれていたが、D120(81)A の活性中心には原子吸

光法では 1 酵素あたり 2 個含まれていたにも関わらず、構造解析からでは 1 個しか含まれていなかった (Fig. 1B)。これはおそらく結晶成長に時間がかかったため、結晶化溶液中の過剰の酢酸イオンのキレート作用により Zn₂ が脱離し、フリーの Cys221(158)の硫黄原子が酸化され SO₂ になった結果 Cys221(158)が生じ、これが Zn₂ 部分に埋まっていたと考えられた。Zn₁ は 3 つの His と酢酸イオンの 2 つの酸素原子が bidentate で配位しており、水分子は配位していなかった (Fig. 1B)。これらの結果は、120(81)位の Asp から Ala への置換により、Zn(II)イオンの正電荷が上昇したためと考えられ、この正電荷の増加は、リン酸イオンによる D120(81)A の活性阻害に関連していることが考えられる。

D120(81)E の活性中心は WT のように 2 つの Zn(II)イオンを含んでいたが、配位環境が WT と全く異なっていた (Figs. 1A and B)。WT の Asp120(81)O δ 1 は CcrA のように架橋した Zn₁-OH₂-Zn₂ または Zn₁-OH-Zn₂ に水素結合し、Zn₁ には配位していないと考えられる。しかし D120(81)E では Glu120(81)O ϵ 1 は Zn₁-Glu120(81)O ϵ 1 と Zn₂-Glu120(81)O ϵ 1 の距離がそれぞれ 2.5 ± 0.6 Å と 2.5 ± 0.3 Å であることから、Glu120(81)O ϵ 1 は 2 つの Zn(II)イオンに架橋して配位していると考えられる (Fig. 1C)。D120(81)E の Zn-Zn 距離は 3.6 ± 0.1 Å であり WT (3.3 Å)より 0.3 Å 長かった (Table 5)。これは D120(81)E の構造では 2 つの Zn(II)イオンに架橋している水分子 (Zn₁-OH₂-Zn₂) は disorder しているため、Zn₂ とは架橋できずに Zn₁-OH₂ になり、また Glu の酸素原子が Zn(II)イオンの正電荷を抑えたことから Zn₁-OH₂ から H⁺の解離が抑制されたことが示唆された。この配位環境は D120(81)E の pH 依存性の実験において、2 つの Zn(II)イオンに架橋できなくなったため、Zn₁ に配位した Zn₁-OH₂ の pK_aが増加したことから支持される。

5. 結論

すべてのMBLの活性中心に保存されている Asp-120 は、IMP-1 の Asp120(81)を Ala または Glu に置換した IMP-1 変異体を調製しそれらの結晶化並びに X 線結晶構造解析を行った。IMP-1 と変異体との X 線結晶構造の比較から、Asp120 のカルボキシル基の酸素原子が、2 つの Zn(II)イオンに架橋している OH₂ と水素結合することが触媒活性を得るためには必須であることがわかった。

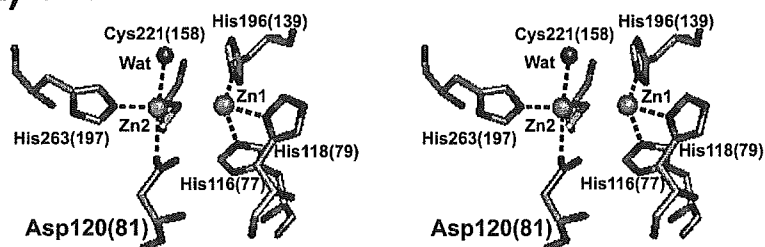
6. 研究発表論文

1. Yamaguchi, Y., Kuroki, T., Yasuzawa, H., Higashi, T., Jin, W., Kawanami, A., Yamagata, Y., Arakawa, Y., Goto, M., and Kurosaki, H. (2005) *J. Biol. Chem.* **280**, 20824-20832

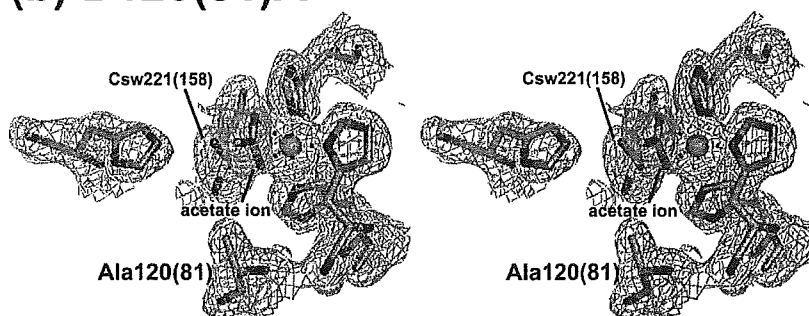
7. 参考論文

1. Wang, Z., Fast, W., and Benkovic, S. J. (1999) *Biochemistry* **38**, 10013-10023
2. McManus-Munoz, S., and Crowder, M. W. (1999) *Biochemistry* **38**, 1547-1553
3. Otwinowski, Z., and Minor, W. (1997) *Methods Enzymol.* **276**, 307-326
4. 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., and Abdel-Meguid, S. S. (2000) *Biochemistry* **39**, 4288-4298
5. Navaza, J. (1994) *Acta Crystallogr.* **A50**, 157-163
6. 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
7. Jones, T. A., Zou, J.-Y., Cowan, S. W., and Kjeldgaard, M. (1991) *Acta Crystallogr.* **A47**, 110-119
8. Kleywegt, G. J., and Jones, T. A. (1998) *Acta Crystallogr.* **D54**, 1119-1131
9. Suarez, D., Brothers, E. N., and Merz, K. M., Jr. (2002) *Biochemistry* **41**, 6615-6630
10. Oelschlaeger, P., Schmid, R. D., and Pleiss, J. (2003) *Protein Eng.* **16**, 341-350

(a) WT



(b) D120(81)A



(c) D120(81)E

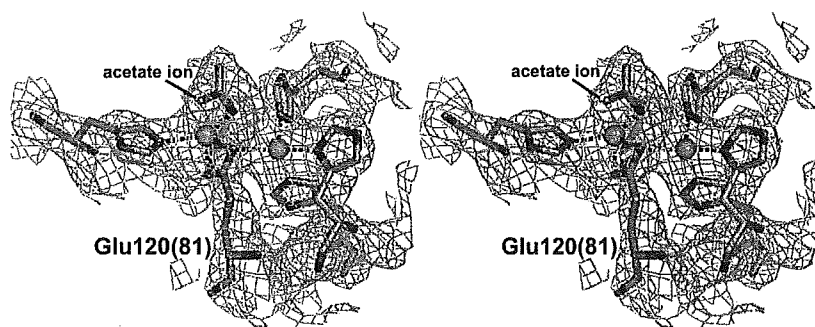


Fig. 1. Comparison of the active sites of WT (A) and the IMP-1 mutants D120(81)A (B) and D120(81)E (C). The calculated stereoscopic $2|F_o| - |F_c|$ maps (*magenta*) are represented at 1.5 and 1.0 δ levels for (B) and (C), respectively. Zn(II) ions and a water molecule are represented by *green* and *red spheres*, respectively. Amino acid residues are displayed as *sticks* (carbon, oxygen, nitrogen, and sulfur atoms colored in *gray*, *red*, *blue* and *yellow*, respectively). In WT, a bridging OH_2 or OH^- is not observed.

Table 1. X-ray data collection and structure refinement.

	D120(81)A	D120(81)E
A. Data collection statistics		
Unit cell parameter		
<i>a</i> (Å)	49.7	49.2
<i>b</i> (Å)	73.0	73.1
<i>c</i> (Å)	82.5	80.9
α (deg)	85.4	84.8
β (deg)	75.5	76.1
γ (deg)	73.6	74.0
Space group	<i>P</i> 1	<i>P</i> 1
Molecules / asymmetric unit	4	4
Resolution (Å) (outer shell)	50.0-2.01 (2.08-2.01)	99.0-2.97 (3.08-2.97)
No. observed reflections	226690	32258
No. unique reflections	67829	19685
Overall completeness (%) (outer shell)	94.5 (67.4)	85.7 (62.3)
R_{sym} (%) (outer shell)	6.0 (18.1)	5.8 (11.9)
B. Refinement statistics		
R_{working} (%)	21.2	22.4
R_{free} (%)	21.8	29.5
rms deviation from ideal		
Bonds (Å)	0.023	0.008
Angles (deg.)	2.00	1.60

$$R_{\text{sym}} = \frac{\sum |I - \langle I \rangle|}{\sum I}$$

$R_{\text{working}} = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$, where F_o and F_c are the observed and calculated structure factors, respectively. The R_{free} was determined from 5 % of the data.

Table 2. Comparison of Zn(II)-ligand distances for WT and the IMP-1 mutants, D120(81)A and D120(81)E.

	WT	D120(81)A	D120(81)E
	Distance (Å)		
Zn1–His116(77)	2.3	2.3 ± 0.041	2.2 ± 0.17
Zn1–His118(79)	2.3	2.0 ± 0.051	2.0 ± 0.068
Zn1–His196(139)	2.1	2.0 ± 0.046	2.1 ± 0.15
Zn1–ACY_OXT	2.9	2.1 ± 0.12	2.9 ± 0.081
Zn1–ACY_O		2.4 ± 0.27	
Zn1–Asp120(81)Oδ1 (Glu120(81)Oε1)	4.2		2.5 ± 0.58
Zn2–Asp120(81)Oδ2 (Glu120(81)Oε2)	2.5		2.0 ± 0.18
Zn2–Cys221(158)	2.4		2.3 ± 0.18
Zn2–His263(197)	2.3		2.1 ± 0.16
Zn2–ACY_OXT	2.8		2.5 ± 0.35
Zn2–Asp120(81)Oδ1 (Glu120(81)Oε1)	3.2		2.5 ± 0.30
Zn1–Zn2	3.3		3.6 ± 0.081

The deviations in the distance arise from the average Zn(II)-ligand distance of molecules A, B, C, and D in the structures of the IMP-1 mutants.

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
**3-(3-Mercaptopropionylsulfanyl)propionic acid pentafluorophenyl ester による
metallo- β -lactamase (IMP-1)の非可逆的阻害**

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

本研究では、MBL である IMP-1 に対して非可逆的に阻害する阻害剤を開発するために、Zn(II) イオンに配位するチオール基と活性中心近傍に位置している Lys224 残基による求核攻撃を受けるための活性エステルを有した新規阻害剤 (Pentafluorophenyl 3-mercaptopropionate (PFMP, 1)および 3-(3-Mercaptopropionylsulfanyl) propionic acid pentafluorophenyl ester (MPAP, 2))を設計、合成した。

阻害剤の IMP-1 に対する阻害能の評価を速度論的研究、MALDI-TOF MS、X 線結晶構造解析によって行なった。PFMP と MPAP は、ゲルろ過法および透析法により、IMP-1 と非可逆的に結合していることがわかり、MALDI-TOF MS の実験から PFMP と MPAP から pentafluorophenol 基が脱離した化合物が IMP-1 と共有結合していることがわかった。MPAP で処理された IMP-1 複合体の X 線結晶構造解析から、MPAP から pentafluorophenol 基が脱離した 2-P のチオール基は、IMP-1 の 2つの Zn(II)イオンに架橋して配位し、Lys224(161)とアミド結合により共有結合していた。

以上のことから、新たに設計、合成した PFMP と MPAP は、提案どおりに IMP-1 を非可逆的に阻害することがわかった。この阻害剤はさらに IMP-1 と適合するように分子設計をする必要があるが、Zn 含有酵素の強力な阻害剤として効率的な阻害機構を開発したと考えられる。

1. 研究目的

メタロ- β -ラクタマーゼ(MBL)阻害剤の開発は、現在使用している β -ラクタム剤だけでなく β -lactamase の出現で使用されなくなった安価な β -ラクタム剤も臨床の場に復活させることができるため、医療経済の高騰を抑制できる効果がある。そのため世界中で MBL 阻害剤の開発が行なわれているが、MBL の基質認識機構が詳細に解明されていないことなどから、Phase I に移った MBL 阻害剤は未だない。

Goto らは 1997 年に簡単なチオール化合物が MBL である IMP-1 を阻害することを報告し

(11)、Jin ら(12)はチオール基を有する MBL 阻害剤を設計・合成し、IMP-1 に対し阻害活性があることを報告した。この阻害効果は Concha らが 2000 年に報告した IMP-1 とメルカプト酢酸化合物複合体の X 線結晶構造解析の結果から、チオール基は IMP-1 の 2つの Zn(II)イオンに架橋して配位していることがわかった(4)。しかしこれまでに MBL 阻害剤が数多く報告されているが、いずれも可逆的な阻害であった(13,14)。

そこで本研究では非可逆的阻害剤の開発を行なった。非可逆的阻害剤の合成戦略を Fig. 1

に示す。Fig. 1 に示すように、1) チオール基を IMP-1 の 2 つの Zn(II)イオンへの架橋配位子として用いる、2) ほとんどすべての MBL に保存されている活性中心近傍の Lys224 残基により求核攻撃を受け、共有結合を形成させるための良い脱離基を有した活性エステルを導入する。その結果チオールの Zn(II)イオンへの配位と酵素中のアミノ酸残基との共有結合生成による 2 箇所の相互作用で IMP-1 の非可逆的阻害が達成されると考えた。

そこで 2 つの新規阻害剤 Pentafluorophenyl 3-mercaptopropionate (PFMP, **1**) と 3-(3-Mercaptopropionylsulfanyl) propionic acid pentafluorophenyl ester (MPAP, **2**)を設計、合成し (Fig.2)、それらの阻害様式を調べるために

- 1) 新規阻害剤による IMP-1 阻害の時間依存性
- 2) 新規阻害剤の非可逆的阻害の検討
- 3) 新規阻害剤と IMP-1 複合体の X 線結晶構造解析

を行なうことを目的した。

2. 実験

2.1. 新規阻害剤(PFMP、MPAP)の合成

Pentafluorophenyl 3-mercaptopropionate (PFMP)

3-MPA 1.55 g (14.6 mmol)、pentafluorophenol 2.80 g (14.6 mmol)、HOBt 2.23 g (14.6 mmol)を Ar 下で酢酸エチル約 200 mL に溶かし、氷冷下で攪拌しながら DCC 3.01 g (14.6 mmol)を少量ずつ加えた。初め氷冷下 1 時間攪拌し、さらに室温で 1 晩攪拌させた。得られた反応液をろ過し、ろ液を濃縮した後、シリカゲルカラムクロマトグラム (ϕ 40 mm \times 500 mm、溶出液 ; トルエン : ヘキサン = 1:8)により分離し、目的とする分画を濃縮し、シリカゲルカラムクロマトグラム (ϕ 40 mm \times 500 mm、溶出液 ; トルエン : ヘキサン = 1:1)により分離、精製を行った。収量 590 mg (14.9 %). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS)

δ : 1.77 (t,1H), 2.91 (q,2H), 3.03 (t,2H). EI-MS m/z : $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COOC}_6\text{F}_5^+$ requires 272.19; found 272.

3-(3-Mercaptopropionylsulfanyl) propionic acid pentafluorophenyl ester (MPAP)

PFMP 5 g(18.4 mmol)、MPA 2.9 g (21.7 mmol)を Ar 下で 400 mL の酢酸エチルに溶かし、氷冷下で攪拌しながら約 100 mL の酢酸エチルに溶かした DCC 5.5 g (21.7 mmol)を少量ずつ加えた。初め氷冷下 1 時間攪拌し、さらに室温で 12 時間攪拌した。反応混合物をろ過し、ろ液を濃縮して、シリカゲルカラムクロマトグラフィー (ϕ 35 mm \times 150 mm、溶出液 ; トルエン : ヘキサン = 3:7) により分離・精製を行った。収量 3 g (50 %). $^1\text{H NMR}$ (CDCl_3 , TMS) δ : 1.59 (t,1H), 2.83 (q,2H), 2.93 (t,2H), 3.03 (t,2H), 3.27 (t,2H). EI-MS m/z : $\text{HSCH}_2\text{CH}_2\text{COSCH}_2\text{CH}_2\text{COOC}_6\text{F}_5^+$ requires 360.32; found 360.

2.2. 新規阻害剤 (PFMP、MPAP) による IMP-1 の阻害の時間依存性

10 nM の IMP-1 と所定の濃度の新規阻害剤 (PFMP: 1-10 μM , MPAP:0.07-0.75 μM)を含む Tris-HCl 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl) 30 mL を 15 $^\circ\text{C}$ でインキュベートした。所定の時間に 3 mL ずつ抜き取り、100 μM となるようにニトロセフィンを加えすばやく混合し、491 nm の吸光度変化($\Delta\epsilon_{491} = 20,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)を 30 $^\circ\text{C}$ で 5 分間経時的に測定し、分子活性 k_2 を求めた。それぞれの濃度の阻害剤に対し、時間が 0 のときの活性を 1 とした残存活性の自然対数を時間に対してプロットし、傾きから速度定数 k_{obs} を求めた。また k_{obs} の逆数は阻害剤濃度の逆数に対してプロットし、Kitz and Wilson の方法(Eq. 1)に従って阻害定数 K_i と活性消失速度定数 k_{inact} を求めた(15)。

$$\frac{1}{k_{\text{obs}}} = \frac{1}{k_{\text{inact}}} \times \frac{1}{[\text{inhibitor}]} + \frac{1}{k_{\text{inact}}} \quad \text{Eq. 1}$$

2.3. ゲルろ過による新規阻害剤の IMP-1 に対する非可逆阻害性の検討

全量 500 μL 中、10 μM の IMP-1、100 μM の種々の阻害剤濃度となるように、50 μM の IMP-1 を含む Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl) 100 μL を Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl) 300 μL に加え、メタノールで調製した 500 μM 阻害剤溶液 100 μL を加えて静かに混和した。水中で所定の時間インキュベートした後、遊離の阻害剤と IMP-1 を分離するためにゲルろ過を行った(Sephadex G25、 ϕ 8 mm \times 200 mm)。溶出液は 1 μM $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$ を含む Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl)で行った。溶出液を 10 滴ずつ分取し、それぞれの分画の 280 nm の吸光度を測定し、 $\epsilon_{280}=49,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ から IMP-1 濃度を求め、IMP-1 を最も多く含む分画について活性測定を行った。活性測定は測定する分画を Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl)で 310 nM となるように希釈し、この希釈液 10 μL を Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl) 3.0 mL に加え、測定セル内を 3.01 mL とし、30 $^{\circ}\text{C}$ で 10 分間インキュベートした後、3.1 mM ニトロセフィン を 100 μL 加え、すばやく混ぜ 491 nm の吸光度変化を 3 分間経時的に測定した。

インキュベート時間 t における k_2 を $k_{2,t}$ とし、コントロールの k_2 の平均を $k_{2,0}$ として比 $k_{2,t}/k_{2,0}$ を取り、インキュベート時間に対してプロットした。また、阻害剤を含まないコントロールとしてメタノールを用い、可逆阻害を示す事が分かっている 3-メルカプトプロピオン酸(3-MPA)も同様の操作によりゲルろ過を行った。それぞれの測定は 3 回行った。

2.4. 透析による新規阻害剤の IMP-1 に対する非可逆阻害性の検討

50 μM の IMP-1 は 250 μM の新規阻害剤と共に 2.0 mL の Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl)中 0 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートされた。コントロール実験として新規阻害剤の代わりにメタノールを加えた。混合液は 4 $^{\circ}\text{C}$ の Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl)中で透析された。4 時間毎に Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl)は交換され、16 時間透析した。回収された酵素溶液の k_2 を実験 3 の手法で求めたが、新規阻害剤と共に透析した場合、活性の回復は見られなかったが、コントロールでは 95%以上の活性の回復が見られた。

2.5. 新規阻害剤処理 IMP-1 のレーザーイオン化質量分析装置 (MALDI-TOF MS) による分子量測定

全量 500 μL 中、10 μM の IMP-1、100 μM の阻害剤濃度となるように、50 μM の IMP-1 を含む Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl) 100 μL を Tris 緩衝液(50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl) 300 μL に加え、メタノールで調製した 500 μM の阻害剤溶液 100 μL を加えて静かに混和した。水中で 10 分インキュベートした後、遊離の阻害剤と IMP-1 を分離するために実験 3 と同様の操作によりゲルろ過及び活性測定を行い、活性がないことを確認した。測定用サンプルを以下のように ZipTip_{C18} (Millipore)による脱塩処理を行い MALDI-TOF MS 測定を行った。

- 1) ZipTip をピペットマン(P-20)に装着し、0.1% TFA/50%アセトニトリル溶液で 50 回ピペッティングし、tip の洗浄を行った。
- 2) ZipTip を 0.1% TFA/10%溶液で 50 回ピペッティングし、tip の洗浄、ならびに平衡化を行った。
- 3) ZipTip をタンパク質溶液で 100 回ピペッティングし、tip にタンパク質を吸着させた。
- 4) ZipTip を 0.1% TFA 溶液で 100 回ピペッティングし、tip の脱塩を行った。

5) ZipTip を 10 μ L 0.1 % TFA/95 % アセトニトリル溶液で 50 回ピペッティングし、タンパク質を溶出させた。

2.6. MPAP で処理した IMP-1 の X 線結晶構造解析

実験 2.3. で得られた MPAP で処理した IMP-1 溶液を限外ろ過 (centricon YM-10) を用いて濃縮し Hepes-NaOH 緩衝液 (20 mM, pH 7.5) に変換した後、5 mg/mL まで濃縮した。その後 0.45 μ m のフィルターでろ過し、結晶化用のタンパク溶液とした。リザーバ溶液は 6 g の 50 % Polyethylene Glycol Monomethyl Ether 2000 と 2 M 硫酸アンモニウム、1 M 酢酸ナトリウム (pH 4.6) 溶液を 1 mL 加え、MilliQ で 10 mL にメスアップした。この溶液を 0.45 μ m のフィルターでろ過した。結晶化は蒸気拡散法 (Hanging drop) で行った。タンパク溶液 3 μ L とリザーバ溶液 3 μ L を混合し、6 μ L を 1 drop とした。リザーバ溶液は 500 μ L 用い、約 1 週間 20 $^{\circ}$ C で放置することにより、角柱状結晶を多数得ることができた。結晶は空間群が $P2_12_12_1$ の斜方晶系に属し、格子定数は $a = 49.987$ \AA 、 $b = 53.314$ \AA 、 $c = 196.344$ \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。

2-P-IMP-1 複合体の結晶は SPring-8 の BL41XU で R-AXIS V Imaging Plate を detector として測定した。測定条件は 1.00 \AA の波長で 100 K、露光時間 15 秒、振動角 0.5 $^{\circ}$ で 270 枚、結晶-detector 距離を 500 mm とすることで 2.63 \AA の分解能で X 線回折データを回収することができた。これらのデータは HKL2000 を使って、integrating、merging、scaling した(3)。

2-P-IMP-1 複合体の結晶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) を search model として使った(16)。プログラム AMoRe で分子置換(5)を行い、プログラム CNS で精密化(17)した。グラフィックソフト O

でモデル構築と修正(7)を行った。修飾された Lys 残基の topology ファイルと parameter ファイルは HIC-UP (<http://x-ray.bmc.uu.se/hicup/>) を利用した(18)。2-P-IMP-1 複合体の構造は、1VGN として Protein Data Bank に登録した。

3. 結果

3.1. 新規阻害剤の IMP-1 に対する阻害能

3-メルカプトプロピオン酸(3-MPA)の阻害定数 K_i は可逆的な阻害として 1.2 μ M であり(11)、3-MPA から誘導・合成した非可逆的阻害剤はそれよりも強い阻害を示す事が期待された。

そこで新規阻害剤の IMP-1 に対する阻害能を検討するために、新規阻害剤の IMP-1 阻害 (PFMP では 1-10 μ M、MPAP では 0.07-0.75 μ M) に対する時間依存性と濃度依存性を調べた。10 nM の IMP-1 を、所定の濃度の阻害剤を含む Tris 緩衝液 (50 mM, pH 7.4, 0.5 M NaCl)、15 $^{\circ}$ C でインキュベートした後、所定の時間毎に混合液を抜き取り、ニトロセフィンの加水分解活性 k_2 を求めた。インキュベート時間 t における $k_{2,t}$ の $k_{2,0}$ (コントロールの平均) に対する残存活性 ($k_{2,t}/k_{2,0}$) の自然対数のプロットは、直線になったことから、見かけの不活化の速度定数は疑 1 次反応に従っていることがわかった (Fig. 3A, B)。得られた直線の傾き (k_{obs}) の逆数は阻害剤濃度の逆数に対して Kitz and Wilson プロット (15)⁶ したところ正の y 切片をもった直線を得ることができた (Fig. 3C, D)。IMP-1 に対する PFMP と MPAP の活性消失速度定数 k_{inact} と阻害定数 K_i は Kitz and Wilson プロットから求められ、それぞれの値は PFMP では 0.076 ± 0.002 s^{-1} と 3.452 ± 0.030 μ M、MPAP では 0.080 ± 0.002 s^{-1} と 0.423 ± 0.013 μ M であった。これらの結果から、MPAP の 2 次速度定数 k_{inact}/K_i は PFMP の 9 倍であった。

3.2. ゲルろ過法による非可逆阻害性の検討

合成した阻害剤は、IMP-1 を阻害することが分かった。次にこれらの阻害剤が非可逆的に