

IMP-1 を阻害するかどうかをゲルろ過法により検討した。

100 μM の阻害剤共存下、水中で一定時間 10 μM の IMP-1 をインキュベートした後、Sephadex G-25 カラム (ϕ 8 mm \times 200 mm) によるゲルろ過を行い、遊離の阻害剤を IMP-1 から分離した。得られた IMP-1 分画についてニトロセフィンを経験として活性測定を行った。コントロールとして阻害剤溶液の代わりにメタノールを用いた。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) に対する相対値 ($k_{2,t}/k_{2,0}$) を、インキュベート時間に対してプロットした。得られたプロットを Fig. 4 に示す。

コントロールでは、ゲルろ過後の IMP-1 の加水分解活性は、ゲルろ過前における加水分解活性の値と同値を示した。可逆的阻害剤である 3-MPA で処理した IMP-1 の活性は、インキュベート直後のゲルろ過後でもほぼ 100 % の回復が見られた。しかし合成した阻害剤は、インキュベート直後で既に、IMP-1 の加水分解活性をほぼ 100% 非可逆的に阻害した。また、ゲルろ過により得られた PFMP 処理 IMP-1 を一晩、4 $^{\circ}\text{C}$ で保存した後、加水分解活性を測定した。3-MPA ではゲルろ過後、約 80% の IMP-1 の活性が回復した。一方、PFMP および MPAP ではインキュベート直後においても Fig. 20 に示すように PFMP ではほぼ 90%、MPAP ではほぼ 100% 活性の回復は見られなかった。さらに、12 時間においても活性の回復は観察されなかった。

3.3. 透析法による非可逆阻害性の検討

透析法を使って新規阻害剤の非可逆阻害性についても検討した。250 μM の新規阻害剤と 50 μM の IMP-1 を Tris 緩衝液 (50 mM, pH 7.4) 中、0 $^{\circ}\text{C}$ で 30 分間インキュベートし、4 $^{\circ}\text{C}$ で 16 時間透析をした。4 時間ごとに緩衝液交換を行った。コントロールは阻害剤の代わりにメタ

ノールを加え同条件下で行った。

コントロールの IMP-1 の残存活性は 95% 以上あったが、阻害剤で処理された IMP-1 の残存活性は回復しなかった。この結果は先のゲルろ過法のそれらと一致した。

3.4. 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

合成した阻害剤は、いずれも IMP-1 を強く、かつ非可逆的に阻害した。阻害様式を詳しく検討するため、MALDI-TOF MS 測定を行った。MALDI-TOF MS では、IMP-1 と阻害剤が共有結合すると、それに対応した分子量の和が得られる。10 μM の IMP-1 と 100 μM の阻害剤を水中で 30 分間インキュベートした IMP-1-阻害剤混合溶液をゲルろ過し、遊離の阻害剤を除去し、活性の減少を確認して MALDI-TOF MS 測定を行った。また、コントロールにはメタノール溶液を用いて 10 分間インキュベートしたものを同様の操作により MALDI-TOF MS 測定を行った。それぞれ得られた MS スペクトルをそれぞれ Fig. 5 に示す。

IMP-1 のみでは、 $m/z = 25113.2$ に 1 つのピークが見られた。このピークは、IMP-1 のアミノ酸配列から計算される分子量 25112.3 に一致した。PFMP、MPAP で処理した IMP-1 では $m/z = 25201.5$ と 25290.1 にそれぞれ大きなピークが見られた (Fig. 5)。この値は、IMP-1 に 3-メルカプトプロピオニル基 ($\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-} = \text{1-P}$ と表す, MW = 88.13) と 3-(3-メルカプトプロピオニルスルファニル)プロピオニル基 ($\text{S-CH}_2\text{-CH}_2\text{-S-CO-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CO-} = \text{2-P}$ と表す, MW = 176.9) が IMP-1 の分子量の $m/z = 25113.2$ に結合することにより計算される分子量と一致した。これらから IMP-1 と 2 つの新規阻害剤は 1 対 1 で共有結合を介して IMP-1 と結合していることがわかった。

3.5. MPAP-IMP-1 複合体の X 線結晶構造解析

これまでの結果より、考案した非可逆的阻害剤は IMP-1 に対し強い阻害を示し、1 対 1 で反応して非可逆的に阻害していることがわかった。この非可逆的阻害剤の共有結合部位のアミノ酸残基の特定および阻害機構をより詳しく解明するために、阻害剤(MPAP)で処理した IMP-1 の結晶を調製し、X 線結晶構造解析を行った。

MPAP で処理した IMP-1(2-P-IMP-1)複合体の結晶構造は、分解能が 2.6 Å、空間群 $P2_12_12_1$ で結晶格子に 2 個の独立した構造(molecules A and B)が存在していた。構造の精密化により得られたデータを Table 1 でまとめた。2-P-IMP-1 複合体の構造は、それぞれ R_{working} 22.8%、 R_{free} 24.3%で精密化できた。

2-P-P-IMP-1 複合体の全体構造と活性中心は Fig. 22 で示した。IMP-1 複合体の 3 次元構造は、native の IMP-1 と同様に $\alpha\beta/\beta\alpha$ のサンドイッチ構造をとり、阻害剤が結合したことによる 3 次元構造の崩壊は見られなかった(Fig. 6A)。Molecules A と B の C- α の重ね合わせから、r.m.s.d.が 0.31 Å であった。2-P-IMP-1 複合体の活性中心および Phe58(22)から Val67(31)のアミノ酸残基から構成されるフラップと呼ばれる部位の Trp64(28)が阻害剤に覆い被さるようにフラップ全体が移動していた(Fig. 6A)。

Zn(II)イオンとリガンドの距離と結合角を Table 2 と Table 3 に示す。MPAP から pentafluorophenol 基が脱離した化合物(2-P)のチオール基は、活性中心に存在する 2 つの Zn(II)イオンに架橋して配位していた。また Zn2 の配位環境は、CcrA で報告されるような歪んだ三角両錐型でなく、歪んだ四面体構造であった。阻害剤は 224(161)位に存在する Lys の側鎖のアミノ基(N ζ)とアミド結合していた。また、阻害剤と Lys224 のアミド結合のカルボニル酸素原子が Asn233(167)の主鎖の窒素原子と、チオエステル部位のカルボニル酸素が

Asn233(167)の側鎖の窒素原子と水素結合していた(Fig. 6B)。

これらの結果より、考案した非可逆的阻害機構に基づいて合成した阻害剤は、その構想通りの非可逆的阻害をしていることがわかった。つまり、チオール基が活性中心に存在する Zn(II)イオンに配位し、活性中心近傍に存在する Lys 残基の側鎖の N ζ アミノ基とアミド結合によって共有結合するために、活性中心にその阻害剤が保持され、IMP-1 を非可逆的に阻害していることが明らかとなった。

4. 考察

今回合成した阻害剤は、3-MPA に電子吸引性の脱離基を導入することで、IMP-1 に対して非可逆的に阻害することを期待した。IMP-1 に対する新規阻害剤の阻害の時間依存性および濃度依存性の研究から、IMP-1 に対する阻害能は PFMP より MPAP の方が強いことがわかった。従って、IMP-1 に対する阻害には、脱離基の電子吸引性と共に阻害剤のメルカプト基から脱離基までの距離が阻害に影響していると考えられる。

次に新規阻害剤の非可逆性を検討するために、IMP-1 と 10 倍量の新規阻害剤をインキュベートし、ゲルろ過法で遊離の阻害剤を排除した。その結果、IMP-1 の活性はインキュベート直後で既に消失し、少なくとも 2 時間は回復しなかった。透析法で遊離の阻害剤を排除した場合も同様の結果を得ることができた。これらのことから新規阻害剤は IMP-1 に非可逆的に結合していることがわかった。

PFMP、MPAP 処理した IMP-1 を MALDI-TOF MS で分子量を測定した。すると、IMP-1 : 阻害剤 = 1 : 1 で反応している分子量増加が得られた。この増加した分子量を計算すると、PFMP では 3-メルカプトプロピオニル基(1-P, MW 88.13)が、MPAP では 3-(3-メルカプトプロピオニルスルファニル)プロピオニル基(2-P, MW

176.9)が結合していた。従って、この結果より阻害剤は、良い脱離基である pentafluorophenol 基が脱離して求核性アミノ酸残基の求核攻撃による共有結合生成によって、IMP-1 を非可逆的に結合していると考えられる。

MPAP で処理した IMP-1 複合体(2-P-IMP-1)の X 線結晶構造解析を行った。PFMP で処理した IMP-1 の結晶も得ることができたが、構造解析ができる程の X 線回折データを得ることができなかった。

2-P-IMP-1 複合体の構造解析の結果、全体的な 3 次元構造の崩壊は見られなかったが、活性中心、およびフラップと呼ばれる基質認識に重要と考えられている部位に変化が見られた。IMP-1 と 2-P-IMP-1 複合体の活性中心は、Zn(II)イオン周りの結合角から、2 つの Zn(II)イオンの配位環境は Zn1、Zn2 共に 4 配位の四面体型であると考えられた。Native IMP-1 では、Zn2 サイトの Zn(II)イオンは Asp120(81)と水分子を軸とした 5 配位の三角両錐型と提案されている⁴²。これは、WT では求核試薬として働くと考えられている Zn1-OH₂-Zn2 または Zn1-OH-Zn2 が 2 つの Zn(II)イオンに架橋して配位しているが、2-P-IMP-1 複合体の活性中心では、チオール基が OH₂ または OH に置換されて配位したことで、Zn2 サイトが 4 配位になったと考えられる。またこれは IMP-1 のβ-ラクタム環加水分解活性を消失させた原因であると考えられた。

Phe58(22)から Val67(31)のアミノ酸残基で構成されるフラップと呼ばれる部位は Gly63(27)-Trp64(28)-Gly65(29)のアミノ酸配列をもつ可動性な Trp64(28)を頂点にもつ。基質または阻害剤が活性中心に入り込むとそれらを包み込むように移動し、基質と疎水性相互作用をすることで基質認識に関わっていると考えられている(14,16)。2-P-IMP-1 複合体でも、Trp64(28)の移動が見られ、阻害剤と相互作用し

ていた。Trp64(28)のインドール環と 1 番近い距離にある阻害剤のメチレン鎖との距離は約 4 Å であった。また、IMP-1 には基質を受け入れるための空間が 2 つの Zn(II)イオンの上部に存在する。しかし、2-P-IMP-1 複合体ではその空間が共有結合によって固定された阻害剤で埋められている。よって、基質が活性中心に到達できなくなっていることも加水分解活性消失の 1 つの大きな要因である。

阻害剤が結合している 224 位の Lys は、MBL によく保存されているアミノ酸残基であり、活性中心である 2 つの Zn(II)イオンからおおよそ 6 Å の位置に Lys224 残基の側鎖が存在し、そこから活性中心の方向に側鎖が伸びている。従って、活性中心から比較的近い位置にアミノ基が存在しているため、IMP-1 と基質との親和性を高めていると考えられている。2000 年に Concha 等が報告したメルカプト酢酸の阻害剤や、2001 年に Toney らが報告したコハク酸誘導体の阻害剤との IMP-1 複合体の X 線結晶構造解析において、224 位の Lys はそれらの阻害剤に存在するカルボキレートと静電的な相互作用している(14,16)。今回行った 2-P-IMP-1 複合体の X 線結晶構造解析により阻害剤が Lys224 残基に結合していることから、反応機構から考えると 224(161)位の Lys の側鎖は -NH₂ として MPAP と反応したと考えられた。

また、PFMP と IMP-1 との阻害様式は、ゲルろ過、透析、MALDI-TOF MS による実験から IMP-1 : PFMP = 1 : 1 で非可逆的に IMP-1 を阻害していることがわかった。残念ながら X 線結晶構造解析はできなかったが、PFMP は化合物の長さを考慮すると、Lys224(161)ではなく、Zn2 に配位している Cys221(137)と共有結合を形成していると推定できる。

5. 結論

IMP-1 に対して強力な阻害剤を開発するため、非可逆的阻害剤(PFMP および MPAP)を分

子設計した。新規阻害剤は、Zn(II)イオンに配位するためのチオール基と、IMP-1の活性中心に存在するCysやLysから求核攻撃を受け、共有結合させるための良い脱離基としての活性エステルを分子内に含んでいる。合成したPFMPとMPAPは、ゲルろ過法および透析法からIMP-1を非可逆的に阻害することがわかった。またMALDI-TOF MSからPFMPおよびMPAPで処理したIMP-1の分子量は、PFMPおよびMPAPから良い脱離基として導入したpentafluorophenol基(P)が脱離した化合物の分子量とIMP-1の分子量の和であることがわかった。さらにMPAPで処理したIMP-1のX線結晶構造解析から、MPAPからpentafluorophenol基(P)が脱離した化合物(MPAP-P)のチオール基は2つのZn(II)イオンに架橋して配位しており、MPAP-PはLys224(161)とアミド結合を介してIMP-1に共有結合していることがわかった。

6. 研究発表論文

1. Kurosaki, H., Yamaguchi, Y., Higashi, T., Soga, K., Matsueda, S., Yumoto, H., Misumi, S., Yamagata, Y., Arakawa, Y., and Goto, M. (2005) *Angew. Chem., Int. Ed. Engl.* **44**, 3861-3864

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
11. Goto, M., Takahashi, T., Yamashita, F., Koreeda, A., Mori, H., Ohta, M., and Arakawa, Y. (1997) *Biol. Pharm. Bull.* **20**, 1136-1140
12. 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**, 851-856
13. Quiroga, M. I., Franceschini, N., Rossolini, G. M., Gutkind, G., Bonfiglio, G., Franchino, L., and Amicosante, G. (2000) *Chemotherapy* **46**, 177-183
14. 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**, 31913-31918
15. Kitz, R., and Wilson, I. B. (1962) *J. Biol. Chem.* **237**, 3245-3249
16. 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
17. 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., Sect. D: Biol. Crystallogr.* **54**, 905-921
18. Kleywegt, G. J., and Jones, T. A. (1998) *Acta Crystallogr. Sect. D: Biol. Crystallogr.* **54**, 1119-1131

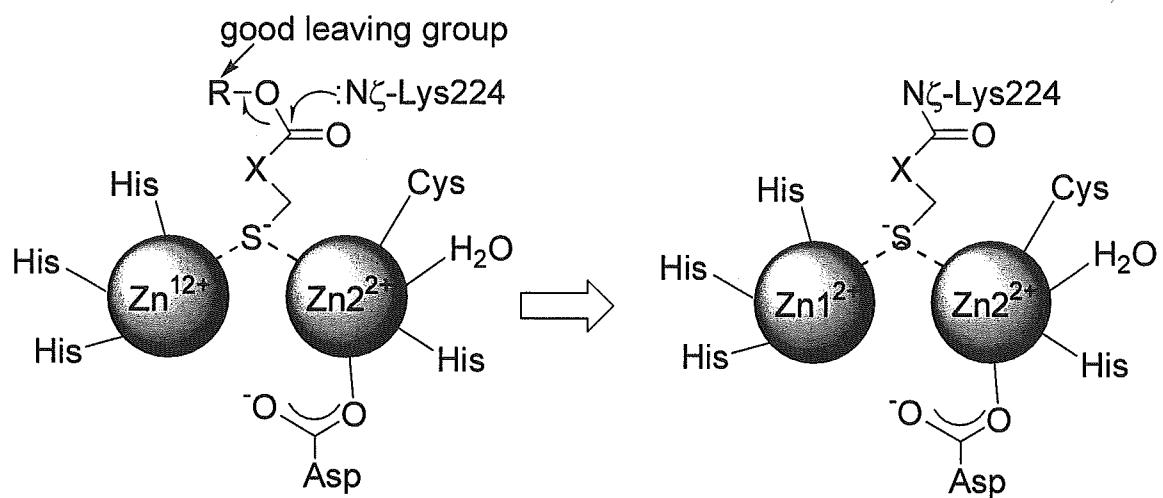


Fig. 1. Strategy for the irreversible inhibition of thiol compounds with a good leaving group.

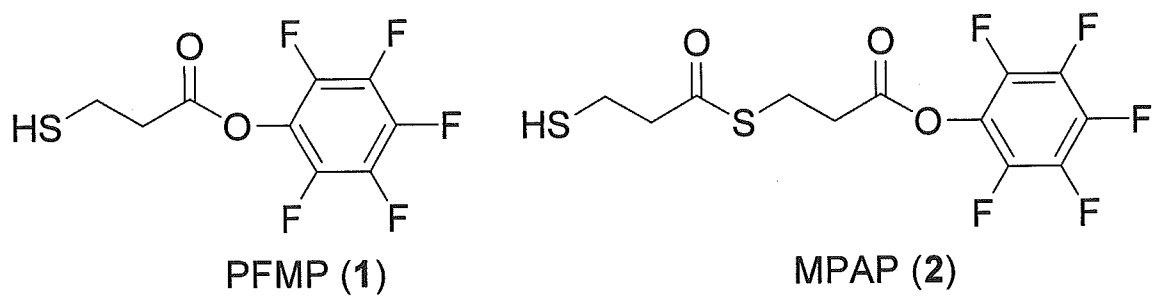


Fig. 2. Chemical structures of inhibitors used in this study.

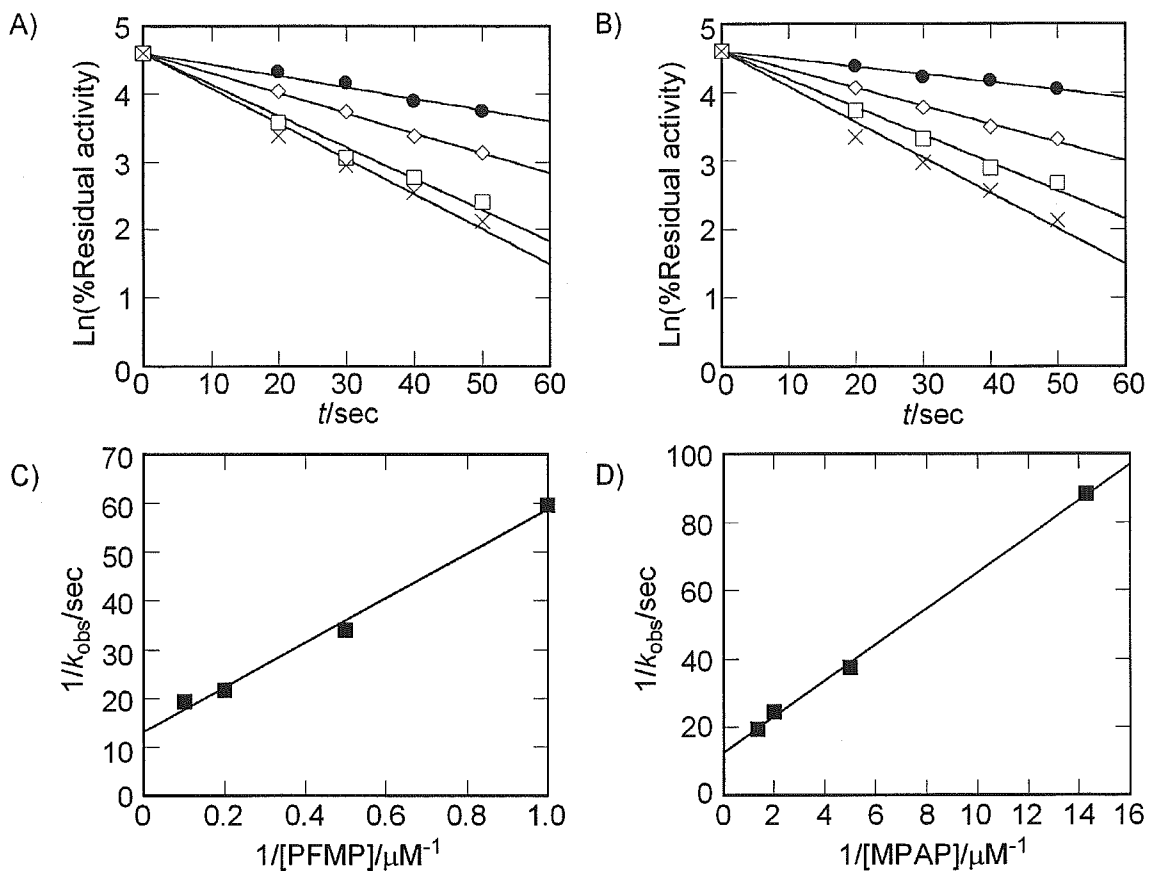


Fig. 3. Time- and concentration-dependent inactivation of IMP-1 by PFMP (A) and MPAP (B), in 50 mM Tris-HCl-0.5 M NaCl buffer (pH 7.4) at 15 °C. Inhibition concentrations: (●) 1 μM ; (◇) 2 μM ; (□) 5 μM ; (×) 10 μM for PFMP and (●) 0.07 μM ; (◇) 0.2 μM ; (□) 0.5 μM ; (×) 0.75 μM for MPAP. Each point shown represents the mean of three experiments. Double reciprocal plots of k_{obs} versus concentration of PFMP (C) and MPAP (D).

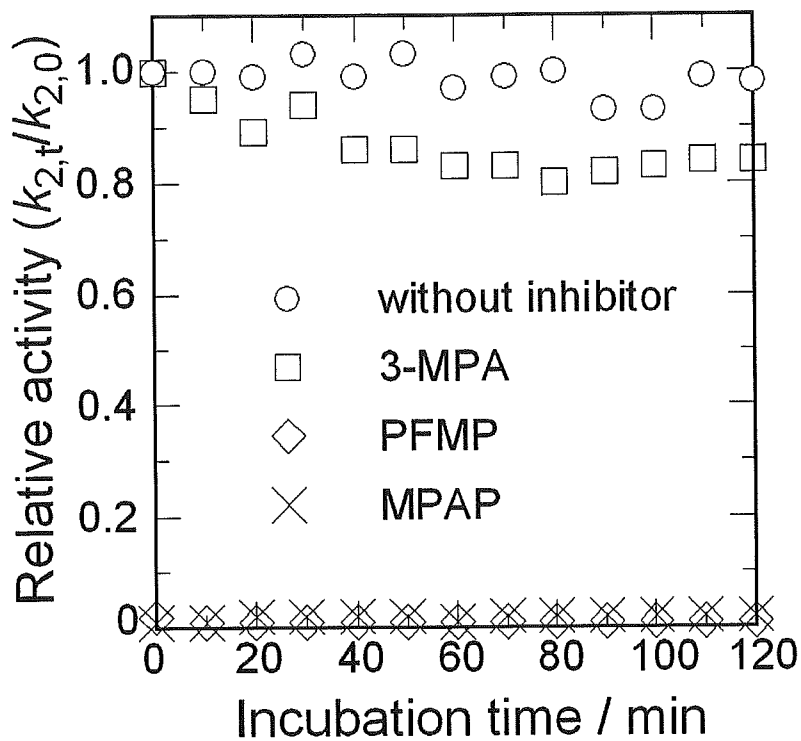


Fig. 4. Plots of the relative activity of IMP-1 recovered by gel filtration against incubation time treated with or without PFMP and MPAP at 0 °C. ○, without inhibitor; □, 3-MPA; ◇, PFMP, ×, MPAP. Activity was measured by the hydrolysis of nitrocefin at pH 7.4 and 30 °C. The experimental points represent the averages of three independent experiments.

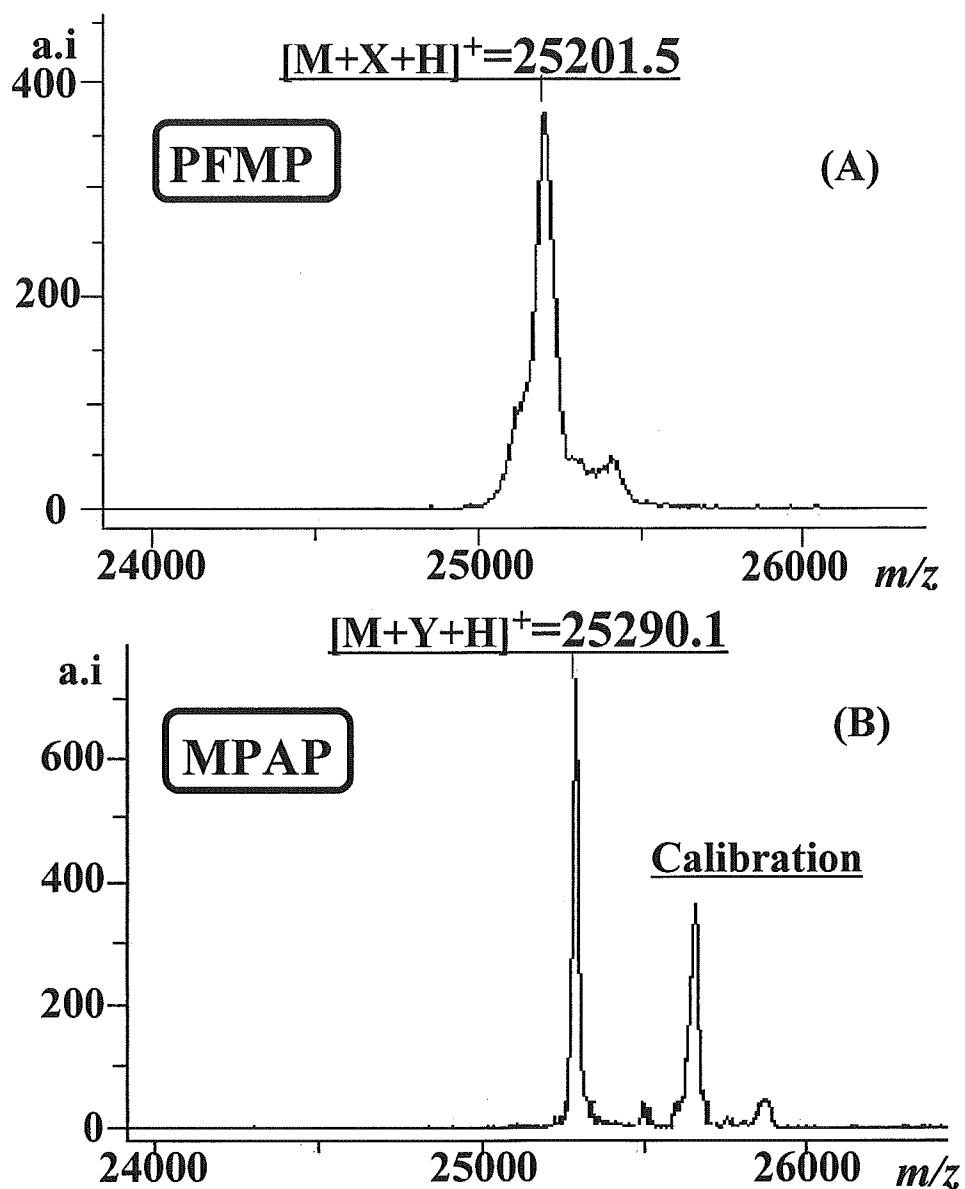


Fig. 5. MALDI-TOF MS spectrum of 10 μ M IMP-1 after treatment with 100 μ M PFMP (A) and MPAP (B) for 10 min at 30 $^{\circ}$ C, followed by gel filtration.

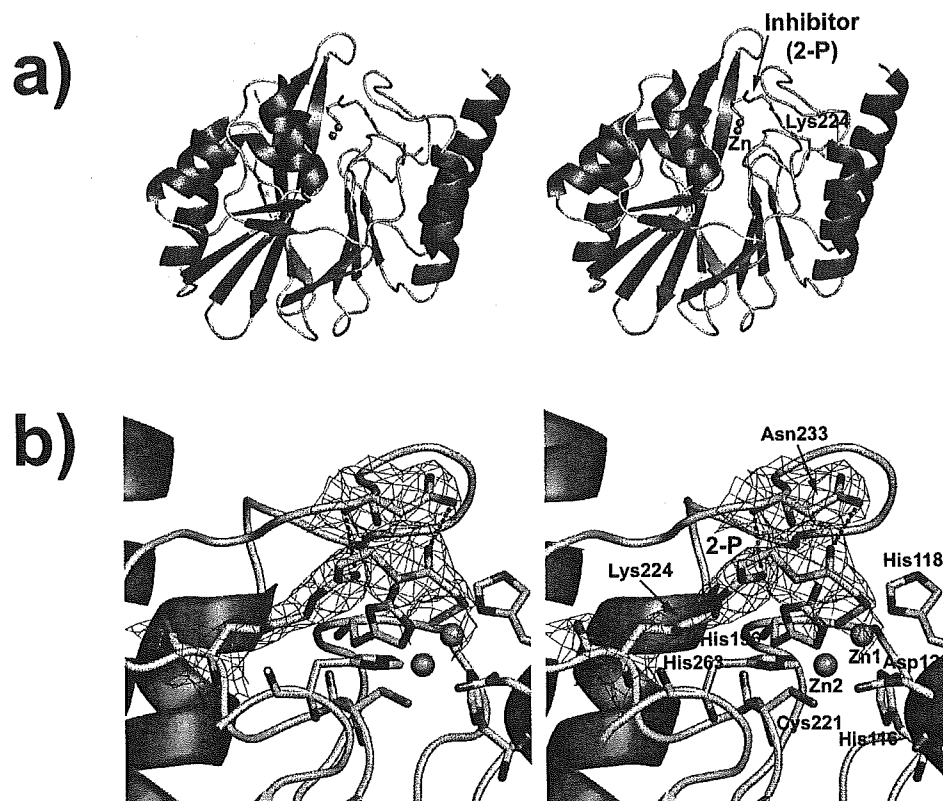


Fig. 6. A) The overall structure of IMP-1 in complex with 2-P. α -Helices, β -strands, and loops are in red, green, and yellow, respectively. Zn(II) ions are represented as orange spheres. Inhibitor and Lys224 are displayed as sticks (carbon, nitrogen, oxygen, and sulfur atoms colored in grey, blue, red, and green, respectively). B) The crystal structure of IMP-1 modified by 2-P. The electron density of Lys224 and its covalently attached inhibitor molecule is shown countoured at 3.0σ in a $2|F_o| - |F_c|$ map.

Table 1. Data collection and refinement statistics.

A. Data collection statistics	
Unit cell parameter	
<i>a</i> (Å)	50.0
<i>b</i> (Å)	53.3
<i>c</i> (Å)	196.3
Resolution (Å) (outer shell)	50.0-2.63 (2.72-2.63)
Space group	<i>P</i> 2 ₁ 2 ₁ 2 ₁
Molecules / asymmetric unit	2
No. observed reflections	79872
No. unique reflections	16158
Overall completeness (%) (outer shell)	98.5 (97.4)
<i>R</i> _{sym} (%) (outer shell)	6.2 (19.8)
<i>I</i> /σ(<i>I</i>) (outermost shell)	43.2 (13.1)
B. Refinement statistics	
<i>R</i> _{working} (%)	22.8
<i>R</i> _{free} (%)	24.3
rms deviation from ideal	
Bonds (Å)	0.004
Angles (deg.)	1.20

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

^b $R_{\text{working}} = \frac{\sum ||F_o| - |F_c||}{\sum |F_o|}$, where *F*_o and *F*_c are the observed and calculated structure factors, respectively.

^cThe *R*_{free} was determined from 5 % of the data.

Table 2 Distances (Å) for the active site of 2-P-IMP-1 (Molecules A and B)

Atom		Distance (A)	Distance (B)
Zn1 —	Zn2	3.6	3.7
	His116 Nε2	2.0	2.0
	His118 Nδ1	1.9	1.8
	His196 Nε2	2.1	2.0
	Inhibitor S	2.2	2.2
Zn2 —	Asp120 Oδ2	2.3	2.0
	Cys221 Sγ	2.3	2.2
	His263 Nε2	2.1	2.1
	Inhibitor S	2.3	2.5

Table 3 Angles (°) for the active site of 2-P-IMP-1 (Molecules A and B)

Ligand	Metal	Ligand	Angle (A)	Angle (B)
His116 Nε2 —	Zn1	— His118 Nδ1	90	105
	Zn1	— His196 Nε2	105	112
	Zn1	— Inhibitor S	136	126
His118 Nδ1 —	Zn1	— His196 Nε2	106	117
	Zn1	— Inhibitor S	119	105
His196 Nε2 —	Zn1	— Inhibitor S	100	93
Asp120 Oδ2 —	Zn2	— Cys221 Sγ	101	101
	Zn2	— His263 Nε2	99	104
	Zn2	— Inhibitor S	122	112
Cys221 Sγ —	Zn2	— His263 Nε2	109	116
	Zn2	— Inhibitor S	107	113
His263 Nε2 —	Zn2	— Inhibitor S	117	111

緑膿菌のマルチコンポーネント型 RND 型排出システムの機能解析

分担研究者: 後藤 直正; 研究協力者: 小川倫洋、奥野陽亮
 京都薬科大学・微生物学教室

緑膿菌の染色体上には、少なくとも 12 種類のマルチコンポーネント型多剤排出(Mex)システムがコードされている。これらの Mex システムのうち、幾つかが様々な抗菌薬、消毒薬や色素の排出に機能し、異物に対する自己防衛機構として働くことが明らかにされてきた。しかし、なぜ 12 種類もの自己防衛機構が必要なのか? という疑問に対する明確な答えはない。そこで、私たちは 12 種類の Mex システムの存在意義を明らかにするため、それぞれの発現量や抗菌薬耐性および病原性への関与について調べたところ、次の結果を得た。多くの Mex システムの欠損が抗菌薬感受性に影響を与えなかったのは、それらの発現量が低いことと主要な排出システム遺伝子群である *mexAB-oprM* が発現していることに起因していると考えられる。一方、発現量が低い Mex システムの欠損によって病原因子の産生低下や MDCK モノレイヤ透過度の減少が起こったことは、12 種類の Mex システムの多くが主として抗菌薬耐性に働くのではなく、細胞内で合成した病原性発現を誘導する化合物を細胞外へ排出することで緑膿菌の病原性発揮に機能することが本来の生理的機能であることを示唆している。

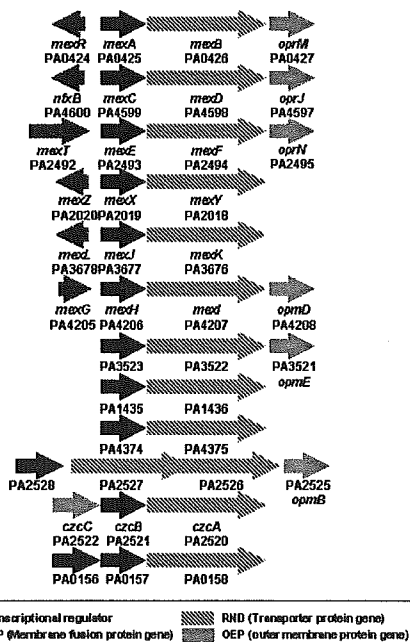


図2 PA01ゲノムから推定されるMexシステム

A. 研究目的

Pseudomonas aeruginosa (緑膿菌)の染色体上には、少なくとも 12 種類の RND マルチコンポーネント型多剤排出(Mex)システムがコードされている。これらの Mex システムのうち、幾つかが様々な抗菌薬、消毒薬や色素の排出に機能し、本菌の増殖や生存に障害となる異物に対する自己防衛機構として働いていることが明らかにされてきた。しかし、なぜ 12 種類もの自己防衛機構が必要なのか? という疑問に対する明確な答えはない。最近になり、この疑問の 1 つの答えとして細菌間情報伝達機構であるクオラムセンシングとの関わりが報告

された。本機構は色素や菌体外毒素の産生、バイオフィルムの形成など様々な病原性に関する形質の発現を誘導、または抑制している。*P. aeruginosa* における 12 種類の Mex システムのうち、主要な排出システム遺伝子群である MexAB-OprM はこの機構の構成因子であるホモセリンラクトン (homoserine lactone; HSL) を排出することでクオラムセンシングに依存的な病原因子の発現制御に関与していると考えられる。このように、今まで主として抗菌薬耐性機構に焦点が当てられてきた Mex システムが病原性にも関与している可能性が示唆された。本研究では、12 種類の Mex システムの生理的機能の解明を目的として、12 種類の Mex システムの発現量、抗菌薬耐性および病原性発現への関与、他の菌種との相互作用について調べた。

B. 研究材料と方法

1) Mex システム・オペロンの欠損株および発現プラスミドの構築: *P. aeruginosa* PAO1 のゲノム DNA を鋳型に、PCR 増幅した 12 種類の Mex システム・オペロンのそれぞれの 5' 末端と 3' 末端の近傍の部分断片を fusion PCR によって連結した。得られた Mex システム・オペロンを含まない断片を用いた相同的組換え

により PAO1 染色体上の Mex システム・オペロンの欠損株を作成した。さらに、PCR 増幅した Mex システム・オペロンを用いて発現プラスミドを構築した。

2) Mex システムの抗菌薬耐性への関与: Mex システム・オペロン欠損株および発現プラスミドを用いて、抗菌薬感受性測定を行なった。

3) Mex システム・オペロンの病原性発現への関与: Mex システム欠損にともなった病原因子 (エラスターゼ, アルカリプロテアーゼ, 運動性) の発現や MDCK 細胞モノレイヤの透過の変動を調べた。

4) Mex システム・オペロンの発現解析: Mex システムのコンポーネントに特異的な抗体を用いたウェスタン・イムノブロット法および定量的 RT-PCR により各種培養条件下での Mex システムの発現量を定量化した。

C. 結果および考察

Mex システムの欠損株を用いて、以下の実験を行なった。

1) Mex システムの発現解析: *P. aeruginosa* PAO1 を用いて Mex システムのコンポーネントに特異的な抗体を用いた Western immunoblot 法および定量的 RT-PCR により各種培養条件下での Mex システムの発現量

strain	Genotype	swimming (mm)	swarming (mm)	twitching (mm)	3-oxo-C ₁₂ -HSL (%)	Elastase (mg/ml)	Alkaline proteinase (ng/ml)	ExoA (ng/ml)	Promoter activity(%)		<i>lasI</i> exp. (logX*)	<i>rhlI</i> exp. (logX*)
									<i>lasB</i>	<i>rhlA</i>		
PAO1	wild type	38	54	9	100.0	318.2	1656	12.0	100.0	100.0	6.0	6.3
KG7004	$\Delta lasI \Delta rhlI$	-	-	13	0	2.2	0	37.6	0.0	0.0	-	-
KG2239	$\Delta mexAB-oprM$	34	22	4	118.0	289.6	760	34.0	43.0	60.9	ND	ND
KG3104	$\Delta mexCD-oprJ$	35	58	-	241.0	668.2	232	14.3	84.0	89.2	ND	ND
KG4553	$\Delta mexEF-oprN$	-	34	4	1.0	29.5	8	35.5	6.7	4.1	1.4	1.6
KG5009	$\Delta mexXY$	-	27	7	129	129.4	936	26.4	8.0	16.7	6.3	5.2
KG4542	$\Delta mexJK$	39	53	-	148.0	549.0	232	15.9	78.8	113.8	ND	ND
KG4547	$\Delta mexHI-oprD$	43	55	-	183.0	324.0	120	13.3	93.5	89.9	ND	ND
KG4548	$\Delta mexPQ-oprE$	-	24	-	12	2.2	0	44.3	3.8	3.7	2.8	2.1
KG4549	$\Delta mexMN$	23	56	-	189.0	248.4	184	15.3	49.7	130.8	ND	ND
KG4550	$\Delta mexI/W$	-	31	-	7	3.2	0	42.5	2.7	4.2	1.7	1.7
KG4551	$\Delta PA2525-8$	-	55	-	192.0	328.2	136	17.2	49.2	119.3	ND	ND
KG7029	$\Delta czcBA$	48	50	14	ND	366.6	1912	11.2	80.0	99.9	ND	ND
KG4552	$\Delta PA0156-8$	-	54	-	164.0	132.6	280	18.2	94.5	83.6	ND	ND

を定量化した。その結果、Western immunoblot 法では *mexAB-oprM* のみの発現が検出された。また、定量的 RT-PCR で発現量を測定したところ、*mexAB-oprM* 以外の Mex システムは Western immunoblot 法では検出不可能であるがわずかに発現していることがわかった。

2) 抗菌薬耐性への関与: 抗菌薬感受性測定を行なったところ、*mexAB-oprM* の欠損株によるカルバペネム系を除く多くの抗菌薬に対する高感受性が観察された。しかし、それ以外の Mex システムについては欠損による感受性の変化は顕著ではなかった。

3) 抗菌ペプチドに対する影響: 抗菌ペプチドに対する感受性測定を行なったところ、*mexAB-oprM* の欠損でのみ抗菌ペプチドに対する感受性が観察された。

4) 病原性発現への関与: Mex システムの欠損に伴った病原因子(エラスターゼ、アルカリプロテナーゼ、ホモセリンラクトン、エキソトキシン、運動性)の発現、MDCK 細胞モノレイヤの透過性、カイコに対する致死活性を調べた。その結果、*mexEF-oprN*, *mexPQ-opmE*, *mexVW* の欠損により、エラスターゼ、アルカリプロテナーゼ、ホモセリンラクトンの産生量の減少および運動性の低下が観察された。また、*mexAB-oprM*, *mexVW*, *czcABC* の欠損により、*P. aeruginosa* の MDCK 細胞モノレイヤ透過性が他の Mex システムの欠損に比べて著しく低下した。さらに、*czcABC* の欠損ではカイコに対する致死活性も減少することがわかった。

5) *Staphylococcus aureus* (黄色ブドウ球菌) との相互作用: *P. aeruginosa* が産生する LasA protease (staphylolysin) による *S. aureus* の溶菌に与える Mex システムの影響について調べたところ、*mexCD-oprJ*,

mexEF-oprN, *mexHI-opmD*, *mexPQ-opmE*, *mexMN*, PA0156-PA0157-PA0158 の欠損により *S. aureus* に対する溶菌作用が低下した。

以上のことから、多くの Mex システムの欠損が抗菌薬感受性に影響を与えなかったのは、それらの発現量が少ないことまた、構成的に発現している *mexAB-oprM* が感受性変化を補うために *mexAB-oprM* 以外の欠損株における感受性変化が観察されなくなることに起因していると考えられる。しかし、発現量が低い Mex システムの欠損によって、病原性発現への関与については種々の病原因子の産生量の低下、MDCK 細胞モノレイヤの透過性の低下、カイコに対する致死活性の減少を引き起こし、また、他の菌種との相互作用に関しては *S. aureus* に対する溶菌作用の低下を引き起こすことがわかった。これらのことは、12 種類の Mex システムの多くが主として抗菌薬耐性に働くのではなく、細胞内で合成した病原性発現を誘導する化合物の細胞外への排出を通して病原性発揮に機能するとともに、他の菌種との相互作用にも影響を及ぼすことを示唆している。また、抗菌ペプチドに対しても Mex システムが機能することが示唆され、自然免疫を回避する一つ的手段として Mex システムを用いていることが示唆された。このように、Mex システムの生理的機能については未知の部分が多く、本研究より明らかとなった機能以外にも新たな機能を有している可能性が考えられる。今後は、本研究で得られた結果をもとに Mex システムと病原性発現および他の菌種との相互作用の間をどのようなシステムが仲介し、機能しているのかについてさらなる研究を行なう必要がある。そして、これらの情報が各種の抗菌薬に耐性を示す傾向が強い *P. aeruginosa*

感染に対して耐性を獲得することがないターゲットの模索に有効に活用されることを期待する。

D. 総括

12 種類の Mex システムの多くが主として抗菌薬耐性に働くのではなく、細胞内で合成した病原性発現を誘導する化合物を細胞外へ排出することで緑膿菌の病原性発揮に機能することが本来の生理的機能であることを示唆している。

本補助金による研究成果の発表論文

- 1) 後藤直正. 2005. 特集「病原細菌と外界を結ぶチャンネル・薬剤排出ポンプと病原因子分泌装置」細菌のマルチコンポーネント型 RND 異物排出システム群の機能. *蛋白質核酸酵素* 50: 6-12.
- 2) 後藤直正. 2005. 特集「Quorum-sensing 機構研究の新展開・呼吸器感染症を中心に」緑膿菌のエフラックスシステムと Quorum-sensing 機構. *分子呼吸器病* 9: 22-25.
- 3) Yoneda, K., Chikumi, H.; Murata, T., Gotoh, N., Yamamoto, H., Fujiwara, H., Nishino, T. and Shimizu, E. 2005. Measurement of *Pseudomonas aeruginosa* Multidrug Efflux Pumps by Quantitative Real-time Polymerase Chain Reaction. *FEMS Microbiol. Lett.*, 243:125-131.
- 4) Chuanchuen, R., Murata, T., Gotoh, N., and Schweizer, H.P. 2005. Substrate-dependent utilization of OprM or OpmH by the *Pseudomonas aeruginosa* MexJK efflux pump. *Antimicrob. Agents Chemother.*

49:2133-2136.

- 5) Niga, T., Ito, H., Oyamada, Y., Yamagishi, J., Kadono, M., Gotoh, N., Nishino, T., and Inoue, M. 2005. Cooperation between Alternation of the DNA gyrase genes and Overexpression of MexB and MexX Confers High-level Fluoroquinolone Resistance in clinical strains of *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol. Immunol.* 49:443-446.

クラス A に属するカルバペネマーゼ、KPC-3、の酵素学的特徴

分担研究者：山口 恵三 東邦大学医学部微生物・感染症学講座

イミペネムおよびメロペネムに対して $4 \mu\text{g/ml}$ および $2 \mu\text{g/ml}$ の MIC 値を示す *Escherichia coli* 233 株からクラス A に属するカルバペネム系薬分解型 β -ラクタマーゼ、KPC-3 を精製し、その酵素学的パラメータを算出した。その結果、本酵素はペニシリン系薬、セファロスポリン系薬、カルバペネム系薬およびスルバクタムを分解する酵素であることが明らかとなった。最も分解されやすい基質はセファロチンであり、その k_{cat}/K_m 値は $3.48 \mu\text{M}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}$ であった。KPC-3 のイミペネムおよびメロペネム分解効率 (k_{cat}/K_m) は類似した値を示し、それぞれ $1.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $1.9 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。今回の検討から KPC-3 は KPC-2 と比較して幅広いスペクトラムを有しており、MIC 値では併用効果が期待されたスルバクタムをも分解することが明らかとなった。

研究協力者： Alba Jimena
木村 総一郎
石井 良和
東邦大学医学部微生物・感染症学講座

A. 研究目的

カルバペネム系薬は β ラクタマーゼに安定な抗菌薬として知られているが、本邦ではこれを分解する IMP-1 などの、クラス B に属する β ラクタマーゼを産生する *Pseudomonas aeruginosa* や腸内細菌科に属する菌種が臨床材料から分離され、問題視されている。欧米においてもクラス B に属する酵素産生株が分離されているが、これに加えてクラス A やクラス D に属するカルバペネム分解能を有する β ラクタマーゼを産生する菌株も分離されており、その増加が危惧されている。クラス A に属する

カルバペネム系薬分解酵素として Sme-型、NMC-A、IMI-型、KPC-型および GES-1 などが報告されている。これらの β -ラクタマーゼは腸内細菌科に属する菌種が産生している。その中でも、Tisch Hospital の集中治療室において発生した KPC-3 産生 *Klebsiella pneumoniae* は 1 年間に 24 人の患者に感染を起こしたことなど注目すべき点が多い。幸いにも本邦ではクラス A あるいはクラス D に属するカルバペネマーゼ産生株は報告されていないが、この種の酵素の特徴を把握し、治療薬を選定しておくことは極めて重要なことであると考えられる。

今回は、Creighton 大学 (Nebraska, U.S.A) の Kenneth Thomson らと共同で、KPC-型酵素の一つである KPC-3 の酵素学的特徴を把握するために詳細なパラメータを算出することを目的に検討を行った。

B. 研究方法

KPC-3 産生 *Escherichia coli* 233 株は Hachensack University 付属病院から分与を受けた。薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standards Institute が推奨する微量液体希釈法に準じて測定した。

KPC-3 の構造遺伝子は組換えせず、4L の LB 培地で直接 *E. coli* 233 を培養した。菌体は遠心集菌後、30%ショ糖添加 30 mM Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) に再懸濁し、定法に従って、そのペリプラスミック画分を Lysozyme-EDTA 法で得た。得られたペリプラスミック画分は、10 mM 酢酸緩衝液 (pH 5.0) に対して透析を行い、HiPrep 16/10 SP XL カラムに KPC-3 を結合させ、0 から 400 mM の塩化ナトリウムのグラジエントにより、同酵素を溶出させた。フラクション中の β -ラクタマーゼ活性はニトロセフィンを用いて確認した。得られた酵素活性を有するフラクションは、10 mM MES 緩衝液 (pH 5.5) に対して透析後、Mono S HR 5/5 カラムに酵素を結合させ、0 から 300mM の塩化ナトリウムのリニアグラジエントにより、KPC-3 を溶出させた。溶出フラクションの酵素活性は前述の方法で確認し、SDS-ポリアクリルアミド電気泳動後にゲルを Comassie brilliant blue で染色し、単一バンドを認めたフラクションのみを集めた。集められた精製酵素は 50 mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) に対して透析し、タンパク濃度を確認した後、最終濃度 20 μ g/mL となるようにウシ血清アルブミンを添加した。

KPC-3 の N-末端アミノ酸配列は

Procise 492clC-1 Protein sequencer (Applied Biosystems) を用いて決定した。

酵素学的パラメータは、島津社製の吸光度計 UV-2550 を用いた UV 法により算出した。すなわち、精製酵素と基質を一定時間、30°C で反応させ、分解前の吸光度と反応終了時の分解産物の差を基に、Hanes-Woolf プロットを用いて各種パラメータを算出した。モキサラクタムとセフォキシチンは、 K_m 値の算出が困難であったため、これら 2 抗菌薬に対しては、ニトロセフィンをリポータ基質として用い、 K_i 値を算出した。それ以外の基質は、直接吸光度変化を観察し、 K_m 値および k_{cat} 値を算出した。今回は力価の明らかな抗菌薬を使用して検討を加えた。

C. 研究結果

Antimicrobial susceptibility patterns (MICs) for KPC-3 producing *E. coli* 233

Antimicrobial agent	MIC (μ g/ml)
Ampicillin	>512
Cephaloridine	256
Cephalexin	>512
Cefoxitin	128
Ceftriaxone	128
Ceftazidime	32
Cefepime	512
Moxalactam	8
Imipenem	4
Meropenem	2
Meropenem-Clavulanic acid*	≤ 0.25
Meropenem-Sulbactam*	≤ 0.25

(* Clavulanic acid and Sulbactam were tested at a constant concentration of 4 μ g/ml.

E. coli 233 のメロペネムおよびイミペネムに対する MIC 値は、夫々 2 μ g/mL および 4 μ g/mL の値を示した。メロペネムに対する MIC 値はクラブラン酸あるいはスルバクタムの存在下で 0.25 μ g/mL 以下となった。すなわち、 β -ラクタマーゼ阻害剤によってカルバペネム系薬の感受性が改善することが示された。本菌株のその他の β -

ラクタム系薬に対する薬剤感受性を見るとモキサラクタムに対する MIC 値が $8 \mu\text{g/mL}$ と最も低かった。他の抗菌薬の MIC 値は 32g/mL 以上であった。

KPC-3 が最も高い加水分解効率を示した基質は、ニトロセフィンとセファロチンであり、 k_{cat}/K_m 値は夫々 $2.6 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $3.5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ の値を示した。セファロチンの k_{cat} および K_m 値は夫々 264s^{-1} および $261 \mu\text{M}$ と極めて高値を示した。イミペネムとメロペネムは KPC-3 に対する好適基質であり、 k_{cat}/K_m 値は夫々 $1.9 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ および $1.4 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であった。全体的に KPC-3 は KPC-1 および KPC-2 の酵素学的パラメータと類似の値を示した。しかし、詳細にそのパラメータを見てみると、KPC-3 が他の KPC-型酵素と比較して、セフトラジジムに対する k_{cat} 値が高いこと、セフォキシチンの K_m 値が高いことなど相違点を認めた。

Comparison of kinetic parameters for KPC-1, KPC-2 and KPC-3

Substrate	K_m or K_i (μM)			k_{cat} (s^{-1})			k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)		
	KPC-1	KPC-2	KPC-3	KPC-1	KPC-2	KPC-3	KPC-1	KPC-2	KPC-3
Ampicillin	130	230	65 (5.5)	110	210	77 (4.4)	0.9	0.9	1.7
Nitrocefin	NA	NA	42 (2.5)	NA	NA	107 (2.5)	NA	NA	2.6
Cephalosporins	500	500	261 (2.1)	540	570	364 (2.4)	0.6	1.1	1.4
Cephalosin	13	32	44 (2.3)	73	69	153 (2.5)	1.4	0.8	3.5
Cefazolin	160	220	93 (4.8)	14	22	52 (4.4)	0.1	0.1	0.5
Cefazolin	94	NA	83 (1.1)	0.1	0.1	3 (10.00)	0.001	NA	0.03
Cefazolin*	120	180	978 (5.5)	0.3	0.3	0.03 (20.00)	0.002	0.002	0.9
Moxicetam*	NA	NA	14 (1.4)	NA	NA	0.01 (10.00)	NA	NA	0.05
Mecopenem	12	15	4 (1.1)	3	4	6 (16.00)	0.3	0.3	1.4
Imipenem	11	51	25 (1.6)	12	15	45 (16.00)	0.2	0.3	1.9
Substrates	NA	NA	30 (0.9)	NA	NA	4 (10.1)	NA	NA	0.1

Kinetic values used for KPC-1 and KPC-2 were reported by Vignatelli et al.
 NA: Not available
 ND: Not determined
 *: K_i values were obtained using 100 μM Nitrocefin as reporter substrate
 #: k_{cat} values obtained by hydrolyzing a low concentration of substrate with a high concentration of enzymes

D. 考察

データは示さなかったが、私どもは本研究の中で、KPC-1 と KPC-2 産生株も入手して検討を加えた。その結果、既報では、1 アミノ酸残基異なるとされていた KPC-1 と KPC-2 は全く同一のアミノ酸配列を有する酵素であることが明らかとなった。その結果は、共同研究者の Thomson らと共に

に CDC の F. Tenover にその報告をした。

KPC-3 は KPC-2 と 1 アミノ酸残基 (H272Y) を異にするのみである。この相違がセフトラジジムとセフォキシチンに対する酵素学的パラメータの差異につながるのか否か部位特異的変異導入方などによって確認する必要があると考えている。私どもが既に報告した、X-線結晶解析より得られた Toho-1 (CTX-M-44) の 3 次元構造のデータを基に KPC-3 の 3 次元構造を予測してみた。予備的な検討ではあるが、272 番目のアミノ酸残基は、KPC-3 が基質となる β -ラクタム系薬の側鎖のひとつであるカルボン酸と相互作用すると考えられる、KPC-型酵素の 209 番目のアルギニンに影響を与える可能性が示唆された。この変異部位は Toho-1 では R274 に当たるアミノ酸残基と同様の働きを有していると考えている。今後、この点についても詳細な検討を加える必要があると考えている。

E. 結論

KPC-3 に最も分解されやすい基質はセファロチンであった。KPC-3 のイミペネムおよびメロペネム分解効率は類似の値を示した。今回の検討から KPC-3 は KPC-2 と比較して幅広いスペクトラムを有しており、ペニシリン系、セファロsporin系およびカルバペネム系薬のみならず β -ラクタマーゼ阻害薬のひとつであるスルバクタムをも分解することが明らかとなった。KPC-3 の幅広い基質特異性を獲得したメカニズムに関して、さらに詳細な検討が必要になると考えられた。