

研究成果

1. Nkano R. Okamoto R. Nakano Y. Kaneko K. Okitsu N. Hosaka Y. Inoue M. CFE-1, a novel plasmid-encoded AmpC β -lactamase with an ampR gene originating from *Citrobacter freundii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:1151-1158, 2004
2. Okitsu N, Kaieda S. Yano H. Nakano R. Hosaka Y. Okamoto R. Kobayashi T. Inoue M. Characterization of ermB gene transposition by Tn1545 and Tn917 in macrolide-resistant *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 168-173, 2005
3. Kaneko K. Okamoto R. Nakano R. Kawakami S. Inoue M. Gene mutations responsible for overexpression of AmpC β -lactamase in some *Enterobacter cloacae* clinical isolates. *J. Clin. Microbiol.* (投稿中)

平成 16 年度分担研究報告書

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

分担研究者：生方 公子（北里大学北里生命科学研究所，感染情報学研究室）

〔研究要旨〕呼吸器感染症における原因微生物の網羅的検索法として，その原因となる確率の高い6菌種に対する新たな PCR 法であるモレキュラー・ビーコンを用いる real-time PCR 法による同時・迅速診断法の確立を目的とした。目的菌は，①肺炎球菌，②インフルエンザ菌，③A-群溶血レンサ球菌，④マイコプラズマ菌(*M.pneumoniae*)，⑤レジオネラ菌(*L.pneumophila*)，⑥クラミジア菌(*C.pneumoniae*)である。新たな方法では，結果を得るまでの所要時間を 1.5 時間に短縮できた。また，その操作は極めて省力化された。この方法を成人と小児の呼吸器感染症から採取された検査材料に応用し，培養よりもはるかに高い感度と精度で起炎菌を証明することができることを証明した。

以上の成績は，肺炎や化膿性髄膜炎例等に対し，入院当日中に最も適切な治療抗菌薬が選択できること，外来症例においては再診時に処方した抗菌薬が適切であったか否かの判断ができることを示した。省力化ならびに迅速化された real-time PCR 法の普及は，患者のみならず，医療経済効果の上からも極めて有用であると結論される。

研究協力者：

諸角 美由紀，小林 玲子，長谷川 恵子，
千葉 菜穂子（北里大学北里生命科学研究所，感染情報学研究室）

岩田 敏（(独)東京医療センター小児科）

青木 泰子((独)東京医療センター内科)

川名 明彦((独)東京国際医療センター内科)

砂川 慶介(北里大学医学部感染症学講座)

A. 研究目的

呼吸器感染症の起炎菌として頻度の高い肺炎球菌，インフルエンザ菌，マイコプラズマ・ニューモニエなどにおいて，さまざまな抗菌薬に対する耐性化が急速に進行し，難治例や重症感染症例が増加してきている。このような背景には，外来患者に対して，細菌検索を行うことなく empiric therapy が行われていることがひと

つの増加要因になっている。新たな耐性菌増加の防止には，evidence に基づいた化学療法 (Evidence Based Chemotherapy: EBC)を行うことが最も肝要である。

そのためには，感染の初期段階において，起炎菌となりうる確率の高い微生物をできるだけ網羅的に，しかも同時に検索する手法の確立が必要との視点から，成人と小児の肺炎例を対象に，real-time PCR 法で使用可能な「呼吸器感染症起炎菌・迅速検索キット」の構築を目標とした。

B. 研究方法

1) 検査材料

平成 16 年 4 月以降，平成 17 年 1 月までに「小児呼吸器感染症研究会(ARD 研究会)」あるいは「成人呼吸器感染症研究会(MIA 研究

会)」によって収集された検査材料を対象とした。

2) 検索用プライマーとモレキュラー・ビーコン

市中で発症する呼吸器感染症における起炎菌検索の対象としたのは、①肺炎球菌、②インフルエンザ菌、③A 群溶血レンサ球菌、④マイコプラズマ(*M.pneumoniae*)、⑤レジオネラ菌(*L.pneumophila*)、および⑥クラミジア菌(*C.pneumoniae*)の6菌種である。

各プライマーは主にそれぞれの16S rRNA 遺伝子上に設計したが、肺炎球菌のみ本菌に特有の *LytA* 遺伝子に設計した。real-time PCR 用のモレキュラー・ビーコンは、増幅されるDNA上の約20bpの塩基に結合でき、6菌種が同一温度条件で陽性反応を示すように設計した。モレキュラー・ビーコンとはその末端に蛍光色素とクエンチャーを付けたものである(図-1)。

それぞれのプライマーの感度は、菌種ごとに正確に10倍希釈した菌液を作成し、それぞれの threshold cycle(Ct:増幅の陽性反応が確認できた cycle 数)を求めて標準曲線を描いた(図-2, 図-3)。6菌種は反応チューブあたり1-10CFUあたりのDNAが存在すれば、陽性と判定された。この成績は、検体採取用のシードスワブ(滅菌綿棒)の先に 10^3 CFUの目的菌DNAが付着していれば、real-time PCR 陽性と判定される感度であった。

また、図-4に示すように、個々の検査材料で得られた threshold cycle(Ct)を標準曲線へ当てはめると、材料中にどの程度の菌量が存在したのかが計算でき、ある程度の定量性が得られる。

3) 検査材料への応用

前述した網羅的迅速検索用キットの精度と感度を検証するため、ARD研究会ならびにMIA研究会によって収集されている検査材料に対し、2)項のプライマーとモレキュラー・ビーコンセットを用いて原因菌の検索を行っ

た。併せて、肺炎球菌、インフルエンザ菌、およびマイコプラズマに対しては培養による検索も行った。実際の real-time PCR のプロトコールは図-5に示した通りである。

4) 倫理面への配慮

検査材料の収集については、一般細菌検査に替わって実施されているものであるが、症例の倫理面に配慮し、各施設からの材料にはイニシャルのみの記載をお願いした。また、得られた real-time PCR および培養成績は、結果判明と同時に担当医へ報告された。

C. 研究結果

1) real-time PCR と培養での成績

対象とした肺炎例は、成人40例と小児97例であったが、成人では一部気管支炎が含まれていた。

real-time PCR によって陽性と判定された菌種について、成人と小児に分けて表-1と図-6に示す。

肺炎球菌は、両研究会において最も高い割合で分離された。小児ではそれらのほとんどは培養によっても菌が証明されたが、成人例では発症から時間が経過し、既に注射薬剤が使用されているためか、培養検査で菌を分離することができない症例があった。

A 群溶血レンサ球菌は、成人例で2例明らかな陽性を示し、培養でも同様に陽性であった。

マイコプラズマについては、成人と小児の両方で、real-time PCR での陽性例がかなり認められたが、マクロライド系薬が前投与された症例では検査材料中に残存しているDNA量も少なく、培養では陰性であった。また、発症から4日以上経過した検体ではマイコプラズマはほとんど培養で陰性であった。

クラミジア菌は陽性例がわずかに認めら

れたが、その陽性率は低かった。本菌については培養が難しいことからそれらは実施していない。

レジオネラ菌の存在が証明できたのは成人の1例である。本例の検査材料は抗菌薬投与後のものを症状の改善度が悪いということで送付を受けたものである。尿中抗原が陽性とならないV型(24時間風呂の検査で強陽性)であったため、real-time PCRのみが陽性となって起炎菌を証明できた。

また、real-time PCR法では図-7に示すように、混合感染例の菌検索においては特に有用であると思われた。

2) real-time PCR への前投薬の影響

上述したように、起炎菌であった菌種に対して抗菌力を有するような注射用抗菌薬が empiric に使用された症例においては、real-time PCR で死滅あるいは増殖停止した菌の DNA を増幅することにより、高い確率で菌種を推定することは可能であった。しかし、それによってサンプル中の菌数を算出しても余り意味がないことを理解しておく必要がある。

現実的な問題としては、先生方から送付された検体のうち、小児は約半数例に経口抗菌薬が投与され、成人の場合にはほとんどに注射薬が使用されていた。耐性菌の多い肺炎球菌やインフルエンザ菌が起炎菌の症例に対し、経口セフェム薬やマクロライド系薬が使用されていた際には、生菌が残存している可能性は高いが、注射薬投与例においては培養で菌種を同定するのはほとんど不可能であった。

D. 考察 および E. 結論

real-time PCR 法による迅速診断法は、治療薬選択の上で極めて優れていると結論される。特に重症肺炎例の喀痰や、化膿性髄膜炎例の髄液に対して実施されれば有用な

方法である。

しかし、呼吸器感染症由来の上咽頭ぬぐい液や咽頭ぬぐい液のように、本来無菌的ではない材料を対象とした際には、real-time PCR 陽性の菌=起炎菌(原因菌)と単純には判断できない場合もある。

乳幼児例においては肺炎球菌やインフルエンザ菌は高い頻度で保菌されており、また成人においてもインフルエンザ菌の保菌率は高いためである。

本研究を通し、特に重要視すべきこととして提出される検査材料の半数以上に既に抗菌薬が使用されていたことである。本来、検査材料は抗菌薬使用前に口腔内を洗浄した後に採取することが基本原則である。このことが守られない限り、real-time PCR といえどもその威力を発揮することはできない。

そのような原則が守られて real-time PCR 法が用いられるようになれば、本法は臨床サイドにおいて起炎菌検索の有力な武器になるであろうと考えられる。

その結果、臨床では余分な抗菌薬を使わなくて済み、耐性菌の出現とその増加防止や、医療コスト削減に貢献できる結論された。

将来的には、抗菌薬使用の対象外であるウイルスによる肺炎例を細菌による肺炎例から区別するために、ウイルス用 real-time PCR も構築していくことが必要である。

F. 研究発表 (論文)

1. M. Morozumi, K. Hasegawa, N. Chiba, S. Iwata, N. Kawamura, H. Kuroki, T. Tajima, and K. Ubukata. Application of PCR for *Mycoplasma pneumoniae* detection in children with community-acquired pneumonia. *Journal of Infection Chemotherapy*, 10:274-279, 2004

2. 砂押 克彦, 中山 栄一, 小林 玲子, 鈴木 悦子, 田島 剛, 生方 公子: 小児急

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

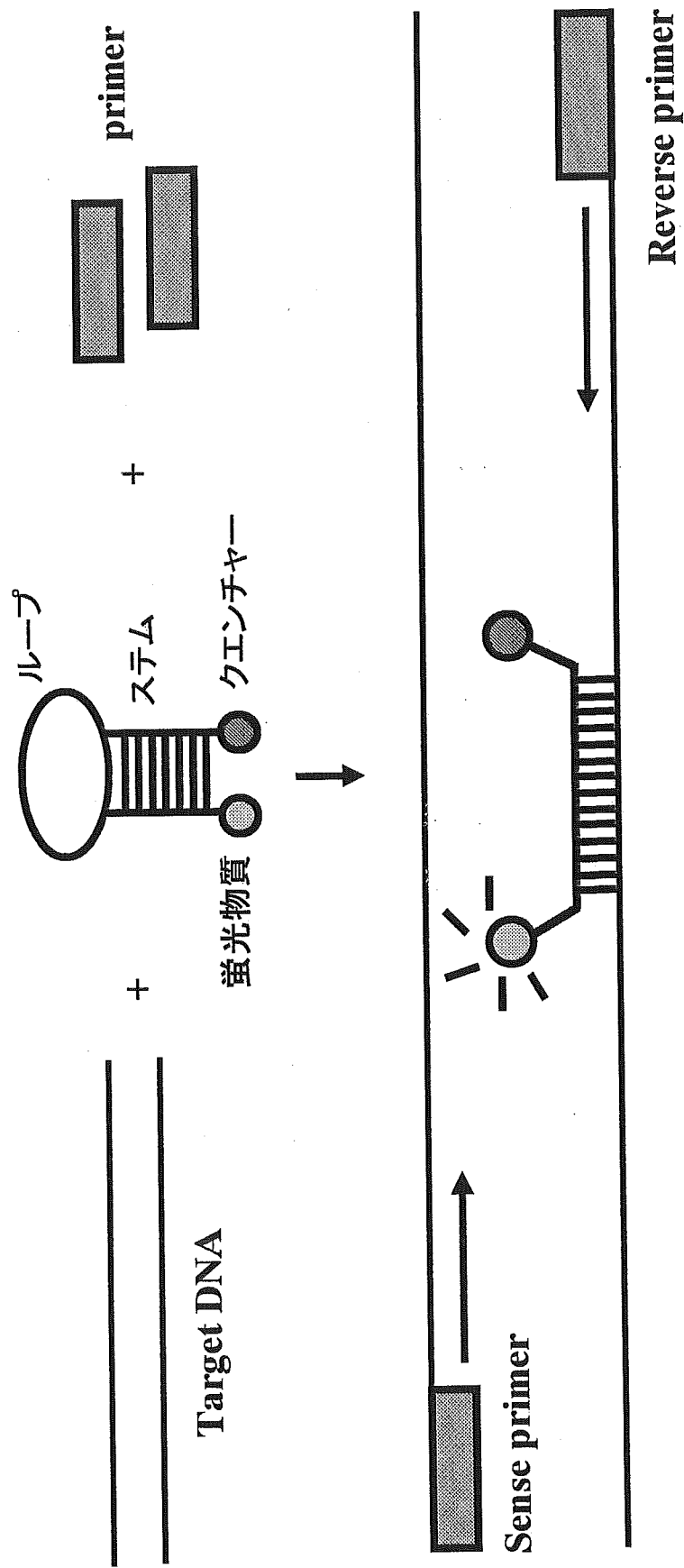


図-2. Real-time PCR法での*M. pneumoniae*の検量線

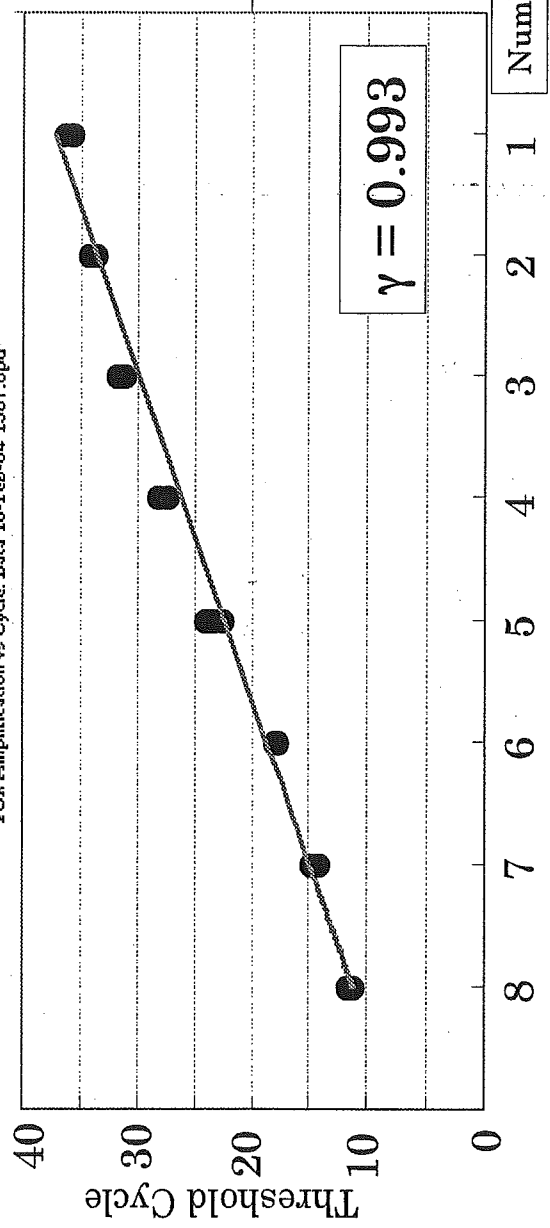
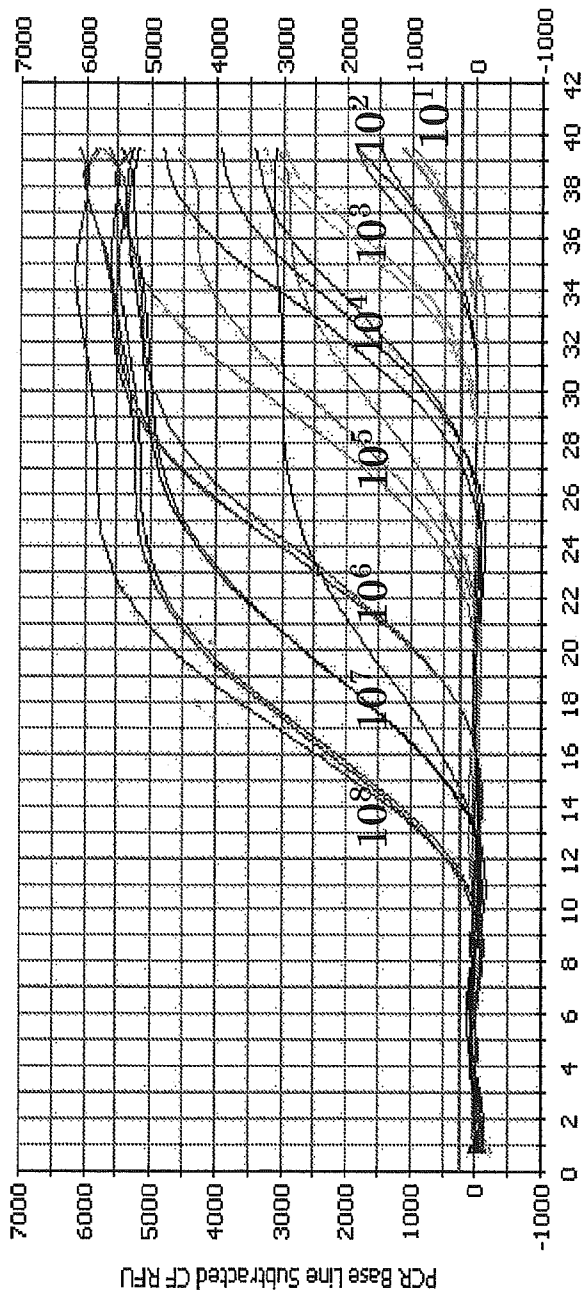


図-3. Real-time PCR法での肺炎球菌の検量線

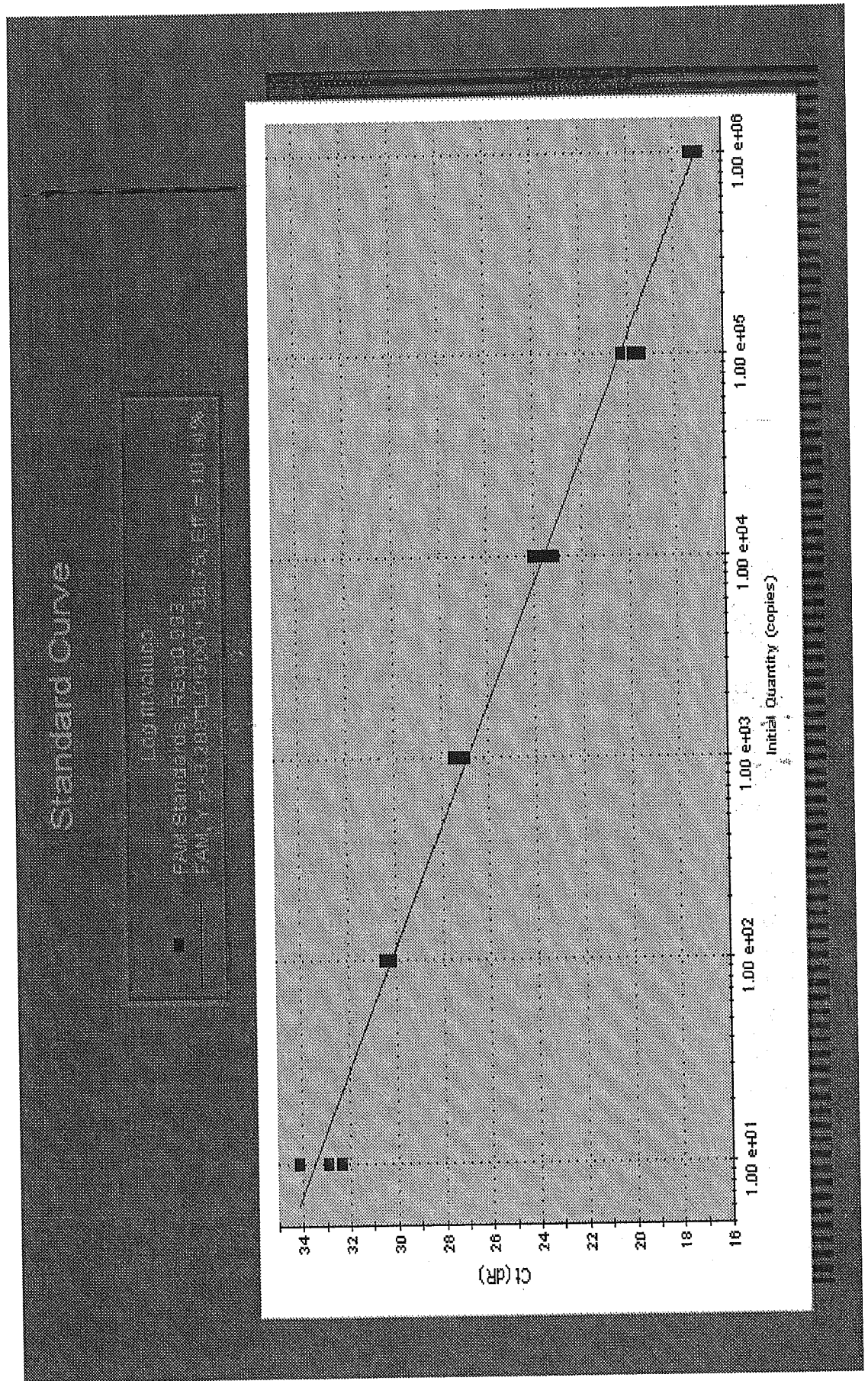


図4. Real-Time PCRによる肺炎例の*M. pneumoniae*陽性例

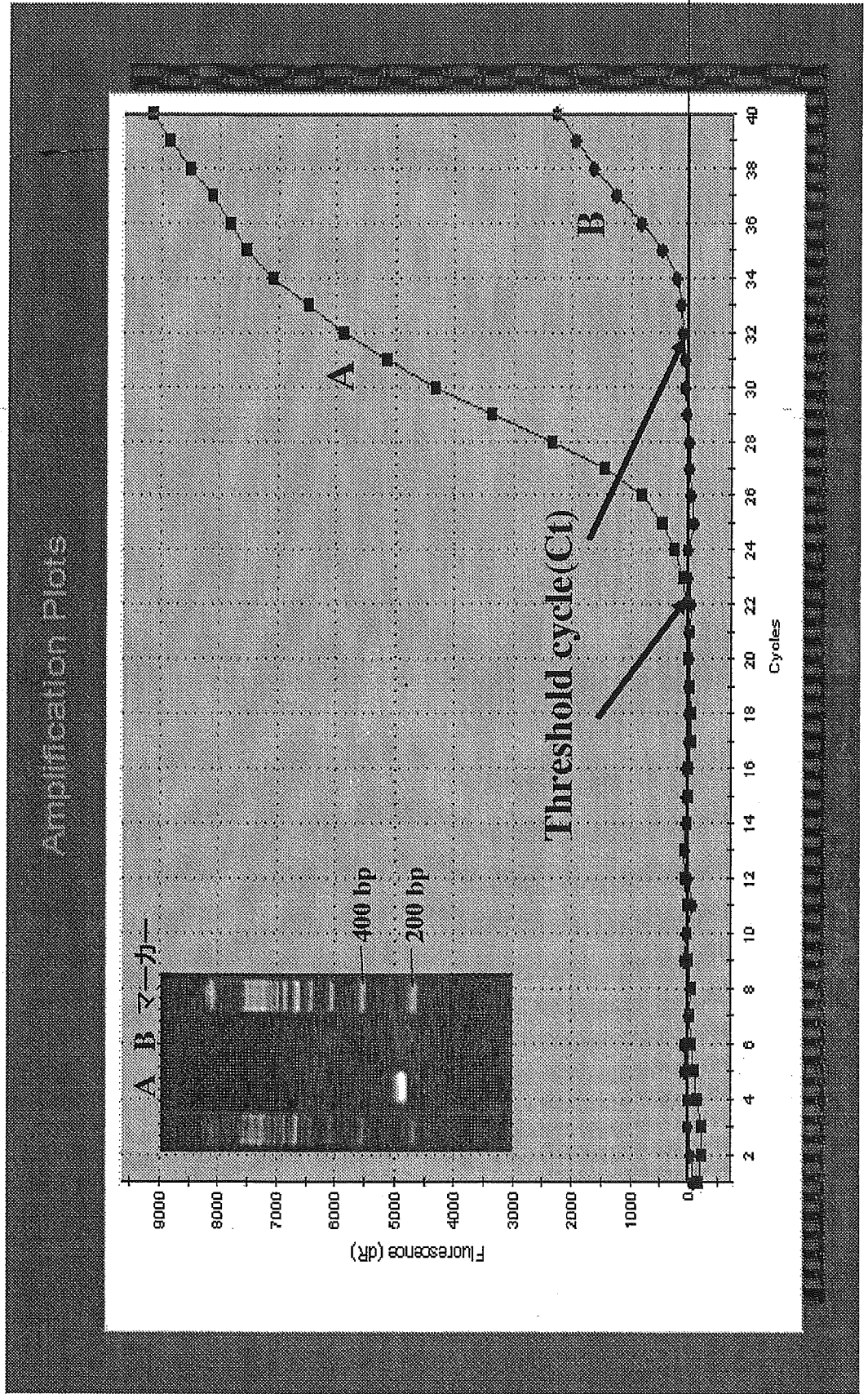


図-5. 細菌/ウイルスの迅速検索プロトコール

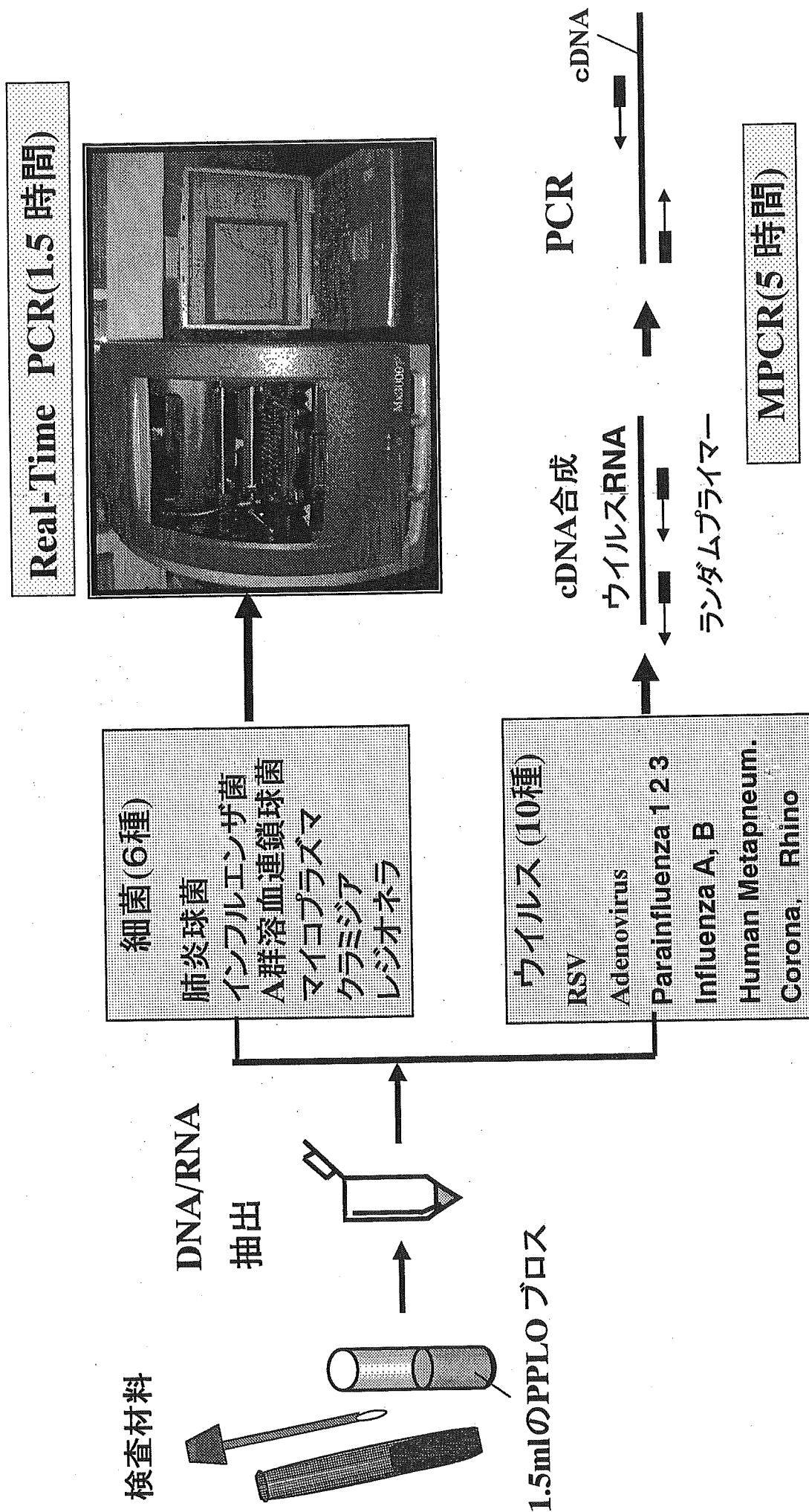
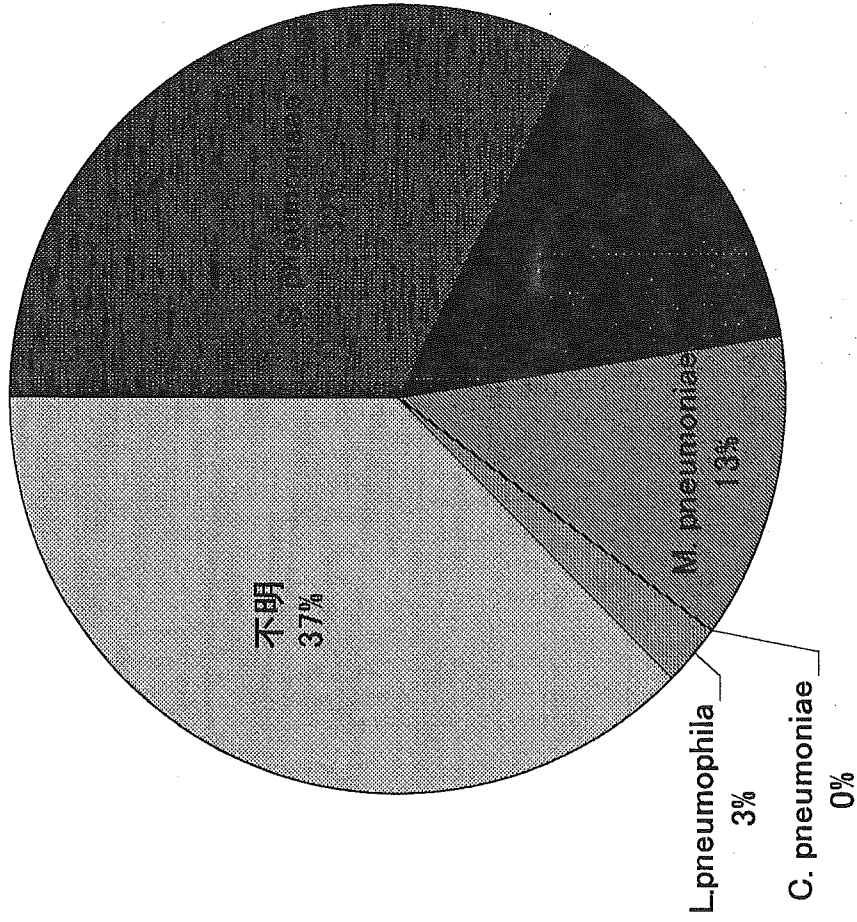
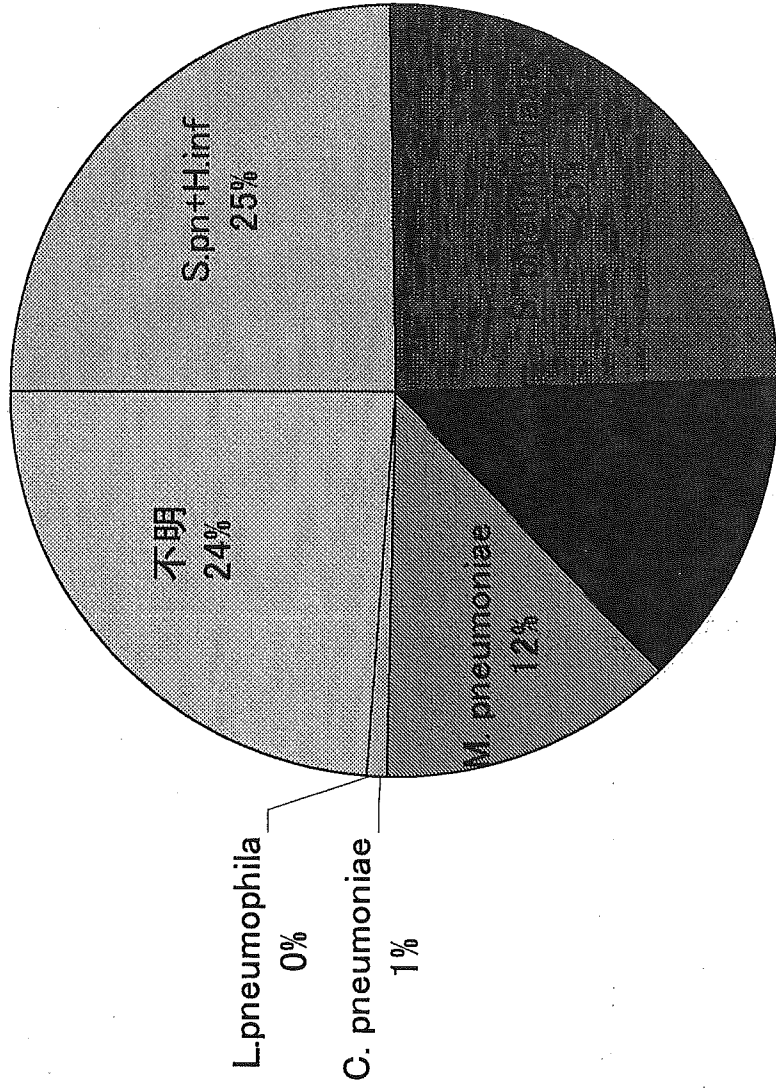


図-6. Real-time PCRによる陽性例



成人



小児

図-7. 成人(20歳,女性)肺炎例1: Real-time PCRの成績

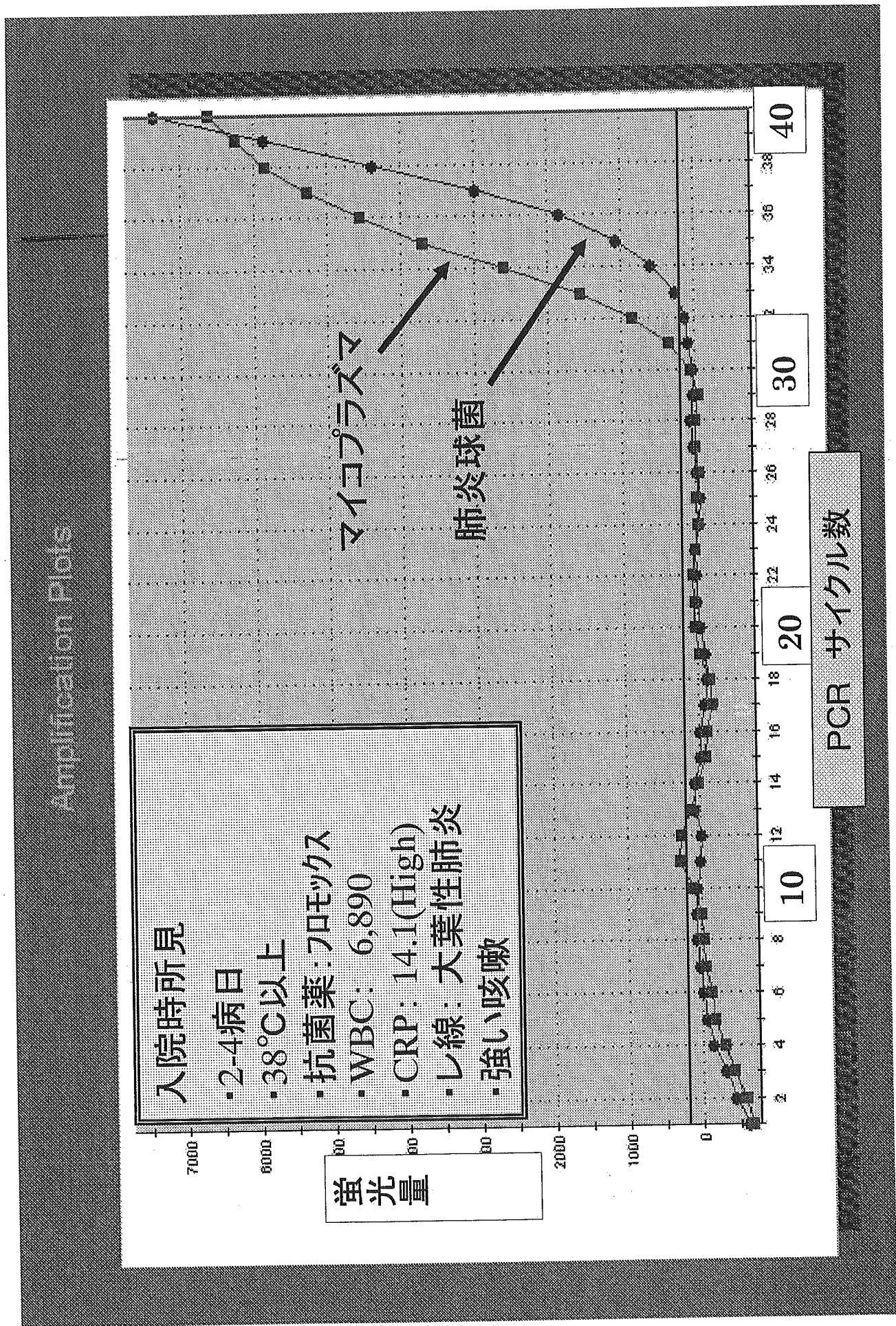


表-1. 成人と小児肺炎例に対するreal-time PCRの成績

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 32.5	10 25	6 15	6 15	5 12.5	4 10	1 2.5	0	0	0 ND
小児陽性例 (%)	48 49.5	47 48.5	37 38.1	37 38.1	12 12.4	10 10.3	0	0	1 1.0	1 ND

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 (PhenylC_nSH (n = 1-4)) と N-[(7-chloro-quinolin-4-ylamino)-alkyl]-3-mercapto-propionamide (QuinolineC_nSH (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る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。PhenylC_nSH (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。QuinolineC_nSH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 QuinolineC_nSH 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 QuinolineC_nSH (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 PhenylC_nSH (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 PhenylC_nSH 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。

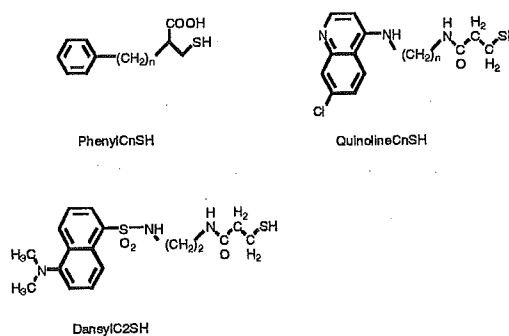


Fig. 1. Chemical Structures of Inhibitors Used in This Study

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。

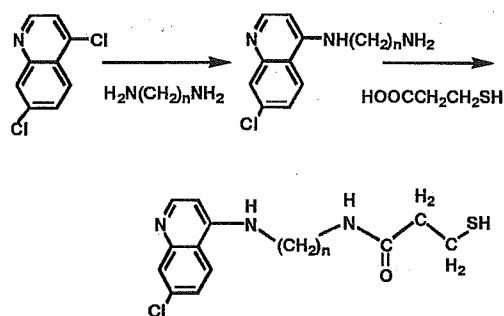


Chart 1. Synthetic Route of QuinolineC_nSH (n = 2-6)

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、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-chloroquinolin-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-chloroquinolin-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-chloroquinolin-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-chloroquinolin-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-chloroquinolin-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, PhenylC_nSH 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 QuinolineC_nSH ($n = 2-6$) または PhenylC_nSH ($n = 1-4$) 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た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) QuinolineC_nSH ($n = 2-6$) 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 QuinolineC_nSH ($n = 2-6$) 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 $a = 45.2$ \AA , $b = 90.8$ \AA , $c = 129.0$ \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 つ存在することがわかった ($Z = 8$, $V_m = 2.23$ $\text{\AA}^3/\text{Dalton}$)。

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 \AA 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 \AA), peak (1.2817 \AA), remote (1.2906 \AA) 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 \AA のデータは、SPring-8 のビームライン BL41XU において 1.00 \AA 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/prodrgr/rodrgr.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 \AA 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

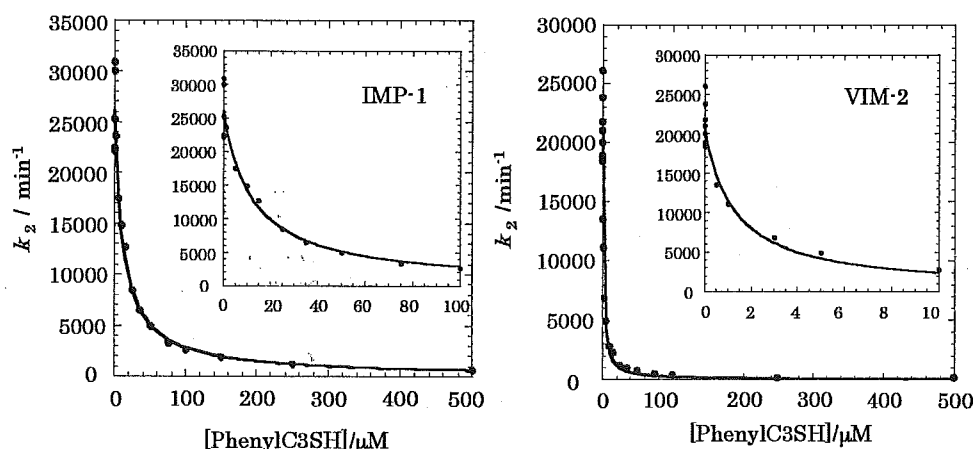


Fig. 2. Typical Plots of Molecular Activity of IMP-1 (Left) and VIM-2 (Right) against the Concentration of PhenylC3SH

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(PhenylC n SH($n = 1-4$)またはQuinolineC n SH($n = 2-6$))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。

PhenylC n SH ($n = 1-4$)によるIMP-1, VIM-2阻害効果: PhenylC n SH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PhenylC n SH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PhenylC n SH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。

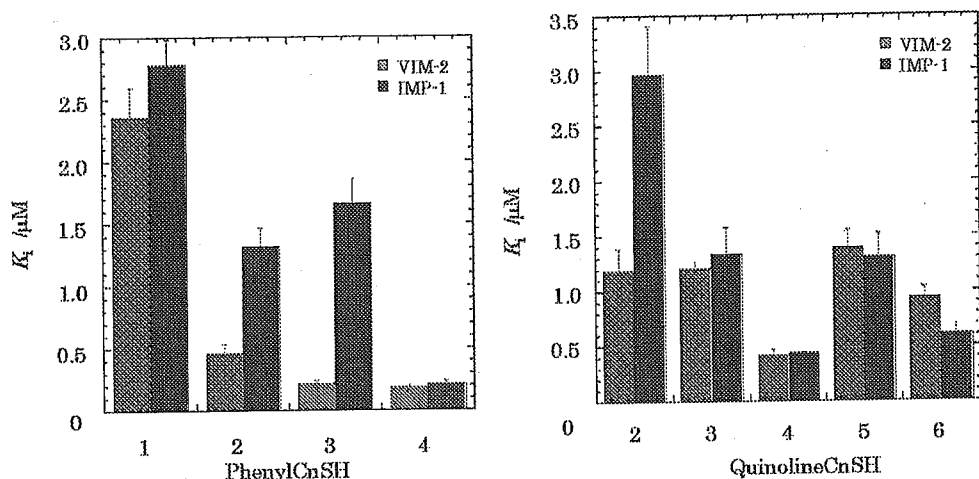


Fig. 3. Variation of Inhibition Constants of IMP-1 and VIM-2 with n , for PhenylC n SH (Left) and QuinolineSH (Right)

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 PhenylC n SH ($n=1-4$) and QuinolineC n SH ($n=2-6$) to IMP-1 and VIM-2

Inhibitors	$IC_{50}/\mu M$	
	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

QuinolineC n SH ($n=2-6$)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 QuinolineC n SH 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。QuinolineC n SH と DansylC2SH との構造の比較から、QuinolineC n SH 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。

QuinolineC n SH 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。QuinolineC n SH ($n=2-6$) 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 $2.5\mu M$ (QuinolineC4SH)– $14.2\mu M$ (QuinolineC2SH), $0.44\mu M$ (QuinolineC4SH)– $2.97\mu M$ (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 $2.4\mu M$ (QuinolineC4SH)– $7.6\mu M$ (QuinolineC5SH), $0.42\mu M$ (QuinolineC4SH)– $1.39\mu M$ (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。

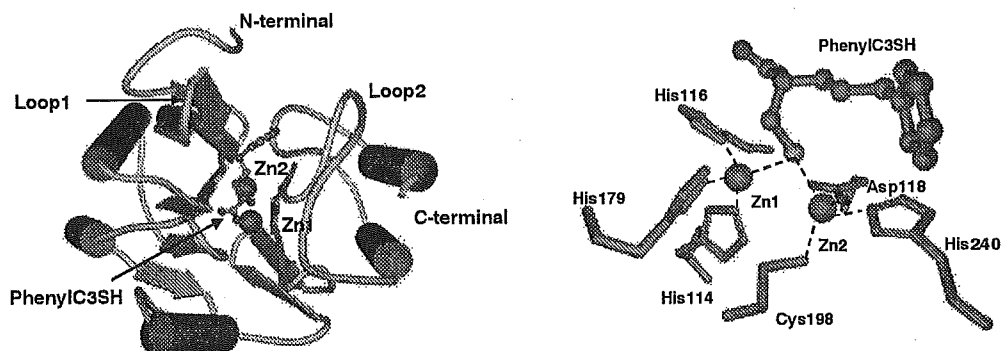


Fig. 4. The Overall Structure (Left) and the Active Site (Right) of the Complex of VIM-2 with PhenylC3SH

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)へエクタリアル側から配位している)、その平面に対しアクシナル位から 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。

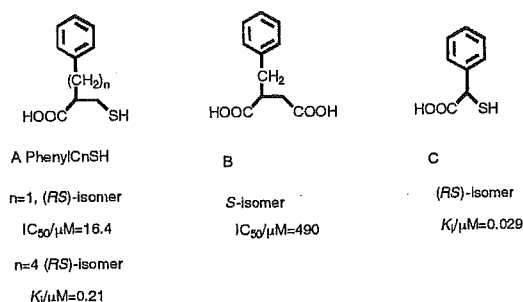


Fig. 5. Relation of Inhibitor Effect versus Structures, for Several Inhibitors of IMP-1

IMP-1 に対する類似阻害剤の阻害能の比較: 合成した PhenylC_nSH 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 に対する阻害作用はニトロセフィンを経験したとき、PhenylC1SH は IC₅₀ = 16.4 μM, B は IC₅₀ = 490 μM, 前者は後者の 1/30 であった。PhenylC4SH (K_i = 210 nM) は PhenylC_nSH 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。

QuinolineC_nSH 蛍光特性: QuinolineC_nSH 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 Å, PhenylC3SH-Zn2 では 2.5 Å 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 Å 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。

PhenylC_nSH (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 PhenylC_nSH (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与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) PhenylC_nSH 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