

費抑制にも貢献すると考えた。

そのためには、感染の初期段階に起炎菌となりうる微生物を網羅的に同時検索する手法の確立が必要である。最終的な目標は入院患者に対しては入院当日、外来患者に対しては再診時において抗菌薬使用の是非も含めて最も適切な抗菌薬投与へとスイッチできるようにすることであるが、当面の目標は、2-2.5 時間で主要原因菌を確定できる「呼吸器感染症・起炎菌迅速検索キット」の構築とした。

## 研究方法

### 1) 検査材料

平成 14 年 4 月以降、平成 15 年 12 月までの 1 年間に「小児呼吸器感染症研究会(ARD 研究会):代表者 岩田 敏(国立病院東京医療センター・小児科医長)」によって収集された検査材料を対象とした。総計は 1,644 検体となった。

### 2) 検索性 primer

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*)、及び⑥クラミジア菌 (*C.pneumoniae*) の 6 種である。

各 primer は主にそれぞれの 16S rRNA 遺伝子上に設計した。設計にあたっては、同一条件で PCR が実行でき、かつ感度も一定に保たれるように工夫した。また、PCR によって増幅される DNA の長さも差をつけて解析しやすいようにした。

それぞれの primer の感度は表1、またその増幅 DNA のサイズは図1に示したとおりである。

チューブあたり 1-7CFU の菌が存在すれば、陽性と判定されている。この成績は、検体採取用の滅菌綿棒の先に $10^3$ CFU の目的菌が付着していれば、PCR 陽性と判定される感度である。

### 3) 小児由来検査材料への応用

前述した網羅的迅速検索性キットの精度を見るために、ARD 研究会によって収集されている検査材料に対して、2)項の primer セットを用いて原因菌の検索を行い、併せて培養による菌検索を実施した。

実際のプロトコールは図2に示したとおりである。

### 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施行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依頼した。また、得られた PCR と培養の成績については、担当医へ報告された。

## 研究結果

### 1) PCR と培養での成績

1年半に検討したのは 1,644 症例であったが、検体送付時に記載された疾患の内訳を図 3 に示す。肺炎例が最も多く、次いで急性気管支炎、扁桃炎・咽頭炎、急性上気道炎、急性中耳炎であった。

6 菌種 PCR によって陽性と判定された菌について、疾患別に集計した成績を図 4 に示す。肺炎球菌とインフルエンザ菌は、いずれにおいても 40~60%と高い割合で分離されていた。そして、これらの 99.5%は培養によっても菌が証明された。A 群溶血レンサ球菌においては、扁桃炎

などで 10%程度の陽性率であった。一方、マイコプラズマ菌については、下気道感染症となる程高い陽性率になっており、肺炎では検出菌の 20%を越えていた。PCR 陽性の 80%以上で培養陽性であった。クラミジア菌はさまざまな疾患で陽性例がみられたが、対象が6歳以下の小児が多かったためか、陽性率は低かった。

レジオネラ菌は、小児では分離率が低いといわれているが、急性咽頭炎の 1 例のみが陽性で、培養によっても証明できた。

疾患を肺炎例のみに絞ってその成績をみると、肺炎球菌陽性例は 21.2%、インフルエンザ菌が 18.8%、その両菌種の同時陽性例が 17.4%、そして *M. pneumoniae* 陽性例が計 22.4%、*C. pneumoniae* が 1.3 %となっていた。PCR で *M. pneumoniae* 陽性と判定された症例のうち、数例を除いて抗体価の上昇を認め、またこれら陽性例の 80%から培養によって *M. pneumoniae* が分離された。

一般細菌不明例は 18.9%認められたが、この原因菌不明例を減らすためには、ウイルス検索も同時に行っていく必要があると考えられた。

## 2) PCR への前投薬の影響

抗菌薬が既に使用されている症例に対する PCR の成績について、*M. pneumoniae* での具体例を図 5 に示す。

現実問題として、先生方からお送りいただく検体の半数例には既に抗菌薬が投与されていた。肺炎球菌やインフルエンザ菌では、耐性菌の割合が高いので、経口セフェム薬やマクロライド系薬が使用されていても、多くの場合、菌は

残存していて PCR でも陽性と判定されることが多かった。

しかし、*M. pneumoniae* 等が原因菌の場合には、図にみられるように、本菌に無効なβ-ラクタム薬や前投与なしの場合には 80%以上で PCR 陽性となるが、マクロライド薬やニューキノロン薬が使用されているとその3割程度しか PCR によっても陽性と判定できていなかった。本菌では既に耐性菌が出現し始めているが、一般的には感受性が優れているために1日でもマクロライドが服用されると起炎菌として証明できなくなるということが明らかにされた。

## D. 考察 および E. 結論

PCR 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ことは事実である。無菌的な検査材料に使用する際には、特に有用な方法である。

しかし、呼吸器感染症由来の検査材料のように、本来無菌的ではない材料を対象とした際には、PCR 陽性菌＝原因菌と単純には断定できないといった重要な問題を抱えている。

第一に、肺炎球菌やインフルエンザ菌の陽性例において、感染症例と保菌者の区別は可能かどうかということがある。乳幼児例においてはこれらの菌を高い頻度で保菌しているからである。

第二に、「提出された検査材料は適切か否か？」といったことがあげられる。抗菌薬使用前の適切な検査材料が採取されているか否かといったことである。

この問題の解決のためには、単に PCR のみ

を実施するのではなく、炎症所見がみられるか否かということが重要である。小児においては上咽頭ぬぐい液での炎症所見、成人の肺炎例では喀痰の検鏡が必須であると結論された。

化学療法においても empiric ではなく、evidence の基づく chemotherapy が本来の姿である。ここで述べたような起炎菌の網羅的迅速検査が確立されれば、耐性菌の増加を防止でき、また医療コストの面でも有用性が高いと結論された。

そのためには、ウイルスを含めて検索菌種をさらに増やしていくこと、完全自動化できること、薬剤耐性遺伝子も組み込んだシステム構築が必要であろう。これらが確立されてこそ、真の網羅的迅速検査といえる。

#### F. 研究発表（論文）

1. Hasegawa, K., K. Yamamoto, N. Chiba, S. Iwata, K. Nagai, M.R. Jacobs, PC Appelbaum, K. Sunakawa, and K. Ubukata.: Diversity of ampicillin-

resistance genes in *Haemophilus influenzae* in Japan and the United States. *Microbial Drug Resistance*, 9:39-46, **2003**

2. Ubukata, K.: Problems associated with high prevalence of multidrug-resistant bacteria in patients with community-acquired infections. *Journal Infection and Chemotherapy*, 9:285-291, **2003**
3. 生方公子 他:本邦において1998年から2000年の間に分離された *Streptococcus pneumoniae* の分子疫学. *日化療誌*, 51:60-70, **2003**
4. 諸角 美由紀, 他:M.pneumoniae の迅速検索を目的とした PCR —小児呼吸器感染症検体を用いて—. *日化療誌*, 51:289-299, **2003**

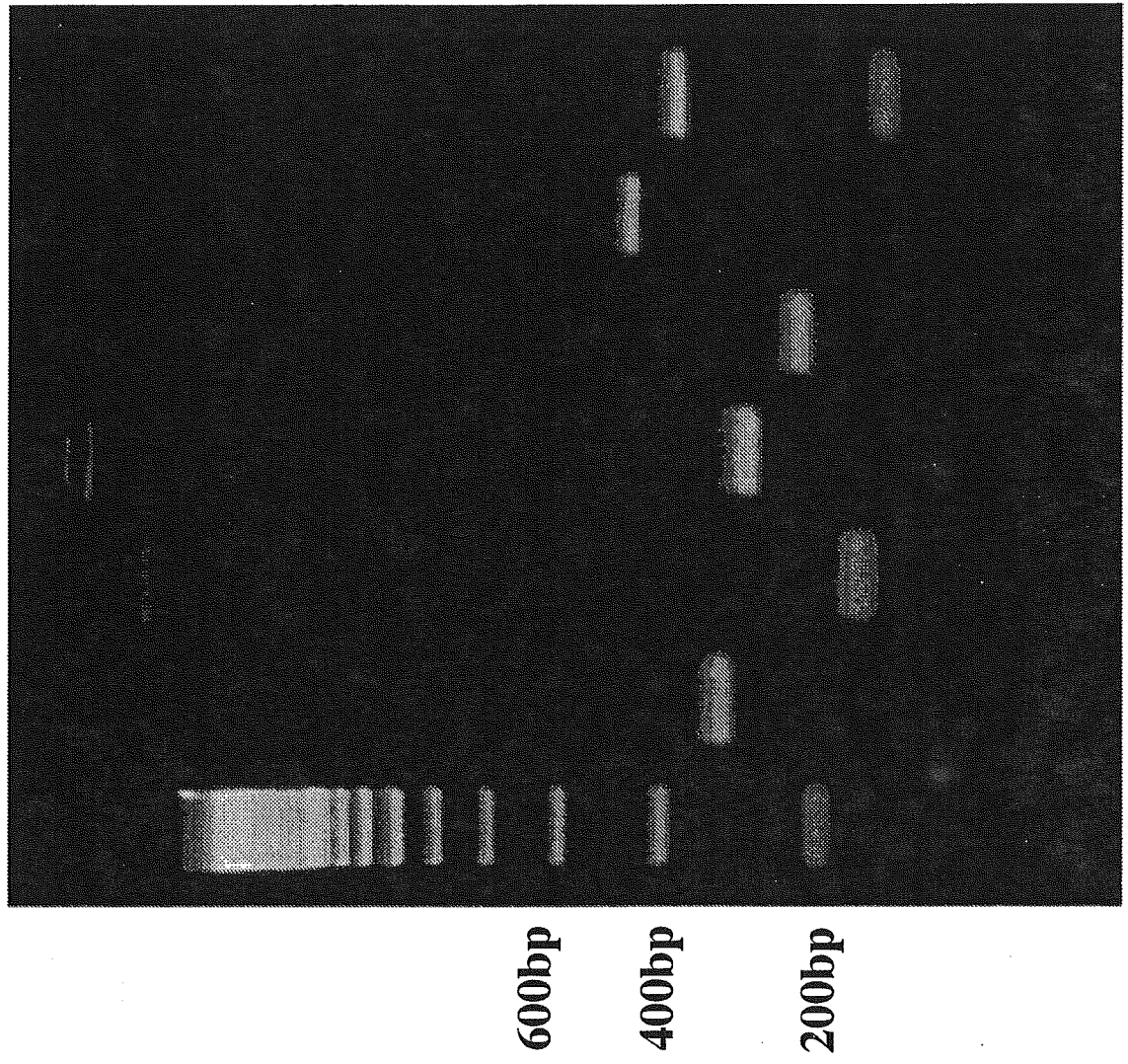
表1. 構築した6菌種・検索用primerの感度

Microorganism	CFU/tube* (30 $\mu$ l)	CFU/lysis tube (35 $\mu$ l)	CFU/sample (150 $\mu$ l)**
<i>S. pneumoniae</i>	1	18	$5.3 \times 10^2$
<i>H. influenzae</i>	2	35	$1.1 \times 10^3$
<i>S. pyogenes</i>	7	123	$3.7 \times 10^3$
<i>M. pneumoniae</i>	2	35	$1.1 \times 10^3$
<i>C. pneumoniae</i>	1	18	$5.3 \times 10^2$
<i>L. pneumophila</i>	7	123	$3.7 \times 10^3$

\*: CFU/reaction tube

\*\* : CFU values are expressed per sterile seed swab collected nasopharyngeal secretions from pediatric outpatients.

図1. 6菌種PCR後の電気泳動成績



# 図2. 検査材料を直接用いるPCRプロトコール

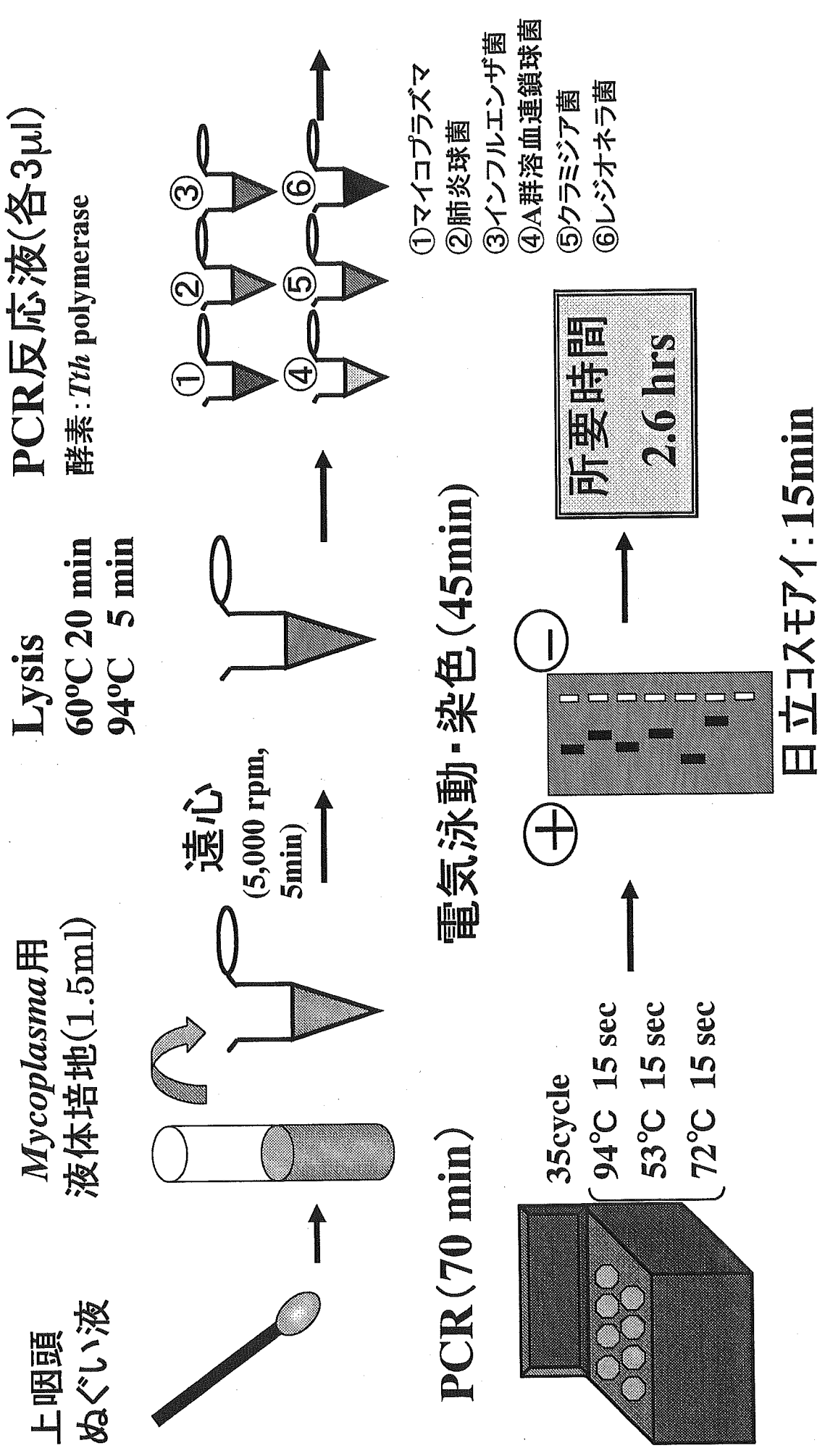


図3. 全症例における疾患の内訳 (n=1,644)

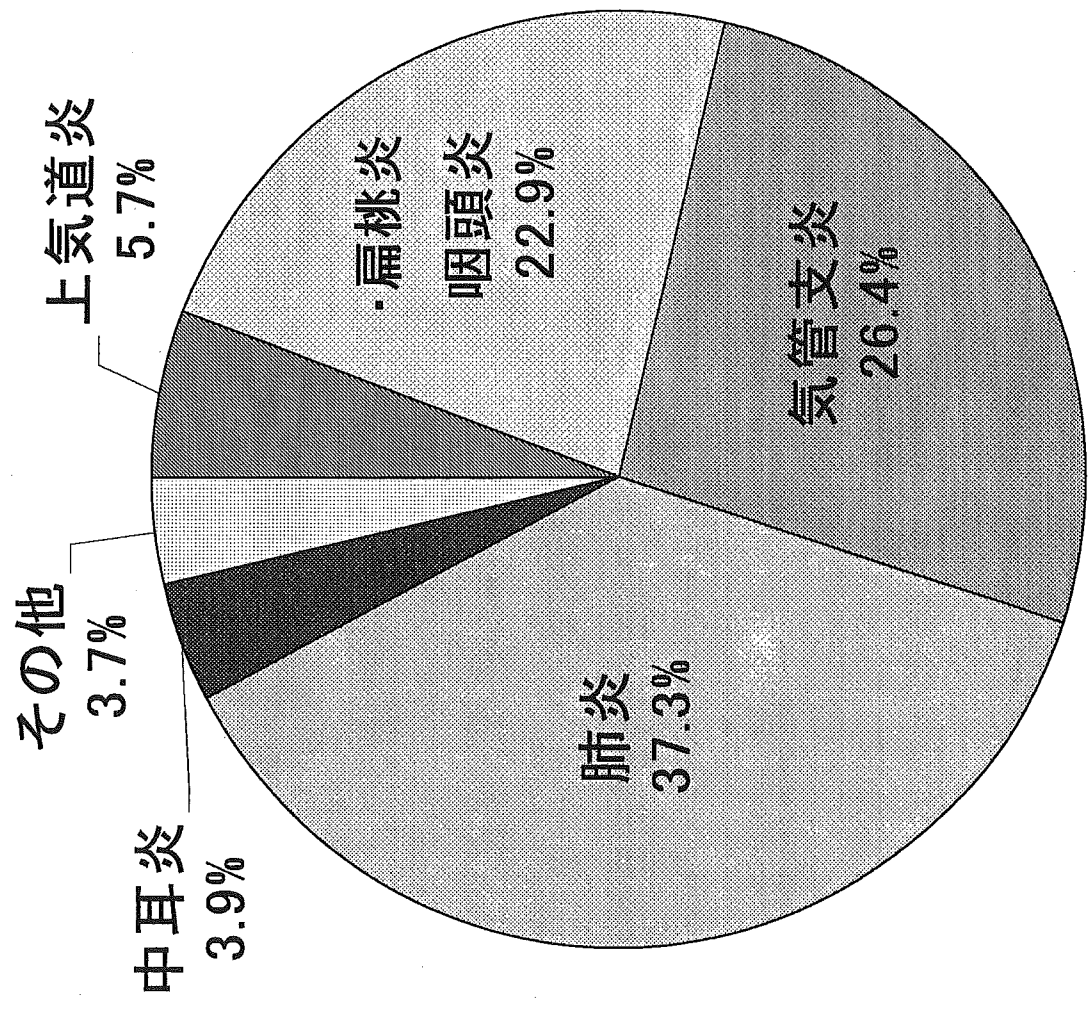


図4. 小児の疾患別にみた6菌種・PCRの陽性率

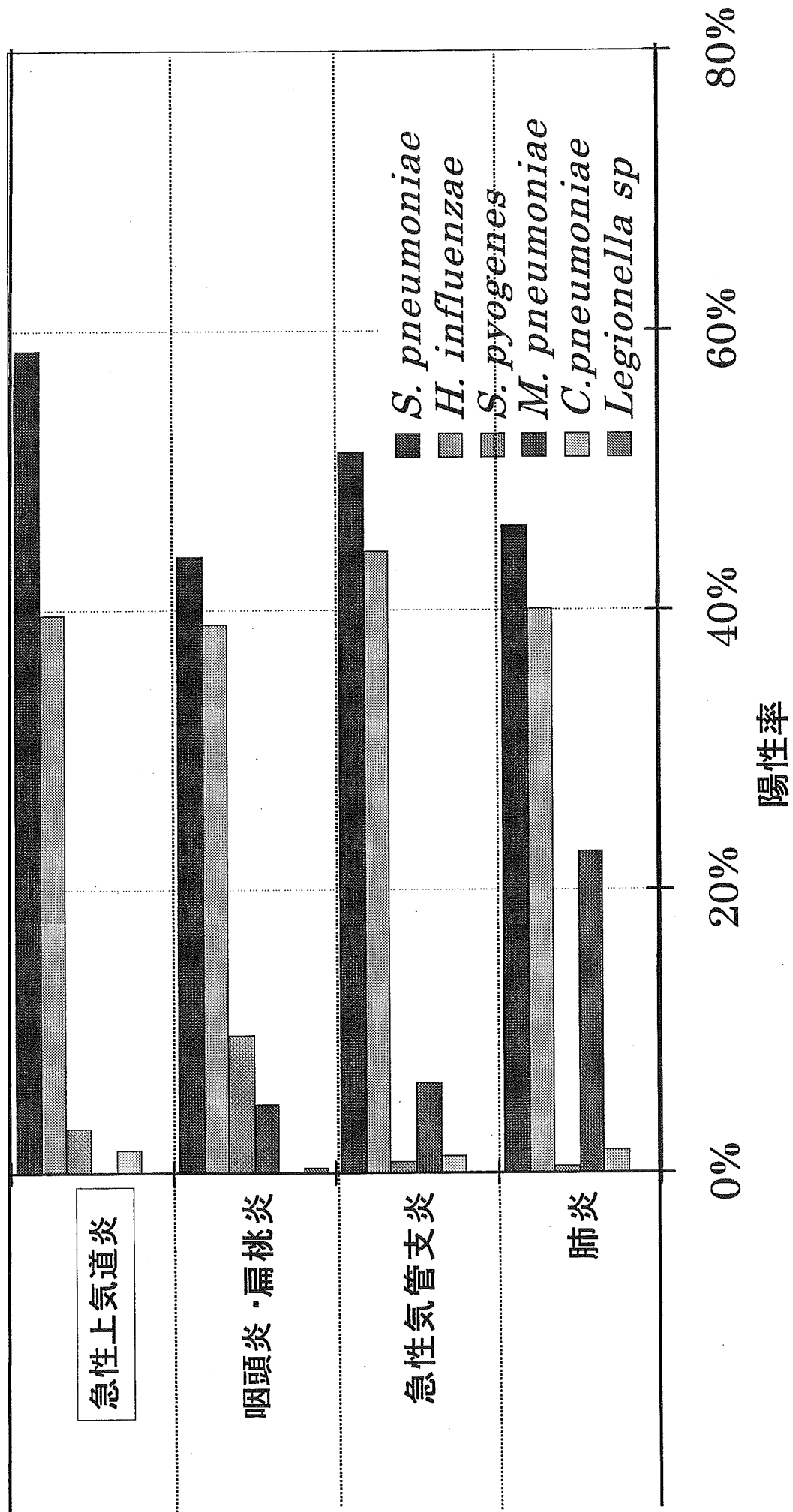
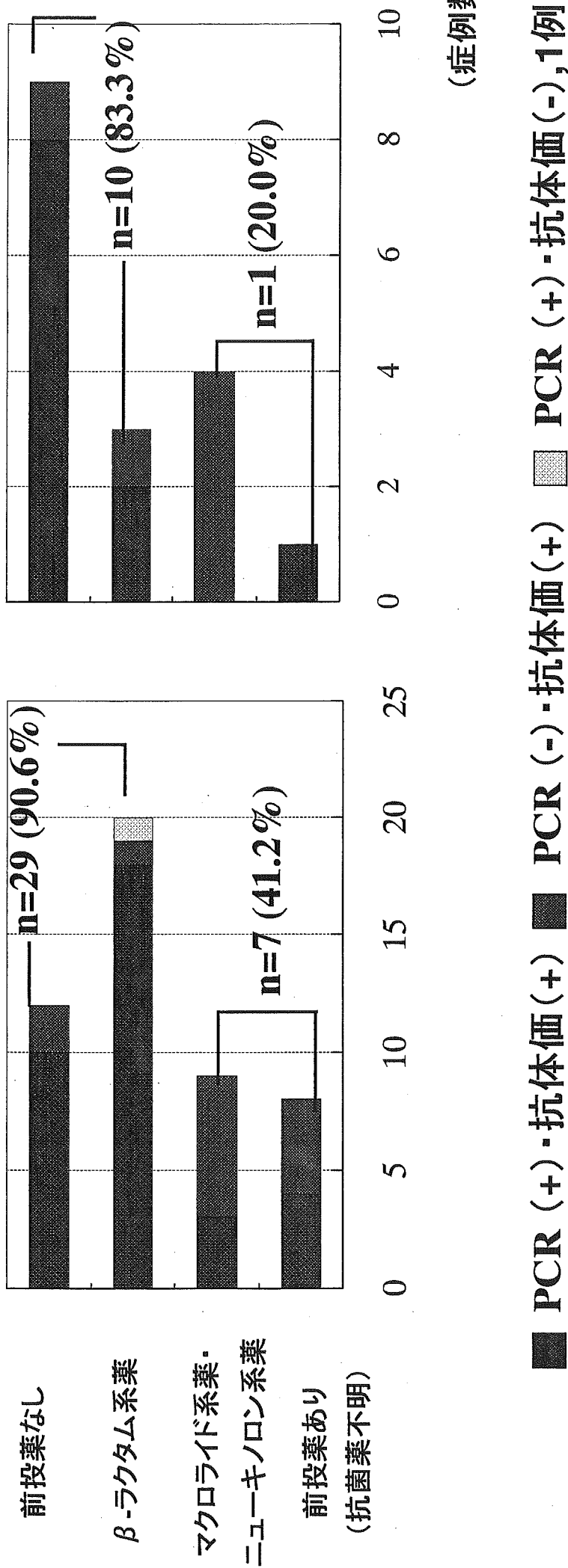




図5. PCRによる*M.pneumoniae*陽性率と前投薬および抗体価との関係(PA・CF法)

PA法 (n=49)                      CF法 (n=17)



平成 15 年度 厚生労働科学研究費補助金 新興・再興感染症研究事業

「新型の薬剤耐性菌のレファレンス並びに耐性機構の解析及び迅速・

簡便検出法に関する研究」

分担：「カルバペネム耐性菌のレファレンスと研究」報告書

平成 16 年 3 月

後藤正文

熊本大学大学院医学薬学研究部

構造機能物理化学分野

## 目次

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

## 第二章 実験方法

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

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

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

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

#### 第2項 加水分解活性の検定

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

#### 第3項 IMP-1 の定量

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

(DansylC6SH). 収率 55%.  $^1\text{H NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  1.19 (q, 2H), 1.19 (q, 2H), 1.36 (q, 2H), 1.37 (q, 2H), 1.58 (t, 1H), 2.45 (t, 2H), 2.78 (q, 2H), 2.89 (q, 2H), 2.89 (s, 6H), 3.16 (q, 2H), 4.97 (t, 1H), 5.73 (t, 1H), 7.19 (d, 1H,  $J = 7.32$  Hz), 7.52 (t, 1H,  $J = 4.28$  Hz), 7.56 (t, 1H,  $J = 8.24$  Hz), 8.24 (d, 1H,  $J = 6.10$  Hz), 8.31 (d, 1H,  $J = 8.55$  Hz), 8.54 (d, 1H,  $J = 8.54$  Hz).  $^{13}\text{C NMR}$  ( $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  20.53, 25.69, 25.88, 29.26, 29.34, 39.13, 40.45, 42.96, 45.43, 115.22, 118.77, 123.22, 128.38, 129.51, 129.67, 129.95, 130.38, 134.94, 150.06, 170.73. HRFABMS:  $m/z$  438.1843 [calcd for  $\text{C}_{21}\text{H}_{31}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}_2$  ( $M + \text{H}^+$ ) 438.1885]

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

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

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

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

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

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



(1)より

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

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

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

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

ただし、

FI：蛍光強度

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

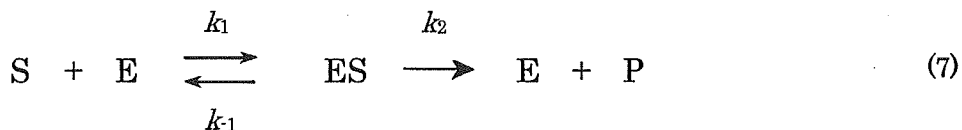
b：IMP-1 非存在下における DansylCnSH (n = 2-6) の蛍光強度

(2), (3), (4), (5) より、

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

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

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



ただし、

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

I: 阻害剤 (DansylCnSH (n = 2-6))

(9)より、

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

(8), (9)より、

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

ただし、

v: 見かけの反応速度,  $V_{\max}$ : 最大速度

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

[S]: ニトロセフィンの濃度 (100  $\mu$ M)

[I]: DansylCnSH (n = 2-6) の濃度

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

### 第1項 結晶化

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

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

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

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



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

## 第2項 X線結晶構造解析

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

Table 1. X-ray Data collection.

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

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

DansylC4SH と IMP-1 との複合体の構造は分子置換法によって決定した。2000 年に Concha 等によって報告されている *P. aeruginosa* 由来の IMP-1 (PDB file, 1DD6)<sup>27)</sup> を search model として使用した。プログラムは CCP-4 の AMoRe<sup>28)</sup>を用いた。グラフィックプログラム O<sup>29)</sup> でモデルを修正し、プログラム CNS<sup>30)</sup> で構造の精密化を行った。精密化には結晶学的に独立な 2 つのタンパク質分子が同一構造を持つという制限 (noncrystallographic symmetry, NCS) を用いて行った。また DansylC4SH の構造は新規な構造だったので、

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

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

Table 2. Refinement data.

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

### 第三章 結果と考察

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

当研究室より低分子量チオール化合物がメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) を阻害することが既に報告されている<sup>25)</sup>。このことを基にして、蛍光発色団としてダンシル基を有したチオール化合物がメタ

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

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

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

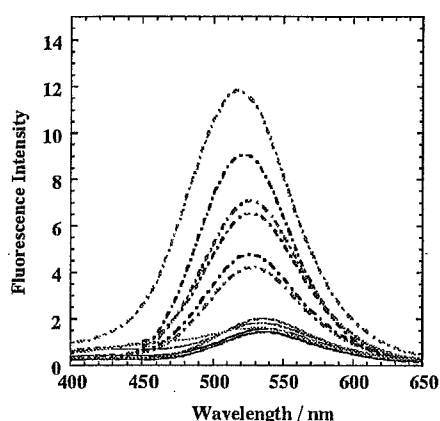


Fig. 2. Fluorescence emission spectra (excitation 340 nm) of 1  $\mu$ M Dansyl derivatives in the absence (solid line) or in the presence (dashed line) of equimolar IMP-1. Black, DansylC2SH; pink, DansylC3SH; blue, DansylC4SH; green, DansylC5SH; red, DansylC6SH; orange, DansylSH. These spectra were measured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

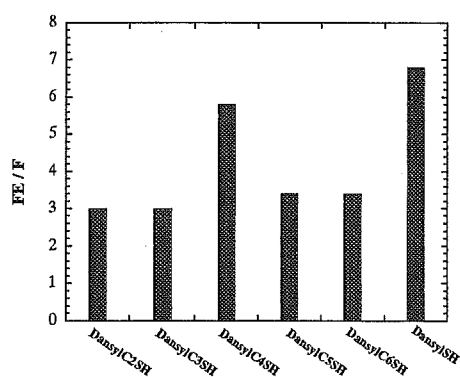


Fig. 3. Ratio of fluorescence intensity. FE is the fluorescence intensity of Dansyl derivatives in the presence of IMP-1 and F is the fluorescence intensity in the absence of IMP-1.

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

光は消光し、DansylSH の場合は蛍光強度が増大する。

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

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

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

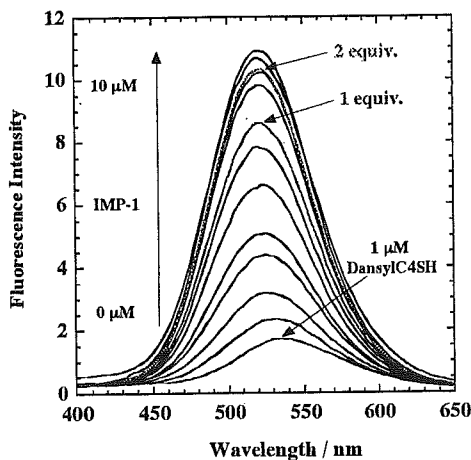


Fig. 4. Fluorescence emission spectra (excitation 340 nm) of 1  $\mu$ M DansylC4SH with increasing concentration of IMP-1 ranging from 0 to 10  $\mu$ M or 8  $\mu$ M. Blue, 1 equiv. of IMP-1; red, 2 equiv. of IMP-1. These spectra were measured at 25  $^{\circ}$ C, in 50 mM Tris-HCl Buffered solution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

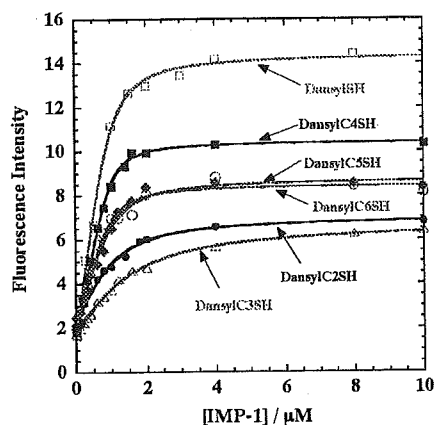


Fig. 5 Dependency of fluorescence intensity at 535 nm of Dansyl derivatives