

厚生労働科学研究費補助金（新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

新型の薬剤耐性菌の構造と立体構造に立脚した検出剤の分子設計  
並びに迅速・簡便検査法の確立

研究分担者 黒崎 博雅 （熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授）  
研究協力者 山口 佳宏 （熊本大学・環境安全センター・准教授）

## 研究要旨

本研究では *Serratia marcescens* 由来のメタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の結晶化を行い、2.0 Å の分解能で X 線結晶構造解析を行った。IMP-1 の活性中心には、結晶化溶液由来のクエン酸 1 分子が存在しており、分子中にある 3 つのカルボキシル基のうち 2 つカルボキシル基と水酸基の酸素原子が 2 つの Zn(II) イオン (Zn1 と Zn2) に結合していた。さらに Zn(II) イオンへの結合に参与しているカルボキシル基は活性中心近傍にある基質の認識に重要であると考えられている Lys224 と Asn233 に水素結合していることが分かった。残り 1 つのカルボキシル基はどのアミノ酸残基とも相互作用しておらず、フリーの状態にあった。2000 年に Concha らが報告した *Pseudomonas aeruginosa* 由来の IMP-1 の結晶構造を報告しているが、活性中心構造は異なっていることが分かった。すなわち Zn1 と Zn2 の配位構造は Concha らの構造では 4 配位 4 配位構造であるのに対し、我々の構造では 5 配位 6 配位構造をとっていた。

クエン酸が結合した IMP-1 の結晶構造を基にして、新たにクエン酸モノベンジルエステルを合成し、IMP-1 に対する阻害活性を検討した。その結果、クエン酸モノベンジルエステルの濃度 500 μM において IMP-1 の酵素活性を約 50% 阻害することが分かった。

今回明らかにしたクエン酸 - IMP-1 複合体構造は、新たな阻害様式に基づいたメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤を分子設計する上で重要な知見を与えるものと考えている。

## A. 研究目的

NDM-1 (New Delhi Metallo-β-lactamase) は 2009 年にインドから帰国したスウェーデン人からはじめて分離された。これまでのメタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) は、緑膿菌など日和見細菌から殆ど産生されていたのに対して、NDM-1 は大腸菌や肺炎桿菌から分離され、市中感染して世界的に蔓延することが危惧されている。MBL は、活性中心に Zn(II) イオンを含有し、ペニシリンからカルバペネムまでほぼ全ての β-ラクタム剤を分解する。現在臨床使用されているクラバン酸やスルバクタムなどのセリン-β-ラクタマーゼ阻害剤に対して全く感受性を示さず、臨床効果的な阻害剤がない。さらに今回の新たな NDM-1 出現もあり、薬剤耐性の化学反応機構の詳細や阻害剤開発

など分子科学からの研究が待たれている。

我々は、メタロ-β-ラクタマーゼの X 線結晶構造に基づき、MBL 阻害剤の開発を行っている。本研究では、メタロ-β-ラクタマーゼ (IMP-1) の活性中心にクエン酸が結合した結晶構造を決定し、この構造を基にクエン酸誘導体の分子設計と合成を行い、IMP-1 に対する阻害活性を評価した。

## B. 研究方法

### (1) IMP-1 の発現と精製

IMP-1 は、既に報告された方法に従って、大腸菌 BL21(DE3) で発現させ、イオンカラムクロマトグラフィーとゲル濾過カラムクロマトグラフィーによって精製した<sup>(1)</sup>。8 L の培養液から、約 100 mg の IMP-1 を精製することができた。純度は、SDS-PAGE によって確認した。

## (2) IMP-1 の結晶化

IMP-1 の結晶は、既に報告された方法に従って行った<sup>(2)</sup>。具体的には、60 mg/mL の IMP-1 (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) を蛋白質溶液とし、0.2 M 酢酸ナトリウム、PEG4000 (30% w/v) を含む 0.1 M クエン酸 - クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.0) をリザーバ溶液として IMP-1 の結晶化を蒸気拡散法によって 20 で行った。約2週間後に 0.2 mm × 0.2 mm × 0.1 mm の大きさの IMP-1 の結晶が析出した。

## (3) IMP-1 の構造解析

IMP-1 の結晶は、高エネルギー加速器研究機構にある Photon Factory (PF) の BL-5A において、クライオプロテクトなしで 100K で、X 線回折データを収集した。X 線回折データは、HKL2000 を使って解析した。

IMP-1 の構造解析は、既に報告されている IMP-1 の構造データ (PDB code; 1DD6) を使って、分子置換法で行った。分子置換法は、CCP4 ソフトウェアパッケージにある MolRep プログラムを使い、精密化は REFMAC プログラムを使った。モデリングは Coot によって行った。

## (4) クエン酸モノベンジルエステルの合成

クエン酸(無水) (15 g, 78 mmol)、ベンジルアルコール (21 g, 196 mmol)、ホウ酸 (0.5 g, 8 mmol) を混合し、室温で 4 日撹拌した。反応液に酢酸エチルエステル 100 mL と水 100 mL を加え撹拌しながら 10% NaOH 水溶液で pH 8 に調整した。分液ロートで酢酸エチルエステル層と水層を分離した後、水層を 1 M HCl 水溶液で pH 1 に調整した。塩化メチレン 100 mL で抽出操作を行い、塩化メチレン層を分離し、Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(無水) で乾燥・ろ過し、ろ液をエバポレーターで濃縮すると油状物質が得られた。これに塩化メチレン-*n*-ヘキサン溶液を加え室温で 2 日間放置すると白色のクエン酸モノベンジルエステルが固体として得られた (収量, 5 g)。

化合物の同定は <sup>1</sup>H NMR スペクトル (300 Hz, CDCl<sub>3</sub>, TMS:  $\delta$  = 12.0-9.5 (s, 1-2H), 7.42-7.30 (m, 5H), 5.14 (s, 2H),

3.06-2.87 (m, 4H) ppm) を測定して行った。得られた <sup>1</sup>H NMR スペクトルはクエン酸モノベンジルエステルの化学構造を支持した。

## (5) 加水分解測定

酵素活性の評価は、分光光度法によって行った。0.3 M NaCl を含む 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 (Tris-Buffer) 3.0 mL に酵素の最終濃度が 1 nM となるように 310 nM の IMP-1 溶液を 10  $\mu$ L 加え、30 で 5 分間インキュベートした。その後、基質の最終濃度が 100  $\mu$ M となるように 3.1 mM セファロチン水溶液を 100  $\mu$ L 加え、すばやく混合し、297 nm の吸収を 3 分間測定した。直線的な吸光度の減少から初速度を求めた。

## (6) クエン酸モノベンジルエステルによる IMP-1 阻害の検討

(5) の酵素活性評価と同様に行った。具体的には、Tris-Buffer 2.9 mL に、所定の濃度となるようにメタノールで調製したクエン酸モノベンジルエステル溶液 100  $\mu$ L と酵素の最終濃度が 1 nM となるように 310 nM の IMP-1 溶液を 10  $\mu$ L 加え、30 で 5 分間インキュベートした。その後、基質であるセファロチンを加え、297 nm の吸収を 3 分間測定した。直線的な吸光度の減少から初速度を求めた。

得られた初速度 (1 分間当たりの傾き) とクエン酸モノベンジルエステル未添加の時の初速度を比較した。

## C. 研究結果

### (1) クエン酸 - IMP-1 複合体の結晶構造

IMP-1 の結晶構造は、分解能 2.0 で解析され、空間群 *P*1、結晶格子  $a = 49.9$ ,  $b = 75.7$ ,  $c = 82.3$ ,  $\beta = 83.5$ ,  $\alpha = 75.4$ ,  $\gamma = 74.1$  であった。非対称単位に IMP-1 分子が 4 分子あった。IMP-1 の活性中心には、2 つの Zn(II) イオン (Zn1 と Zn2) と 1 つのクエン酸の電子密度を観察することができた (図 2)。精密化とモデリングによって、 $R_{\text{working}} = 0.210$ ,  $R_{\text{free}} = 0.263$  まで解析した。現在、更に精密化を行っている。

### (2) クエン酸の結合様式

クエン酸は、3つのカルボキシル基と1つの水酸基をもつ分子量 192 の化合物である。クエン酸の水酸基は Zn2 に結合していた。1つ目のカルボキシル基の一方の酸素原子は、Zn1とZn2を架橋して結合しており、もう一方の酸素原子は、Zn1とAsn233側鎖の窒素原子に結合していた。2つ目のカルボキシル基の一方の酸素原子は、Zn2とLys224側鎖の窒素原子と結合しており、もう一方の酸素原子はAsn233の主鎖窒素原子に結合していた。3つ目のカルボキシル基は、フリーの状態であった(図3,4)。

### (3)クエン酸モノベンジルエステルの合成

今回明らかにしたクエン酸 - IMP-1 複合体構造を基に、1つのクエン酸誘導体を分子設計した。クエン酸の1つのカルボキシル基はフリーの状態にあり(前述)、このカルボキシル基を化学修飾すれば未置換のクエン酸分子に比べ、よりIMP-1に強く結合すると考えた。そこで、クエン酸モノベンジルエステル(図5)を合成し、IMP-1に対する阻害活性を評価した。

クエン酸モノベンジルエステルは、ホウ酸(触媒)存在下、クエン酸とベンジルベンジルアルコールを室温で4日反応させた後、抽出操作を行うことで、1段階で合成できた。

### (4)クエン酸モノベンジルエステルによるIMP-1阻害の検討

IMP-1の結晶構造では、活性中心にクエン酸が結合していることが分かった。そこでクエン酸を阻害剤として、IMP-1のセファロチン加水分解反応溶液中に1mMとなるように加えてIMP-1に対する阻害活性を調べた。その結果、1mMのクエン酸がIMP-1反応溶液中に存在しても、IMP-1活性は阻害されないことが分かった。このことから、IMP-1のクエン酸に対する50% inhibitory concentration ( $IC_{50}$ )値は1mM以上であることが推定される。

次に、クエン酸モノベンジルエステルを阻害剤として、IMP-1のセファロチン加水分解反応溶液に1mMとなるように加え、その阻害活性

を調べた。その結果、クエン酸の時とは違い、IMP-1の加水分解速度が約70%低下することが分かった(図6)。そこでクエン酸モノベンジルエステルが500  $\mu$ Mとなるように加えたところ、阻害剤を加えない時のIMP-1活性より約50%低下することが分かった(図6)。クエン酸モノベンジルエステルが100  $\mu$ MではIMP-1活性が15%低下した(図6)。このことから、クエン酸モノベンジルエステルのIMP-1に対する阻害活性 $IC_{50}$ 値は約500  $\mu$ Mであることが分かった。

## D. 考察

IMP-1の全体構造は / サンドイッチ構造をとっており、その -シート間の広くて浅い溝の底に活性中心が存在していた(図1)。さらに活性中心には、クエン酸が1分子結合していた(図2,3)。このクエン酸はIMP-1を結晶化するときのリザーバ溶液由来であることが想定できた。2000年にConchaらはIMP-1の結晶構造を報告されている<sup>(2)</sup>。我々はConchaらの結晶化条件に従い結晶化を行った。しかし、ConchaらのIMP-1の活性中心にクエン酸は見られなかった。この原因として今回の分解能は2.0  $\text{\AA}$ であり、Conchaらは3.1  $\text{\AA}$ であったことから、結晶構造のデータが改善され、今まで見えなかったクエン酸が観察できるようになったと考えられる。

またIMP-1に対するクエン酸の結合様式において(図3,4)、3つあるクエン酸のカルボキシル基のうち、1つのカルボキシル基は、どのアミノ酸残基と結合していないフリーの状態であった。そこで、このカルボキシル基にベンゼン環を導入したクエン酸モノベンジルエステルを合成して、IMP-1に対する阻害活性の向上を目指した。IMP-1に対する阻害活性の検討において、クエン酸では $IC_{50}$ 値が1mM以上であったが、クエン酸モノベンジルエステルでは、約500  $\mu$ Mと阻害活性が向上した。

MOE(統合計算化学システム)によるIMP-1とクエン酸モノベンジルエステルのドッキングシミュレーションの結果から、2つのZn(II)イオンへのクエン酸モノベンジルエステル結合様式は結晶構造の結合様式とほぼ同一であった。さらに新たに導入したベンジル

エステル部位は、IMP-1 活性ポケットの疎水性空間を埋めるように基質の認識・取り込みに重要な働きを担っていると考えられている。Trp64 の方向へ向かっていた。この疎水性相互作用によってクエン酸よりもより強く IMP-1 に結合し、その結果として IMP-1 に対する阻害活性が高くなったものと考えられる。このことから、クエン酸をリード化合物とした IMP-1 に対する阻害剤開発が行えることが分かった。

## E. 結論

今後は分子構造の最適化を図り、IMP-1 酵素阻害活性が強い化合物の探索を行っていく予定である。さらに、 $\beta$ -ラクタム剤に対する精密な速度論解析および熱測定を行い、野生型と変異型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの遷移状態における活性化自由エネルギーを算出し、 $\beta$ -ラクタム剤とメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの加水分解反応機構を明らかにしたいと考えている。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

(1) クエン酸 - メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) 複合体の結晶構造

山口佳宏、荒川宜親、黒崎博雅

第 42 回薬剤耐性菌研究会

(2013/10/17-18, 熱海)

(2) IMP-2 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの結晶化と X 線結晶構造解析

山口佳宏、黒崎博雅

第 25 回日本臨床微生物学会総

(2014/2/1-2, 名古屋)

(3) メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (IMP-1) の活性中心に結合したクエン酸の結合様式

山口佳宏、荒川宜親、黒崎博雅

日本薬学会第 134 年 (発表予定)

(2014/03/27-30, 熊本)

## H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 なし
2. 実用新案登録 なし
3. その他

## I. 参考文献

- (1) W. Jin, Y. Arakawa, H. Yasuzawa, T. Taki, R. Hashiguchi, K. Mitsutani, A. Shoga, Y. Yamaguchi, H. Kurosaki, N. Shibata, M. Ohta, M. Goto, Biol. Pharm. Bull., 27(6), 851-856 (2004)
- (2) N. O. Concha, C. A. Janson, P. Rowling, S. Pearson, C. A. Cheever, B. P. Clarke, C. Lewis, M. Galleni, J.-M. Frère, D. J. Payne, J. H. Bateson, S. S. Abdel-Meguid, Biochemistry, 39(15), 4288-4298 (2000)

