

新たな薬剤耐性菌の耐性機構の解明及び薬剤耐性菌の  
サーベイランスに関する研究  
分担課題 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 120 位のアスパラギン酸をグルタミン酸に置換した変異体(D120E)の citrate 複合体の結晶化を行い、X線結晶構造解析(1.9 Åの分解能)によって立体構造を決定した。IMP-1-citrate 複合体の結晶構造との比較から、120 位の変異に伴い、活性中心に存在する 2つの Zn(II)イオン(Zn1 と Zn2)の内、Zn1 周りの配位構造が大きく異なっていることがわかった。興味深いことに、citrate は酵素と 1:1 で活性中心の 2つの Zn(II)イオンに結合し、その配位様式は IMP-1-citrate 複合体や VIM-4-citrate 複合体と同じであることが明らかとなった。

### A. 研究目的

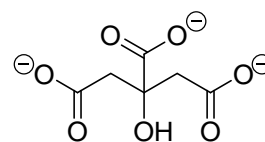
IMP-1、VIM-1、NDM-1 をはじめとするメタロ-β-ラクタマーゼを産生する薬剤耐性菌が日本はもとより、世界各国の医療施設から分離され深刻な問題になっている。メタロ-β-ラクタマーゼはほとんど全てのβ-ラクタム剤を分解し不活化する酵素である。この酵素はセリン型β-ラクタマーゼ阻害剤であるスルバクタムやクラブラン酸には無効であり、現在臨床で有効な阻害剤はない。

本研究では、種々のメタロ-β-ラクタマーゼの構造機能解析を通して、基質の認識および取り込み機構を解明すると共に、それらの立体構造に基づいたメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤・検出剤の開発を行っている。

以前、我々は全てのメタロ-β-ラクタマーゼの活性中心に保存されている 120 位のアスパラギン酸(Asp120)の役割を明らかにするために、IMP-1 メタロ-β-ラクタマーゼにおいてグルタミン酸に置換した D120E を調製した [J. Biol. Chem. 280(21), 20824-20832 (2005)]。野生型 IMP-1 との比

較から、Asp120 は活性中心の Zn(II)イオンに配位する H<sub>2</sub>O または OH<sup>-</sup>イオンがβ-ラクタム剤のβ-ラクタム環のカルボニル炭素へ求核攻撃できるように最適な位置に配置させる役割を担っていることを明らかにした。

本年度は D120E のグルタミン酸への変異に伴う Zn(II)配位子と citrate(Figure 1)の Zn(II)結合への影響を調べるために、D120E の citrate 複合体の結晶化と X線結晶構造解析を行い、我々が昨年度決定した IMP-1-citrate 複合体と Lassaux 等が報告した VIM-4-citrate 複合体 [Antimicrob. Agents Chemother. 55, 1248-1255 (2011)] の結晶構造と比較した。



Citrate

Figure 1. Chemical structure of citrate.

## B. 研究方法

### (1) D120E の発現と精製

D120E は、既に報告された方法[J. Biol. Chem. 280(21), 20824-20832 (2005)]に従って、大腸菌 BL21(DE3)で発現させ、イオン交換カラムクロマトグラフィー[HiTrap SP-HP]と疎水性相互作用カラムクロマトグラフィー[HiTrap Phenyl HP]、ゲル濾過カラムクロマトグラフィー[HiLoad 16/600 Superdex 75 pg]によって精製した。カラムクロマトグラフィーにおいて、緩衝液はすべて 20 mM Tris-HCl, pH 7.4 を基本として用いた。8 L の培養液から、約 100 mg の D120E を得た。酵素の純度は、SDS-PAGE によって確認した (95%以上)。

### (2) D120E の結晶化

D120E の結晶は、IMP-1-citrate 複合体の結晶化条件に従って行った。60 mg/mL の D120E (20 mM HEPES-NaOH, pH 7.5) をタンパク質溶液とし、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 D120E の結晶化を蒸気拡散法によって 20 で行った。D120E 結晶は、あらかじめ IMP-1 の結晶を調製し、その結晶を粉々に砕き希釈した溶液を seed として析出させた (Micro-seeding 法)。seeding してから数日後に結晶が析出した。

### (3) D120E-citrate 複合体の X 線結晶構造解析

D120E-citrate 複合体の結晶は、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、クライオプロテクタントなしで 100 K 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。

D120E-citrate 複合体の構造解析は、IMP-1 の原子座標 (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。

## C. 研究結果と考察

### (1) D120E - citrate 複合体の結晶構造

Citrate の結晶構造は、1.9 の分解能で解析され、空間群  $P1$ 、結晶格子  $a = 47.7$ 、 $b = 72.9$ 、 $c = 82.2$ 、 $\alpha = 84.8^\circ$ 、 $\beta = 75.6^\circ$ 、 $\gamma = 73.7^\circ$  であった。非対称単位中に D120E 分子は 4 分子 (分子 A ~ D) 存在していた。D120E の分子 A から D の各々の活性中心には、2 つの Zn(II) イオン (Zn1 と Zn2) と 1 分子の citrate が存在した。精密化とモデリングによって現時点での、 $R_{\text{working}}$  と  $R_{\text{free}}$  値はそれぞれ 0.163 と 0.202 まで解析した。

### (2) D120E - citrate 複合体と IMP-1 - citrate 複合体の全体構造の比較

我々は平成 25 年度に IMP-1 - citrate 複合体の結晶構造を 2.0 の分解能で決定した。IMP-1 - citrate 複合体においても非対称単位中に IMP-1 分子は 4 分子 (分子 A ~ D) 存在していた。IMP-1 - citrate 複合体では分子 A から D の C 炭素を重ね合わせた時の root mean square difference (rmsd) は 0.20 から 0.26 であった。一方、D120E - citrate 複合体では 0.19 から 0.26 であった。これらの結果、IMP-1 - citrate 複合体と D120E - citrate 複合体の各々の分子 A ~ D はほぼ同一の全体構造を取っていることがわかった (Figure 2)。そのため、これ以降 IMP-1 および D120E それぞれの分子 B について議論する。

IMP-1 - citrate 複合体と D120E - citrate 複合体の分子 B 同士の C 炭素 [Leu39 - Glu296] を重ね合わせた時の rmsd は 0.23 であり、全体構造はほぼ同じであることがわかった。

IMP-1 - citrate 複合体と D120E - citrate 複合体は共にメタロ- -ラクタマーゼに特徴的な / サンドイッチ構造を有し、closed 構造を形成していた (Figure 3a)。この closed 構造は choncha 等が報告した IMP-1 - メルカプトカルボン

酸阻害剤 (see chemical structure in Figure 4) 複合体 (Figure 3b) [Biochemistry 39(15), 4288-4298 (2000)] や我々が決定した IMP-2 の構造に類似していることがわかった[Biol. Pharm. Bull. 38(1), 96-101 (2015)]. IMP-1 - citrate 複合体と D120E - citrate 複合体構造の重ね合わせから、活性中心にある citrate 分子はほぼ同じ位置に存在していた (Figure 2)。

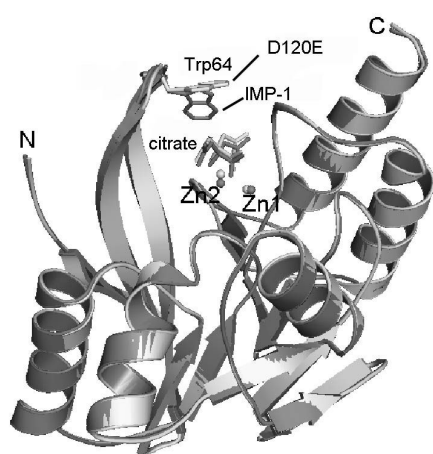


Figure 2. The superimposed complex structures of IMP-1 and D120E with citrate. Molecule B of each citric complex is only depicted. Zinc(II) ions are represented as spheres. Citrate and Trp64 in IMP-1 and D120E are shown as magenta and yellow sticks, respectively. The figure was prepared with the PyMol software (<http://pymol.sourceforge.net/>).

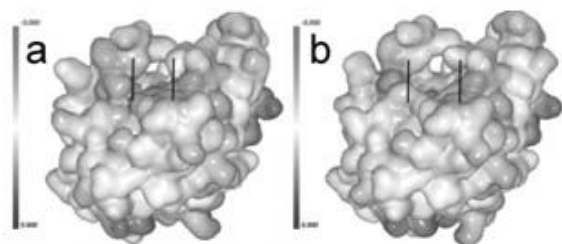
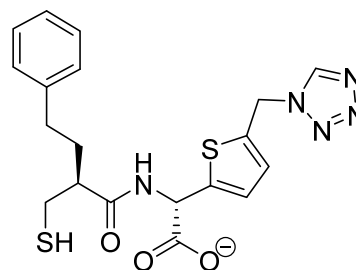


Figure 3. Comparison of the molecular surfaces of (a) IMP-1-citrate complex and (b) IMP-1-mercaptocarboxylate inhibitor complex (PDB accession code: 1DD6). Citrate and a mercaptocarboxylate inhibitor are omitted from the active site. Zn(II) atoms are shown as spheres. The figure was prepared with MolFeat software (FiatLux Corporation).



Mercaptocarboxylate inhibitor: 2-[5-(1-tetrazolylmethyl)thien-3-yl]-N-[2-(mercaptomethyl)-4-(phenylbutyryl)glycinate]

Figure 4. Chemical structure of mercaptocarboxylate inhibitor, 2-[5-(1-tetrazolylmethyl)thien-3-yl]-N-[2-(mercaptomethyl)-4-(phenylbutyryl)glycinate] [Biochemistry 39(15), 4288-4298 (2000)].

### (3) D120E - citrate 複合体と IMP-1 - citrate 複合体の活性中心構造の比較

Zn(II) - ligand の結合距離と結合角を Table 1 に示す。D120E - citrate 複合体と IMP-1 - citrate 複合体はいずれも活性中心に 2 つの Zn(II) [Zn1 と Zn2 とする] を有するが、Zn1 回りの配位構造に大きな違いがみられた。IMP-1 - citrate 複合体の Zn1 回りは tetrahedral 構造 [His116, His118, His196, citrate の C00<sup>-</sup>基の酸素原子が Zn1 に配位] を取っていた (Figure 5a)。一方、D120E - citrate 複合体の Zn1 回りは、His119, His196, citrate の C00<sup>-</sup>基の酸素原子と Glu120 の C00<sup>-</sup>基の酸素原子がエクアトリアル平面を形成し、His116 がアクシャル位から Zn1 に配位した square-pyramidal 構造を取っていた (Figure 5b)。この配位構造の違いは Glu120 の C00<sup>-</sup>基が 2 座配位子として Zn1 と Zn2 に結合することによって引き起こされたと考えられる。

D120E - citrate 複合体と IMP-1 - citrate 複合体の Zn2 回りはいずれも octahedral 構造 [Asp120 (または Glu120), Cys221, His263 と citrate の脱プロトン化した水酸基の酸素原子と 2 つの C00<sup>-</sup>基の酸素原子] を形成していた。ここで注目すべきことは、Asp120 から Glu120 へ

の変異に伴う構造変化にも関わらず、citrate の Zn(II)への結合様式は同じであるという点である。

Table 1. Zinc(II)-ligand distances (Å) of IMP-1 and D120E in complexed with citrate

		IMP-1	D120E
Zn(II)-ligand		distance <sup>a</sup>	
Zn1	His116NE2	2.0	2.1
	His118ND1	2.1	2.1
	His196NE2	2.0	2.1
	Glu120OE1		2.0
	OB1	2.1	2.1
(citrate carboxylate)			
Zn2	Asp120OD2	2.0	
	Glu120OE2		2.1
	Cys221SG	2.5	2.6
	His263NE2	2.0	2.0
	OH	2.1	1.8
	(citrate hydroxyl)		
	OA1	2.3	2.2
(citrate carboxylate)			
	OB1	2.6	2.4
(citrate carboxylate)			
Zn1	Zn2	3.6	3.7

<sup>a</sup>The distances of Zn(II)-ligand (Å) for the citrate complexes of IMP-1 and D120E are quoted for molecule B. The average ligand-Zn(II)-ligand angles for molecule B in the citrate complexes of IMP-1 are 109° for Zn1 and 89° for Zn2, whereas those for molecule B in the citrate complexes of D120E are 95° for Zn1 and 89° for Zn2.

さらに、citrate の3つある COO<sup>-</sup>基の2つは隣接のアミノ酸残基(Lys221 と Asn223)と水素結合を形成し、残り1つはフリーの状態にあった。

#### (4) VIM-4 - citrate 複合体構造と IMP-1 - citrate 複合体構造の比較

Lassaux 等は VIM-4 - citrate 複合体の X 線結晶構造 [1.9 分解能, Antimicrob. Agents Chemother. 55(3), 1248-1255 (2011)]を報告している。VIM-4 も IMP-1 や D120E 同様に / 構造を形成している。IMP-1 とのアミノ酸一次配列相同性は 29% とかなり低いが、2つの Zn(II)[Zn1 と Zn2] に配位するアミノ酸残基は保存されている。Zn1 と Zn2 回りはそれぞれ tetrahedral と octahedral 構造を形成し(Figure 6)、IMP-1 - citrate 複合体と同じであった(Figure 5a)。

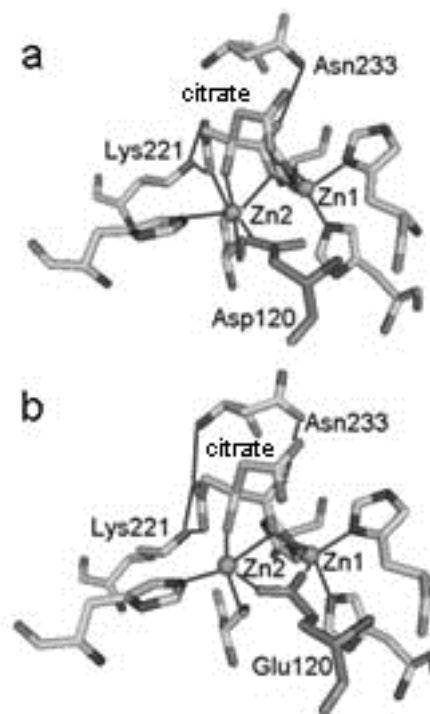


Figure 5. Active sites of (a) IMP-1 and (b) D120E in complex with citric acid. Molecule B of each citrate complex is only depicted. Zn(II) atoms are shown as orange spheres. His116, His118, His196, Lys 224, Asn233, His263, Asp120, and Cys221 residues and citrate are represented as sticks. The figure was prepared with PyMol software (<http://pymol.sourceforge.net/>).

Citrateの3つのCOO<sup>-</sup>基は隣接のPhen62, Tyr67, Arg228 と Asn233 と疎水性相互作用ならびに水素結合している。この点が IMP-1 - citrate 複合体や D120E - citrate 複合体

と大きく異なっている。

以前、我々は VIM-2 - 阻害剤複合体の X 線結晶構造を報告した[J. Med. Chem. 50, 6647-6653 (2007)]。野生型 VIM-2 構造 [Garcia-Saez et al. J. Mol. Biol. 375, 604-611 (2008)] との比較から、Arg228 と Asn233 残は基質または阻害剤の認識と取り込みに重要な働きを担っていることを明らかにした。IMP-1 - citrate 複合体や D120E - citrate 複合体では、citrate は Lys221 と Asn233 と水素結合しているが、VIM-4 では 221 位は His に置き換わっている。従って VIM-4 の His221 の側鎖は IMP-1 や D120E の Lys221 に比べ短いため、活性中心に結合している citrate の C00<sup>-</sup>基と結合できないことがわかった。そのため、VIM-4 の Asn233 残基が IMP-1 や D120E の Lys221 の代わりに基質または阻害剤の認識・取り込みの役割を担っていることが明らかとなった。

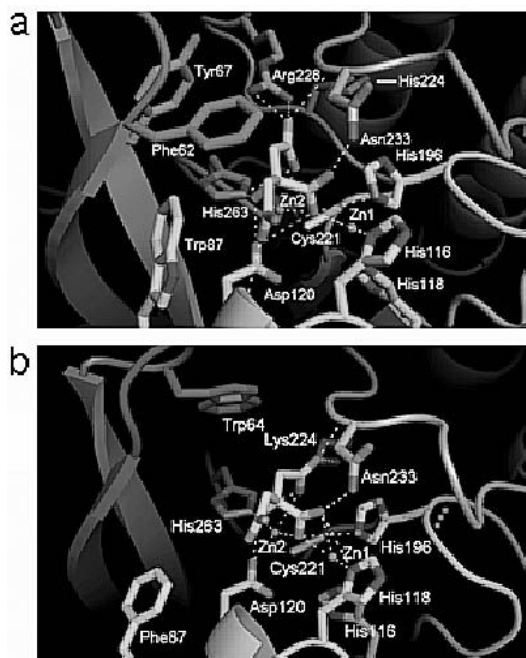


Figure 6. Active site comparisons of (a) VIM-4 and (b) IMP-1 (complexed with citrate). Zn(II) atoms are shown as spheres. The figure was prepared with PyMol software (<http://pymol.sourceforge.net/>).

#### D. 結論

我々は IMP-1 の 120 位のアスパラギン酸

をグルタミン酸に置換した変異体 D120E の citrate 複合体の X 線結晶構造を 1.9 Å の分解能で決定した。IMP-1-citrate 複合体の結晶構造の比較から、アスパラギン酸とグルタミン酸では活性中心の Zn(II)イオンの配位構造が異なっていることがわかった。しかしながら、IMP-1 - ,D120E - ,VIM-4 - citrate 複合体においても、citrate の Zn(II)への配位様式は全く同じであることがわかった。

本研究の成果は citrate のような polycarboxylate 化合物は全てのメタロ-ラクタマーゼに有効な阻害剤のリード化合物になり得ると考えられる。

#### E. 健康危険情報

該当なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Yamaguchi Y, Matsueda S, Matsunaga K, Takashio N, Toma-Fukai S, Yamagata Y, Shibata N, Wachino J, Shibayama K, Arakawa Y, Kurosaki H. Crystal structure of IMP-2 metallo-β-lactamase from *Acinetobacter* spp. Biol. Pharm. Bull. 38(1), 96-101 (2015).

##### 2. 学会発表

1) Crystal structure of IMP-2 metallo-β-lactamase from *Acinetobacter* spp.

Hiromasa Kurosaki, Yoshihiro Yamaguchi, Sachiko Toma-Fukai, Yuriko Yamagata, Naohiro Shibata, Jun-ichi Wachino, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa

第 13 回あわじしま感染症・免疫フォーラム in 奈良(2014/09/23-36)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし