

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、*Citrobacter freundii* 由来の KHM-1、*Acinetobacter* spp. 由来の IMP-2 および *Serratia marcescens* 由来の IMP-1 とその 120 位のアスパラギン酸をグルタミン酸に置き換えた変異体(D120E)の citrate 複合体、計 4 種類のメトロ- β -ラクタマーゼの結晶構造を決定した。これらの結晶構造の比較から、基質認識と取り込みに重要であると考えられているループ 1 の可動性は、68 位のアミノ酸の変異によって大きく変化することがわかった。KHM-1 と IMP-1 の活性ポケットは KHM-1 の方が IMP-1 よりも広いことがわかった。このため、KHM-1 はセフトジジムのような嵩高い置換基を持った β -ラクタム剤を活性中心ポケットに取り込み易くなり、セフトジジムをより加水分解し易くなっていることがわかった。さらに、本研究では citrate 骨格をもつ化合物(citrate モノ-ベンジルエステル)が IMP-1 のみならず全てのメトロ- β -ラクタマーゼに対する阻害剤のリード化合物となり得ることを見出した。

A. 研究目的

カルバペネム系 β -ラクタム剤をはじめほとんど全ての β -ラクタム剤に耐性を持ち、さらに既存の β -ラクタマーゼ阻害剤に対し感受性を持たない薬剤耐性菌の単離が相次いでいる。その原因の一つにメトロ- β -ラクタマーゼの産生が挙げられている。

メトロ- β -ラクタマーゼの多くは、それらの遺伝子が伝達性プラスミド上に存在することから、菌種を越えた伝播が可能であり世界的な蔓延が進みつつある。

そこで本研究では、臨床株から単離された種々のメトロ- β -ラクタマーゼの構造機能解析を行い、基質取り込みならびに β -ラクタム加水分解機構を明らかにすることを第一の目標とした。さらに、メトロ- β -ラクタマーゼの立体構造に基づいた臨床で使用できるメトロ- β -ラクタマーゼ阻害剤となりうるリード化合物の探索を第二の目標とし、平成 24 年度から平成 26 年度までの

3 年間研究を行った。

B. 研究方法

(1) KHM-1 遺伝子 (bla_{KHM-1}) のクローニング

KHM-1 遺伝子 (bla_{KHM-1}) は pET28a ベクターにサブクローニング (KHM-1/pET28a) した。

(2) KHM-1, IMP-2 と IMP-1 およびその 120 位変異体(D120E)の培養と精製

KHM-1, IMP-2, IMP-1 および D120E の培養・精製は、我々が既に報告した方法に従って行った[Biol. Pharm. Bull. 27(6), 851-856 (2004); J. Biol. Chem. 28(21), 20824-20832 (2005)]。

(3) KHM-1 の結晶化

5 mg/mL の KHM-1 酵素溶液 (20 mM HEPES-NaOH (pH 7.5)) とリザーバー溶液 (20

mM BisTris-HCl (pH 6.5), 0.1 M ammonium sulfate, 5 mM zinc(II) nitrate, 30(w/v)% PEG 4000)を用い、20 で結晶化を行うと約 1 ヶ月後に大きく厚みのある透明な結晶が析出した。

(4) IMP-2 および IMP-1-citrate 複合体と D120E-複合体の結晶化

IMP-2 および IMP-1-citrate 複合体と D120E-複合体それぞれの結晶は、Concha 等の方法に従って行った[Biochemistry 39(15), 4288-4298 (2000)]。一例を示すと、IMP-1-citrate 複合体では 60 mg/mL の IMP-1(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 IMP-1 の結晶化を蒸気拡散法によって 20 で行った。約2週間後に結晶が析出した。

(5) KHM-1, IMP-2 および IMP-1-citrate 複合体と D120E-citrate 複合体の X 線結晶構造解析

KHM-1、IMP-1-citrate 複合体および 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。

IMP-2 の結晶は熊本大学薬学部附属創薬研究センター機器分析施設にある Rigaku R-AXIS VII 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、CrystalClear (Rigaku Corporation)を使って解析した。

KHM-1、IMP-2、IMP-1-citrate 複合体および 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。

(6) Citrate モノ-ベンジルエステルの合成
Citrate モノベンジルエステルの合成は Altenbach 等の方法に従って行った [WO/2013/057110 (2013)]。

(7) Citrate モノ-ベンジルエステルによる IMP-1 阻害の検討

20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4, 0.3 M NaCl) 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 citrate モノ-ベンジルエステル溶液 100 μ 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 μ 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、290 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. 研究結果と考察

(1) KHM-1, IMP-2 および IMP-1-複合体とその 120 位変異体(D120E)-複合体の X 線結晶構造解析

KHM-1, IMP-2 および IMP-1-citrate 複合体と D120E-citrate 複合体はそれぞれ 2.0, 2.3, 2.0, 1.9 の分解能で回折データを収集した。

(2) KHM-1 と IMP-1 の構造比較

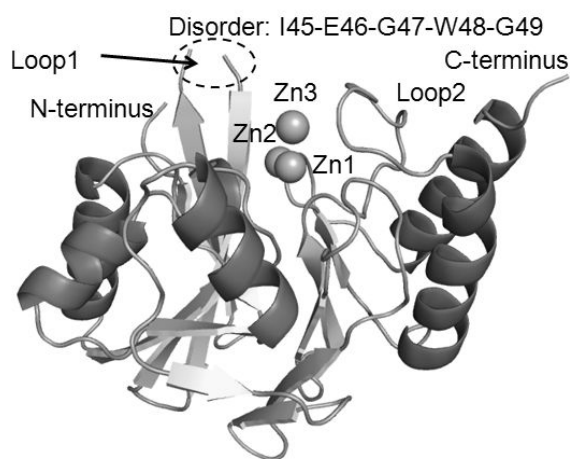
決定した 4 種類の全体構造はいずれもメタロ- -ラクタマーゼに特徴的な /モチーフ構造をとっていた。

決定した KHM-1(図 1A)と IMP-1(図 1B)の比較から、KHM-1 は IMP-1 の活性中心ポケットがやや広がっていることがわかった。KHM-1 のセフトジジムに対する速度論的パラメーターは $K_m = 8 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 118 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.5 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ 、一方、IMP-1 のそらは、 $K_m = 44 \mu\text{M}$, $k_{\text{cat}} = 8 \text{ s}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 1.8 \times 10^6 \text{ M}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ であると報告されている [Antimicrob. Agents Chemother. 52(11),

4194-4197 (2008)].

KHM-1 のセフトラジジムに対する結合親和性の指標となる K_m 値が IMP-1 よりも約 1/5 倍になっており、KHM-1 は IMP-1 に比べ高い置換基をもつセフトラジジムと結合し易くなっている。結晶構造の結果はこの速度論的パラメーターの結果をうまく説明できることがわかった。

(A)



(B)

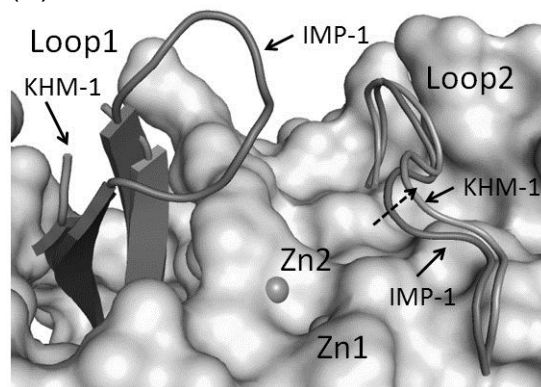


Figure 1. (A) Overall structure of KHM-1 metallo- β -lactamase and (B) comparison of the active pocket between KHM-1 and IMP-1.

(2) IMP-1 と IMP-2 の構造比較

IMP-1 と IMP-2 のアミノ酸配列相同性は 85% である。60 から 66 位のアミン残基 (EVNGWGV) は IMP-1 と IMP-2 とともに共通であり、これらのアミノ酸残基は基質・取り込みに重要な可動性ループ(ループ 1 と略す)を形成している。しかしながら、ループ 1 に近傍にある 68 位のアミノ酸残基は IMP-1 ではプロリン、IMP-2 ではセリンに置換し

ている。我々は IMP-1 と IMP-2 の構造の比較から、68 位の変異がループ 1 の可動性に大きく影響を与えていることを明らかにした(図 2)。興味深いことに、基質(β -ラクタム剤)や阻害剤がない場合、IMP-1 のループ 1 は必ず open 構造を取っているのに対し、IMP-2 では IMP-1 と異なり open 構造と closed 構造のうちどちらかの構造をとり得ることがわかった。

以上の結果から、IMP-2 のループ 1 は IMP-1 のそれよりもフレキシブルな構造であるが示唆された。

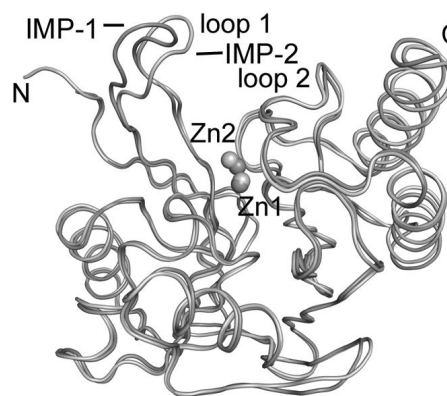


Figure 2. Superposition of IMP-1 and IMP-2 structures.

(3) IMP-1-citrate 複合体とその 120 位変異体 (D120E)-citrate 複合体並びに VIM-4-citrate 複合体の構造比較

IMP-1-citrate 複合体とその 120 位変異体 (D120E)-citrate 複合体の全体構造は 120 位の置換によらず、ほぼ同一構造を形成していた。両者の citrate 複合体構造は活性中心に 2 つの Zn(II) イオン (Zn1 と Zn2, 前述) を有する。しかし、IMP-1 では Zn1, Zn2 の配位構造は 4 配位と 6 配位、一方、D120E は 5 配位と 6 配位で大きくことなっていることがわかった。

ここで注目すべきことは、citrate は 120 位のアミノ酸残基の置換に係わらず、同一の配位様式で活性中心の Zn(II) に結合していた(図 3)。

Lassaux 等は VIM-4 - citrate 複合体の X 線結晶構造 [1.9 Å 分解能, Antimicrob.

Agents Chemother. 55(3), 1248-1255 (2011); IMP-1 とのアミノ酸一次配列相同性は 29%]を報告しているが、citrate の 2 つの Zn(II)イオンへの配位様式も同様であることがわかった。

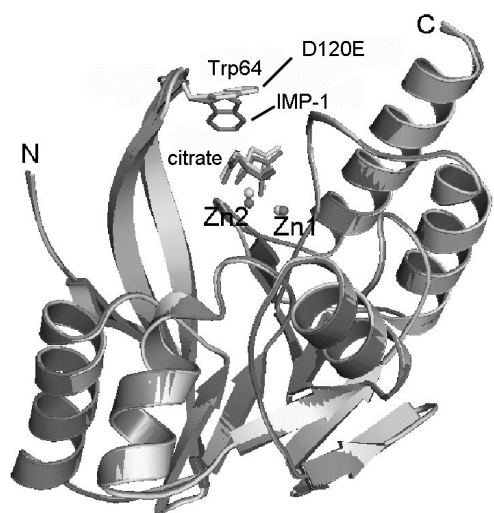


Figure 3. The superimposed complex structures of IMP-1 and D120E with citrate.

(4) Citrate 骨格を有するメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤のリード化合物の探索

我々がこれまでに明らかにしてきたメタロ-β-ラクタマーゼの構造を基に citrate 骨格を有するメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤の開発を行った。

設計・合成した citrate-モノベンジルエステル(図4)の IMP-1 に対する阻害活性(IC₅₀ 値)は約 500 μM であることがわかった。ここで、親化合物である citrate は IMP-1 を全く阻害しなことがわかった。

Concha 等が報告した IMP-1 -メルカプトカルボン酸阻害剤複合体 [Biochemistry 39(15), 4288-4298 (2000); PDB code, 1dd6]の原子座標を使って citrate モノベンジルエステルと IMP-1 のドッキングシミュレーションを行った(図5)。この結果から、citrate-モノベンジルエステルのフェニル基は活性中心付近にある疎水性 S1 ポケットに入り込み安定化していることがわかった。この結果から、疎水性相互作用により親水性化合物である citrate よりも IMP-1 を強く阻害することが明

らかとなった。

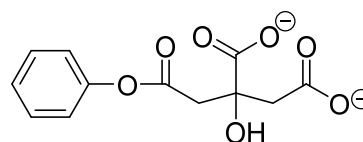


Figure 4. Chemical structure of citrate mono-benzyl ester.

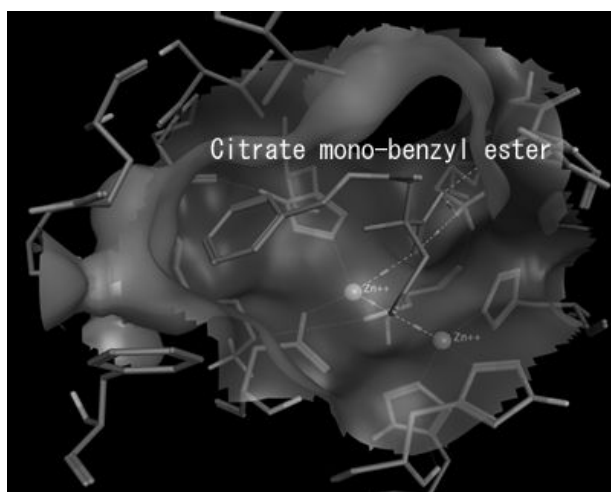


Figure 5. Docking of citrate mono-benzyl ester in IMP-1.

D. 結論

我々は3年間の研究で、4つのメタロ-β-ラクタマーゼのX線結晶構造を決定した。これらの構造比較から、68位のアミノ酸残基の意義を明らかにした。さらに決定したメタロ-β-ラクタマーゼのX線結晶構造を基に citrate を出発物質としたメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤のリード化合物を見出した。本研究で得られた結果は、今後の臨床で有効なメタロ-β-ラクタマーゼ阻害剤開発を行う上で極めて重要な知見を与えられられる。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Wachino J-I, Yamaguchi, Y, Mori, S, Kurosaki, H, Arakawa, Y, Shibayama, K. Structural insights into the subclass B3 metallo-β-lactamase SMB-1 and the mode inhibition by the common metallo-β-lactamase inhibitor

mercaptoacetate. Antimicrob. Agents Chemother. 57(1), 101-109 (2013).

- 2) 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) *Citrobacter freundii*由来メタロ- β -ラクタマーゼ (KHM-1) の単核Zn型および複核Zn型の結晶構造、山口佳宏、西並 隆、安田健二、切替照雄、山縣ゆり子、黒崎博雅、第12回日本蛋白質科学会(2012/06/20-22、名古屋).
- 2) 効率よくセフェム系 β ラクタム剤を加水分解するメタロ- β -ラクタマーゼ (KHM-1) の構造的解析、山口佳宏、西並 隆、安田健二、切替照雄、山縣ゆり子、黒崎博雅、第10回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマ・フォーラム(2012/08/6-7、京都).
- 3) Zn 酵素メタロ- β -ラクタマーゼ (KHM-1) の活性中心におけるシステイン酸化型・還元型の結晶構造、山口佳宏、西並 隆、安田健二、切替照雄、山縣ゆり子、黒崎博雅、

平成 25 年度日本結晶学会年会 (2013/10/12-13、熊本).

- 4) クエン酸 メタロ- β -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).
- 5) メタロ- β -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の解明、山口佳宏、荒川宜親、黒崎博雅、日本薬学会第134年会 (2014/3/27-30、熊本).
- 6) IMP-2 メタロ- β -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会(2014/2/1-2、名古屋)
- 7) 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).

F. 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 | なし |