

令和 4 年 5 月 12 日現在

機関番号：33101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07566

研究課題名(和文)メタロ-ラクタマーゼの未知酵素活性の検証と新規アプローチによる阻害剤探索

研究課題名(英文) Analysis of unknown activity of metallo-beta-lactamase and search for novel inhibitors

研究代表者

井深 章子 (Ibuka, Akiko)

新潟薬科大学・応用生命科学部・教授

研究者番号：60301420

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：-ラクタム系薬耐性菌の多くは酵素-ラクタマーゼ生産により耐性を獲得する。メタロ-ラクタマーゼ(MBL)は、広範囲の-ラクタム剤に対して分解活性を有し、臨床で使用可能な阻害剤が存在しない。我々はMBL酵素IMP-1、IMP-27についてキレート剤存在下で解析を行い、IMP-1から派生したIMP-27が高い亜鉛欠乏耐性を獲得していることを明らかにした。また、MBLと立体構造が類似したMBL類似酵素の基質に対する触媒活性を解析した。その結果、IMP-1はRNase活性を有することが明らかになった。類似酵素の基質による-ラクタマーゼ活性阻害作用は、現時点では確認できていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

-ラクタム剤は感染症治療に多用される抗生物質である。感染症の原因菌は、この薬剤を分解する酵素-ラクタマーゼを生産する。これらの酵素は、新規薬剤の使用に伴い変化(分子進化)すると考えられている。我々は-ラクタマーゼIMP-1、IMP-27し、IMP-1から派生したIMP-27が亜鉛欠乏耐性を獲得していることを明らかにした。さらに、IMP-1が本来の活性以外に核酸分解活性を有することを示した。

研究成果の概要(英文)：Many beta-lactam drug-resistant bacteria acquire resistance through the production of the enzyme beta-lactamase. Metallo-beta-lactamases (MBLs) have degrading activity against a wide range of beta-lactam drugs, and there are no clinically available inhibitors. We analyzed the MBL enzymes IMP-1 and IMP-27 in the presence of chelating agents and found that IMP-27, which is derived from IMP-1, acquired zinc deficiency tolerance. We also analyzed the catalytic activity of IMP-1 toward the substrates of MBL-like enzymes, whose steric structure is similar to that of MBL. The results revealed that IMP-1 has RNase activity. The inhibition of beta-lactamase activity by substrates of MBL-like enzymes has not been confirmed at this time.

研究分野：構造生物学、酵素学

キーワード：MBLスーパーファミリー -ラクタマーゼ ホモセリンラクトナーゼ

### 1 . 研究開始当初の背景

医療現場で単離される  $\beta$ -ラクタム系薬に対する耐性菌の多くは、 $\beta$ -ラクタマーゼを生産することで耐性を獲得する。 $\beta$ -ラクタマーゼはアミノ酸配列の相同性に基いて4クラス(クラスA~D)に分類される。クラスA,C,Dはセリン残基を触媒基としたセリン $\beta$ -ラクタマーゼであり、2つのドメイン間に活性部位が位置する共通の立体構造をもつ。一方、クラスBは活性中心に亜鉛イオンを結合したメタル $\beta$ -ラクタマーゼ(Metallo- $\beta$ -lactamase, MBL)であり、クラスA,C,Dの酵素とは全く異なる立体構造をとる。MBLはセリン $\beta$ -ラクタマーゼに分解されにくいカルバペネム系薬に対する分解活性が高く、MBL生産菌は院内感染における脅威の1つであり、MBL阻害剤の開発は感染症の治療上重要な課題である。

MBL遺伝子がグラム陰性菌に拡散している一方で、真核生物・古細菌・細菌の3つのドメインすべてに、 $\beta$ -ラクタム系薬に対する活性を示さないがMBLと共通の立体構造を有するタンパク質(以下「MBL類似酵素」とする)が存在する。MBL類似酵素はMBLと同様の立体構造を有し、どの酵素でも2枚の $\beta$ -シート構造の間のくぼみに金属イオンの結合した活性中心が位置する。MBL類似酵素はその触媒機能で分類され、グリオキサラーゼII、DNA/RNAの加水分解/プロセシング酵素、酸化還元酵素など、加水分解酵素を中心とした多様な酵素が含まれる。これらのMBL類似酵素はMBLも含めてMBLスーパーファミリーと呼ばれる。

MBLスーパーファミリー酵素間の立体構造の類似性は、全体構造以上に活性中心でより顕著である。MBL類似酵素の1つであり、tRNAプロセシング酵素tRNaseZの活性中心をMBLと比較すると、2つの亜鉛イオンの位置、亜鉛イオンに配位するアミノ酸残基が正確に保存されていた。一般に、酵素は基質認識が厳密な化学反応触媒であると考えられているが、基質特異性の厳密さは酵素ごとに異なる。 $\beta$ -ラクタマーゼの場合、特定の $\beta$ -ラクタム系薬に対してのみ強い分解活性を示す酵素がある一方で、多様な骨格・置換基を持つ $\beta$ -ラクタム系薬を幅広く分解する酵素(基質特異性拡張型酵素)も存在する。本課題で研究対象とするMBLスーパーファミリーの酵素群は、多様な触媒機能を有する一方で活性中心を含む構造の保存性が非常に高い。上述した $\beta$ -ラクタマーゼの例も考えると、MBLを含むMBLスーパーファミリー酵素群の中には、1つの酵素が多様な酵素活性を有し、生体内での役割・影響が多岐にわたる可能性があると考えられた。

### 2 . 研究の目的

本研究では、 $\beta$ -ラクタマーゼ活性を示さないMBL類似酵素が多くの生物種で幅広く存在していることに着目し、MBLおよびMBL類似酵素が本来知られている酵素活性とは別の触媒能を有する可能性を検証し、共通の立体構造基盤を有しながら異なる活性を有する酵素における基質認識機構を解明することを目的とした。

タンパク質科学の領域では、一般に酵素は高い基質特異性を有する化学反応触媒であると考えられている。 $\beta$ -ラクタマーゼについては、様々な種類の骨格・置換基の $\beta$ -ラクタム剤を基質として考え、それらに対する基質特異性の広狭を議論する研究は多いが、核酸など、全く異なる物質に対する酵素活性の測定は行われてこなかった。本研究では、1つの酵素が実は異なる酵素活性を同時に有し、生体内・環境内で複雑な効果を生ずる可能性や、ごく一部の構造的な違いで基質特異性を大きくスイッチする可能性を検証することを目指した。また、MBL阻害剤を探索する上で、全く新規の阻害剤発見に結びつきうると考えられ、基礎研究ながら感染症治療に貢献する可能性があると考えた。

### 3 . 研究の方法

本課題では、以下の解析を行なった。

MBLの発現系の再構築、金属結合能の解析：

市販のプラスミドベクターpET-26aを使用してペリプラズム分泌型のMBL発現系を再構築し、薬剤耐性菌におけるMBL生産に近い形でタンパク質を生産した。この発現系を用いて2つのMBL酵素IMP-1,IMP-27を調製し、実験に用いた。キレート剤EDTA,DPA,PAR,カプトプリル存在下で、精製酵素の $\beta$ -ラクタマーゼ活性および酵素生産菌の最小生育阻止濃度(MIC)を測定した。

MBLのMBL類似酵素活性測定：

MBLと立体構造が類似しているMBL類似酵素群のうち、tRNaseZとアシルホモセリンラクトナーゼに着目し、これらの酵素の基質(RNAおよびアシルホモセリンラクトン)に対するMBLの加水分解活性を測定した。

MBL類似酵素の $\beta$ -ラクタマーゼ活性測定：

tRNA5'末端プロセシング酵素tRNaseZおよびアシルホモセリンラクトナーゼの $\beta$ -ラクタマーゼ活性を測定した。

MBL類似酵素の基質によるMBLの $\beta$ -ラクタマーゼ活性阻害の検証：

MBL類似酵素のうち、tRNaseZおよびアシルホモセリンラクトナーゼの基質(核酸および

## アシルホモセリンラクトン)

MBL/MBL 類似酵素の基質特異性を決定するアミノ酸残基の特性：

MBL および MBL 類似酵素のアミノ酸配列と立体構造を比較し、それぞれの酵素の基質特異性を決定していると思われる領域を置換した変異型酵素を作製し、活性の変化を解析した。

## 4. 研究成果

### [MBL の分子進化]

本課題では、すべての解析に先立ち発現系の再構築を行った。これまでに我々は大腸菌の菌体内で組換えタンパク質を発現して解析に用いていたが、今回、IMP-1 および IMP-27 の金属定量を行ったところ、亜鉛結合数が報告されている数より少ない傾向が見られた。そこでペリプラズム分泌型の発現系を再構築し、薬剤耐性菌における MBL 生産に近い形の発現系とした。この発現系を用いて 2 つの MBL 酵素 IMP-1, IMP-27 の解析を行ったところ、いずれの酵素も 1 分子あたり約 2 個の亜鉛を結合していることが確認され、本来の状態に近い酵素が得られたと考えられた。

キレート剤 EDTA, DPA, PAR, カプトプリル存在下での活性を測定したところ、EDTA, PAR は IMP-1 に対する阻害が強いのにに対し、DPA とカプトプリルは IMP-27 をより強く阻害した。これらの違いは、キレート剤の酵素結合状態の違いによって生じるのではないかと考えており、この点についてはさらなる検証が必要である。EDTA を添加した培地では、IMP-1 および IMP-27 を生産する大腸菌の最小生育阻止濃度 MIC を測定した結果、IMP-27 は EDTA 添加による最小生育阻止濃度の低下が起こりにくいことが判明した(表 1)。生体内では、細菌感染時に亜鉛などの金属濃度の低下が起きるといふ報告がある。IMP-27 は IMP-1 から派生したと考えられているが、今回の結果から、IMP 型酵素の分子進化の過程において、IMP-27 は亜鉛欠乏状態でも活性を維持する方向に進化した可能性が強く示唆された。

Enzymes	培地中の EDTA 濃度 (μM)	培地中の抗生物質濃度(μg/mL)		
		Ampicillin	Cephalothin	Ceftazidime
Control	0	1	2	0.0312
IMP-1	0	32	256	32
	5	16	128	16
	50	1	0.5	0.25
IMP-27	0	4	256	32
	5	4	128	16
	50	2	32	8

表 1. EDTA 存在下/非存在下での IMP 型酵素生産菌の最少生育阻止濃度

### [MBL および MBL 類似酵素の未知活性・基質認識]

MBL である IMP-1 では、アシルホモセリンラクトンに対する加水分解活性は検出されなかったが、核酸に対しては構造をとらない RNA (usRNA) を決まった箇所まで切断した(図 1)。MBL 類似酵素である tRNaseZ は tRNA5'末端プロセシング酵素であるため、プレ tRNA に対する活性を確認したところ、tRNaseZ およびヒト由来ホモログ hTLΔ30 とは異なる箇所を高い特異性で切断することが明らかになった(図 2)。

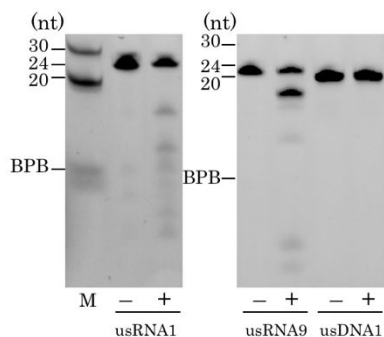


図 1. IMP-1 による usRNA/usDNA 切断

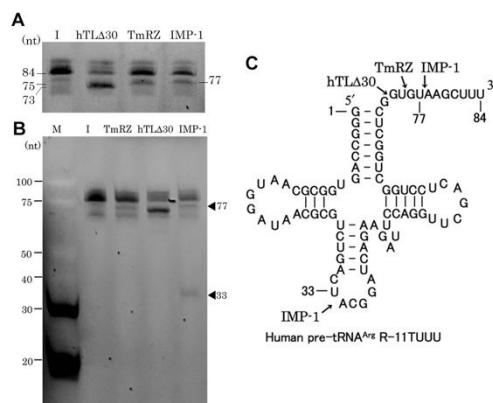


図 2. ヒト pre-tRNA<sup>Arg</sup> の切断

MBL 類似酵素のうち、RNaseZ およびアシルホモセリンラクトナーゼ AiiA の β-ラクタマーゼ活性の測定も行った。複数の骨格の異なる β-ラクタム剤に対する加水分解活性を解析したが、RNaseZ では β-ラクタマーゼ活性は検出されなかった。一方、AiiA はペニシリン系、セファロスポリン系抗生物質に対して加水分解活性を示し、セフォタキシム系抗生物質に対しては測定論的パラメータが決定できた。その中でも特にセフォタキシムに対して高い活性を示すことが明

らかになった。

以上の結果より、IMP-1 と MBL 類似酵素は、お互いの活性を一部共有している可能性が示された。ただ、その活性は高くはなく、また作用する基質も限られていた。ただ、MBL 類似酵素の基質が IMP-1 の活性部位に結合するのであれば阻害作用を占める可能性がると考え、これらの物質が IMP-1 の  $\beta$ -ラクタマーゼ活性に及ぼす影響を検証した。

RNA 添加による活性の変化は確認できず、ジヌクレオチドを添加した場合は、やや活性が上昇するという傾向が見られた。ジヌクレオチドが酵素をわずかに活性化している可能性があり、この場合、ジヌクレオチドは本来の基質結合部位とは別の箇所に結合しているのではないかと考えられるが、詳細についてはさらなる検証が必要である。アシルホモセリンラクトンにおいても、添加による活性の変化は検出されなかった。濃度を上げることで変化が検出される可能性もあるが、IMP-1 の活性部位に対する親和性は低いものと思われた。

以上の結果から、この 2 つの類似酵素の基質は、MBL 阻害剤候補にはならないと考えられ、阻害剤に関しては、今後さらなる検討と探索が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Ishikawa Tatsuya, Furukawa Nayuta, Caselli Emilia, Prati Fabio, Taracila Magdalena A., Bethel Christopher R., Ishii Yoshikazu, Shimizu-Ibuka Akiko, Bonomo Robert A.	4. 巻 12
2. 論文標題 Insights Into the Inhibition of MOX-1 $\beta$ -Lactamase by S02030, a Boronic Acid Transition State Inhibitor	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.720036	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yoshiki Kato, Masayuki Takahashi, Mineaki Seki, Masayuki Nashimoto, Akiko Shimizu-Ibuka	4. 巻 15
2. 論文標題 RNA-hydrolyzing activity of metallo- $\beta$ -lactamase IMP-1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0241557
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0241557	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 加藤善輝
2. 発表標題 IMP-27の機能・構造解析：IMP型 $\beta$ -ラクタマーゼの分子進化
3. 学会等名 第94回日本生化学大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤善輝、高橋昌幸、関峰秋、梨本正之、井深章子
2. 発表標題 メタロ $\beta$ -ラクタマーゼIMP-1のRNA加水分解活性
3. 学会等名 日本生化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	梨本 正之  (Nashimoto Masayuki)  (30228069)	新潟薬科大学・健康・自立総合研究機構・教授    (33101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------