

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月20日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21590116

研究課題名（和文）  $\beta$ -ラクタム剤不活化酵素メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼを標的とする  
非可逆的阻害剤の創製研究課題名（英文） Development of irreversible inhibitors for  
 $\beta$ -lactam inactivated enzyme, metallo- $\beta$ -lactamase

研究代表者

黒崎 博雅 (KUROSAKI HIROMASA)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：70234599

研究成果の概要（和文）：IMP-1 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼはカルバペネムをはじめとするほとんどすべての $\beta$ -ラクタム剤を加水分解して不活化する複核の Zn(II) 酵素であり、薬剤耐性機構の一つに関与している。我々は、IMP-1 メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの2つの Zn(II) 結合サイト(Zn1 と Zn2 サイト)から Zn(II) を取り除いたアポ IMP-1 酵素(apo-IMP-1)の調製を確立し、Zn(II) と Co(II) の両金属イオンに対する Zn1 と Zn2 サイトへの結合親和性を紫外-可視分光法により検討した。1 当量の Zn(II) と 1 当量の Co(II) を含む apo-IMP-1 の紫外-可視吸収スペクトルから判断すると、Zn(II) は Co(II) に比べ Zn1 サイトに高い結合親和性を示すことがわかった。また、Co(II) 置換 IMP-1 酵素 (Co(II)-IMP-1) を用いてメルカプト酢酸との相互作用についても分光学的に検討した。本研究により、apo-IMP-1 中の複核金属結合部位への Co(II) または Zn(II) の結合様式ならびにメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤であるメルカプト酢酸と Co(II)-IMP-1 との結合様式を推定することができた。

研究成果の概要（英文）：IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase is a dinuclear Zn(II) enzyme that catalyzes the hydrolysis and inactivation of most  $\beta$ -lactams including carbapenems, and is involved in one of the mechanisms for generating clinical resistance to antibiotics in pathogenic bacteria. We investigated the metal preferences of Zn(II) and Co(II) for the apo-enzyme of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase, apo-IMP-1, which contains a dinuclear metal binding site (the Zn1 and Zn2 sites), by UV-visible spectroscopy. The UV-visible spectrum of apo-IMP-1 containing 1 equiv. of Co(II) and 1 equiv. of Zn(II) showed a high preference of Zn(II) for the Zn1 site compared to Co(II). The interaction of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase with mercaptoacetic acid was also investigated using Co(II)-substituted IMP-1 and UV-visible spectroscopy. Possible metal binding modes of Co(II) or Zn(II) to the dinuclear metal binding site in apo-IMP-1 and of mercaptoacetic acid to Co(II)-substituted IMP-1 are proposed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学、創薬化学

キーワード：医薬分子設計、感染症、 $\beta$ -ラクタム剤、薬剤耐性菌、阻害剤、金属酵素

## 1. 研究開始当初の背景

メタローβ-ラクタマーゼ(以下、MBL と略す)は1990年代に本邦で新たに薬剤耐性菌の耐性機構として発見されたZn(II)含有の加水分解酵素である。この酵素はカルバペネムを含むほとんどすべてのβ-ラクタム剤を分解するだけでなく薬剤耐性遺伝子がプラスミド中に遺伝子カセットとして組み込まれているため菌種を超えた拡散が起りつつあり、それらの院内感染症の発生が大きな社会的問題になっている。さらに問題なのは、活性中心にセリン残基を含むセリン-β-ラクタマーゼに対する有効な阻害剤は既に臨床で使用されているが、MBLに対する阻害剤はなくその開発が緊急の課題となっている。

## 2. 研究の目的

本研究では、臨床で有用な非可逆的MBL阻害剤を分子設計するために酵素の活性中心金属イオンの配位環境と我々が報告した阻害剤・チオール化合物(1)の活性中心金属イオンへの配位を明らかにする目的で分光学的に検討した。

## 3. 研究の方法

(1) IMP-1の分離精製 *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*Escherichia coli* BL21(DE3)からIMP-1をすでに報告されている方法に従って抽出、精製した(2)。ただし、OD<sub>600</sub>が約3.5の時に、IPTGを1mMとなるように添加した。10Lの培養液から、約240mgの精製酵素を得ることができた。精製された酵素の純度検定は、15% SDS-PAGEを用いて行った。分子量マーカーの位置から精製酵素の分子量が約25,000 Daltonであり、単一バンドであることを確認した。

(2) 加水分解活性の検定 IMP-1の基質加水分解活性の評価は、分光光度法によって行った。Cephaloridine 100 μMを含む50 mM Tris-HCl (pH 7.4)、0.5 M NaCl、2 μM 硝酸亜鉛緩衝液3.1 mLをUVセル内に入れ、30°Cで5分間保った後、希釈した酵素溶液をセル中1 nMの酵素濃度となるように10 μL加え、素早く振り混ぜ260 nmにおける吸光度の変化を3分間経時的に測定した。260 nmでのCephaloridineの差モル吸光係数を $\Delta\epsilon_{260} = 10,500 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とし、直線的な吸光度の減少から初速度 $v_{\text{init}}$ を求めた。

(3) 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(3)、IMP-1溶液の280 nmにおける吸光度から濃度を算出した。

(4) アポIMP-1酵素(以下、apo-IMP-1と略す)

の調製 IMP-1溶液[50 mM MOPS-NaOH、1.0 M NaCl (pH 6.5)緩衝液]に30%のグリセリンになるようグリセリンを加えた後、50 mM MOPS-NaOH、1.0 M NaCl 緩衝液(pH 6.5)に溶かした200 mM EDTA溶液を50 mMとなるように少しずつ加え、30°Cで12時間置いた。Cephalothin 加水分解活性がEDTA未処理のIMP-1に対して5%になったことを確認した後、5°CでPD-10カラム(φ16×50 mm)を使い、30%グリセリンを含む50 mM MOPS-NaOH、1.0 M NaCl 緩衝液(pH 7.0)で溶出し、約200 μL毎に分取した。それぞれの分画の280 nmにおける吸光度を測定し濃度を決定した。

(5) Zn(II)共存下でのapo-IMP-1の活性の回復 Cephalothin 100 μMを含む50 mM MOPS-NaOH、1.0 M NaCl、2 μM 硝酸亜鉛緩衝液(pH 7.0) 3.1 mLをUVセル内に入れ、30°Cで5分間保った後、調製して得られたapo-IMP-1を50 mM MOPS-NaOH、1.0 M NaCl、2 μM 硝酸亜鉛、30%グリセリン緩衝液H(pH 7.0)で希釈し、その溶液をセル中1 nMの酵素濃度となるように10 μL加え、素早く振り混ぜ270 nmにおける吸光度の変化を3分間経時的に測定した。270 nmでのCephalothinの差モル吸光係数を $\Delta\epsilon_{270} = 12,950 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とし、直線的な吸光度の減少から初速度 $v_{\text{init}}$ を求めた。

(6) Co(II)置換 IMP-1酵素(以下、Co(II)-IMP-1と略す)の可視-紫外吸収スペクトル アルゴン気流下、150~178 μM apo-IMP-1溶液200 μLに25%グリセリンを含む50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液(pH 7.4)に溶かした硫酸コバルトを0.2当量ずつ(1 μL)加え、穏やかに混和した後、室温で290-800 nmの吸収スペクトルを光路長1 cmのマイクロセルを用いて測定した。これを酵素1分子当たりCo(II)を2当量まで繰り返した。

(7) 2種類の金属イオンで置換した酵素の可視-紫外吸収スペクトル変化 178 μM apo-IMP-1溶液200 μLに25%グリセリンを含む50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液(pH 7.4)に溶かした硫酸コバルトを0.2当量ずつ(1 μL)加え、穏やかに混和した後、室温で290-800 nmの吸収スペクトルを光路長1 cmのマイクロセルを用いて測定した。これを酵素1分子当たりCo(II)を1当量まで繰り返した。つぎに、25%グリセリンを含む50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液(pH 7.4)に溶かした硝酸亜鉛を0.2当量ずつ(1 μL)加え、穏やかに混和した後、室温で290-800 nmの吸収スペクトルを光路長1 cmのマイクロセルを用いて測定した。これを酵素1分子当たりZn(II)を1当量まで繰り返した。また、同様の方法でZn(II)を1当量添加後、Co(II)を3当量まで添加し吸収スペクトルを測定した。

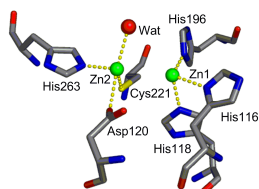
(8) Co(II)-IMP-1 と阻害剤・3-メルカプト酢酸との可視-紫外吸収スペクトル変化 アルゴン気流下、168~172  $\mu\text{M}$  Co(II)-IMP-1 溶液 200  $\mu\text{L}$  に 25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶かしたメルカプト酢酸を 0.2 当量ずつ (1  $\mu\text{L}$ ) 加え、穏やかに混和した後、室温で 290–800 nm の吸収スペクトルを光路長 1 cm のマイクロセルを用いて測定した。これを酵素 1 分子当たりメルカプト酢酸を 2 当量まで繰り返した。また、25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶かした 172  $\mu\text{M}$  硫酸コバルト溶液 200  $\mu\text{L}$  に 25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液 (pH 7.4) に溶かしたメルカプト酢酸を 0.5 当量ずつ (1  $\mu\text{L}$ ) を 2 当量まで加え同様に吸収スペクトルを測定した。

#### 4. 研究成果

*Pseudomonas aeruginosa* 由来の IMP-1 の活性中心構造を図 1 に示す (4)。第 1 の Zn(II) (Zn1) には 3 つのヒスチジンが配位し、第 2 の Zn(II) (Zn2) にはヒスチジン、アスパラギン酸、システイン、水分子が配位している。一般に MBL では、架橋配位子として水またはヒドロキシアニオンがこの 2 個の Zn(II) に架橋しているが、この IMP-1 の 3 次元構造では確認されなかった。しかし、そのアミノ酸配列相同性などから考えると、IMP-1 にも架橋配位子として水またはヒドロキシアニオンが存在すると考えられる。

本研究では、*S. marcescens* 由来のクラス B IMP-1 MBL を用い、apo-IMP-1 を安定に調製する方法を確立して分光学的にサイレントな Zn(II) を Co(II) [Co(II) は Zn(II) とほぼ同じイオン半径 Zn(II): 0.74 Å, Co(II): 0.72 Å] に置換した酵素 (Co(II)-IMP-1) を調製し、金属周辺の環境を分光学的に検討した。さらに、チオール化合物が IMP-1 を可逆的に阻害することを見出したが (1)、その阻害が活性中心部位の金属イオンへの配位によることを明らかにする目的で検討を行った。

**Fig. 1.** Schematic representation of the active site of IMP-1 from *Pseudomonas aeruginosa* (PDB code 1DDK). The Zn(II)

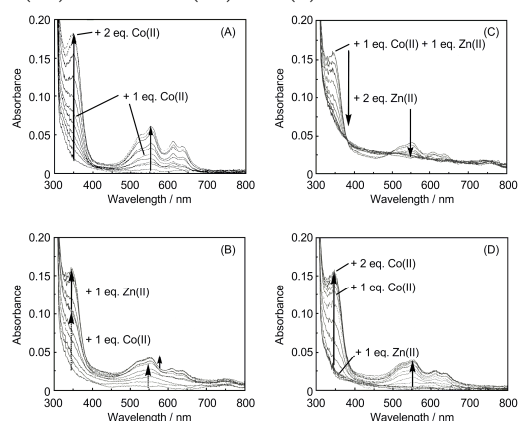


atoms and a water molecule are shown as spheres.

(1) apo-IMP-1 の調製 IMP-1 を 30%グリセリンを含む 50 mM MOPS-NaOH、1.0 M NaCl、50 mM EDTA 緩衝液 (pH 6.5) 中、30°C でインキュベ

トし、EDTA で酵素から Zn(II) を取り除き apo-IMP-1 を調製した。Cephalothin を用いて加水分解活性を測定し、50 mM EDTA を含まない 50 mM MOPS-NaOH (pH 7.0)、1.0 M NaCl 緩衝液中の加水分解活性を 100% としたとき、加水分解活性が 5% 以下になったことを確認した。ついでゲルろ過 (PD-10) によりタンパク分画から EDTA を分離し、それぞれの apo-IMP-1 を調製した。調製した apo-IMP-1 の活性は 100  $\mu\text{M}$  の硝酸亜鉛の添加により約 100% の回復が見られた。

**Fig. 2.** UV-visible spectral changes of apo-IMP-1 with varying concentrations of Co(II) or Zn(II). (A) Solid arrow:



apo-IMP-1 (150  $\mu\text{M}$ ) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl and 25% glycerol was titrated by 0.2 equiv of Co(II) to a total of 2 equiv. (B) 1 equiv of Co(II) in increments of 0.2 equiv was added to apo-IMP-1 (178  $\mu\text{M}$ ) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl, and 25% glycerol (dashed arrow), followed by the addition of Zn(II) (0.2 equiv increments) up to 1 equiv (solid arrow). (C) 2 equiv of Zn(II) in increments of 0.2 equiv was added to apo-IMP-1 containing 1 equiv of Co(II) and 1 equiv of Zn(II) (see final spectrum in Fig. 2B). (D) 1 equiv of Zn(II) in increments of 0.2 equiv was added to apo-IMP-1 (178  $\mu\text{M}$ ) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl, and 25% glycerol, followed by the addition of Co(II) (0.2 equiv increment) up to 2 equiv (solid arrow).

(2) Co(II) の apo-IMP-1 への結合 アルゴン気流下、25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液 (pH 7.4) 中で apo-IMP-1 と Co(II) の分光滴定を行った。その紫外-可視吸収スペクトル変化を図 2A に示す。Co(II) を apo-IMP-1 に添加していくと 350 nm に強い吸収と 500–650 nm の可視領域に d-d バンドに基づく吸収が観測された。前者は Cys221 の S から Co(II) への LMCT (ligand-to-metal charge transfer) バ

ンドであると帰属した。この 350 nm の LMCT バンドは 221 位の Cys を Ala に置換した IMP-1 変異体の Co(II) 酵素では消失することからも支持された。LMCT と d-d の両バンドは共に Co(II) の添加に伴って吸収強度は増加し、ap その後酵素当たり 2 当量で飽和した。1 当量の Co(II) を含む apo-IMP-1 のスペクトルは 350, 520, 552, 612 と 635 nm に吸収極大を示した(図 2A)。ここで 350 nm の LMCT バンドの吸収強度から判断すると、Co(II) は Zn1 と Zn2 サイトに 2:1 の割合で分布していると考えられる。この結果は de Seny 等によって報告された BcII MBL の結果と一致する(5)。Co(II) と apo-IMP-1 との分光滴定によって得られたスペクトル変化から DynaFit プログラム(6)を用いて解離定数  $K_d$  を算出した。その結果、 $K_{d1}$  は  $< 60$  nM と  $K_{d2}$  は  $0.3$   $\mu$ M であることがわかった(5. 主な発表論文②参照)。

(3) apo-IMP-1 における Zn1 と Zn2 サイトへの Co(II) と Zn(II) の結合親和性 apo-IMP-1 の 2 つの金属結合部位への Co(II) と Zn(II) の結合親和性を検討した。アルゴン気流下、25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液(pH 7.4)中で apo-IMP-1 に 0.2 当量ずつ 1 当量の Co(II) を連続的に添加した後、Zn(II) を 0.2 当量ずつ添加していった。そのときのスペクトル変化を図 2B に示す。1 当量の Co(II) を含む apo-IMP-1 のスペクトルは 350, 520, 552, 612 と 635 nm に極大吸収を示した(上述)。これに 1 当量の Zn(II) を添加していくと 350 nm の吸収強度が増加していった。一方、d-d バンドの著しい吸収強度の増加は観測されなかった。350 nm の LMCT バンドの吸収強度の増加は Co(II) の Zn2 サイトへの結合によるものであることを示唆している。それゆえ、このスペクトルの挙動は Zn(II) の Zn1 サイトへの結合に伴って Co(II) が Zn1 サイトから Zn2 サイトへ移動していることに起因する。したがって、Zn(II) は Zn2 サイトに比べ Zn1 サイトへ優先的に結合することがわかった。

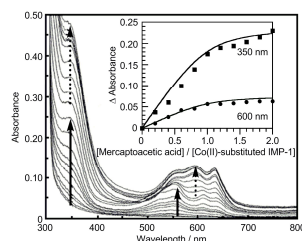
さらに 1 当量の Co(II) と 1 当量の Zn(II) を含む apo-IMP-1 に 2 当量の Zn(II) を添加していくと Zn(II) 濃度の増加に伴って 350 nm と 500–650 nm の吸収強度は減少していった(図 2C)。これは Zn1 と Zn2 の両サイトにおいて、Zn(II) によって Co(II) が金属結合部位から解離していることを示唆するもので、Zn(II) は Co(II) によりも両サイトにおいて、より高い結合親和性を有していることがわかる。

図 2D では、アルゴン気流下、25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液(pH 7.4)中で apo-IMP-1 に 1 当量の Zn(II) を 0.2 当量ずつ添加した後、さらに 2 当量の Co(II) を 0.2 当量ずつ添加していった

ときのスペクトル変化を示している。1 当量の Zn(II) 存在下では apo-IMP-1 のスペクトルに変化は認められなかった。これに Co(II) を添加していくと LMCT と d-d の両バンド共に吸収強度が増加した。そして 2 当量の Co(II) を添加したときのスペクトルは図 2B のスペクトルと一致し、Co(II) は Zn2 サイトへ結合していることを示している。

ここで興味深いことは、1 当量の Zn(II) を apo-IMP-1 に添加後に 1 または 2 当量の Co(II) を添加したときの 350 nm の LMCT バンドのモル吸光係数( $\epsilon$ )はそれぞれ約 730 と 900  $M^{-1} cm^{-1}$  であった。これらの値は 2 当量の Co(II) 存在下の apo-IMP-1 のモル吸光係数  $\epsilon =$  約 1,200  $M^{-1} cm^{-1}$  よりも小さな値であった[図 2A:Co(II) は完全に Zn2 を占有している]。これより、Zn(II) は Co(II) 添加前にすでに Zn1 と Zn2 の両サイトに分布していることを示している。

**Fig. 3.** Spectrophotometric titration of Co(II)-substituted IMP-1 with mercaptoacetic Acid. Solid arrow:



apo-IMP-1 (171  $\mu$ M) in 50 mM Tris-HCl (pH 7.4), 1.0 M NaCl, and 25% glycerol was titrated by 0.2 equiv of Co(II) to a total of 2 equiv. Dashed arrow: 2 equiv of mercaptoacetic acid in increments of 0.2 equiv was added to Co(II)-substituted IMP-1 [apo-IMP-1 containing 2 equiv of Co(II)]. Inset: plot of the absorbances at 350 nm (squares) and 650 nm (circles) as a function of the concentration of added mercaptoacetic acid. The absorbances of apo-IMP-1 and Co(II)-substituted IMP-1 were subtracted from the absorbance of Co(II)-substituted IMP-1 added mercaptoacetic acid. The solid lines represent fits obtained from numerical simulation of a one-step binding model to the data using the program Dynafit (BioKin, Ltd.)(6). The apparent dissociation constant obtained was 14  $\mu$ M.

予備的な実験ではあるが、apo-IMP-1、単核 Zn(II)-IMP-1 と野生型 IMP-1 の示差走査熱量測定(DSC)から、変性温度( $T_d$ )はそれぞれ apo-IMP-1 では 56.4  $^{\circ}C$ 、単核 Zn(II)-IMP-1 [apo-IMP-1 に 1 当量の Zn(II) を添加して調製したもの]では 56.5  $^{\circ}C$ 、野生型 IMP-1 では 76.9  $^{\circ}C$  であった。これらの解析

から Zn1 は酵素活性に大きく寄与し、一方、Zn2 はタンパク質構造の安定化と酵素の触媒効率の向上の両方に重要な役割を担っていることが明らかとなった。

(4)メルカプト酢酸と Co(II)-IMP-1 との相互作用 以前、我々のグループによって IMP-1 がチオール化合物によって阻害されることを報告した(1)。なかでも同一炭素にチオール基を持つ 2-メルカプトプロピオン酸(阻害定数  $K_i = 0.19 \mu\text{M}$ )、メルカプト酢酸( $K_i = 0.23 \mu\text{M}$ )が強く阻害した。そこで Zn(II) を Co(II) に置換した酵素を用い、IMP-1 阻害剤として働くチオール化合物が活性中心の金属イオンへ配位することによって酵素阻害することを明らかにするために、apo-IMP-1 に 2 当量の Co(II) を添加して調製した Co(II)-IMP-1 酵素とメルカプト酢酸の相互作用を紫外-可視吸収スペクトル分光法によって検討した。

アルゴン気流下、25%グリセリンを含む 50 mM Tris-HCl、1.0 M NaCl 緩衝液(pH 7.4)中で Co(II)-IMP-1 酵素に 0.2 当量ずつ 2 当量のメルカプト酢酸を連続的に添加していったときのスペクトル変化を図 3 に示す。メルカプト酢酸を Co(II)-IMP-1 酵素に 2 当量まで添加していくと 350 nm の S-to-Co(II) LMCT バンドの著しい吸収強度の増加と d-d バンドの吸収極大(555, 597 と 635 nm)の長波長側へのシフトを伴いながら吸収強度の増加が観測された(図 3)。前者の特性はメルカプト酢酸の S から Co(II) への LMCT バンドに帰属できる。Bicknell 等は Co(II) 置換アンジオテンシン II 変換酵素(Co(II)-ACE)を調製し、チオール阻害剤であるカプトプリルの Co(II)-ACE への結合様式を分光学的に調べている(7)。Co(II)-ACE の可視吸収スペクトルは 525 nm ( $\epsilon = 75 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )に小さな吸収を示すが captopril の添加によって d-d バンドが吸収強度は増大し、540 ( $\epsilon = 350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ), 618 (520) と 637 (560) nm に吸収を示した。この吸収の長波長側への波長の移動と吸収強度の増加は、阻害剤の活性中心金属へ結合による Co(II) の d-d 遷移の変化によるとされている。

IMP-1 メルカプト酢酸を添加した際の吸収の変化の特長は、344 nm の S から Co(II) への LMCT バンドの波長が変化せず吸収強度のみが増加したことと、500-720 nm の吸収の変化が吸収帯のシフトよりむしろ新たな吸収が付加されたようにみえることである。このスペクトル変化は Co(II)-BcII MBL-D-captopril 複合体のそれに類似している(7)。

試料には酵素 1 mol に対して全体として Co(II) は 2 mol 含まれていることから、メルカプト酢酸が酵素に結合していない遊離の

Co(II) と錯形成する可能性が考えられたが、同一濃度の硫酸コバルトの緩衝液へメルカプト酢酸を添加したときのスペクトルは、添加したときの増加したスペクトルとは全く異なっていることから、この可能性は否定される。

添加したメルカプト酢酸濃度に対して 350 と 650 nm の吸光度変化をプロットすると、[メルカプト酢酸]/[Co(II)-IMP-1] の濃度比が 1 以上でプラトーになる現象が観測された。これは、メルカプト酢酸が Co(II)-IMP-1 に 1:1 で結合することを示している。DynaFit プログラム(6)を用いてみかけの解離定数  $K_d$  をもとめたところ  $14 \mu\text{M}$  となった。

Antony 等は polarizable molecular mechanics method SIBFA を用いて CcrA MBL の captopril や thiomandelate 阻害剤の安定構造を検討している(9, 10)。阻害剤が CcrA に結合した安定構造は S は 2 つの Zn(II) に結合した monodentate 錯体であり、captopril または thiomandelate 分子中の -COO<sup>-</sup> や -CO 基は活性中心付近のアミノ酸残基と相互作用している。彼らの結果は、BlaB MBL と D-captopril (11) や IMP-1 または VIM-2 とメルカプトカルボキシレート阻害剤との複合体の結晶構造と一致している(4, 11)。

Co(II)-IMP-1 とメルカプト酢酸の紫外-可視吸収スペクトル、molecular mechanic calculations や X 線結晶構造解析の結果を考慮すると、メルカプト酢酸の SH 基は 2 つの Co(II) に架橋して配位していると考えられる(図 4)。

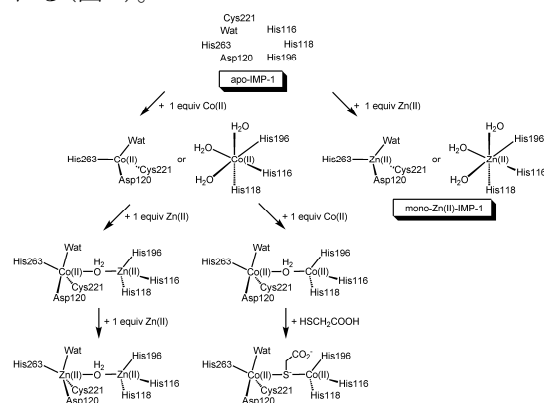


Fig. 4. Proposed modes of reconstruction of IMP-1 from apo-IMP-1 by Zn(II) and Co(II) and the interaction of Co(II)-substituted IMP-1 with mercaptoacetic acid.

#### <結論>

我々は、apo-IMP-1 の複核金属結合部位における Co(II) と Zn(II) の親和性と Co(II)-IMP-1 とメルカプト酢酸との相互作用を分光学的に検討した。Co(II) や Zn(II) の apo-IMP-1 への添加によって再構築される IMP-1 の結合様式と Co(II)-IMP-1 とメルカプト酢酸との結合モデルを提唱した(図 4)。1



当量の Co(II) または Zn(II) を apo-IMP-1 に添加すると、それらの金属イオンは Zn1 と Zn2 サイトへある割合で分布することを明らかにした。

Co(II)-IMP-1 の活性部位の金属イオンにメルカプト酢酸の SH 基が配位することを明らかにした。したがって、阻害剤であるチオール化合物は、Zn(II) を含む野生型酵素の場合にも SH 基が 2 つの Zn(II) に架橋して配位することによって酵素活性を阻害することが示唆された。

#### 【参考文献】

- (1) M. Goto, T. Takahashi, F. Yamashita, A. Koreeda, H. Mori, M. Ohta, Y. Arakawa, *Biol. Pharm. Bull.*, 1997, 20(11), 1136-1140.
- (2) E. Osano, Y. Arakawa, R. Wacharotayankun, M. Ohta, T. Horii, H. Ito, F. Yoshimura, N. Kato, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1994, 38(1), 71-78.
- (3) M. Goto, H. Yasuzawa, T. Higashi, Y. Yamaguchi, A. Kawanami, S. Mifune, H. Mori, H. Nakayama, K. Harada, Y. Arakawa, *Biol. Pharm. Bull.*, 2003, 26(5), 589-594.
- (4) N. O. Choncha, 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*, 2000, 39(15), 4288-4298.
- (5) D. de Seny, U. Heinz, S. Wommer, M. Kiefer, W. Meyer-Klaucke, M. Galleni, J.-M. Frère, R. Bauer, H. W. Adolph, *J. Biol. Chem.*, 2001, 276(48), 45065-45078.
- (6) P. Kuzmič, *Anal. Biochem.*, 1996, 273(2), 260-273.
- (7) R. Bicknell, B. Holmquist, F. S. Lee, M. T. Martin, J. F. Riordan, *Biochemistry* 1987, 26(23), 7291-7297.
- (8) U. Heinz, R. Bauer, S. Wommer, W. Meyer-Klaucke, C. Papamichaels, J. Bateson, H. W. Adolph, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(23), 20659-20666.
- (9) J. Antony, N. Gresh, L. Olsen, L. Hemmingsen, C. J. Schofield, R. Bauer, *J. Comput. Chem.*, 2002, 23(13), 1281-1296.
- (10) J. Antony, J. P. Piquemal, N. Gresh, *J. Comput. Chem.*, 2005, 26(11), 1131-1147.
- (11) I. García-Sáez, J. Hopkins, C. Papamicael, N. Franceschini, G. Amicosante, G. M. Rossolini, M. Galleni, J.-M. Frère, O. Dideberg, *J. Biol. Chem.*, 2003, 278(26), 23868-23873.

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

- ① Yoshihiro Yamaguchi, Shijia Ding, Emi Murakami, Kayo Imamura, Sachiko Fuchigami, Ryo Hashiguchi, Katsuhide Yutani, Hiromasa Mori, Shinnichiro Suzuki, Yoshichika Arakawa, Hiromasa Kurosaki, A demetallation method for IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase that restored enzymatic activity upon addition of metal ion(s), *ChemBioChem*, 査読有, 2011, 12(13), 1979-1983.
- ② Yoshihiro Yamaguchi, Kayo Imamura, Ako Sasao, Emi Murakami, Yoshichika Arakawa, Hiromasa Kurosaki, Metal preference of Zn(II) and Co(II) for the dinuclear metal binding site of IMP-1 metallo- $\beta$ -lactamase and spectroscopic properties of Co(II)-substituted IMP-1 with mercaptoacetic acid, *Med. Chem. Commun.*, 査読有, 2011, 2(8), 720-725.

〔学会発表〕 (計 2 件)

- ① Kouki Matsuda, Yoshihiro Yamaguchi, Junzo Hirose, Yoshichika Arakawa, Hiromasa Kurosaki (Detection of metallo- $\beta$ -lactamase producing bacteria by fluorescent probe having dansyl and thiol groups) 第 20 回金属の関与する生体関連反応シンポジウム, 2010.6.25, 徳島文理大学 (徳島)
- ② 松田幸喜、山口佳宏、廣瀬順三、荒川宜親、黒崎博雅 (薬剤耐性菌が産生するメタローβ-ラクタマーゼの蛍光検出法の開発: ダンシルとチオール基を持つ蛍光剤のメタローβ-ラクタマーゼ IMP-1, VIM-2, IND-7 に対する蛍光特性と速度論解析、第 38 回薬剤耐性菌研究会, 2009.11.20, 森秋旅館 (群馬))

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

黒崎 博雅 (KUROSAKI HIROMASA)  
熊本大学・大学院生命科学研究部・  
准教授  
研究者番号: 70234599

##### (2) 研究分担者

山口 佳宏 (YAMAGUCHI YOSHIHIRO)  
熊本大学・環境安全センター・准教授  
研究者番号: 10363524

##### (3) 連携研究者

荒川 宜親 (ARAKAWA YOSHICHIKA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 10212622