

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 10 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790045

研究課題名(和文)メタロ-β-ラクタマーゼに普遍的に結合する未知化合物の物理化学的解析と創薬展開

研究課題名(英文) Physicochemical study and drug development for an unknown compound binding to metallo-beta-lactamase

研究代表者

山口 佳宏 (Yoshihiro, Yamaguchi)

熊本大学・環境安全センター・准教授

研究者番号：10363524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)は、ほとんどすべてのβ-ラクタム剤を分解する酵素である。あるMBL酵素が赤紫色になっていることを見出し、この原因が有色金属イオンの結合ではなく有色化合物の結合であると考えた。そこで、MBL酵素から有色化合物を分離して、有色化合物の構造と結合様式を調べることにした。MBL酵素に結合した有色化合物は、MBL酵素を変性させる(構造を崩す)ことで遊離すると考えた。この実験で、有色化合物は分解されやすいことが分かった。今後は、質量分析によって有色化合物の分子量などの構造情報を入手することで、有色化合物の構造と結合状態を調べる予定である。

研究成果の概要(英文)：Metallo-beta-lactamase (MBL) is an enzyme capable of hydrolyzing nearly all beta-lactam antibiotics. MBLs are normally colorless, however a series of red-violet MBL enzymes were discovered. The cause of this coloration was presumed to be due to colored compounds bound to the MBL. This research is an attempt to isolate these colored MBLs and examine their structure and binding mechanisms. It was assumed that denaturing the MBL enzyme would cause separation from the colored compound. This study confirmed that these colored compounds degrade easily with denaturation of the MBL enzyme. Future research will involve finding the molecular weight of the compound via mass spectrometry and other analyses to further understand its chemical structure and binding mechanism.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・物理系薬学

キーワード：蛋白質の発色 薬剤耐性菌 酵素 酵素阻害剤

1. 研究開始当初の背景

メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) は、ほとんどすべての β-ラクタム剤を加水分解する酵素である。この酵素の産生は、細菌の薬剤耐性化に寄与している。そのため MBL 阻害剤の開発は、MBL 産生菌の除菌や検査薬として利用できるため、世界中で行われている。しかし実際には、MBL 阻害剤は臨床の現場に存在していない。

MBL は Zn 含有酵素のため無色のはずであるが、ある MBL が赤紫色を呈色していることが本研究の着目点である。赤紫色である MBL 溶液の UV-Vis 測定を行ったところ、蛋白質由来の 280nm 以外に、340nm と 560nm に極大吸収を持つことが分かった。また有色の金属イオンの結合を想定して、ICP-AES 測定を行ったが、有色金属イオンの結合はないことが分かった。これらのことから、ある MBL が赤紫色を呈している原因は、MBL に発色団を持つ化合物が結合していると考えた。

そこで本研究は、この化合物の構造と結合様式を物理化学的手法で化学的に解明することを目的とした。この結果は、MBL 阻害剤の候補となる可能性があると考えた。特にこの化合物は、大腸菌または培地由来の化合物であることが予想されるので、MBL 阻害剤として開発される場合は、生体影響の少ない化合物が選択できることになる。また本研究によって、タンパク質に結合した生体由来の化合物を抽出する方法論を提供できる。

2. 研究の目的

本研究は、MBL に結合していると考えられている発色団を持つ低分子化合物の構造と結合様式を物理化学的手法で化学的に解明することが目的である。そこで4つのサブテーマを設定した (図1)。

- (1) MBL 酵素から分取カラムを使った HPLC で発色団を持つ化合物を分離する。
- (2) 分離された発色団を持つ化合物の構造決定を質量分析及び NMR で行う。
- (3) 同定された化合物の MBL 酵素に対する結合能を速度論的及び熱力学的に解析する。
- (4) この化合物の MBL 酵素に対する結合様式を X 線結晶構造解析で可視化する。

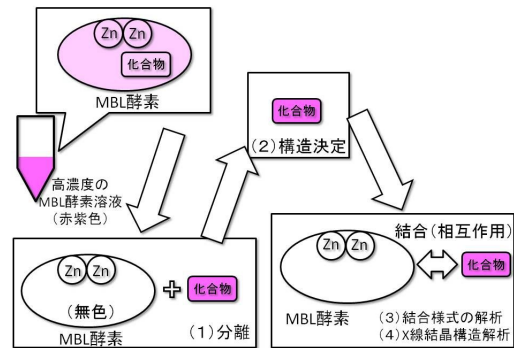


図1 本研究の流れ

3. 研究の方法

(1) MBL 酵素から分取カラムを使った HPLC で発色団を持つ化合物を分離する。

タンパク質に結合した低分子化合物は、従来法ではゲルろ過法、透析法及び限外ろ過法で分離することができる。しかし MBL 酵素に結合した発色団を持つ化合物は、ゲルろ過法では酵素から分離できないことがわかっている。そこで2つの分離方法を検討する (図2)。

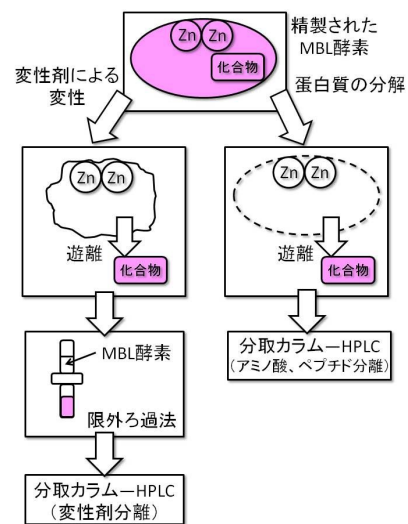


図2 MBL から MBL 酵素から発色団を持つ化合物の分離方法

(2) 分離された発色団を持つ化合物の構造決定を質量分析及び NMR で行う。

(1)で分離できた発色団を持つ化合物は、質量分析 (TOF(ESI)-MS、TOF(MALDI)-MS) 及び NMR (400 MHz) を使って構造決定を行う。

(3) 同定された化合物の MBL 酵素に対する結合能を速度論的及び熱力学的に解析する。

阻害活性の測定 発色団を持つ化合物が MBL 酵素の加水分解活性を阻害するか、速度論的に検討する。この解析から、発色団を持つ化合物の MBL 酵素に対する阻害定数 (K_i)、阻害様式 (競合阻害または非競合阻害) が解明できる。

結合能の測定 発色団を持つ化合物が MBL 酵素に結合するか、速度論的及び熱力学的に解析する。速度論的解析は、表面プラズモン共鳴を用いた分子間相互作用測定装置を用いる。この解析から、結合の特異性、結合速度 (k_{ON})、解離速度 (k_{OFF})、結合定数 (K_b) が解明できる。また熱力学的解析は、等温滴定カロリーメトリを用いる。この解析から、結合定数 (K_b)、結合のモル比、結合の熱力学的定数 (ΔG 、 ΔH) が解明できる。

(4) MBL 酵素と発色団を持つ化合物の結合様式を X 線結晶構造解析で可視化する。

MBL 酵素を結晶化できるまで高純度に精製して、大量に調製する。発色団を持つ化合物と MBL 酵素の複合体を調製して、さらに結晶化させ、X 線結晶構造解析を行うことで、発色団を持つ化合物と MBL 酵素の結合様式を可視化する。

4. 研究成果

(1) MBL 酵素である IMP-1 および KHM-1 の大量培養と精製

IMP-1 は、赤紫色を呈した MBL 酵素である。IMP-1 遺伝子は、pET ベクターに組み込まれ、大腸菌 BL21(DE3) に導入され、大腸菌内で IMP-1 酵素を発現させた。その後、大腸菌破碎を行い、陽イオン交換カラムクロマトグラフィー及びゲル濾過カラムクロマトグラフィーを行った。精製の確認は、SDS-PAGE によって行った。

また、KHM-1 も赤紫色を呈した MBL 酵素である。この酵素も IMP-1 と同様の方法で精製することができた。

(2) 酸による IMP-1 変性と発色団を持つ化合物の分離

5mg/mL の IMP-1 に 0.1M の硫酸を加えたところ、560nm の極大吸収が消失した。この反応は硫酸の代わりに 0.1M の水酸化ナトリウムを加えても、IMP-1 の代わりに KHM-1 を使って酸・アルカリ処理を行っても同様の結果となった (図 3)。

酸処理後の IMP-1 溶液は、分子量 10,000 をカットする限外ろ過によってタンパク質と化合物の分離を行った。しかしろ液 (分子量 10,000 以下の化合物を含む溶液) は、

UV-Vis 測定の結果、310nm の極大吸収のみを観察することができた。

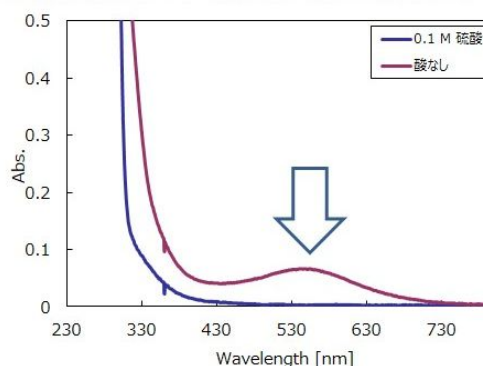


図 3 酸処理した IMP-1 の UV-Vis スペクトル

(3) 変性剤処理による IMP-1 変性と発色団を持つ化合物の分離

5mg/mL の IMP-1 にタンパク質変性剤であるグアニジン塩酸塩または尿素を加えたところ、340nm および 560nm の極大吸収は、希釈による吸光度の減少が観察された。次に限外ろ過によって IMP-1 溶液を濃縮し、さらに変性剤を加える操作を 2 回行った。その結果、IMP-1 溶液の UV-Vis 測定によって、340nm と 560nm の極大吸収の減少が見られた。しかし、限外ろ過後のろ液 (分子量 10,000 以下の化合物を含む溶液) の UV-Vis 測定では、560nm の極大吸収は見られなかった。

(4) 熱処理による IMP-1 変性と発色団を持つ化合物の分離

5mg/mL の IMP-1 溶液を 80 のドライバスで加熱した。その結果、加熱後すぐに沈殿が観察された。そこで沈殿を防ぐために、IMP-1 溶液にグリセリン溶液を添加して加熱を行ったが、沈殿が生じるまでの時間は数分ほど延びたが、沈殿が生じた。

そこで上清に発色団を持つ化合物の存在を確認するために、UV-Vis 測定を行ったが、吸収は観察できなかった。次に沈殿に発色団を持つ化合物の存在を確認するために、緩衝液や有機溶剤で懸濁させ、遠心後に上清を UV-Vis 測定を行った。しかし 560nm の吸収は観察できなかった。

(5) タンパク質分解酵素による IMP-1 分解と発色団を持つ化合物の分離

5mg/mL の IMP-1 に、IMP1-に対して 2% になるようにトリプシンを加え、UV-Vis 測定を行った。しかし、560nm の極大吸収が消失することが分かった (図 4)。

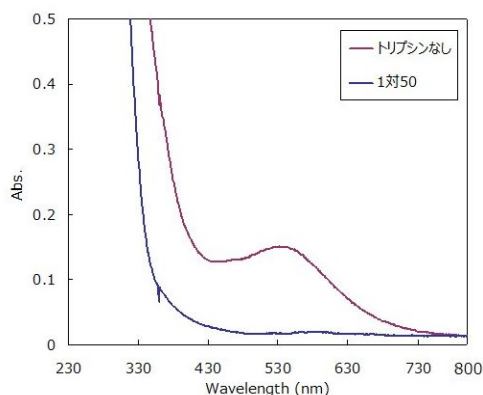


図4 トリプシンしたIMP-1のUV-Visスペクトル

(5) 研究成果のまとめ

本研究は、MBL に結合していると考えられている発色団を持つ低分子化合物の構造と結合様式を物理化学的手法で化学的に解明することが目的である。そのため、MBL 酵素から発色団を持つ化合物を分離する方法を検討した。分離方法として、MBL 酵素を変性させて化合物を遊離させ、限外ろ過によってタンパク質と化合物を分離する方法である。もう一つは、MBL 酵素をタンパク質分解酵素で分解させ、化合物を遊離させる方法である。

本研究期間では、MBL である IMP-1 を中心に研究を行った。成果として、IMP-1 に結合している化合物は、酸やアルカリ、熱処理、タンパク質分解酵素によって、560nm の極大吸収が消失したことから、分解されやすい構造をもつ化合物であることが分かった。また種々の処理後に行った限外ろ過のろ液には、310nm に吸収を持つ化合物が分離することができたことから、発色団を持つ化合物は、310nm に吸収を持つ化合物同士が結合して共役が延びた化合物、あるいはIMP-1 にある Trp と結合して共役が延びた化合物であると推定した。本研究では、発色団を持つ化合物の構造情報を推測しか得ることができなかった。今後は、質量分析を利用して、この化合物の分子量を求め、さらに IMP-1 に直接結合しているか実験を行う予定である。

本研究は、MBL 酵素を大量に調製できないと達成できない内容である。研究代表者は、本研究で扱った IMP-1 や KHM-1 という MBL 酵素以外にも、VIM-2、IND-7 が赤紫色をしていることを見出している。本研究を今後も継続させ、MBL 酵素を発色させる原因を追究して、MBL 阻害剤の可能性を見出したい。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

山口 佳宏、甲斐 紀子、稲津 誠、荒川 宜親、黒崎 博雅、金属酵素メタロ-β-ラクタマーゼに結合した未知化合物の分離法の探索、2014年度日本蛋白質科学会(2014/06/25-27、横浜産貿ホールマリネリア、ポスター番号:2P-001)(予定)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://yamaguchi-labo.jp>

6. 研究組織

(1)研究代表者

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: 1 0 3 6 3 5 2 4

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし