

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：32519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460534

研究課題名(和文) -ラクタマーゼ反応メカニズムと新規阻害剤探索に関する構造生物学的研究

研究課題名(英文) Structure basis of reaction mechanism of beta-lactamases and new inhibitor search

研究代表者

額賀 路嘉 (Nukaga, Michiyoshi)

城西国際大学・薬学部・准教授

研究者番号：20251150

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：-ラクタマーゼは細菌による -ラクタム剤耐性の主要因である。近年、制圧困難である、カルバペネム耐性腸内細菌が世界的に問題となっている。本研究ではカルバペネムを分解するカルバペネマーゼとそれを阻害可能であるアビバクタムに関連して以下の3つの研究を行った。

(1) 代表的クラスAカルバペネマーゼであるPenA -ラクタマーゼとアビバクタムとの複合体構造解析。(2) Fox-4クラスC -ラクタマーゼとアビバクタムとの複合体の構造解析。(3) Enterobacter cloacae P99クラスC -ラクタマーゼとイミペネム、ピアペネム複合体のX線結晶解析。

研究成果の概要(英文)：beta-Lactamases are the main cause of bacterial beta-lactams resistant. However, the emergence of novel beta-lactamases with direct carbapenem-hydrolyzing activity (carbapenemase) has contributed to an increased prevalence of carbapenem-resistant Enterobacteriaceae (CRE). In this study, we studied three subjects, which are concerned with beta-lactamase inhibition mechanism by carbapenems or carbapenemase inhibitor, avibactam. (1) PenA class A carbapenemase PenA complex with avibactam. (2) Fox-4 plasmid mediated class C beta-lactamase in complex with avibactam. (3) Enterobacter cloacae P99 class C beta-lactamase in complex with biapenem.

研究分野：構造生物学

キーワード：薬剤耐性 抗生物質 感染症 蛋白質 構造生物学 X線結晶解析

1. 研究開始当初の背景

現在の医療には抗生物質の利用は欠かせない。一方で、薬剤耐性 (AMR) 菌と呼ばれる抗生物質が効かない菌の発生の問題が日々、大きくなっており、特に、最近では既存の抗生物質のほぼすべてが効かない、スーパー耐性菌と呼ばれる細菌まで出現し、世界的な問題となっており、研究期間中の伊勢志摩サミットでもとりあげられたほどである。その一方、抗生物質には他の医薬品とは異なり、いわゆる寿命があるということで、製薬会社による研究が少なくなっている事実もある。本研究では、特に利用頻度の高いβ-ラクタム系抗生物質を対象に研究を行う。

β-ラクタマーゼは細菌が産生するβ-ラクタム系抗生物質加水分解酵素であり、ラクタム環を構成するアミド結合を加水分解、開裂させ抗菌活性を失わせる細菌のβ-ラクタム系薬剤耐性の主要因である。β-ラクタマーゼはさまざまな菌種の細菌が染色体やプラスミド上にその遺伝子をもち、数多くの種類が存在している。一般的にはアミノ酸配列の相同性によりクラス A, B, C, D の4つのクラスに分類している。

これらのβ-ラクタマーゼによる耐性菌に対抗するためにさまざまなβ-ラクタム系薬がつくられ、使われてきた。その代表例、かつ現在最もよく効く抗生物質のひとつであるのは”Last Resorts”と形容されることもあるカルバペネム系薬である。この薬剤に対しては、カルバペネマーゼといった新型β-ラクタマーゼが報告されこれらの薬剤が有効でない耐性菌が出現し、この酵素遺伝子をもつ耐性菌の一種は、他の多くの薬剤耐性因子も同時に持ち、スーパー耐性菌として認知されている。

2. 研究の目的

本研究では、抗生物質の中でも特に使用頻度の高いβ-ラクタム系抗生物質をとりあげ、その主たる耐性要因であるβ-ラクタマーゼの作用機序をX線結晶解析の手法を用いて解析し、新規抗菌剤開発の基礎データとすることを旨とした。

- ① 代表的な抗生物質であるβ-ラクタム剤あるいはβ-ラクタマーゼ阻害剤の作用メカニズムを分子のレベルで解明する。
- ② 上を基礎として新たな阻害剤開発の参考とする。

今回は特に上述カルバペネム系薬を分解するカルバペネマーゼにも効果があるアビバクタムの作用機序と、カルバペネム系薬の作用メカニズムについての研究を行った。

3. 研究の方法

(1) β-ラクタマーゼ遺伝子の入手と発現系構築

今回は、*Enterobacter cloacae* P99, *E. cloacae* GC1 の生産する染色体性クラス C β-ラクタマーゼ、Fox-4 プラスミド性クラス C

β-ラクタマーゼ、*Burkholderia multivorans* 由来 PenA クラス A β-ラクタマーゼ (カルバペネマーゼ) を材料に研究を行った。その遺伝子は過去に発現系として準備されていたが、PenA 遺伝子のみ、十分な量を得ることができなかったので、pET50b を利用した高発現システムを作成した。

(2) 酵素タンパク質の発現と精製

3 から 9L の培養液より、菌を回収、破碎し、粗酵素抽出液とした。これに対し、イオン交換、Ni アフィニティ、ゲル濾過などの各種クロマトグラフィーを行った。それぞれのβ-ラクタマーゼが精製度が 99%以上になるまで、精製ステップを繰り返し、高純度の精製タンパク質を得た。

(3) 結晶化と X 線結晶解析

今回の研究では、既にアポ酵素の結晶化条件は決定されていた。回折実験はつくば、高エネルギー加速器研究機構のフotonファクトリーで行った。回折実験の直前に、必要に応じて結晶をアビバクタムやカルバペネム剤などの阻害剤溶液に浸し、酵素阻害剤複合体を形成させた。(ソーキング) 結晶を 20% グリセロール (クライオプロテクタント) に数十秒浸したあと、マウントし数秒の照射時間で 180 から 400 枚程度のデータを収集、指数づけ、スケーリングを行ない、回折データを得た。

今回は、全ての場合で、アポ酵素の結晶解析を行っていたので、直接既知構造から位相を決定した。マニュアルによるフィッティングと精密化プログラムによる計算を繰り返さない、最終モデルを構築していった。

(4) 分子動力学計算

本申請で購入した Nvidia 製 K80GPU を利用し、Linux 上で Amber16 を利用できるようにセットアップを行った。

4. 研究成果

(1) PenA:アビバクタム複合体の構造解析

アビバクタムは、クラス A, C, D のセリンβ-ラクタマーゼに対する強力な阻害剤であり、

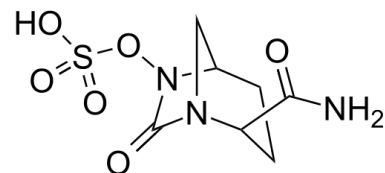


図1: アビバクタムの構造

一般的にはセフトジジムなどと合剤として利用されている。カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) にも有効であるため、特にアメリカで多く利用されている。本研究では、カルバペネムが効かない代表的な菌種である *Burkholderia multivorans* 由来の PenA β-ラクタマーゼとアビバクタム複合体の X 線結晶解析を 1.6Å 解像度で行った。

アビバクタムが PenA β-ラクタマーゼの活

性中心に結合した様子を図2に示した。アビバクタムは、PenAのアミノ酸残基のコンフォメーションにほとんど影響を与えずに活性中心に結合していた。アビバクタムはクラスAβ-ラクタマーゼに対して図3の反応機構に従って、図2の状態から、元のアビバクタム分子に戻ってリサイクルされる反応と、このまま、加水分解されて分解されてしまう反応が考えられている。(図3)しかしながら、この反応が起こらないことが、アビバクタムの阻害活性が高いことと関係している。その理由を立体構造から明らかとした。

図2の構造中、脱アシル化水とアビバクタム分子との相互作用により求核性の低下が予想され、アビバクタム加水分解反応が進みにくいことが明らかとされた。また、同時にLys73がプロトン化された状態であることが示唆され、Lys73がSer130の水素原子を引き抜くことができない可能性を示すことができた。すなわち、アビバクタムのリサイクル反応も起こりにくい構造をとっていた。この2点により、PenA：アビバクタム複合体の安定性が保たれ、強力な阻害剤としての性質を示していた。

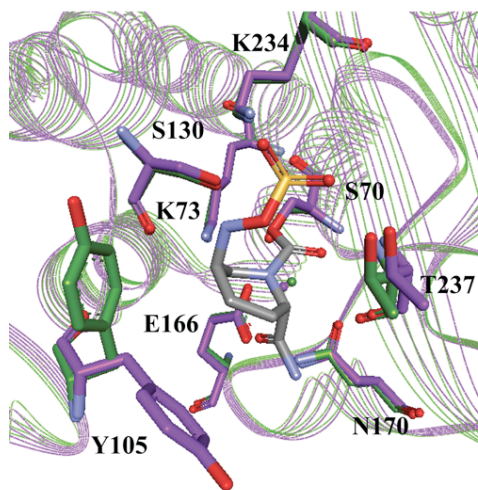


図2：PenA：アビバクタム複合体の活性中心

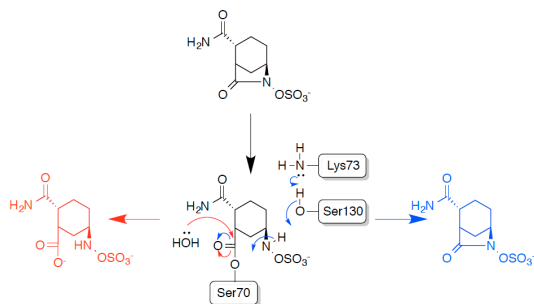
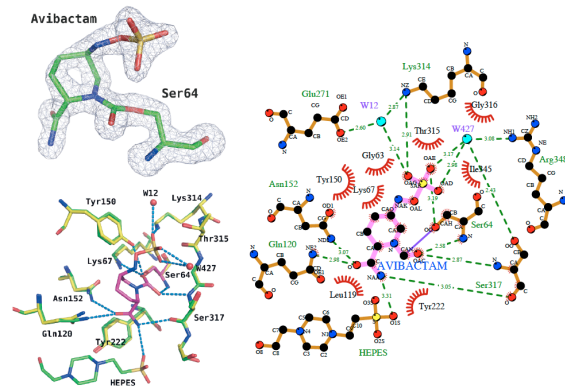


図3クラスAβ-ラクタマーゼによるアビバクタムのリサイクル及び加水分解反応機構

(2) Fox-4:アビバクタム複合体の構造解析

Fox-4はプラスミド性のクラスCβ-ラクタマーゼであり、セファマイシンを分解できる基質特異性拡張型のβ-ラクタマーゼのひとつである。(1)と同様、Fox-4：アビバクタム複合体のX線結晶解析を行った。



Yellow: Fox-4 apo

Green and Magenta: fox-4:avibactam complex

図4：Fox-4：アビバクタム複合体のX線結晶解析

3.0σレベルのオミットマップ(左上)。活性中心に結合したアビバクタム(左下)。アビバクタムとFox-4の相互作用(LigPlot図、右)

図4に示したように、Fox-4β-ラクタマーゼの活性中心セリンに結合したアビバクタムが非常にきれいな電子密度マップと共に観察された。これは、アビバクタム分子の動きが少なく安定して存在する事を示唆している。既に解析されているアポ酵素と比較しても、活性中心残基が、ほとんど変化が無かった。しかしながら、アビバクタムの結合形態は、次節で報告するカルバペネム複合体と同様、水分子の求核攻撃をスルホン酸基がブロックしていることが示唆された。

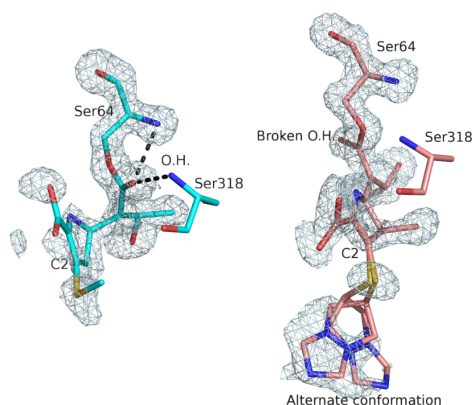
これを確認するため、Fox-4：アビバクタム複合体の分子動力学計算を行っている。Amber16を利用し、3D-RISM法にて、複合体近傍の水分子の位置を予想した後、分子動力学計算をはじめた。結果が次第、論文などで発表する予定である。

また、これまでにP99、GC1クラスCβ-ラクタマーゼとアビバクタムとの複合体のデータ収集を終えて、活性中心にアビバクタムが結合していることを確認している。これらの結果とともに、アビバクタムのクラスCβ-ラクタマーゼ阻害機構を明らかにする。

(3) P99:ピアペネム複合体の構造解析

Enterobacter cloacae P99が産生するクラスCβ-ラクタマーゼは、約30年前に構造が明らかになって以来多くの阻害剤との複合体が研究されている。以前より構造解析を行っていた各種カルバペネム系薬との複合体解析を行ってきた中、新たにピアペネム複合体

の構造を明らかにした。イミペネム、パニペネム、ドリペネムなどでは、オキシアニオンホールが形成されるのにも関わらずその後の脱アシル化反応が起こりにくい構造が観察されたのに対して、ピアペネムではオキシアニオンホールが形成されない状態のアシル中間体が観察された。全く異なるタイプの阻害形態ではあるが、両方とも、少なくともX線結晶解析が可能であるほどには安定な阻害作用がある。この2つの阻害形態が全てのカルバペネム系薬で可能なのか、また、それぞれの安定性に差があるのかを検討するために現在、分子動力学計算を行っている。



イミペネム、オキシアニオンホール形成 ピアペネム、オキシアニオンホール非形成
 図5：P99：イミペネム複合体（左）とピアペネム複合体（右）の2.5 σ レベルのオミットマップ

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 4 件)

- ① “Overcoming an Extremely Drug Resistant (XDR) Pathogen: Avibactam Restores Susceptibility to Ceftazidime for Burkholderia cepacia Complex Isolates from Cystic Fibrosis Patients.”, Papp-Wallace KM, Becka SA, Zeiser ET, Ohuchi N, Mojica MF, Gatta JA, Falleni M, Tosi D, Borghi E, Winkler ML, Wilson BM, LiPuma JJ, Nukaga M, Bonomo RA., ACS Infect Dis. 2017
doi: 10.1021/acsinfecdis.7b00020.
- ② “Two Distinctive Binding Modes of Endonuclease Inhibitors to the N-Terminal Region of Influenza Virus Polymerase Acidic Subunit.”, Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M, Hoshino T., Biochemistry. 2016 May 10;55(18):2646-60.
doi: 10.1021/acs.biochem.5b01087.
- ③ “Structural and computational study on inhibitory compounds for endonuclease activity of influenza virus polymerase.”, Fudo S, Yamamoto N, Nukaga M, Odagiri T, Tashiro M,

Neya S, Hoshino T., Bioorg Med Chem. 2015 Sep 1;23(17):5466-75.

doi: 10.1016/j.bmc.2015.07.046.

- ④ 「クラスC β -ラクタマーゼ」構造、反応機構、進化-, 額賀路嘉, 2015年07月01日, 臨床と微生物学 Vol42, No4, 特集「 β -ラクタマーゼから考える細菌の進化」, p35-p42,

[学会発表] (計 3 件)

- ① “Size Matters: Probing the Mechanisms of Inactivation of Class C beta-Lactamases with Avibactam (AVI).”, M. Nukaga, S. T. Lefurgy, M. D. Barnes, K. M. Papp-Wallace and R. A. Bonomo, 2016年06月21日, 56th Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Boston, MA, USA.
- ② “Exploring the Inactivation Mechanism by Avibactam (AVI) of an Inhibitor-Resistant Carbapenemase, PenA from *Burkholderia multivorans* (Bm).”, K. M. Papp-Wallace, J. A. Gatta, N. Ohuchi, M. L. Winkler, S. A. Becka, J. J. LiPuma, R. A. Bonomo, M. Nukaga, 2015年09月21日, Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2015, San Diego, CA
- ③ “Studies on the Inactivation of *Enterobacter cloacae* P99 Class C beta-Lactamase by Carbapenems: Doripenem, Panipenem, Imipenem and Biapenem.”, M. Nukaga, N. Ohuchi, C. R. Bethel, R. A. Bonomo, 2015年09月21日, Interscience Conference of Antimicrobial Agents and Chemotherapy 2015 (ICAAC/ICC2015), San Diego, CA

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
額賀 路嘉 (NUKAGA, Michiyoshi)
 城西国際大学・薬学部・教授
 研究者番号：20251150
- (2) 研究分担者
 なし
- (3) 連携研究者
星野 忠次 (HOSHINO, Tyuji)
 千葉大学・薬学研究院・准教授
 研究者番号：90257220
- (4) 研究協力者
 - James R Knox
 Univ. of Connecticut, Professor
 - Robert Bonomo
 Research Service, Louis Stokes
 Cleveland Department of Veterans
 Affairs, Professor