

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：33905

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08376

研究課題名（和文）カルバペネム抗菌薬をも不活化するメタロ-β-ラクタマーゼの阻害剤・検出剤の合成

研究課題名（英文）Synthesis of inhibitors and fluorescence reagents for metallo-beta-lactamases

研究代表者

黒崎 博雅（Kurosaki, Hiromasa）

金城学院大学・薬学部・教授

研究者番号：70234599

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：(1) IMP-1型とIND-7型メタロ-β-ラクタマーゼのDansylC4SHの反応を蛍光ストップトフロー法により検討を行った。IMP-1型とIND-7型メタロ-β-ラクタマーゼへのDansylC4SHの取り込み速度定数 $k+1$ と解離速度定数 $k-1$ は、それぞれ $0.863 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $0.057 \text{s}^{-1}$ と $0.06 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ 、 $0.085 \text{s}^{-1}$ であった。(2) IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌と非産生菌の比率を変化させDansylC4SHの蛍光強度の違いを観察した。DansylC4SHは、IMP-1型メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌に対して強く発光することがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題はこれまで臨床の現場で問題となっているメタロ-β-ラクタマーゼの阻害剤とメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌の蛍光検出法開発を目指す研究であり、本研究で得られた成果は学術的な意義があると考えている。現在、カルバペネム耐性腸内細菌による感染症が増加し、切り札的な抗菌剤に対しても耐性を獲得するに至っている。本研究目的のメタロ-β-ラクタマーゼの阻害剤と蛍光剤の開発は、深刻化している薬剤耐性菌感染症の防止・対策と阻害剤や臨床検査システム開発に直結する点で、社会貢献性が高いと言える。

研究成果の概要（英文）：The results obtained in this study are as follows. (1) We investigated the reaction of DansylC4SH to IMP-1 typed- and IND-7 typed metallo-β-lactamases by fluorescence stopped-flow method. The uptake rate constants  $k+1$  and the dissociation rate constants  $k-1$  of DansylC4SH into IMP-1 typed and IND-7 typed metallo-β-lactamases were  $0.863 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $0.057 \text{s}^{-1}$  and  $0.06 \mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $0.085 \text{s}^{-1}$ , respectively. (2) Using the fluorescent agent DansylC4SH, we observed the difference in fluorescence intensity when the abundance ratio of IMP-1 typed metallo-β-lactamase-producing and non-producing bacteria was changed. As a result, DansylC4SH showed stronger fluorescence in the IMP-1 typed metallo-β-lactamase-producing strain than in the IMP-1 typed metallo-β-lactamase non-producing strain.

研究分野：機器分析学

キーワード：感染症 β-ラクタム剤 阻害剤 蛍光剤 薬剤耐性 メタロ-β-ラクタマーゼ 金属酵素

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

カルバペネム系抗菌薬が効かないニューデリーメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ (NDM-1)を産生する腸内細菌などによる新型のグラム陰性薬剤耐性菌が海外の医療施設で広がり、<sup>1</sup>国内でもNDM-1が検出され医療の根幹を脅かす現実的な脅威となっている。IMP-1型、VIM-2型、NDM-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの耐性遺伝子は、伝達性のプラスミド上に存在するため、容易に他の細菌への接合伝達により菌種を超えて伝播し多剤耐性化していく。これまでのIMP-1型やVIM-2型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼは緑膿菌など日和見細菌から殆ど産生されていたのに対して、NDM-1は大腸菌や肺炎桿菌から分離され、院内だけでなく市中感染して世界的に蔓延することが危惧され、<sup>2</sup>世界各国とも警戒している。さらに問題なのは、メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼはカルバペネム系抗菌薬をも分解するだけではなく、臨床的に有効な阻害剤が未だに無いことである。

### 2. 研究の目的

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの精密なX線結晶構造解析を通じて、我々は、全てのメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの阻害剤とメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌を蛍光法で検出できる検出剤の開発を目指した。

### 3. 研究の方法

(1) IMP-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの発現および精製  
既に報告されている方法に従って抽出・精製した。<sup>4</sup>

(2) IND-7型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの発現および精製  
既に報告されている方法に従って抽出・精製した。<sup>5</sup>

(3) *E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1)菌体懸濁液の調製  
*E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1)菌体懸濁液は(1)の方法に従って調製した。

(4) *E. coli* BL21(DE3)(pET9a)菌体懸濁液の調製  
*E. coli* BL21(DE3)(pET9a)菌株を50  $\mu$ g/mLカナマイシンを含むLB寒天培地にストリークし、37 $^{\circ}$ Cで一晩培養した。形成した菌の白色コロニーから菌体を釣菌し、50  $\mu$ g/mLカナマイシンを含む10 mLのLB培地中37 $^{\circ}$ Cで振とう培養(150 rpm)した。50  $\mu$ g/mLカナマイシンを含む500 mLのLB培地に培養液を接種し、37 $^{\circ}$ CでOD<sub>600</sub>が3.0になるまで振とう培養した。培養液を回収し、湿菌重量1 gに対して1 mLの割合になるように50 mM Tris-HCl (pH 7.4)を加えて再懸濁した溶液を菌液とした。

(5) *N*-[2-(5-dimethylamino-naphthalene-1-sulfonylamino)butyl]-3-mercaptopropionamide (DansylC4SH)の合成  
蛍光剤(DansylC4SH)の合成は既に報告された方法に従って合成した(Fig. 1)。<sup>6</sup>

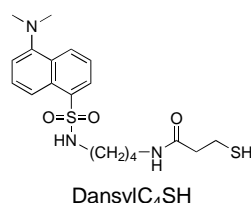


Fig. 1. Chemical structure of DansylC4SH.

(6) 蛍光ストップフロー法によるIMP-1型およびIND-7型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの蛍光剤(DansylC4SH)に反応速度解析

DansylC4SHのIMP-1型およびIND-7型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼへの取り込み・解離速度をストップフロー法により用いて検討した。実験条件は、25 $^{\circ}$ C、励起波長340 nm、測定波長535nm、cutoffフィルター400 nm以下としてメタノール6%を含む50 mM Tris-HCl (pH 7.4, 0.5M NaCl)を用いて行った。5  $\mu$ Mの酵素溶液にDansylC4SHの濃度範囲(5  $\mu$ M ~ 30  $\mu$ M)において535 nmの蛍光強度の変化の時間変化を継時的に測定した。

(7) 落射型蛍光顕微鏡を用いたDansylC4SHのIMP-1型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌簡易検出への応用

集菌した *E. coli* BL21(DE3)(pET9a)および *coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1)の懸濁液を、50 mM Tris-HCl (pH 7.4) 890  $\mu$ L、菌液 10  $\mu$ L、メタノール 100  $\mu$ L、DansylC4SH 1  $\mu$ M を混合した溶液を 30 分インキュベートし、2  $\mu$ L をスライドガラスの上におせ、乾燥しないようにカバーガラスをマニキュアで封入したサンプルを蛍光顕微鏡で観察し、蛍光強度の違いを観察した。蛍光顕微鏡は落射型蛍光顕微鏡を用いた。DansylC4SH は、極大吸収波長が 340 nm、極大蛍光波長が 540 nm である。そのため、励起フィルター (330 ~ 385 nm)、ダイクロイックミラー (400 nm) と吸収フィルター (420 nm) のフィルターを選択した。

#### 4. 研究成果

(1) 蛍光ストップフロー法による IMP-1 型および IND-7 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼの DansylC4SH への取り込み・解離速度定数

本研究では DansylC4SH の IMP-1 型および IND-7 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼへの取り込み・解離速度を蛍光ストップフロー法により検討を行った。

IMP-1 型および IND-7 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼと DansylC4SH との反応を擬一次反応とし、測定データを式(1)にあてはめ、みかけの一次反応速度定数を求めた。

時間変化による蛍光強度変化は次式で表わされる。

$$F(t) = F_{\text{exp}}(-k_{\text{obs}}t) + F \quad (\text{eq. 1})$$

ただし、

$F(t)$  : 蛍光強度変化

$F$  : 蛍光強度の振幅

$F_{\text{exp}}$  : 蛍光強度の最終値

$k_{\text{obs}}$  : みかけの一次反応速度定数

次に

$$k_{+1}$$



$$k_{-1}$$

の関係が成り立つことが分かった。

ここで、

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ : IMP-1 型または IND-7 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ

DansylC4SH : 今回用いた蛍光剤

メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ  $\cdot$  DansylC4SH : 酵素と蛍光剤との複合体

$k_{+1}$  : 取り込み速度定数

$k_{-1}$  : 解離速度定数

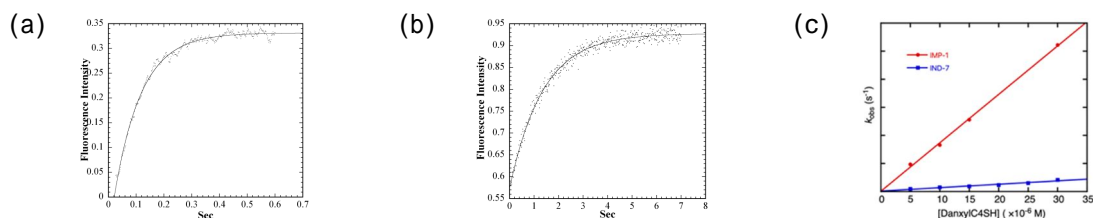
である。さらに、DansylC4SH の初濃度が酵素濃度に比べ高い時、擬一次速度定数  $k_{\text{obs}}$  は

$$k_{\text{obs}} = k_{+1}[\text{メタロ-}\beta\text{-ラクタマーゼ}] + k_{-1} \quad (\text{eq. 3})$$

で表すことができる。 $k_{-1}$  と  $k_{+1}$  の値は  $[\text{DansylC4SH}]$  vs  $k_{\text{obs}}$  のプロットの傾きと切片からそれぞれ得られる。メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ  $\cdot$  DansylC4SH 複合体の解離定数  $K_D$  は式 4 から求めた。

$$K_D = k_{-1}/k_{+1} \quad (\text{eq. 4})$$

一例として、IMP-1 型および IND-7 型メタロ- $\beta$ -ラクタマーゼと DansylC4SH の濃度が 5  $\mu$ M の時の蛍光強度の時間変化を Fig. 2 に示す。



**Fig. 2.** Time courses of the binding of DansylC4SH to (a) IMP-1 or (b) IND-7 at 25°C. The concentrations of IMP-1 typed metallo- $\beta$ -lactamase, IND-7 typed metallo- $\beta$ -lactamase, and DansylC4SH are 5  $\mu$ M, respectively. (c) The lines were drawn according to eq.1, using  $k_{+1} = 0.863 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{-1} = 0.057 \text{s}^{-1}$  for IMP-1 typed metallo- $\beta$ -lactamase and  $k_{+1} = 0.060 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{-1} = 0.085 \text{s}^{-1}$  for IND-7 typed metallo- $\beta$ -lactamase, respectively.

IMP-1 型と IND-7 型メタロ-ラクタマーゼへの DansylC4SH の取り込み速度定数  $k_{i1}$  と解離速度定数  $k_{-1}$  は、それぞれ  $0.863 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $0.057 \text{s}^{-1}$  と  $0.06 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $0.085 \text{s}^{-1}$  であった (Table 1)。これらの結果から、IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼの取り込み速度定数は、IND-7 の速度定数に比べ 4.4 倍となり、DansylC4SH の IND-7 型メタロ-ラクタマーゼへの取り込み速度定数は IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼと比べてかなり遅いことが分かった。一方、IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼの解離速度定数は、IND-7 の速度定数に比べ、0.67 倍となった。取り込み速度定数  $k_{i1}$  と解離速度定数  $k_{-1}$  から得られた IMP-1 型および IND-7 型メタロ-ラクタマーゼの解離定数  $K_0$  は、それぞれ  $0.066 \mu\text{M}$  と  $1.4 \mu\text{M}$  となった。これらの値は、蛍光分光滴定から求めた  $K_0$  値とほぼ一致した結果となった (Table 1)。<sup>3</sup>これより、IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼと比べ IND-7 型メタロ-ラクタマーゼでは DansylC4SH は結合しにくいことが明らかとなった。

**Table 1.** The formation and decay rate constants of DansylC4SH to IMP-1 and IND-7 typed metallo- $\beta$ -lactamases.

Metallo- $\beta$ -lactamase	$k_{i1}$ ( $\mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	$k_{-1}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	$K_0$ ( $\mu\text{M}$ )	$K_0^*$ ( $\mu\text{M}$ ) <sup>3</sup>
IMP-1	0.863	0.057	0.066	0.067 <sup>3</sup>
IND-7	0.06	0.085	1.4	3.3

<sup>3</sup> $K_0^*$  values are obtained by a fluorometric titration.

考えられる要因としては、次のことが挙げられる。

- 1) IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼでは、64 位の Trp が基質や阻害剤が結合する際に重要と考えられている基質の認識に含むアンチパラレル  $\beta$ -シート上の 58 - 67 位のアミノ酸残基から構成されるフラップがあること。このフラップは、基質や阻害剤が結合する際に重要と考えられている。<sup>7</sup>以前、我々は IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼと DansylC4SH の結晶構造を報告した。<sup>3</sup>これによれば DansylC4SH のインドール環と 64 位の Trp とは edge-to-face で相互作用しており、取り込み速度に大きく影響を及ぼしていると考えられる。
- 2) IND-7 型メタロ-ラクタマーゼの 64 位は Lys であるため IMP-1 でみられる相互作用がないことから結合能が弱まったと考えられる。

(2) IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼ産生菌と非産生菌の存在比率の変化による蛍光強度への影響

IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼ産生菌 *E. coli* BL21 (DE3) (pET9a/IMP-1) と IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼ非産生菌 *E. coli* BL21(DE3) (pET9a) を用いて、この二種の菌の存在比率 (*E. coli* BL21 (DE3) (pET9a/IMP-1) : *E. coli* BL21(DE3) (pET9a) = 9:1, 5:5, 1:9) を変化させた時の蛍光強度の違いを観察した。それらの結果を Fig. 3 に示す。



**Fig. 3.** Epifluorescence microscopy images of *E. coli* BL21(DE3) cells stained with DansylC4SH. (a) BL21(DE3)(pET9a/IMP-1):*E. coli* BL21(DE3)(pET9a) = 1 : 9, (b) *E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1):*E. coli* BL21(DE3)(pET9a) = 5:5, and (c) *E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1):*E. coli* BL21(DE3)(pET9a) = 9:1. Bacterial cells were incubated with DansylC4SH in 10% methanol 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) at 25°C for 30 min.

IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼ産生菌が少ない時は、ほとんど蛍光は観測されなかったが、IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼ産生菌の割合が多くなるにつれ、明らかに蛍光の増大が認められた。IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼ産生菌が 9 割になるとほとんどの菌が蛍光を発するようになった。これにより、DansylC4SH は IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼと反応し、IMP-1 型メタロ-ラクタマーゼ産生菌を光らせていると考えられる。

#### 4. まとめ

本研究では、臨床の現場で問題となっている  $\beta$ -ラクタム剤の分解酵素(メタロ-ラクタマー

ゼ)の阻害剤と蛍光検出剤(DansylC4SH)の開発を目的とした。DansylC4SHは、IMP-1型メタロ-  
-ラクタマーゼ非産生菌と比べると、IMP-1型メタロ-  
-ラクタマーゼ産生菌に対して、より強く  
発光することがわかった。今後も、化学構造の最適化を図り、臨床で使用可能なメタロ-  
-ラクタマーゼ阻害剤並びにメタロ-  
-ラクタマーゼ産生菌の蛍光検出法の開発を行っていきたい  
と考えている。

<引用文献>

- (1) Moellering, R. C., Jr. NDM-1--a cause for worldwide concern. *N Engl J Med* **2010**, *363* (25), 2377-2379. DOI: 10.1056/NEJMp1011715.
- (2) Kumarasamy, K. K.; Toleman, M. A.; Walsh, T. R.; Bagaria, J.; Butt, F.; Balakrishnan, R.; Chaudhary, U.; Doumith, M.; Giske, C. G.; Irfan, S.; et al. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. *Lancet Infect. Dis.* **2010**, *10* (9), 597-602. DOI: 10.1016/s1473-3099(10)70143-2.
- (3) Kurosaki, H.; Yamaguchi, Y.; Yasuzawa, H.; Jin, W.; Yamagata, Y.; Arakawa, Y. Probing, inhibition, and crystallographic characterization of metallo-beta-lactamase (IMP-1) with fluorescent agents containing dansyl and thiol groups. *ChemMedChem* **2006**, *1* (9), 969-972. DOI: 10.1002/cmdc.200600115.
- (4) Osano, E.; Arakawa, Y.; Wacharotayankun, R.; Ohta, M.; Horii, T.; Ito, H.; Yoshimura, F.; Kato, N. Molecular characterization of an enterobacterial metallo-  
-lactamase found in a clinical isolate of *Serratia marcescens* that shows imipenem resistance. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1994**, *38* (1), 71-78. DOI: 10.1128/aac.38.1.71.
- (5) Yamaguchi, Y.; Takashio, N.; Wachino, J.; Yamagata, Y.; Arakawa, Y.; Matsuda, K.; Kurosaki, H. Structure of metallo-  
-lactamase IND-7 from a *Chryseobacterium indologenes* clinical isolate at 1.65-Å resolution. *J. Biochem.* **2010**, *147* (6), 905-915. DOI: 10.1093/jb/mvq029.
- (6) Kurosaki, H.; Yamaguchi, Y.; Higashi, T.; Soga, K.; Matsueda, S.; Yumoto, H.; Misumi, S.; Yamagata, Y.; Arakawa, Y.; Goto, M. Irreversible inhibition of metallo-  
-lactamase (IMP-1) by 3-(3-mercaptopropionylsulfanyl)propionic acid pentafluorophenyl ester. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44* (25), 3861-3864. DOI: 10.1002/anie.200500835.
- (7) Concha, N. O.; Janson, C. A.; Rowling, P.; Pearson, S.; Cheever, C. A.; Clarke, B. P.; Lewis, C.; Galleni, M.; Frère, J. M.; Payne, D. J.; et al. Crystal structure of the IMP-1 metallo-  
-lactamase from *Pseudomonas aeruginosa* and its complex with a mercaptocarboxylate inhibitor: binding determinants of a potent, broad-spectrum inhibitor. *Biochemistry* **2000**, *39* (15), 4288-4298. DOI: 10.1021/bi992569m.

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamaguchi Yoshihiro, Kato Koichi, Ichimaru Yoshimi, Jin Wanchun, Sakai Misa, Abe Miki, Wachino Jun-ichi, Arakawa Yoshichika, Miyagi Yukina, Imai Masanori, Fukuishi Nobuyuki, Yamagata Yuriko, Otsuka Masami, Fujita Mikako, Kurosaki Hiromasa	4. 巻 64
2. 論文標題 Crystal structures of metallo-β-lactamase (IMP-1) and its D120E mutant in complexes with citrate and the inhibitory effect of the benzyl group in citrate monobenzyl ester	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Medicinal Chemistry	6. 最初と最後の頁 10019 ~ 10026
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jmedchem.1c00308	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ichimaru Yoshimi, Kato Koichi, Jin Wanchun, Sugiura Kirara, Kinoshita-Kikuta Emiko, KINOSHITA Eiji, Kurosaki Hiromasa, Koike Tohru	4. 巻 37
2. 論文標題 Crystal Structure of Bis{1,3-bis[bis(pyridin-2-ylmethyl)amino]propan-2-olato-dizinc(II)}orthophosphate Tris(perchlorate) Octahydrate, [(Phos-tag)2-P04-][ClO4-]3 · 8H2O	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 X-ray Structure Analysis Online	6. 最初と最後の頁 87 ~ 88
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2116/xraystruct.37.87	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 玉寄裕也、山田聖、石井亮太郎、北村祐介、井原俊博、和知野純一、荒川宣親、黒崎博雅、山口佳宏
2. 発表標題 UPLC/MSによる16S rRNA メチル基転移酵素によってメチル化されたグアノシン検出法の開発
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 筑紫奈美、泉昂季、汪若愚、石川吉伸、和知野純一、荒川宣親、黒崎博雅、山口佳宏
2. 発表標題 メタロ-β-ラクタマーゼに対する3-ホルミルクロモン誘導体の阻害効果
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 依紗季子、松瀬奈月、伊東理生、藤間祥子、山縣ゆり子、和知野純一、荒川宜親、黒崎博雅、山口佳宏
2. 発表標題 亜鉛型 ラクタム剤分解酵素のアミノ酸一変異による構造およびZn結合能への影響
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上之園優也、伊東理生、藤田美歌子、藤間祥子、清水伸隆、山縣ゆり子、切替照雄、黒崎博雅、山口佳宏
2. 発表標題 メタロ- -ラクタマーゼ(KHM-1)のセフェム系 -ラクタム剤に対する高効率触媒機構の解明
3. 学会等名 第19回日本蛋白質科学会年会
4. 発表年 2019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	福石 信之  (Fukuishi Nobuyuki)  (70248326)	金城学院大学・薬学部・教授    (33905)	

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
---------	---------