

令和 2 年 6 月 18 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08240

研究課題名(和文) 一変異によるメタロ-β-ラクタマーゼの活性中心と構造に与える影響の物理化学的解析

研究課題名(英文) Physicochemical analysis of the effect of a single mutation on the active center and structure of metallo-beta-lactamase

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：10363524

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：メタロ-β-ラクタマーゼは、β-ラクタム剤を加水分解し、Zn(II)イオンを有する酵素です。本研究では、日本でよく単離されるIMP-1の一アミノ酸変異酵素IMP-6について研究を行いました。IMP-6は、IMP-1と比べてチオール阻害薬の阻害能に違いがありました。そこで、IMP-6の構造、阻害様式、Zn(II)イオンに着目しました。その結果、IMP-6はIMP-1と比べて、構造的に変化がなく阻害様式も同じでした。しかしZn(II)イオンが脱離する速度定数は、IMP-6の方が速いことがわかりました。これらのことから、一アミノ酸変異によって、Zn(II)イオンとの結合能に影響を与えたと思いました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)酵素を産生する細菌は、薬剤耐性菌となり、ほとんどすべてのβ-ラクタム剤を加水分解してしまうことから、感染治療を困難にさせます。本研究では、MBLであるIMP-1とその一アミノ酸変異体であるIMP-6を対象として、IMP-1に対する阻害様式を構造的かつ機能的に検討しました。この比較により、一アミノ酸変異によって、活性中心にあるZn(II)イオンの結合能に影響を与えていることがわかりました。この影響は、他のMBLでも該当すると考えられ、IMP-1に対する阻害剤開発だけでなく、MBL全般の阻害剤開発に役立つと考えています。

研究成果の概要(英文)：Metallo-β-lactamase, an enzyme having two Zn(II) ions at the active site, hydrolyzes β-lactam agents. In this study, we investigated IMP-6, a single amino acid mutation (Ser196Gly near the active site) enzyme of IMP-1, which is frequently isolated in Japan. IMP-6 differed from IMP-1 in the inhibitory potency of thiol inhibitors. Therefore, we focused on the solution structure, inhibition mode against thiol inhibitors, and elimination rate constant of Zn(II) ions from the active site of IMP-6. IMP-6 was structurally similar to IMP-1, and the inhibition mode was the same in both cases. However, the elimination rate constant of Zn(II) ions was found to be relatively high in the case of IMP-6. Based on these findings, it was concluded that a single amino acid mutation (Ser196Gly) of IMP-1 affects the ability to bind Zn(II) ions.

研究分野：酵素化学

キーワード：酵素 蛋白質 薬剤耐性菌 阻害剤 構造機能解析

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

メタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)は、抗生物質であるβ-ラクタム剤のほとんどすべてを加水分解する能力を持つことから、MBL 産生菌は薬剤耐性菌となり薬物治療を困難にさせる。世界中で拡散している MBL として、IMP-1、VIM-2、NDM-1 が挙げられる。MBL は活性中心に2つの Zn(II)イオンと結合できる部位があり、2つの Zn(II)イオンに架橋して配位している水分子またはヒドロキシオンがβ-ラクタム環を求核攻撃すると考えられている。

日本では IMP-1 産生菌がよく単離される。IMP-1 にはアミノ酸配列の相同性が高い IMP 型酵素が複数存在し、その中の一つに IMP-6 がある。IMP-6 はアミノ酸配列の一部が変異した IMP-1 の変種の一つである。IMP-6 と IMP-1 はアミノ酸残基が1つ異なるのみであり、IMP-1 の 196 位のセリンが IMP-6 ではグリシンに変異している (Ser196 Gly196)。

IMP-1 産生菌は、チオール系検査薬を使い、ダブルディスク法という寒天培地上での IMP-1 産生菌の生育の有無によって判定されている。チオール化合物は、MBL の活性中心にある水分子またはヒドロキシオンとチオール基が置換されることで加水分解反応を阻害する。IMP-6 産生菌が、チオール系検査薬では判定しづらいことから、IMP-6 酵素に対する各種チオール化合物の阻害実験 (IC₅₀ 値測定: 50% 阻害濃度) を行った。その結果、IMP-1 酵素と IMP-6 酵素に対する各種チオール化合物の IC₅₀ 値に差がみられることが分かった (Fig. 1)。また、IMP-6 酵素の結晶化を行い、既知の IMP-1 酵素の結晶構造と比較した。IMP-1 の Ser196 の側鎖 -CH₂OH が Zn リガンドである Cys158 の主鎖の N と水素結合しているのに対して、IMP-6 では Gly に置換されたことから、その水素結合が消失していた (Fig. 1)。特に IMP-1 の Ser196 の次のアミノ酸は、Zn リガンドである His197 であり、この水素結合の消失によって、IMP-6 の Zn(II)イオン間距離に影響を与えていると仮説を立てている。なお IMP-1 と IMP-6 の主鎖を重ね合わせ、その rmsd 値を調べると 0.4 Å であることが分かっており、構造学的比較から、阻害剤認識に影響を与える要因を見つけることができなかった。

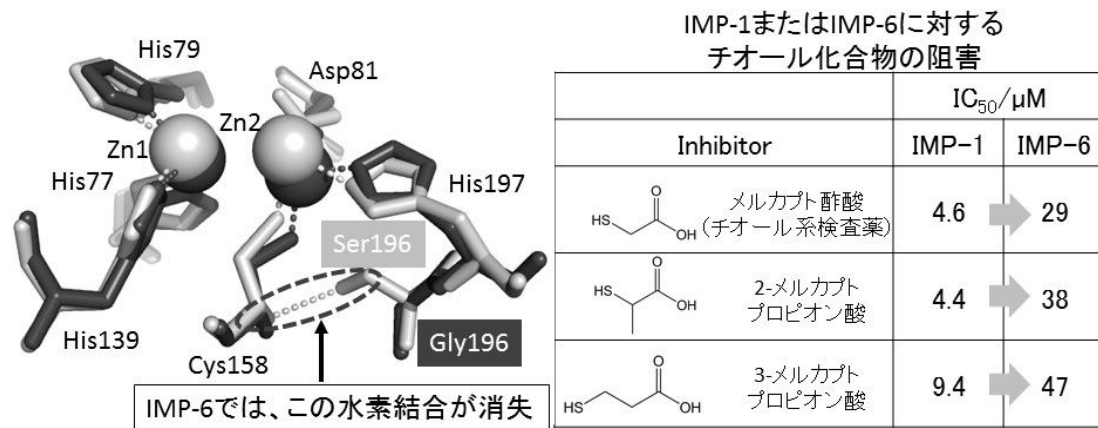


Fig. 1 研究開始当初の背景

2. 研究の目的

これまでに IMP-1 および IMP-6 の両方に有効なチオール阻害剤の検討を行った。様々なチオール系化合物の IC₅₀ 値を算出した結果、メルカプト酢酸(MA)は、IMP-1 および IMP-6 に対してそれぞれ IC₅₀ 値が 4.6μM と 28.6μM であった。3-メルカプトプロピオン酸エチル(Ethyl)は、IMP-1 および IMP-6 に対してそれぞれ 0.7μM、1.6μM であった。本研究では、阻害形式や酵素と阻害剤の結合の状態をより詳しく調べるために Lineweaver-Burk プロットを用いて阻害様式を調べる。また IMP-1 と IMP-6 の結晶構造には大きな違いがないことから、本研究で

は溶液構造を比較するために X 線小角散乱(SAXS)を行う。さらに、活性中心である Zn(II)イオンの溶液中の挙動に着目し、キレート剤を用いて Zn(II)イオンを脱離させ、脱離速度定数を算出する。これら構造的および機能的な解析に基づき、アミノ酸一変異による酵素機能への影響を物理化学的に解析し、IMP-1 だけでなく MBL 全般に有効な阻害剤開発に必要な知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

IMP-6 酵素は、pET ベクターにその遺伝子を組み込み、大腸菌 BL21(DE3)内で発現させた。その後、大腸菌を超音波破碎し、遠心後、その上清に対してイオン交換カラムクロマトグラフィー、サイズ排除カラムクロマトグラフィーによって IMP-6 酵素を調製した。IMP-1 酵素も同様の方法で調製した。

IMP-6 のチオール阻害剤に対する阻害様式の検討は、Lineweaver-Burk プロットを用いて行った。チオール阻害剤は、メルカプト酢酸 (IC_{50} 値: IMP-1; 4.6 μ M, IMP-6; 28.6 μ M)と 3-メルカプトプロピオン酸エチル (IC_{50} 値: IMP-1; 0.7 μ M, IMP-6; 1.6 μ M)を選択した。

IMP-1 および IMP-6 の溶液構造を推測する X 線小角散乱は、共同研究者である奈良先端科学技術大学院大学の藤間祥子准教授が測定と解析を行った。測定は高エネルギー加速器研究機構放射光実験施設 Photon Factory (PF)のビームライン 10C (BL-10C)で行われた。IMP-1、IMP-6 を 300mM NaCl+20mM HEPES-NaOH(pH7.5)+2mM DTT に Buffer 置換し、タンパク質濃度を 1 mg/ml, 2 mg/ml, 3 mg/ml, 4 mg/ml, 5 mg/ml にそれぞれ調製し 250 μ L ずつ用意した。

IMP-6(di-Zn IMP-6)からの Zn(II)イオンの脱離速度定数の算出は、グリセリン共存下で、キレート剤(EDTA)を加えることで、経時的に β -ラクタム剤(セファロチン)の加水分解活性を測定することで算出した。横軸に時間、縦軸に残存活性をプロットし、1 つの Zn(II)イオンが抜けた時の IMP-6(mono-Zn IMP-6)および2つの Zn(II)イオンが抜けた時の IMP-6(apo IMP-6)として、di-Zn IMP6および mono-Zn IMP-6 に活性があると考え、速度論的解析を行った。

4. 研究成果

チオール阻害剤の阻害様式の決定: IMP-1 および IMP-6 に対するメルカプト酢酸と 3-メルカプトプロピオン酸エチルの阻害様式と K_i 値を Table 1 にまとめた。

Table 1 チオール阻害剤に対する阻害様式と K_i 値

	IMP-1	IMP-6
メルカプト酢酸	拮抗型 K_i 0.72 \pm 0.05 μ M	非拮抗型 K_i 11.6 \pm 1.4 μ M
3-メルカプト プロピオン酸エチル	非拮抗型 K_i 6.31 \pm 0.85 μ M	非拮抗型 K_i 11.8 \pm 0.08 μ M

メルカプト酢酸の IMP-1 に対する阻害様式は拮抗型阻害であったが、IMP-6 に対しては非拮抗阻害型阻害であった。また 3-メルカプトプロピオン酸エチルの阻害様式は IMP-1 および IMP-6 に対して、いずれも非拮抗阻害型阻害であった。メルカプト酢酸は、IMP-1 に対して2つの Zn(II)イオンに架橋している水分子またはヒドロキシイオンと置換して配位したことから、拮抗型阻害を示したと考えている。また IMP-6 に対して、メルカプト酢酸は2つの Zn(II)イオンの

どちらかに配位していることから非拮抗阻害型阻害を示したと考えた。これは、IMP-1 および IMP-6 の結晶構造の比較において、Zn(II)イオン間距離がそれぞれ、3.3Å、3.4Å であったことから、その可能性が高いと考えた。

X線小角散乱による溶液構造の解析: IMP-1 と IMP-6 の溶液構造を X線小角散乱測定によって解明することで、一アミノ酸変異による影響を検討した。その結果、IMP-1 および IMP-6 の溶液構造としての粒径(Rg)は Guinier plot より、それぞれ 18.52 ± 1.79 および 18.39 ± 0.49 であることがわかった (Fig. 2)。この結果から、IMP-1 および IMP-6 の溶液構造は、一アミノ酸変異によって全体的に変化がないことが示唆された。これは結晶構造の比較と同じ結果である。

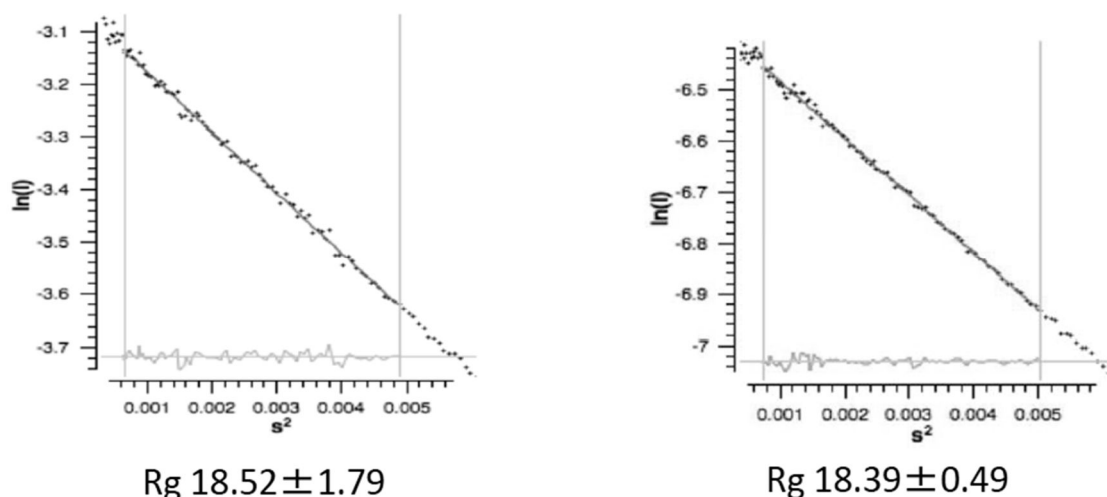


Fig. 2 IMP-1 および IMP-6 の Guinier plot と Rg 値

Zn(II)イオン脱離速度定数の算出: チオール阻害剤の IMP-1 および IMP-6 に対する阻害能の違いや阻害様式の違いが、溶液構造および結晶構造から理解できなかったことから、それぞれの酵素の活性中心にある Zn(II)イオンに着目した。そこで、両酵素からキレート剤を使って Zn(II)イオンを引き抜き、経時的に残存活性を測定することで、Zn(II)イオンの脱離速度定数を算出した。このとき Zn(II)イオンすべてがない酵素を apo 型、1つの Zn(II)イオンが結合している酵素を mono-Zn 型、2つの Zn(II)イオンが結合しているものを di-Zn 型とした。また apo 型酵素は活性がないと仮定している。その結果、IMP-1 では2つの過程で Zn(II)イオンが脱離していることがわかり (Y. Yamaguchi, *et. al.*, *ChemBioChem*, 12, 1979-1983 (2011))、IMP-6 では1つの過程でそれらが脱離していることがわかった。この結果から、IMP-6 は、IMP-1 よりも速く Zn(II)イオンが脱離しやすいことが

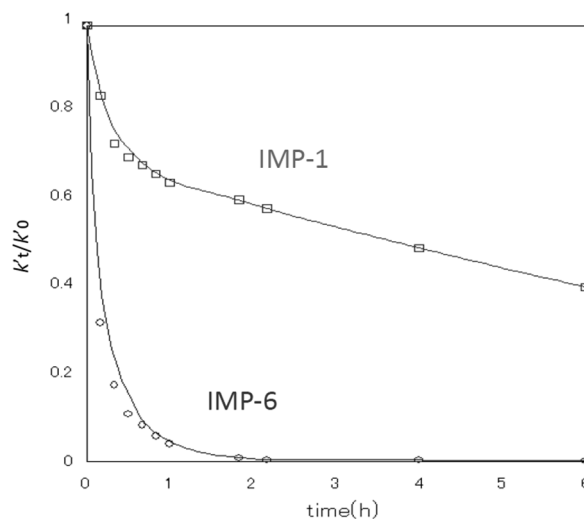


Fig. 3 Zn(II)イオンの脱離による不活性化にかかる時間と酵素の残存活性

わかった。これは、一アミノ酸変異によって、IMP-6 の Zn(II)イオン結合能に影響を与えたと考えている。

総括：IMP-1、IMP-6 に対する各阻害剤の阻害様式は、IMP-1 に対してメルカプト酢酸を用いたときのみ拮抗阻害であり、IMP-1 に対して 3-メルカプトプロピオン酸エチル、IMP-6 に対してメルカプト酢酸、3-メルカプトプロピオン酸エチルを用いたときは非拮抗阻害であった。この阻害様式の違いは、2つの Zn(II)イオン間の距離と阻害剤の構造が関係していると考えた。メルカプト酢酸は主鎖の長さが、IMP-1 の 2 つの Zn(II)イオンに配位する上でちょうど良い長さであるため阻害効果を示したと考えた。IMP-6 はメルカプト酢酸が 2 つの Zn(II)イオン間にぴったりはまることができないため、阻害効果が小さいと予想した。IMP-1、IMP-6 に対する 3-メルカプトプロピオン酸エチルの阻害様式は、3-メルカプトプロピオン酸エチルの側鎖が活性中心付近の溝に入ることによって基質が活性中心付近に近づくのを妨害し阻害効果を示すと考えた。

また、キレート剤を使った IMP-1 の Zn(II)イオンの脱離は、速い反応と遅い反応の 2 つのステップで起きているという知見から、IMP-6 について同様に実験をしたところ、キレート剤添加後 2 時間で急速に活性が低下した。これは IMP-6 において、2 つの Zn(II)イオンがほぼ同時に脱離したと考えた。これらのことから Zn(II)イオンの脱離の仕方の違いは、IMP-1 と IMP-6 の Zn(II)イオンの結合力の大きさによると考えられた。これは 158 位のシステインの柔軟性に起因していると考えた。IMP-6 は 196 位がセリンからグリシンに変異したことによる 158 位と 196 位の水素結合の消失により、158 位のシステインが柔軟である。そのため、Zn(II)イオンが活性中心から外れやすく、脱離しやすいと考えた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 俵 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

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

酵素機能化学 山口研究室 http://yamaguchi-labo.jp/

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
研究協力者	荒川 宜親 (Arakawa Yoshichika)		
研究協力者	黒崎 博雅 (Kurosaki Hiromasa)		

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	山縣 ゆり子 (Yamagata Yuriko)		
研究協力者	藤間 祥子 (Toma Sachiko)		
連携研究者	和知野 純一 (Wachino Jun-ichi) (00535651)	名古屋大学・大学院医学系研究科・講師 (13901)	