

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 25 日現在

機関番号：32519

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22590401

研究課題名(和文) 超高解像度 X 線結晶解析を利用した抗生物質作用機序および耐性機序に関する研究

研究課題名(英文) Ultra high resolution Xray crystallographic study for antibiotic mechanisms of action and resistance

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) 3,600,000 円、(間接経費) 1,080,000 円

研究成果の概要(和文)：世界中で最後の切り札として利用されている抗生物質、カルバペネム系薬の β -ラクタマーゼに対する反応メカニズムの研究を X 線結晶解析法を用いて行なった。本研究でのテーマは以下の4つにまとめられる。(1)カルバペネム系薬によるクラス C β -ラクタマーゼ阻害機構の研究。(2)Burkholderia 属細菌由来染色体性クラス A PenA β -ラクタマーゼ及び PenI ESBL の X 線結晶解析。(3)PenA β -ラクタマーゼ:アピバクタム複合体の X 線結晶解析。(4)クラス B β -ラクタマーゼに対する新規阻害剤の探索。実際の構造解析結果とともに、研究結果の概要を示す。

研究成果の概要(英文)：Carbapenems are one of the most important antibiotics and are used worldwide as "Last Resort". We studied four subjects, which are the inhibition mechanisms of carbapenems to β -lactamases on the basis of Xray crystallography, as listed below. (1) Carbapenems inhibition mechanism for class C β -lactamases. (2) Crystal structures of the PenA β -lactamases from Burkholderia cepacia (PenI) and Burkholderia pseudomallei (PenA). (3) Crystal structure of PenA carbapenemase-avibactam complex. (4) Inhibition or screening of class B β -lactamases. We are showing the overview of the research with crystal structures.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・細菌学(含真菌学)

キーワード：感染症 抗生物質 酵素 蛋白質 構造生物学

1. 研究開始当初の背景

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持ち、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。クラス B β -ラクタマーゼは活性中心に亜鉛イオンをもつ金属 β -ラクタマーゼである。クラス B β -ラクタマーゼは、もとは一部のグラム陽性菌の染色体性 β -ラクタマーゼとして知られていたが、現在は、NDM-1 や IMP-1 などに代表されるプラスミド性のクラス B β -ラクタマーゼが多く、グラム陰性細菌にも広がり、臨床上大きな問題となっている。その理由の一つには、このクラス B β -ラクタマーゼがカルバペネムなどセリン β -ラクタマーゼに安定性の高い薬剤に対する分解活性をもつという特徴にある。クラス A, C, D は活性中心にセリン残基をもつセリン β -ラクタマーゼである。クラス A はグラム陰性菌のプラスミド性およびグラム陽性菌の染色体性のペニシリナーゼの多くが含まれる。クラス C はグラム陰性菌の染色体性 β -ラクタマーゼの多くが含まれ、一般的にセファロスポリナーゼであるといわれている。クラス D β -ラクタマーゼはオキサシリンを分解可能なペニシリナーゼタイプが多く含まれる。

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。その代表例としてセフトキシムやセフトジジムに代表される第三世代セファロスポリン系薬と“Last Resorts”と形容されることもあるカルバペネム系薬があげられる。これらの薬剤に対してはすでにESBL(基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ)や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、拡散している。

クラス A, C β -ラクタマーゼとカルバペネムとの結合状態は2009年以前においてX線結晶解析がされていた。A, C いずれの場合も、オキシアニオンホールが破壊されることがカルバペネムの安定性を説明する理由とされてきた。私達の研究グループではクラス A β -ラクタマーゼとメロペネムの複合体の超高解像度X線結晶解析によりオキシアニオンホールの破壊とは異なった脱アシル化水の方向性の変化によるメカニズムを提唱していた(2008年発表)。本研究では、ここからスタートし、カルバペネム系薬の β -ラクタマーゼ安定性を分子構造から説明することを目的とすることから始まり、他の β -ラクタマーゼも対象として研究を開始した。また、その先の目標として、新規 β -ラクタマーゼ阻害剤のドラッグデザインを目指したいと考えた。

2. 研究の目的

(1) 研究対象について

クラス A の次のステップとして、クラス C β -ラクタマーゼの阻害機構を研究し、さらに、クラス A カルバペネマーゼの構造解析への研究範囲を広げ、カルバペネム系薬とセリン β -ラクタマーゼの相互作用を明かにしたいと考えた。そのため、標準的なクラス A β -ラクタマーゼとしてプラスミド性のSHV-1 β -ラクタマーゼ(既発表済)、クラス C β -ラクタマーゼとして *Enterobacter cloacae*P99 由来の染色体性 β -ラクタマーゼを用いた。カルバペネム系薬を分解してしまう、カルバペネマーゼとして *Burkholderia cepacia* 種由来 PenA クラス A β -ラクタマーゼの構造解析を試みた。研究で用いたカルバペネム系薬の構造を図1に示した。これらの材料を用いてカルバペネム阻害機構のX線結晶解析を行った。新規 β -ラクタマーゼ阻害剤の探索、ドラッグデザインはプラスミド性クラス B β -ラクタマーゼである、NDM-1, IMP-1 を対象として行なった。

(2) 具体的な目標とその意義

本研究の目的は大きく4つに分けられる。

ひとつめとして、(1)で示した酵素、カルバペネム系薬を材料とし、複合体のX線結晶解析を行ない、クラス A, C β -ラクタマーゼがなぜ、カルバペネム系薬と安定な複合体をつくるのか、いいかえると、なぜカルバペネム系薬はこれらラクタマーゼに分解されないのかを明かすことを目標とする。2つめとして、カルバペネマーゼのX線結晶解析を行うことである。カルバペネマーゼはクラス A, B, D のそれぞれのタイプで存在するが、今回は前述の PenA β -ラクタマーゼを対象とする。3つめとして、PenA を阻害することができる、アビバクタムと PenA β -ラクタマーゼの複合体のX線結晶解析を行い、カルバペネマーゼに有効な阻害剤に関する知見を得たい。4つめとして現在、最も制圧しにくいクラス B β -ラクタマーゼを阻害することのできる、新型阻害剤を探索したい。これは現在、臨床的にも最も必要とされている阻害剤である。

3. 研究の方法

(1) 研究材料の入手について

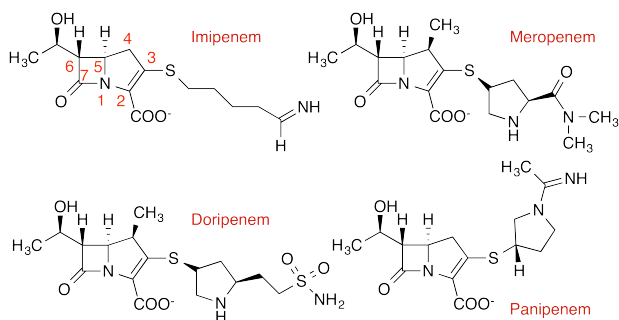


図1: 代表的なカルバペネム系薬の構造

本研究計画では X 線結晶解析を中心に研究を遂行した。その際、十分に精製された目的タンパク質を数 mg から数十 mg と大量に得ることが重要である。前述の β -ラクタマーゼ遺伝子を大腸菌内で大量に発現させ、タンパク質を得ている。その遺伝子ソースとして、多くはもとの臨床分離株からクローニングとしたものを利用しているが (一部は他研究者より譲りうけた)、NDM-1, IMP-1 については遺伝子を得ることができなかつたため、遺伝子を人工的に化学合成したものを利用した。数リットルの培養液より、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。

(2) X 線結晶解析

上述の精製タンパク質からさまざまな条件による結晶化条件スクリーニングを行い、安定的にかつ十分な大きさをもつ結晶を得られる条件を決定した。結晶に X 線をあてる、いわゆる回折実験はつくば、高エネルギー加速器研究機構のフォオンファクトリーにて行った。回折実験の直前に、必要に応じて結晶を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) 結晶をクライオプロテクトant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し、指数づけ、スケールングを行ない、回折データを得た。

クラス A, C β -ラクタマーゼともに、そのもの自体、あるいは相同性が高い β -ラクタマーゼの構造が既に決定されているため、分子置換法もしくは、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して行ない、最終モデルを構築していった。

(3) 阻害剤の探索について

クラス B β -ラクタマーゼの阻害剤探索については、連携研究者の過去の研究成果である、2 価カチオンにキレートする化合物ライブラリに対してスクリーニングを行った。これらの中から、NDM-1, IMP-1 β -ラクタマーゼに阻害活性をもつ化合物をセファロチン分解反応を測定することにより、阻害の程度を評価した。

4. 研究成果

(1) カルバペネム系薬によるクラス C β -ラクタマーゼ阻害

AmpC β -ラクタマーゼとイミペネム複合体の X 線結晶解析が 2002 年に Beadle らにより報告されている。それによると、オキシアニオンホールと呼ばれる酵素反応に重要な構造が形成されておらず、これが、カルバペネムがクラス C β -ラクタマーゼに分解されない理由であると考えられていた。

私達のグループはドリペネム、パニペネムの 2 種類のカルバペネム剤と *E. cloacae*P99 由来クラス C

β -ラクタマーゼとの複合体構造の X 線結晶解析を行った (図 2)。Beadle らの結果とは大きく異なり、2 つのカルバペネム共にオキシアニオンホールが形成されていることが確認された。つまり、オキシアニオンホールが形成されているにもかかわらず、カルバペネムとのアシル中間体は少なくとも複合体の X 線結晶解析が可能ほど安定している。オキシ

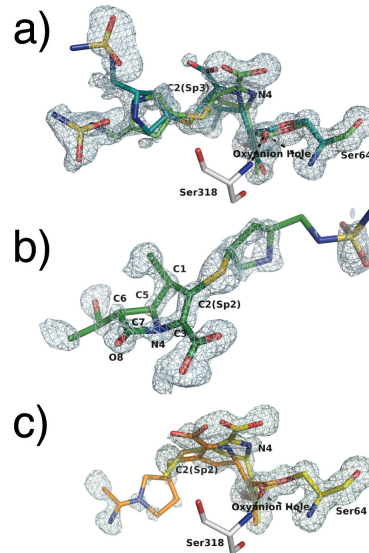


図 2: P99 β -ラクタマーゼ:カルバペネム複合体の電子密度マップ (3.5 σ) オミットマップ。a) はドリペネムアシル中間体、b) は開裂前ドリペネム。c) はパニペネムアシル中間体

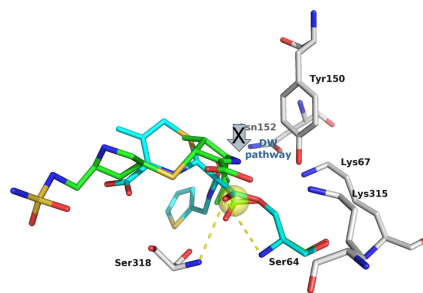


図 3: P99 β -ラクタマーゼとセファロチン (良好基質、シアン) とドリペネム (緑) 複合体の活性中心。セファロチン複合体では存在する脱アシル化水の通り道がドリペネムでは五員環によって塞がれている。

アニオンホールが形成された上での新たなメカニズムとして、これらの解析結果より、アズトレオナムによく似た阻害機構を提唱した。一般的には、クラス C β -ラクタマーゼと良好基質との脱アシル化反応においては、オキシアニオンホールの形成された後、求核攻撃のターゲットであるカルボニル炭素に向かって上方から水分子 (脱アシル化水) が近づく。アズトレオナムのようなオキシイミノ系薬では、水分子が近づいてくる道筋を自らの分子の一部を使ってブロックすることがアシル中間体安定性 (脱アシル化水による求核攻撃が起こりにくいこと) の要

因と考えられていた。同様な現象がカルバペネム系薬での私達の結果からも推測された。アズトレオナムとドリペネムで形成されたアシル中間体で、その部分構造がカルボニル炭素の上方をカバーしている様子を図3に示した。

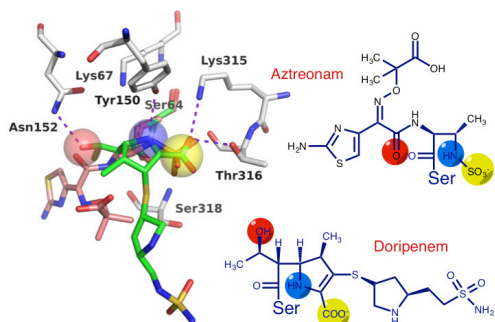


図4: P99 β -ラクタマーゼとアズトレオナム(ピンク)、ドリペネム(緑)複合体の重ね合わせ。アズトレオナムとドリペネムではほぼ同じ場所を対応している原子が占有している。

(2) PenA, PenI β -ラクタマーゼのX線結晶解析

Burkholderia 属の多くの細菌にはカルバペネム系薬が有効でないことが知られている。これまでの遺伝子解析によると、PenI, PenA という2種類のクラスA β -ラクタマーゼ遺伝子が染色体上に存在することが知られており、この2つの β -ラクタマーゼのX線結晶解析を行なうべく研究を行なった。酵素化学的性状はPenAがカルバペネマーゼであり、PenIは第三世代セフェムに分解活性の高い基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼであった。精製、結晶化の後、両酵素とも、1.0-1.1 Å 解像度の回折データを得ることができた。既知酵素との比較により、カルバペネマーゼであるPenA β -ラクタマーゼのカルバペネム系薬分解性の理由の候補として、Tyr105, Arg220, Arg276 周辺の構造の違いが考えられた。

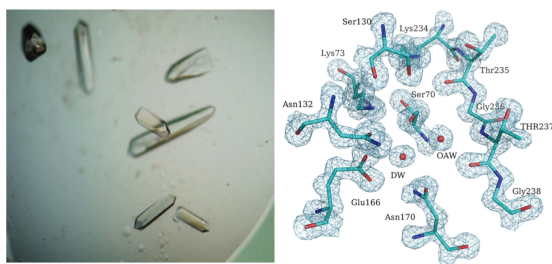


図5: PenA β -ラクタマーゼの結晶(左)と活性中心構造と電子密度マップ(1.5 σ)を示した。

(3) PenA β -ラクタマーゼ: アビバクタム複合体のX線結晶解析

アビバクタムは非 β -ラクタム系のセリン β -ラクタマーゼ阻害剤であり、日本国内では現時点では臨床投入されていないものの、その阻害活性の高さから

注目されている新薬である。PenA β -ラクタマーゼも、アビバクタムにより、効率的に阻害を受けるため、その複合体構造のX線結晶解析を行なった。

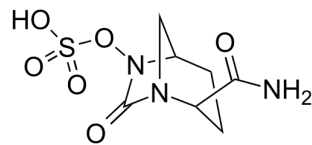


図6: アビバクタムの構造

1.6Å 解像度のPenA β -ラクタマーゼ分子の活性中心には図7のように明確なアビバクタム分子の電子密度マップが観察された。この結果から、PenA独自の相互作用というものは発見できなかったが、脱アシル化水があり、なおかつLys73が主たる相互作用をしていない状態で、安定的に活性中心におさまる様子が観察され、今後、このタイプの阻害剤の修飾に重要な知見が得られた。

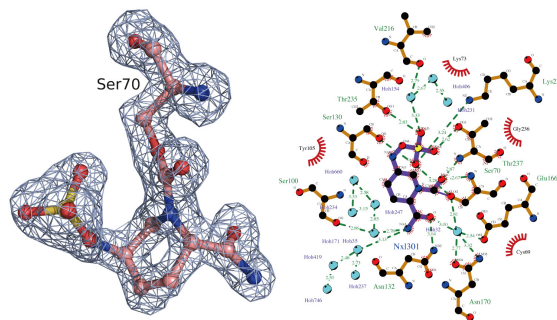


図7: PenA β -ラクタマーゼ:アビバクタム複合体。左は3.5 σ レベルのオミットマップ、右は活性中心における相互作用

(4) クラスB β -ラクタマーゼ阻害剤の探索

NDM-1, IMP-1 β -ラクタマーゼの発現系を準備し、精製する手法を確立した。精製酵素を利用し、2価カチオンにキレートする化合物ライブラリのそれぞれの化合物の酵素阻害を測定したところ3つの化合物で阻害活性が観察された。

2つのクラスB β -ラクタマーゼの結晶化は再現的に得られる条件を決定し、今後、複合体の構造解析を行う予定である。

(5) 今後の展望

平成26年度より、新たに、基盤研究(C)「 β -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」の交付が内定された。この研究を発展させ、セリン β -ラクタマーゼのカルバペネム阻害機構とカルバペネマーゼの分解メカニズムについては計算化学の手法も取り入れ、さらに理論的な説明を完成させたい。また、クラスB β -ラクタマーゼ阻害剤は、具体的な構造を示すべく、研究を進めたいと考えている。

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3件)

- [1] 額賀路嘉: β -ラクタマーゼの構造から考える耐性獲得機構、オキシイミノ系およびカルバペネム系 β -ラクタム剤を中心に、査読有、日本化学療法学会雑誌, Vol.61 (2013), p479-491
- [2] Papp-Wallace KM, Taracila MA, Gatta JA, Ohuchi N., Bonomo R. A., Nukaga M.: Insights into β -lactamases from Burkholderia species, two phylogenetically related yet distinct resistance determinants, Journal of Biological Chemistry, 査読有, Vol.288, (2013), p19090 - 19102
- [3] Ohuchi N., Hayashi K, Iwamoto K, Koike K, Kizawa Y, Nukaga M., Kakegawa T, Murakami H.: Thrombin-stimulated proliferation is mediated by endothelin-1 in cultured rat gingival fibroblasts: Fundam. Clin. Pharmacol., 査読有, Vol.16 (2010), p501- 508

〔学会発表〕(計7件)

- [1] M. Nukaga, N. Ohuchi, C. Bethel, R. A. Bonomo: Studies on the Inactivation of Enterobacter cloacae P99 Class C beta-Lactamases by Carbapenems: Doripenem and Panipenem, 53th ICAAC (Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy) デンバー (コロラド州), USA, Sept., (2013)
- [2] 額賀路嘉: クラス C β -ラクタマーゼの構造・反応機構・耐性化メカニズム、シンポジウム; β ラクタマーゼ学: 構造・活性からその特徴を再考するの招待講演として、第59回日本化学療法学会東日本支部総会, お台場、日航ホテル, (2012) 10月
- [3] K. M. Papp-Wallace, R. A. Bonomo, N. Ohuchi, M. Nukaga: Crystal Structures of the Pen beta-Lactamases of Burkholderia cepacia (Bc) and Burkholderia pseudomallei (Bp), 52th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy(ICAAC), Sept., サンフランシスコ, USA, (2012)
- [4] K. M. Papp-Wallace, M. Nukaga, R. A. Bonomo: The Contribution of Ambler Position P167 in Ceftazidime(TAZ) Resistance in PenI of Burkholderia pseudomallei (Bp), 52th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy(ICAAC), Sept., サンフランシスコ, USA, (2012)

- [5] K. M. Papp-Wallace, M. Nukaga, D.A. Rholl, H. P. Schweizer, M. Taracila, R. A. Bonomo: Structure-function studies of PenA β -lactamase: insights into single amino acid substitutions that mediate ceftazidime (TAZ) resistance in Burkholderia pseudomallei (Bp), 51th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Sept 17 - 20, Chicago, IL, USA, (2011)
- [6] M. Nukaga, C. R. Bethel, S. M. Drawz, R. A. Bonomo: Studies on the Inactivation of Class C beta-Lactamases by Aztreonam (ATM), 51th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC) Sept 17 - 20, Chicago, IL, USA, (2011)
- [7] M. Nukaga, C. R. Bethel, S. Drawz, R. A. Bonomo: Studies on the Inactivation of Class C beta-Lactamases by Carbapenems: Panipenem and P99, 50th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy (ICAAC), Sept. 12 - 15, Boston, MA, USA, (2010)

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・准教授
研究者番号: 20251150
- (2) 研究分担者
大内希 (OHUCHI Nozomi)
城西国際大学・環境社会学部・助教
研究者番号: 20398556
- (3) 連携研究者
田中信忠 (TANAKA Nobutada)
昭和大学・薬学部・准教授
研究者番号: 00286866
- (4) 連携研究者
星野忠次 (HOSHINO Chuji)
千葉大学・薬学研究院・准教授
研究者番号: 90257220
- (5) 研究協力者
Robert Bonomo
Louis Stokes Cleveland Department of Veterans Affairs, オハイオ州、アメリカ合衆国, Professor