

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659054

研究課題名(和文)メタロ-β-ラクタマーゼ産生薬剤耐性菌を蛍光で捉えるためのプローブ開発

研究課題名(英文)Development of fluorescent probes for metallo-beta-lactamase-producing Gram-negative bacteria

研究代表者

黒崎 博雅 (Kurosaki, Hiromasa)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：70234599

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、メタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を臨床現場で、簡便・迅速に菌を培養することなく1個の菌をそのままリアルタイム検出できる新規蛍光プローブの開発を目指した。新規に合成した蛍光性セファロスポリンはメタロ-β-ラクタマーゼ(IMP-1)を作用させると蛍光強度の増加が観測された。よって、本蛍光性セファロスポリンはメタロ-β-ラクタマーゼ産生菌を迅速かつ簡便に検出することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Metallo-beta-lactamase can hydrolyze nearly almost beta-lactams, including carbapenems. It is very important to confirm the production of metallo-beta-lactamase in infectious bacteria for effective chemotherapy at the initial stages of a disease. A new fluorogenic probe based on modified cephalosporin was synthesized and examined the ability of the fluorogenic probe to detect metallo-beta-lactamase (IMP-1) by measurement of the fluorescence spectra. As the concentration of IMP-1, the fluorescence intensity of the fluorogenic probe increased. Thus, the spectral data supports the validity of our design strategy. This fluorogenic probe will serve as lead compounds for the development of detection agents that are selective metallo-beta-lactamases-producing infectious bacteria.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：感染症 抗生物質 院内感染 酵素 ラクタマーゼ β-ラクタム剤

1. 研究開始当初の背景

-ラクタマーゼは、Ambler 等¹によってアミノ酸配列の相同性にに基づき、4つのクラス A、B、C、Dに分類される。クラス A、C、Dに属する -ラクタマーゼは活性中心にセリン残基を持つセリン酵素であり、一方、クラス Bに属する -ラクタマーゼは活性中心に Zn(II)イオンをはじめとする二価の金属カチオンを要求することからメタロ- -ラクタマーゼと呼ばれている。

ごく最近、抗生物質が効かないニューデリーメタロ- -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、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。

メタロ- -ラクタマーゼは -ラクタム剤を加水分解不活化する Zn(II)含有金属酵素で、グラム陰性菌の細胞壁外膜と内膜の間にあるペリプラズム間隙に存在する。メタロ- -ラクタマーゼはセリン- -ラクタマーゼとは異なり、第三世代のカルバペネム系 -ラクタム剤を含むほとんど全ての -ラクタム剤を加水分解し、その耐性遺伝子が遺伝子カセットとしてプラスミド上に組込まれており、接合などによって他の細菌へと水平伝播する。その結果、 -ラクタム剤に対し抵抗性を獲得した耐性菌が日本のみならず世界的な規模で拡散し続けている。さらにメタロ- -ラクタマーゼ産生菌は、現在臨床で汎用されているクラブラン酸やスルバクタムなどのセリン- -ラクタマーゼ阻害剤に対して感受性を示さず、また、この酵素の阻害剤は未だに臨床応用されていないことからメタロ- -ラクタマーゼ産生菌の世界的な蔓延が危惧されている。

このような現状から、診察前の迅速検査判定により適切な -ラクタム剤の選択と投与方針を決定する必要があるため、メタロ- -ラクタマーゼ産生菌を簡便、迅速かつ的確に発見する臨床検査法の開発が緊急の課題となっている。現在知られているメタロ- -ラクタマーゼの検出方法として耐性遺伝子の塩基配列を利用する PCR 法があるが、臨床検査で日常的に行うのは困難である。荒川等は、メルカプト酢酸ナトリウムディスク (SMA) とセフトアジジム (CAZ) のディスクとを並置するダブルディスク法²を報告した。これは、national committee for clinical laboratory standards (NCCLS) 法に従いミューラーヒントン培地に MacFarland 0.5 の菌液を綿棒で塗布し、メタロ- -ラクタマーゼに対して阻害作用を示す SMA ディスクとセフェム系抗菌剤である CAZ のディスクを並置して一晩置き、ディスク周辺の発育阻止帯の変化からメタロ- -ラクタマーゼの産生の有無を識別する方法である。この方法は、臨床検査で比較的簡単に使用することが可能だが培養を必要とし長時間を要する。そこで、臨床で簡便にかつ短時間で検査できる蛍

光プローブ法を用いることを考えた。これは、微量な酵素濃度で定性的及び定量的な測定が可能であると考えられる。

2. 研究の目的

本研究ではメタロ- -ラクタマーゼ産生薬剤耐性菌を実時間によって視覚化できる新規蛍光プローブを得ると共に臨床検査分野への応用を図る基盤を構築する。

これまでに知られているメタロ- -ラクタマーゼ BclI³、CcrA⁴、L1⁵、IMP-1⁶、VIM-2⁷ のアミノ酸配列相同性は 30%程しか示さないが Zn(II)イオンに配位しているアミノ酸残基はよく保存されている。

それらの分子構造は / サンドイッチ構造を形成し、シートの浅くて広い溝に2つの Zn(II)イオンが存在している。一つ目の Zn(II)イオンには3つのヒスチジン (His116, His118, His196) が配位し、二つ目の Zn(II)イオンにはヒスチジン (His263)、アスパラギン酸 (Asp120)、システイン (Cys221)、水分子が配位している。一般にメタロ- -ラクタマーゼでは、架橋配位子として水またはヒドロキシアニオンが2つの Zn(II)イオンに架橋している。

メタロ- -ラクタマーゼの活性中心ポケットの構造に着目し、これにフィットするような *N*-(5-(dimethylamino)-1-naphthalenesulfonamidobutyl)-3-thiopropionamide (DansylC4SH) を合成した⁸。DansylC4SH の分子構造をさらに最適化することにより、菌体に存在する他の金属酵素に反応することなく選択的、かつ特異的にメタロ- -ラクタマーゼに結合し、感度良くメタロ- -ラクタマーゼ産生薬剤耐性菌を蛍光で捉えることが可能であると考えた。

3. 研究の方法

(1)メタロ- -ラクタマーゼ (IMP-1) 産生菌および非産生菌の培養

メタロ- -ラクタマーゼ (IMP-1) を産生する *Escherichia coli* BL21(DE3) (pET9a/IMP-1) 菌体懸濁液の調製
E. coli BL21(DE3) (pET9a/IMP-1) の調製は既に我々が構築した大腸菌に組み込んだ大量発現系を用いて菌の培養を行った⁹。

IMP-1 非産生 *E. coli* BL21(DE3) (pET9a) 菌体懸濁液調製

E. coli BL21(DE3) (pET9a) 菌株を 50 µg/mL カナマイシンを含む LB 寒天培地にストリークし、37 °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 µg/mL カナマイシンを含む 10 mL の LB 培地中 37 °C で振とう培養 (150rpm) した。50 µg/mL カナマイシンを含む 500mL の LB 培地に培養液を接種し、37 °C で OD₆₀₀ が 3.0 になるまで振とう培養 (120rpm) した。培養液を回収し、湿菌重量 1g に対して 1mL の割合になるように 50mM Tris-HCl (pH7.4) を加えて再懸濁した溶液を菌液とした。

IMP-1 産生 *E. coli* JM109(pKF19k/IMP-1) と IMP-1 非産生 *E. coli* JM109(pKF19k) 菌体の懸濁液も上記の方法に準じて調製した。

(2) 落射型蛍光顕微鏡による蛍光観察

集菌した *E. coli* JM109(pKF19k、pKF19k/IMP-1)、*E. coli* BL21(DE3)(pET9a、pET9a/IMP-1) の懸濁液を、50mM Tris-HCl(pH7.4)880 μ L に菌液 10 μ L、メタノール 100 μ L、100 μ M DansylC4SH 10 μ L を混合した溶液を 30 分インキュベートし、2 μ L をスライドガラスの上にのせ、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 Olympus BX51 落射型蛍光顕微鏡を用いた。

(3) (6R,7R)-3-(((3-(((4-((5-(dimethylamino)naphthalene)-1-sulfonamido)butyl)amino)-3-oxopropyl)thio)methyl)-8-oxo-7-(2-phenylacetamido)-5-thia-1-azabicyclo[4.2.0]oct-2-ene-2-carboxylic acid (GCLE-DansylC4SH) とメタロ- β -ラクタマーゼ(IMP-1)との蛍光スペクトル測定

1 μ M の GCLE-DansylC4SH の 50mM Tris-HCl(pH7.4)に IMP-1 酵素濃度が測定溶液中 0.1 μ M から 10 μ M になるように酵素溶液を適宜加えていき、励起波長 340nm で励起し蛍光スペクトルを測定した。

4. 研究成果

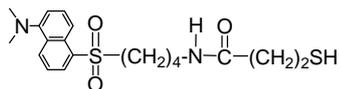


図 1 DansylC4SH の構造

(1) DansylC4SH による IMP-1 産生菌と非産生菌の蛍光染色と落射型蛍光顕微鏡による菌体の蛍光観察

DansylC4SH(図 1)によるメタロ- β -ラクタマーゼ産生菌の蛍光発光検出の原理は DansylC4SH が菌体の外膜を通過しペリプラズムに存在するメタロ- β -ラクタマーゼの活性中心の疎水性空間に結合し、DansylC4SH 自身の蛍光強度よりも高くなることに基づいている。そこで IMP-1 産生菌 *E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1) と IMP-1 非産生菌 *E. coli* BL21(DE3)(pET9a) を用いて、二種の菌の混合比率 (*E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1) : *E. coli* BL21(DE3)(pET9a) = 9:1, 5:5, 1:9) を変えて菌体の蛍光発光強度の差があるかどうか検討した。その結果を図 2 に示す。

IMP-1 産生菌、非産生菌の混合比率を変化させたところ、IMP-1 産生菌 *E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1) の比率の増加に伴って DansylC4SH 染色による菌体の蛍光がはっきりとわかるようになった。これより、IMP-1 産生菌 *E. coli* BL21(DE3)(pET9a) の方が、IMP-1 非産生菌に比べ蛍光強度が高く、

蛍光強度に差があることがわかった。DansylC4SH は菌が産生するメタロ- β -ラクタマーゼと結合し、蛍光強度が上昇することが示された。

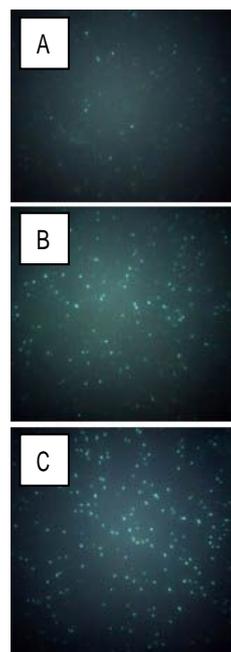
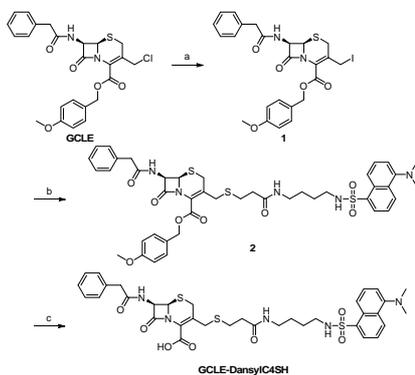


図 2. DansylC4SH 染色による菌体の蛍光イメージ Epifluorescence microscopy. 菌体の混合比率 (A) BL21(DE3)(pET9a/IMP-1) : *E. coli* BL21(DE3)(pET9a) = 1:9; (B) *E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1) : *E. coli* BL21(DE3)(pET9a) = 5:5; (C) *E. coli* BL21(DE3)(pET9a/IMP-1) : *E. coli* BL21(DE3)(pET9a) = 9:1.

(2) DansylC4SH 誘導体の合成

DansylC4SH は菌が産生するメタロ- β -ラクタマーゼと結合し、蛍光強度が上昇することが示された。そこでメタロ- β -ラクタマーゼの作用によって DansylC4SH が遊離し菌の外膜透過性の向上を目的とし、 β -ラクタム剤に DansylC4SH を結合させた化合物 GCLE-DansylC4SH を分子設計・合成した。GCLE-DansylC4SH の合成法をスキーム 1 に示す。7-Phenylacetamido-3-chloromethyl-3-cephem-4-carboxylic acid *p*-methoxybenzyl ester(GCLE, 大塚化学)を出発原料として 3 工程で合成した。全行程の収率は約 50%であった。

図 3A より 340nm で励起すると 1 μ M の GCLE-DansylC4SH のみでは極大波長約 535nm を示す蛍光スペクトルを得た。IMP-1 の添加に伴って蛍光強度は増大していき、極大波長は短波長側へシフトした。ここで、コントロールとして GCLE-DansylC4SH に NaOH 水溶液を添加すると 535nm の蛍光強度は消光していった。



Scheme 1. (a) NaI, acetone, rt; (b) DansylC4SH, *N,N*-diisopropylethylamine, 2,6-lutidine, DMF; (c) triisopropylsilane, TFA, CH₂Cl₂, 0

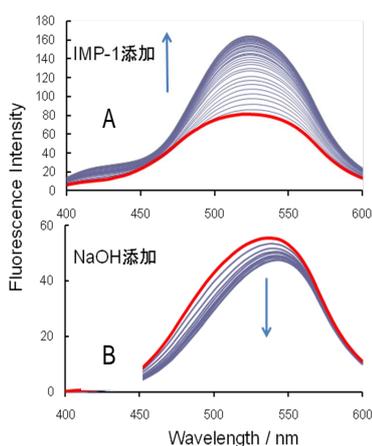


図 3. GCLE-DansylC4SH の蛍光スペクトル変化. (A) DansylC4SH に IMP-1 を添加したとき. (B) DansylC4SH に NaOH 水溶液を添加したとき

まとめ

本研究課題の蛍光検出剤によるメタロ-
-ラクタマーゼ産生菌の蛍光検出法は、従来のメタロ-
-ラクタマーゼ検出法とは全く異なったメカニズムでメタロ-
-ラクタマーゼ産生菌を捉えようとしている点で新規性があると考えられる。多剤耐性緑膿菌をはじめ様々な抗菌薬耐性菌の菌体内で産生しているメタロ-
-ラクタマーゼを蛍光発光させる原理に基づいているので菌種にとらわれず菌の検出・診断が可能である。そのため、菌の培養・粉砕が必要なく迅速かつ簡便に検出・診断が可能となり、診察時において適切な化学療法剤の使用が可能となる。さらには、本法は疾病に關与する金属酵素の検出・診断法開発において重要な知見を与えるものであり、医歯薬学分野に大きく貢献するものと考えられる。

参考文献

- (1) Ambler, R. P. *Philos. Trans. R. Soc. London, Ser. B* **1980**, *289*, 321-331.
- (2) Arakawa, Y.; Shibata, N.; Shibayama, K.; Kurokawa, H.; Yagi, T.; Fujiwara, H.; Goto, M. *J. Clin. Microbiol.* **2000**, *38*, 40-43.
- (3) Hussain, M.; Carlino, A.; Madonna, M. J.; Lampen, J. O. *J. Bacteriol.* **1985**, *164*, 223-229.
- (4) Rasmussen, B. A.; Gluzman, Y.; Tally, F. P. *Antimicrob. Agents Chemother.* **1990**, *34*, 1590-1592.
- (5) Walsh, T. R.; Hall, L.; Assinder, S. J.; Nichols, W. W.; Cartwright, S. J.; MacGowan, A. P.; Bennett, P. M. *Biochim. Biophys. Acta.* **1994**, *1218*, 199-201.
- (6) 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.; Bateson, J. H.; Abdel-Meguid, S. S. *Biochemistry* **2000**, *39*, 4288-4298.
- (7) Garcia-Saez, I.; Docquier, J. D.; Rossolini, G. M.; Dideberg, O. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 604-611.
- (8) Kurosaki, H.; Yamaguchi, Y.; Yasuzawa, H.; Jin, W.; Yamagata, Y.; Arakawa, Y. *ChemMedChem* **2006**, *1*, 969-972.
- (9) Yamaguchi, Y.; Kuroki, T.; Yasuzawa, H.; Higashi, T.; Jin, W.; Kawanami, A.; Yamagata, Y.; Arakawa, Y.; Goto, M.; Kurosaki, H. *J Biol Chem* **2005**, *280*, 20824-20832.

5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 2 件)

黒崎博雅、山口佳宏、荒川宜親、メタロ-
-ラクタマーゼ活性阻害におけるメルカプトカルボン酸の至敵炭素鎖長の決定と加水分解反応に及ぼすアニオンの影響、第 41 回薬剤耐性菌研究会、平成 24 年 10 月 25-26 日、望川館コンベンションホール(岐阜県下呂市湯之島)

Hiromasa Kurosaki, Yoshihiro Yamaguchi, Development of fluorescent probes for metallo-
-lactamase-producing Gram-negative bacteria, 28th International Congress of Chemotherapy and Infection, 2013, June 5th-8th, Pacifico Yokohama, Yokohama

6. 研究組織

(1) 研究代表者

黒崎 博雅 (KUROSAKI, Hiromasa)
熊本大学・大学院生命科学研究所・准教授

研究者番号：70234599

(2)研究分担者

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