

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 19 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24790570

研究課題名(和文)立体構造情報を利用したメタロ型カルバペナム分解酵素の阻害剤創製と細菌検査への応用

研究課題名(英文) Structure-based discovery of metallo-type carbapenemase inhibitor and application to bacteriological examination

研究代表者

和知野 純一 (Wachino, Jun-ichi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：00535651

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、SMB-1メタロ β -ラクタマーゼ(MBL)のX線結晶構造解析を行った。SMB-1の構造は他のサブクラスB3 MBLであるAIM-1、L1、BJP-1と似ていた。活性中心には2つの亜鉛があり、その間に水分子が1つ存在した。この水は、 β -ラクタム環の加水分解に利用されるものと考えられた。SMB-1の持つQ157アミノ酸は、 β -ラクタム薬との結合に重要であると考えられた。また、SMB-1-メルカプト酢酸の複合体構造を決定した。メルカプト酢酸のチオール基とSMB-1の持つ亜鉛との結合が観察された。最後に、in silico screeningによる阻害剤探索を行い、4つの阻害剤を発見した。

研究成果の概要(英文)：We determined the crystal structure of SMB-1 using 1.6Å diffraction data, and revealed that the overall structure of SMB-1 was quite similar to those of the other subclass B3 MBLs, AIM-1, L1, and BJP-1. The electron density map corresponding to a water molecule (wat1), which is assumed to contribute as the attacking nucleophile on the carbonyl carbon of the beta-lactam ring, was observed. SMB-1 possesses a unique amino acid residue, Q157, which probably plays a role in recognition of beta-lactams via the hydrogen bond interaction. In addition, we determined the mercaptoacetate (MCR)-complexed SMB-1 structure and revealed that the mode of its inhibition by MCR: the thiolate group bridges to two zinc ions (Zn1 and Zn2), and occupy the space to which beta-lactams originally bind. Finally, we performed in silico screening to find effective inhibitors of SMB-1 and found four agents which could behave as inhibitors of SMB-1.

研究分野：病態検査学

キーワード：薬剤耐性菌

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性菌による院内感染症の発生が大きな社会問題となり始めている。医療機関において、多剤耐性菌の拡散を防止するためには、細菌検査室が多剤耐性菌の存在をいち早く察知し、広がるまえに対策を講ずることが極めて重要である。したがって、多剤耐性菌の蔓延防止に際し、細菌検査室の果たす役割は大きく、細菌検査室は多剤耐性菌を迅速且つ簡易に識別する検査法を確立しておく必要性がある。

昨今、新型の多剤耐性菌が医療の現場で出現し始めおり、それらの検査法の確立が火急の課題となっている。特に、カルバペネム系薬に耐性を獲得した腸内細菌科細菌（以下 CRE）による感染症は、その発生が法的に届け出の対象となるなど、監視体制が強化されつつある。

2. 研究の目的

本研究では、上述 CRE の主要なカルバペネム耐性因子であるメタロβ-ラクタマーゼ（以下 MBL）の産生性を識別する検査法を開発することを目的とした。MBL については IMP 型や VIM 型など数種類の亜型がこれまでに報告されているが、今回は、研究代表者らが発見した SMB 型 MBL を標的とした。

検査法を開発するにあたり必要なのは、SMB 型 MBL の活性を抑制する阻害剤である。そこで、SMB 型 MBL の立体構造を決定し、得られた構造情報から、有効な阻害剤を見つけることを目的とした。有効な阻害剤を発見できれば、それを MBL 産生菌の検査法開発等に応用することができる。

3. 研究の方法

(1) SMB 型 MBL の発現系の構築及び精製：SMB-1 MBL 遺伝子を pET 系ベクターに連結し、大腸菌に導入した。大腸菌内で SMB-1 MBL を発現させ、菌体破碎後、陽イオン交換カラム-ゲルろ過カラムにて精製した。

(2) タンパク質の結晶化と構造解析：市販のスクリーニングキットを用い、結晶化の初期条件を探索した。出現した結晶がタンパク質由来であることを確認し、さらに至適な結晶化条件を探索した。得られた結晶を放射光施設に持ち込み、回折データの回収を行った。回折データを処理し、SMB-1 の立体構造を決定した。

(3) β-ラクタム薬の最小発育阻止濃度 (MIC) の測定：MIC の測定は寒天平板希釈法にて行った。

(4) 変異体 SMB-1 の作製：部位特異的変異導入法により変異体 SMB-1 を作製した。

(5) 阻害剤探索：SMB-1 の構造情報を基に、*in silico* screening による阻害剤探索を行った。阻害効果が期待される化合物について、*in vitro* の試験により、阻害効果を検証した。

4. 研究成果

(1) SMB-1 の立体構造の決定：最終的に 1.6Å 分解能で構造を決定することができた。SMB-1 の全体像は、AIM-1、BJP-1、L1 といった他のサブクラス B3 MBL のものと似ていた。しかし、SMB-1 の N 末端は、他のものに比べて極端に短く、そのことが SMB-1 の加水分解活性に一部影響を及ぼしているものと考えられた (図 1)。

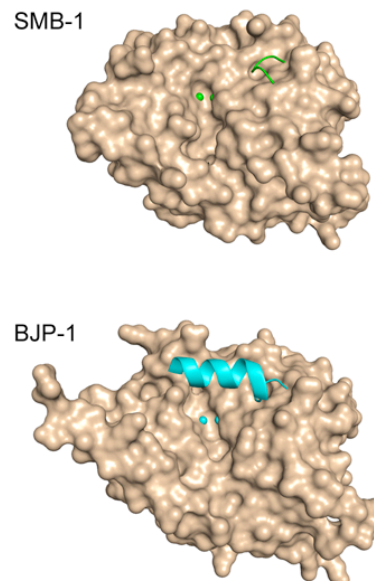


図1. BJP-1のN末端は活性ポケットを覆っているが、SMB-1のN末端は短く、活性ポケットが開放されている。

SMB-1 の活性中心には 2 つの亜鉛があり、その間には水分子が 1 つ存在した。この水分子は β-ラクタム環の加水分解に利用されるものと考えられた。

(2) Q157 アミノ酸の意義：活性中心方向に側鎖が位置する 157 番目のグルタミンは、SMB-1 に特異的なアミノ酸であり、他のサブ

クラス B3 MBL である L1 や BJP-1 にはない (図 2)。

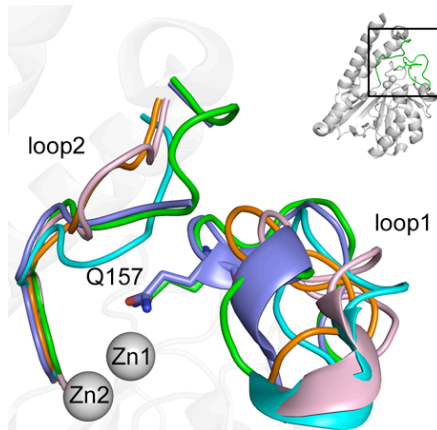


図2. loop1-Q157は活性中心に向いているため、酵素活性に関与するアミノ酸であると考えられた。

そこで、この Q157 の役割を評価するために、アラニン置換体を作製した。Q157A 変異体 SMB-1 を産生する大腸菌の各 β -ラクタム薬に対する MIC は、野生型 SMB-1 を産生する大腸菌のものより低値であった。また、変異体 SMB-1 の各 β -ラクタム薬に対する加水分解活性は野生型のものより低かった。したがって、Q157 アミノ酸が β -ラクタム薬の加水分解活性に影響を及ぼしていることがわかった。しかし、完全に酵素活性が失われなかったため、Q157 は酵素活性に必須なアミノ酸ではないことがわかった (表 1)。

表 1. SMB-1 と Q157A 変異体 SMB-1 の各 β -ラクタム薬に対する触媒効率と薬剤感受性試験結果

Substrate	β -lactamase	k_{cat}/K_m ($M^{-1}\cdot s^{-1}$)	MIC ($\mu g/mL$)
Ampicillin	Wild	2.4×10^6	> 512
	Q157A	1.5×10^6	512
	Control	—	2
Ceftazidime	Wild	7.7×10^4	128
	Q157A	1.2×10^3	32
	Control	—	0.25
Cefotaxime	Wild	8.9×10^5	4
	Q157A	1.8×10^5	1
	Control	—	0.03
Cefepime	Wild	3.6×10^3	0.13
	Q157 A	6.5×10^2	0.06
	Control	—	0.015
Imipenem	Wild	3.9×10^6	4
	Q157 A	4.1×10^5	1
	Control	—	0.25
Meropenem	Wild	4.2×10^6	2
	Q157 A	1.6×10^6	0.5
	Control	—	0.03

(3)メルカプト酢酸—SMB-1 複合体構造解析：MBL の阻害剤であるメルカプト酢酸との複合体構造を 2.2Å で決定した。複合体構造を酵素単独の構造と比較した場合、大きな違いは見られなかった。メルカプト酢酸のチオ

ール基は、SMB-1 の活性中心に位置する 2 つの亜鉛に結合していた。また、カルボン酸と S221 や T223 との結合も観察された。メルカプト酢酸は SMB-1 の活性中心に結合することで、SMB-1 の阻害剤となっていることがわかった (図 3)。

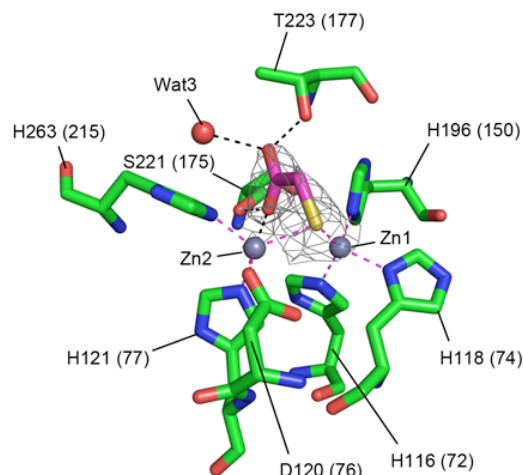


図3. SMB-1の活性中心。メルカプト酢酸のチオール (-SH)が2つの亜鉛原子(Zn1-Zn2)に結合している。

(4) カプトプリル—SMB-1 複合体構造解析：カプトプリルはアンジオテンシン変換酵素阻害剤で、SH 基を有する。そこで、カプトプリル—SMB-1 複合体結晶を作製し、構造解析を行った。その結果、1.8Å分解能の回折データの処理により得られた電子密度マップ中に、カプトプリルに相当する電子密度を確認することができた。予測通り、カプトプリルの SH 基と SMB-1 活性中心の亜鉛との結合が観察された。

(5) *in silico* スクリーニングによる阻害剤探索：決定した SMB-1 の構造情報を利用して、SMB-1 の阻害剤探索を *in silico* スクリーニングにより行った。具体的には、400 万種の化合物のデータベースを活用し、SMB-1 へのドッキングシミュレーションを行った。良好なスコアを示した化合物の中から、市販品として入手可能な 15 個を選び出し、それらの阻害効果を試験管内で検討した。その結果、4 つの化合物については SMB-1 に対するあきらかな阻害効果が確認された。4 つの化合物については、MBL 産生菌検出法の開発等に応用できる可能性がある。

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 11 件)

- ① Evaluation of disk potentiation test using kirby-bauer disks containing high-dosage fosfomicin and glucose-6-phosphate to detect production of glutathione S-transferase responsible for fosfomicin resistance
Jun-ichi Wachino, Kouji Kimura, Keiko Yamada, Wanchun Jin and Yoshichika Arakawa
Journal of Clinical Microbiology, 52: 3827-8, 2015. 査読あり
- ② Practical agar-based disk potentiation test for detection of fosfomicin-nonsusceptible *Escherichia coli* clinical isolates producing glutathione S-transferases.
Genki Nakamura, **Jun-ichi Wachino**, Natsumi Sato, Kouji Kimura, Keiko Yamada, Wanchun Jin, Keigo Shibayama, Tetsuya Yagi, Kumiko Kawamura and Yoshichika Arakawa
Journal of Clinical Microbiology, 52: 3175-9, 2015. 査読あり
- ③ Novel integron-mediated fosfomicin resistance gene *fosK*.
Hiromitsu Kitanaka, **Jun-ichi Wachino**, Wanchun Jin, Satoru Yokoyama, Masa-aki Sasano, Mitsuhiro Hori, Keiko Yamada, Kouji Kimura and Yoshichika Arakawa.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 58: 4978-9, 2014. 査読あり
- ④ Invasive infection caused by carbapenem resistant *Acinetobacter soli*, Japan.
Hiromitsu Kitanaka, Masa-aki Sasano, Satoru Yokoyama, Masahiro Suzuki, Wanchun Jin, Masami Inayoshi, Mitsuhiro Hori, **Jun-ichi Wachino**, Kouji Kimura, Keiko Yamada, and Yoshichika Arakawa
Emerging Infectious Diseases, 20:1574-6, 2014. 査読あり
- ⑤ Ability of VITEK®2 system to detect group B streptococci with reduced penicillin susceptibility (PRGBS)
Kouji Kimura, Noriyuki Nagano, Yukiko Nagano, **Jun-ichi Wachino**, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68: 1422-4, 2013. 査読あり
- ⑥ High cephalosporin resistance due to amino acid substitutions in PBP1A and PBP2X in a clinical isolate of group B *Streptococcus*
Kouji Kimura, **Jun-ichi Wachino**, Hiroshi Kurokawa, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Kunikazu Yamane, Noriyuki Nagano Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa
Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 68: 1533-36, 2013. 査読あり
- ⑦ Screening for group B streptococci with reduced penicillin susceptibility in clinical isolates obtained between 1977 and 2005
Kouji Kimura, Yasunobu Nishiyama, Seiichi Shimizu, **Jun-ichi Wachino**, Mari Matsui, Satowa Suzuki, Kunikazu Yamane, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa
Japanese Journal of Infectious Diseases, 66: 222-5, 2013. 査読あり
- ⑧ First Detection of Fosfomicin Resistance Gene *fosA3* in CTX-M-Producing *Escherichia coli* Isolates from Healthy Individuals in Japan
Natsumi Sato, Kumiko Kawamura, Kunihiko Nakane, **Jun-ichi Wachino**, Yoshichika Arakawa.
Microbial Drug Resistance, 19: 477-82, 2013. 査読あり
- ⑨ Rapid and Reliable Loop-Mediated Isothermal Amplification Method for Detecting *Streptococcus agalactiae*
Kouji Kimura, Hideji Yanagisawa, **Jun-ichi Wachino**, Keigo Shibayama, Yoshichika Arakawa
Japanese Journal of Infectious Diseases, 66: 546-8, 2013. 査読あり
- ⑩ Evaluation of a double-disk synergy test with a common metallo- β -lactamase inhibitor, mercaptoacetate, for detecting NDM-1-producing *Enterobacteriaceae* and *Acinetobacter baumannii*.
Jun-ichi Wachino, Mari Matsui, Hoang Huy Tran, Masato Suzuki, Keigo Shibayama.
Japanese Journal of Infectious Diseases, 67: 66-8, 2014. 査読あり
- ⑪ Structural insights into the subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1 and the mode of inhibition by the common metallo- β -lactamase inhibitor mercaptoacetate
Jun-ichi Wachino, Yoshihiro Yamaguchi, Shigetaro Mori, Hiromasa Kurosaki, Yoshichika Arakawa, Keigo Shibayama.
Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 57: 101-109, 2013. 査読あり

[学会発表] (計 7 件)

- ① **和知野純一**、荒川宜親
CRE が産生するカルバペネマーゼの種類と CRE の疫学
第 26 回日本臨床微生物学会総会. 2015

年1月31日-2月1日. 東京都新宿区. 京王
プラザホテル

- ② **和知野純一**、木村幸司、荒川宜親
ESBL 産生大腸菌における新型ホスホマイ
シン耐性機構の出現とその簡易識別法の
開発
第61回日本化学療法学会東日本支部総
会. 2014年10月29日-31日. 東京都文京区.
東京ドーム ホテル

- ③ **和知野純一**、荒川宜親
メルカプト酢酸ナトリウム(SMA)を用いた
NDM 型メタロ β -ラクタマーゼ産生株検出
法の評価.
第62回日本化学療法学会総会. 2014年6
月18日-20日. 福岡県福岡市. ヒルトン福岡
シーホーク

- ④ **和知野純一**、荒川宜親
多剤耐性を引き起こすカルバペネマーゼ
に関する最新の知見
第61回日本化学療法学会西日本支部総
会. 2013年11月6日-8日. 大阪府大阪市.
大阪国際会議場

- ⑤ **和知野純一**、荒川宜親
アミノグリコシド、フルオロキノロン、ホ
スホマイシン耐性メカニズムの新知見
第61回日本化学療法学会総会. 2013年6月
5日-6日. 神奈川県横浜市. パシフィコ横
浜

- ⑥ **Jun-ichi Wachino**, Yoshichika Arakawa
Genetic, biochemical and structural analyses of
a subclass B3 metallo- β -lactamase SMB-1
from a *Serratia marcescens* clinical isolate.
28th International Congress of Chemotherapy
and Infection. June 5-6, 2013. Kanagawa
Yokohama. Pacifico Yokohama

- ⑦ **和知野純一**、森茂太郎、柴山恵吾、荒川宜
親
メタロ β -ラクタマーゼ SMB-1 の構造機能
解析
第86回日本細菌学会総会. 2013年3月18
日-20日. 千葉県千葉市. 幕張メッセ国際会
議場

[産業財産権]

○出願状況 (計1件)

名称: ホスホマイシン不活化酵素産生菌の検
出

発明者: 和知野純一、荒川宜親

権利者: 名古屋大学

種類: 特許

番号: 2014-083319(JP)

出願年月日: 2014年4月

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

和知野 純一 (WACHINO Jun-ichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 00535651