

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 3 日現在

機関番号：24601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2015

課題番号：25670276

研究課題名(和文)立体構造情報に基づいたCTX-M型ラクタマーゼの基質特異性拡張機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of enlargement mechanism of substrate specificity of CTX-M type beta-lactamase based on protein crystallography.

研究代表者

山本 恵三 (YAMAMOTO, Keizo)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：90254490

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：DNA配列、及び構造の比較から、CTX-M型ラクタマーゼの基質特異性の変化に関与するのは、3つのループ部分、 $\omega$ ループ、VNYPループ、 $\alpha/\beta$ ドメインを繋ぐループに生じたアミノ酸置換であることが示唆された。 $\alpha/\beta$ ドメインを繋ぐループ中に存在するAla-219に対し、A219V、A219L、A219F、の変異型酵素を作成し構造を解析した。その結果、野生型に対し、A219Lの主鎖は最大0.42 nmという大きな変位を示したことから、CTX-M型ラクタマーゼの構造は潜在的に柔軟性があり、ループ部分のアミノ酸置換により、全体構造と活性が大きく変化することが示された。

研究成果の概要(英文)：Plasmid-mediated extended spectrum beta-lactamases (ESBLs) named CTX-M causes hospital- and community-acquired infections in Japan. Comparison of DNA sequences and structures of CTX-Ms showed that amino acid substitution in the three loop regions, omega-loop, VNYP-loop, and a loop connecting alpha/beta domain must be important to change of substrate specificity. Ala-219 which locates in a loop connecting alpha/beta domain is considered as a key residue to substrate specificity. Thus, the structures of three mutant enzymes, A219V, A219L, A219F, and wild type CTX-M-2 were solved. Although the structural difference among wild type, A219V, and A219F were very small, maximum XYZ-difference between wild type and A219L were 0.42 nm. It reveals that the structure of CTX-Ms is latently flexible and mutation in the loop region raises changes of overall structure and substrate specificity.

研究分野：タンパク質工学

キーワード：ラクタマーゼ X線結晶構造解析 基質特異性 構造変化

1. 研究開始当初の背景

基質特異性拡張型 - ラクタマーゼ (Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase: ESBL) は、ペニシリン系と第3世代セファロスポリン、モノバクタム系薬剤までに耐性を示す - ラクタマーゼである。1980年代には、ESBL 産生菌はヨーロッパにおいて、院内感染の起因菌として多く検出されるようになった。これらの耐性菌はプロトタイプである TEM-1, SHV-1, OXA-1 の - ラクタマーゼのアミノ酸の1~数か所が置換することにより広い基質特異性を有するようになった ESBL を保有するものであった。

欧米では TEM 型、SHV 型を始め、様々な ESBL が検出されるが、日本では 1990 年代より CTX-M 型と呼ばれる ESBL が主として検出されている。CTX-M 型は現在まで 6 種のサブグループ、130 種類以上のバリエーションが確認されている。TEM 型、SHV 型 ESBL については多くの立体構造や変異型酵素の解析例が報告されており、研究は非常に進んでいる、しかしながら、CTX-M 型 ESBL については、研究開始当初に構造が解明されていたバリエーションはわずか 5 種であり、基質特異性の拡張を説明するための構造学的情報は非常に乏しかった。そこで CTX-M 型 - ラクタマーゼについて、網羅的な配列解析、及び複数のタンパク質について X 線結晶構造解析による立体構造の決定を着想した。

2. 研究の目的

当初の研究目的は、以下の 4 項目である。

- (1) CTX-M 型 ESBL のサブグループの鑑別。
- (2) 大腸菌における CTX-M 型 ESBL の高発現化と高純度なタンパク質の精製方法の確立。
- (3) CTX-M 型 ESBL の結晶化と複数のタンパク質についての X 線結晶構造解析による立体構造決定。
- (4) 立体構造の比較による基質特異性の拡張機構の解明。

3. 研究の方法

- (1) CTX-M 型 ESBL のサブグループの鑑別。

CTX-M 型の各サブグループに特異的な配列を認識するプライマーを用いて、PCR により、奈良県立医科大学附属病院で分離された ESBL 発現菌が保有する ESBL 遺伝子の鑑別を行う。

- (2) 大腸菌における CTX-M 型 ESBL の高発現化と高純度なタンパク質の精製方法の確立。

ESBL 発現菌よりプラスミドを単離し、コードされている CTX-M 型 ESBL 遺伝子の配列を決定する。その結果を用いて CTX-M 型 ESBL 遺伝子を PCR により取得して、大腸菌の発現ベクターに組み込み、発現条件を検索する。得られた菌体破碎液より、迅速かつ

高純度な精製タンパク質を得る方法を確立する。

- (3) CTX-M 型 ESBL の結晶化と複数のタンパク質についての X 線結晶構造解析による立体構造決定。

精製したタンパク質に対し、結晶化条件検索キットを用いて、結晶化条件を検索する。単結晶が得られた条件を精密化し、結晶構造解析が可能な大きさの単結晶が得られる条件を決定する。得られた単結晶を用いて放射光施設 (SPring-8) において X 線回折データを収集し、立体構造を決定する。

- (4) 立体構造の比較による基質特異性の拡張機構の解明。

決定した複数の CTX-M 型 ESBL の構造を比較し、どのようにして基質特異性が拡張されてきたかを推論する。

4. 研究成果

- (1) CTX-M 型 ESBL のサブグループの鑑別。

平成 24 年度に奈良県立医科大学附属病院で単離された ESBL 保有菌株について、PCR を用いた鑑定を行った。その結果を表 1 に示す。

表 1 平成 24 年度菌株サーベイの結果

Sample No.	TEM	SHV	CTX -M1	CTX -M2	CTX -M9
1	-	-	-	-	+
2	+	-	-	-	+
3	+	-	-	-	+
4	-	-	+	-	-
5	+	-	-	-	+
6	-	-	-	+	+
7	-	-	-	-	+
8	+	-	-	-	+
9	-	-	+	-	-
10	-	-	-	-	+
11	-	-	-	-	+
12	+	-	+	-	-
13	-	-	-	-	+
14	-	-	-	-	+

本学附属病院においては、平成 24 年度に単離された菌株が保有する ESBL は主として CTX-M-9(11 検体)であり、CTX-M-1、CTX-M-2 と TEM 型が散見される結果を得た。

研究に先立って、平成 25 年時点で得られ

ていた CTX-M 型 ESBL のアミノ酸配列データ、立体構造データの網羅的解析を行い、基質特異性を変化させる領域の抽出を試みた。その結果、Asn170 を中心とする ループに生じたアミノ酸置換がセフトラジウムに対する活性を増加させる、Val103 – Pro107 で構成される VNYNP ループに生じたアミノ酸置換がセフトラキムに対する活性に影響を与える、活性中心の上部に位置し、 $\beta$ ドメインをつなぐループ中に存在する Ala219 の変異がセフトラキムに対する活性に影響を与える、という知見を得た。これらのアミノ酸の中には、直接基質との相互作用に関わっていないアミノ酸が含まれていることから、CTX-M 型 ESBL の構造は柔軟性に富んでおり、ループ部分に生じたアミノ酸置換により大きく構造を変化させる可能性があることが予想された。そこで、立体構造が解明されていない CTX-M-2 をターゲットとし、Ala219 にループの柔軟性が制限されるようなアミノ酸置換を系統的に導入して解析することを目的とした。

#### (2) 大腸菌における CTX-M 型 ESBL の高発現化と高純度なタンパク質の精製方法の確立。

奈良県立医科大学附属病院で分離された大腸菌 58-132 株より ESBL をコードするプラスミドを単離し、CTX-M-2 遺伝子を保有することを DNA の配列を決定することで確認した。そのデータを基にプライマーを設計し、PCR により遺伝子全長を増幅した。この断片を pET28a の *Nco*I-*Bam*HI 間に挿入し、発現プラスミドを構築した。得られたプラスミドで大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、CTX-M-2 発現株を得た。

大腸菌の通常の培養温度である 37 °C で培養し、OD<sub>600</sub>=0.5 ~ 0.6 で終濃度 1 mM の IPTG を添加して発現誘導をかけたところ、CTX-M-2 の発現は見られたが、ほぼ全量が不溶性画分に存在していた。そこで、可溶化した CTX-M-2 を得るため、培養条件(温度、IPTG 濃度)の最適化を行った。その結果、培養温度 20 °C、OD<sub>600</sub>=0.5 ~ 0.6 で終濃度 0.02 mM の IPTG を添加することで、可溶性の CTX-M-2 を得ることに成功した。

精製条件についても検討を行った結果、大腸菌破砕液の遠心上清を 20 mM MES、pH 6.5 で平衡化した CM-Toyopearl に添加し、0-0.2 M NaCl 直線勾配で溶出させることによって、電気泳動的に単一の CTX-M-2 が得られた。収量は 1L 培養あたり約 70 mg であった。

#### (3) CTX-M 型 ESBL の結晶化と複数のタンパク質についての X 線結晶構造解析による立体構造決定。

Hampton Research 社の結晶化条件検索キットを用いて単結晶が作成できる条件を検索した。いくつかの条件で微結晶が得られたため、結晶化条件の最適化を行った。その結果、0.1 M sodium citrate pH 5.6, 1.9 M

ammonium sulfate, 0.2 M potassium sodium tartrate を沈殿剤として使用することにより、約 0.1 mm 角の bi-pyramidal 型の結晶を得た。この結晶を用い、SPring-8 BL44XU において、X 線回折データを収集したところ、分解能 1.3 Å、空間群 P<sub>3</sub><sub>2</sub>2<sub>1</sub>、格子定数 a=b=72.49, c=97.48 の非常に良好な回折データを収集することができた。

既に構造が決定されている Toho-1 (CTX-M-44) の構造(PDB code: 1iy0)を初期モデルとした分子置換法によって、野生型 CTX-M-2 の構造を決定した(図 1)。

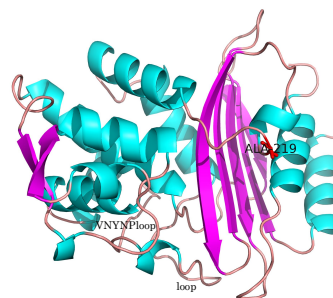


図 1 CTX-M-2 の全体構造  
Ala219 を赤色で示している。

CTX-M-2 は 5 本のアンチパラレル  $\beta$ -sheet を両側から  $\alpha$ -helix からなるドメインが挟んでいる構造をとっていた。活性部位は左の  $\alpha$ -helix からなるドメインと  $\beta$ -sheet からなるドメインとの間にあり、 $\beta$ ループ、VNYNP ループ、Ala219 を含むループが覆う形をとっていた。この構造は、モデルとした Toho-1 とよく似た形であった。

#### (4) 立体構造の比較による基質特異性の拡張機構の解明。

Ala219 を含むループ部分にアミノ酸置換を導入すると、全体の構造にどのような変化が生じるのかを解明するために、PCR を用いて、Ala219 に対し Val, Leu, Phe のアミノ酸置換を導入した。野生型 CTX-M-2 と同様に大腸菌 BL21(DE3) を形質転換し、変異型酵素発現株を作成し、そこから変異型酵素を精製した。A219V, A219F については、タンパク質濃度 20 mg/mL で 0.1 M sodium citrate pH 5.6, 1.9 M ammonium sulfate, 0.2 M potassium sodium tartrate を沈殿剤として使用することにより、約 0.1 mm 角の bi-pyramidal 型の結晶を得た。A219L については、10% PEG200, 0.1 M bis-Tris propane pH 9.0, 17% PEG8000 を沈殿剤として使用することにより、約 0.1 mm 角の直方体型の結晶を得た。得られた結晶を用いて SPring-8 BL44XU において、X 線回折データを収集した。A219V は分解能 1.3 Å、空間群 P<sub>3</sub><sub>2</sub>2<sub>1</sub>、A219L は分解能 1.7 Å、空間群 P<sub>2</sub><sub>1</sub>2<sub>1</sub>2<sub>1</sub>、A219F は分解能 1.7 Å、空間群 P<sub>3</sub><sub>2</sub>2<sub>1</sub> の良好な回折データが収集できた。

既に構造を決定した野生型 CTX-M-2 をモデルとした分子置換法で変異型酵素の立体構造を決定し、野生型のそれと比較した。その結果、A219V, A219F と野生型との主鎖の r.m.s.d は 0.1~0.2 であり、最大でも 0.5 程度の変位しか生じていなかったのに対し、A219L では r.m.s.d が 0.5 で最大 4.2 もの変位が生じていることがわかった。図 2 に A219L と野生型の構造の比較を示す。

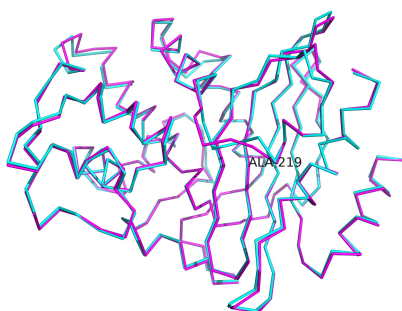


図 2 野生型 CTX-M-2(cyan) と A219L(magenta)の比較

変異を導入した位置の構造はほとんど変化していないのに対し、その他の部分で大きな主鎖の変位が生じていた。このことから、CTX-M 型  $\beta$ -ラクタマーゼの構造には潜在的な柔軟性があり、ループ部分にアミノ酸置換が生じることにより、全体の構造が変化し、基質特異性に影響を与えることが示唆された。

この現象が  $\beta$ -ラクタマーゼに一般的であるのかを調べるため、IMP 型  $\beta$ -ラクタマーゼを用いて検証を行った。IMP-6 は IMP-1 から 1 アミノ酸置換 (Ser196→Gly) で生じた酵素であり、IMP-1 に比べ、メロペナムに対する活性が大きく増大した酵素である。IMP-6 遺伝子を大腸菌にクローニングし、精製した酵素を用いて結晶を作製、立体構造を決定し、両者の構造を比較した (図 3)。

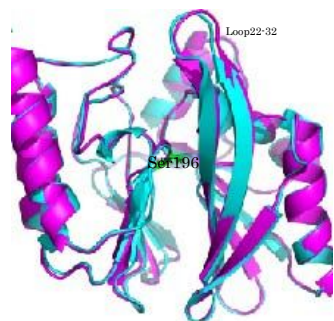


図 3 IMP-1(cyan)と IMP-6(magenta)の構造比較

Ser196 は  $\beta$ -シートから  $\beta$ -ヘリックスに

至るループ中に存在する。この位置の構造は両者でほとんど変化していないが、反対側のドメインに存在するループ 22-32 の部分で大きく構造が変化していることがわかった。このループは基質の結合に関与することがわかっているため、この構造変化が基質特異性に大きな影響を与えていることが考えられた。

以上のことから、 $\beta$ -ラクタマーゼの構造は潜在的な柔軟性に富んでおり、ループ部分に生じたアミノ酸置換によって、全体の構造が変化し、酵素活性に変化をもたらすことが示唆された。

## 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 12 件)

Ogawa, Y., Koizumi, A., Kasahara, K., Lee, S. T., Yamada, Y., Nakano, R., Yano, H., Mikasa, K., First case of *Kerstersia gyiorum* urinary tract., *J. Infect. Chemother.*, 査読有, 22, 2016, 265-267.

DOI: 10.1016/j.jiac.2015.11.003.

Osaki, S., Yamamoto, K., Matsuhira, T., Sakai, H., The effects of seasonal changes on the molecular weight of *Nephila clavata* spider silk., *Polymer J.*, 査読有, 48, 2016, 659-663.

DOI: 10.1038/pj.2015.138.

Mikasa, K., Kasahara, K., Sano, R., Nationwide surveillance of bacterial respiratory pathogens conducted by the surveillance committee of Japanese Society of Chemotherapy, the Japanese Association for Infectious Diseases, and the Japanese Society for Clinical Microbiology in 2010: General view of the Pathogens' antibacterial susceptibility., *J. Infect. Chemother.*, 査読有, 21, 2015, 410-420.

DOI: 10.1016/j.jiac.2015.02.008.

Ogawa, T., Matsumoto, K., Tsujimoto, K., Hishiya, N., Yamada, Y., Uno, K., Kasahara, K., Maeda, K., Mikasa, K., Morita, K., Chronic invasive sinus and intracerebral aspergillosis controlled by combination therapy with micafungin and a daily dose of 400 mg itraconazole oral solution., *J. Infect. Chemother.*, 査読有, 21, 2015, 134-137.

DOI: 10.1016/j.jiac.2014.08.010.

Kasahara, K., Komatsu, Y., Koizumi, A., Chang, B., Ohnishi, M., Muratani, T., Mikasa, K., Serotype 35B *Streptococcus pneumoniae*, Japan, 2002-2012., *J. Infect. Chemother.*, 査読有, 20, 2014, 228-230.

DOI: 10.1016/j.jiac.2013.11.008.  
Koizumi, A., Kasahara, K., Komatsu, Y.,  
Ui, K., Mizuno, F., Nakayama, A.,  
Mikasa, K., Evaluation of the vitek 2  
AST-N269 card for detection of  
meropenem resistance in  
imipenem-susceptible  
meropenem-resistant  
Enterobacteriaceae., J. Clin. Microbiol.,  
査読有、51, 2013, 3908.  
DOI: 10.1128/JCM.02063-13.  
Matsuhira, T., Yamamoto, K., Osaki, S.,  
Effects of UV irradiation on the  
molecular weight of spider silk.,  
Polymer J., 査読有、45, 2013,  
1167-1169.  
DOI: 10.1318/pj.2013.41.

〔学会発表〕(計11件)

中山 章文、永井 秀典、赤羽 貴行、  
茂龍 邦彦、水野 文子、高速リアルタ  
イム PCR 装置を用いた結核菌迅速検出法  
の開発、第 64 回日本医学検査学会、2015  
年 5 月 16 日、福岡県・福岡市  
笠原 敬、臨床医と検査技師の連携～地  
域での連携、そして院内システムの構築  
へ～、第 27 回日本臨床微生物学会、2016  
年 1 月 29 日、宮城県・仙台市  
笠原 敬、三笠 桂一、JAID/JSC 感染  
症治療ガイド 2014 年改訂版はどこが変  
わった?、第 89 回日本感染症学会総会、  
2015 年 4 月 16 日、京都府・京都市  
今井 雄一郎、宇野 健司、梶田 明裕、  
今北 奈津子、北 和也、小川 拓、米  
川 真輔、笠原 敬、中村(内山)ふく  
み、前田 光一、古西 満、石井 良和、  
三笠 桂一、健康成人に発症した K1 型  
Klebsiella Pnumoniae による肝膿瘍、  
敗血症ショックの 1 例、第 57 回日本感  
染症学会中日本地方学術集会・第 84 回日  
本感染症学会西日本地方学術集会、2014  
年 10 月 24 日、岡山県・岡山市  
笠原 敬、重田 純一、岡西 康治、三  
笠 桂一、国内外における抗菌薬サーベ  
イランスの現状と重要性、第 24 回日ノン  
医療薬学会年会、愛知県・名古屋市  
中山 章文、松吉 ひろ子、宇野 健司、  
西川 文子、山本 惠三、河野 久、新  
生児髄膜炎由来大腸菌の遺伝子解析、第  
25 回日本臨床微生物学会、2014 年 2 月 1  
日、愛知県・名古屋市  
笠原 敬、ESBL 産生菌感染症に対する  
治療戦略、第 26 回日本外科感染症学会総  
会、2013 年 11 月 25 日、兵庫県・神戸市  
小松 裕子、笠原 敬、久留野 紀子、  
小泉 章、水野 文子、福盛 達也、米  
川 真輔、小川 拓、宇野 健司、前田  
光一、古西 満、三笠 桂一、ESBL 産  
生大腸菌による敗血症患者の臨床的検討、  
第 61 回日本化学療法学会西日本支部総

会、2013 年 11 月 6 日、大阪府・大阪市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 惠三 (YAMAMOTO, Keizo)  
奈良県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 90254490

(2) 研究分担者

笠原 敬 (KASAHARA, Kei)  
奈良県立医科大学・医学部・准教授  
研究者番号: 50405403

中山 章文 (NAKAYAMA, Akifumi)  
岐阜医療科学大学・保険科学部・教授  
研究者番号: 70536721