

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460037

研究課題名(和文)セフェム系抗菌薬に対して触媒効率を高めたメタロ-β-ラクタマーゼの物理化学的解析

研究課題名(英文) Physicochemical analysis of metallo-beta-lactamase with improved catalytic efficiency for cephem antibiotics

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：KHM-1は、ほとんどすべてのβ-ラクタム剤を加水分解するメタロ-β-ラクタマーゼ(MBL)である。KHM-1は、他のMBLと比べるとセフェム系抗生物質に対して非常に触媒効率が高い。そこで本研究は、KHM-1の高触媒効率機構の解析を目的とした。KHM-1の結晶構造から、活性中心にある2つのZnイオンの一つが解離しやすく、X線小角散乱解析による溶液構造から、構造が非常に類似したMBL(IMP-1酵素)と比べると粒径が小さいことが分かった。さらにKHM-1の活性中心近傍にあるHis170の変異酵素の速度論的パラメータから、KHM-1のHis170は加水分解活性に影響を与えることが分かった。

研究成果の概要(英文)：The enzyme KHM-1 is a metallo-β-lactamase (MBL) that hydrolyzes almost all β-lactam antibiotics; compared with other MBLs, KHM-1 has a higher catalytic efficiency for hydrolyzing cephem antibiotics. The objective of this study was to elucidate the mechanism underlying the high catalytic efficiency of KHM-1. Analysis of the crystal structure of KHM-1 showed that one of the two Zn(II) ions in the active site easily dissociates. Small-angle X-ray scattering analysis revealed that the particle size of KHM-1 in solution is small than that of other MBLs (e.g., IMP-1, with a structure similar to that of KHM-1). Kinetic analysis of KHM-1 revealed that His170 of KHM-1, which is located near the active site, plays an important role in the enzyme's hydrolytic activity.

研究分野：酵素化学

キーワード：加水分解酵素 薬剤耐性菌 メタロ-β-ラクタマーゼ Zn(II)イオン 結晶構造 溶液構造 速度論的解析

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 薬剤耐性菌

抗生物質が効かない薬剤耐性菌が世界中で問題となっており、死亡率を押し上げる要因ともなっている。薬剤耐性菌の脅威は、既存の抗生物質が枯渇する恐れがある。メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) 産生菌は、抗生物質である β-ラクタム剤のほとんどすべてが効かない薬剤耐性菌であり、他の薬剤耐性遺伝子をもち多剤耐性菌として単離されることが非常に多いことから、他の抗生物質による化学療法も困難となる。特に最近になって、カルバペネム耐性腸内細菌科細菌 (CRE) が深刻な問題となり、その中でも MBL 産生菌は、カルバペネマーゼ産生菌 (CPE) として世界中で警戒されている。

### (2) メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL)

MBL は、2つの Zn(II)イオン (Zn1 および Zn2) を活性中心に結合させることができる加水分解酵素である。MBL の活性中心は、広くて浅く、さらに柔軟性の高い loop 構造の存在により、ほとんどすべての β-ラクタム剤を認識できると考えられている。さらに MBL の活性中心では、Zn(II)イオンが1つでも機能することが知られており、MBL の遺伝子突然変異による亜型が次々と単離されることも相まって、臨床上で使える MBL 阻害剤開発が遅れている。

### (3) MBL の KHM-1 酵素

KHM-1 は、杏林大学医学部附属病院において *Citrobacter freundii* のプラスミドから単離された MBL である。また日本でよく単離される MBL である IMP-1 とアミノ酸相同性が約 59% である (J. Sekiguchi, *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52, 4194-4197 (2008))。KHM-1 の特徴は、基質であるペニシリン系 β-ラクタム剤のアンピシリンに対する触媒活性 ( $K_m/k_{cat}$ ) が  $1.9 \times 10^4 (M^{-1} \cdot s^{-1})$  に対して、セフェム系のセフォタキシムに対する触媒活性が  $1.7 \times 10^8 (M^{-1} \cdot s^{-1})$  である。つまり KHM-1 の基質がペニシリン系からセフェム系に

変わっただけで、触媒活性が約 10,000 倍上昇した。なお IMP-1 では、KHM-1 とのアミノ酸相同性が高いにもかかわらず、このような基質の違いによる触媒活性の上昇は約 10 倍くらいである。

## 2. 研究の目的

本研究は、KHM-1 の結晶構造を基盤として、アミノ酸相同性が約 59% である IMP-1 と比較して、これら分子機構に影響を与えるアミノ酸を変異体調製、速度論的解析、蛋白質 X 線溶液散乱および蛋白質 X 線結晶構造解析などによって特定し、KHM-1 がなぜ 10,000 倍以上も高触媒化されたかを解明することが目的である。

## 3. 研究の方法

### (1) KHM-1 の発現および精製

KHM-1 遺伝子は、研究協力者である国立国際医療センター研究所の切替照雄部長から、pET ベクターに組み込まれた状態で譲受した (pET28a/KHM-1)。pET28a/KHM-1 で大腸菌 BL21(DE3) を形質転換させ、LB 液体培地中 37°C で振とう培養させた。濁度 ( $OD_{600}$ ) が 0.4 ~ 0.6 になるまで培養した後、IPTG を 0.1 mM (最終濃度) となるように加え、30°C で 15 時間かけて KHM-1 の発現を行った。培養液から、遠心分離によって菌体を沈殿させて集菌を行った。これを 0.1M NaCl を含む 20mM BisTris-HCl (pH6.5) に再懸濁させ、KHM-1 を発現している菌体を得た。菌体を超音波で破碎し、その後、遠心分離によって上清液を回収した。フィルター (0.45 μm) で限外ろ過を行い、このろ液を粗酵素溶液とした。カラムによる精製はすべて 4°C で行った。陽イオン交換カラムを用いて、0.1M NaCl を含む 20mM BisTris-HCl (pH6.5) で平衡化させた陽イオン交換カラムに KHM-1 を吸着させ、20mM BisTris-HCl (pH6.5) 中の NaCl 濃度 (0.1-0.3M) によって塩勾配をかけ、KHM-1 を溶出させた。KHM-1 を含む画分を濃縮し、ゲルろ過カラムを用いて 0.1M NaCl を含む 20mM BisTris-HCl (pH6.5) で溶出させた。SDS-PAGE で単一の画

分であることを確認し、この溶液を精製酵素液とした。KHM-1 の酵素濃度は 280 nm の吸光度を測定し、 $\epsilon_{280} = 36,000 \text{ (M}^{-1}\text{cm}^{-1}\text{)}$  より、Lambert-Beer の式を用いて決定した。収量は約 20 mg/(8L 培養液)であった。

#### (2) KHM-1 の結晶化および蛋白質 X 線結晶構造解析

KHM-1 結晶は、20 mM BisTris-HCl (pH 6.5)に溶解している 5mg/mL のタンパク質溶液 (KHM-1)を、結晶化溶液 (20mM BisTris-HCl pH6.5、0.1M Ammonium sulfate、30%(w/v) PEG4000)と1:1で混合させてドロップを作り、蒸気拡散法 (Hanging Drop、20°C)で調製した。X線回折データの測定は、高エネルギー加速器研究機構 Photon Factory (PF)の BL5A、NW3A (PF-AR)、NW12A (PF-AR)において 1.0000Å の波長で CCD カメラ (ADSC Quantum 315r (BL5A)、ADSC Quantum 270 (NE3A)、ADSC Quantum 210 (NW12A))を detector として 100K で測定した。露光時間 1 秒、振動角 1°で 360 枚データを集めた。データは、Denzo/ scalepack/ HKL2000 を使い、indexing、integrating、scalingした。KHM-1 の構造は分子置換法によって決定した。2000 年に N. O. Concha らによって報告されている緑膿菌由来の IMP-1 (PDB code:1DDK)を search model として使用した。プログラムは CCP-4 の AMoRe を用いた。グラフィックプログラム Win Coot でモデルを修正し、プログラム Refmac で構造の精密化を行った。

#### (3) KHM-1 変異体の調製

KHM-1 遺伝子の部位特異的変異は、研究協力者である熊本大学薬学部の藤田美歌子准教授の協力の元で行った。具体的には、その遺伝子を制限酵素 *Xba* I および *EcoR* I を使って pBlue ベクターにサブクローニングした (pBlue/KHM-1)。KHM-1\_H170D 遺伝子は、QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (アジレント・テクノロジー)を用いて、部位特異的変異

を行った (pBlue/KHM-1\_H170D)。具体的には、pBlue/KHM-1 を鋳型に、2 つの変異用プライマー (primer 1: 5'-CTT GGC AAT CTT AGC GAT GCG GTA ATT GCA G-3'、primer 2: 5'-CTG CAA TTA CCG CAT CGC TAA GGA TGC CAA G-3')を用いて PCR を行った (95°C for 30 sec、55°C for 1 min、72°C for 4 min、30 cycles)。ここで得られた PCR 産物をアガロース電気泳動で確認した後、大腸菌 DH5 $\alpha$  に導入した。生じたコロニーについて DNA を単離し、塩基配列を調べ、目的の変異導入プラスミドを得た。さらに KHM-1\_H170D 遺伝子は、大量発現のために、制限酵素 *Xba* I および *EcoR* I を使って pET ベクターにサブクローニングした (pET28a/KHM-1\_H170D)。

#### (4) KHM-1 の酵素活性測定

酵素の加水分解活性は分光光度法を利用した。0.5M NaCl を含む 50mM Tris-HCl (pH7.4) 2.9mL をセル長 1cm の UV 測定セルに加え、酵素溶液 (Final 10nM) を 10 $\mu$ L 加えた。30°C、5 分間放置し、温度を一定にした。基質として  $\beta$ -ラクタム剤であるアンピシリン (Final 25-500 $\mu$ M)、セフォタキシム (Final 3-100 $\mu$ M)、セファロチン (Final 3-100 $\mu$ M)、セフトジジム (Final 3-50 $\mu$ M)、イミペネム (Final 25-200 $\mu$ M) を使用し、その溶液を 100 $\mu$ L 加え、すばやく振り混ぜ、加水分解反応による基質に応じた特定の吸光度の減少を 60 秒間経時的に測定した。初速度法で加水分解速度を算出し、速度論的パラメータは、Michaelis-Menten 式を用いて非線形最小二乗法により算出した。

#### (5) X 線小角散乱

KHM-1 と IMP-1 の X 線小角散乱の測定は、研究協力者である高エネルギー加速器研究機構の清水伸隆准教授と行った。KHM-1 と IMP-1 をそれぞれ 50mM NaCl、5% Glycerol、を含む 20mM HEPES-NaOH (pH7.5) に Buffer 交換し、タンパク質濃度 1mg/mL、2mg/mL、3mg/mL、

4mg/mL、5mg/mL をそれぞれ 150 $\mu$ L 調製した。X 線回折データの測定は、PF の BL6A において 1.5000 $\text{\AA}$  の波長で、ハイブリッドピクセル検出器(Dectris PILATUS3 1M)を detector として 298K で測定した。露光時間 1~10 秒で 10~20 枚の測定を行い、影響のない範囲を積算した。測定したデータは ATASAS プログラムを用いて解析を行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) KHM-1 の結晶構造

KHM-1 の結晶構造は、結晶化溶液に含まれる組成によって、5種類得ることができた。具体的には、結晶化溶液の pH が 5.5、6.0、6.5 の結晶構造と、還元剤 Tris(2-carboxyethyl)phosphine (1 mM) を加えた結晶構造、さらに  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  (5 mM) 加えた結晶構造を得た。得られた結晶は空間群がすべて  $P4_1$  であり、結晶格子に 2 個の独立した構造(molecules A and B)が存在していた。KHM-1 の結晶構造は、IMP-1 などの MBL によく観察される  $\alpha\beta/\beta\alpha$  であり、IMP-1 の二次構造と比較すると、ほとんど IMP-1 と同じ二次構造だった(図 1)。

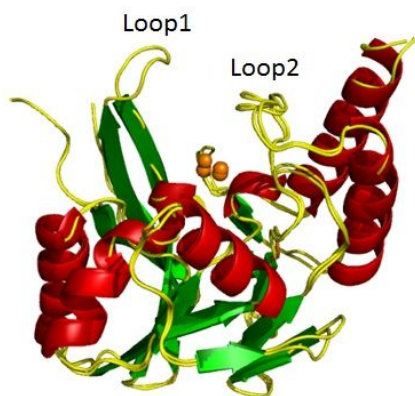


図 1 IMP-1 と KHM-1 の結晶構造の重ね合わせ

活性中心には 2 つの  $\text{Zn}(\text{II})$  イオンが結合していたが、pH 6.5 で結晶化させた KHM-1 の結晶構造では、 $\text{Zn}(\text{II})$  イオンの一つが解離して、 $\text{Zn}(\text{II})$

リガンドでありフリーになった Cys158 が酸化していた。そのため、結晶化条件に還元剤である Tris(2-carboxyethyl)phosphine を加えて KHM-1 の結晶化を行った。しかし、Cys158 の酸化は電子密度からは確認できなかったが、一つの  $\text{Zn}(\text{II})$  イオンの解離を観察することができた。そのため、さらに  $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2$  を結晶化条件に加えることで、KHM-1 の活性中心に 2 つの  $\text{Zn}(\text{II})$  イオンが結合した結晶構造を得ることができた。この結晶構造を使って、IMP-1 の結晶構造 (PDB code: 1DDK) と比較したところ、KHM-1 の活性中心は、IMP-1 よりも約 1.4  $\text{\AA}$  広がっていることが分かった(図 2)。

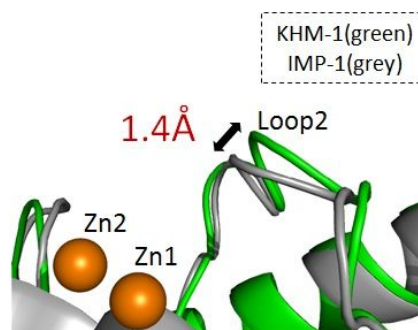


図 2 KHM-1(green)と IMP-1(grey)の活性中心近傍の比較

##### (2) KHM-1 の溶液構造

KHM-1 と IMP-1 の溶液中における構造を解析するため、X 線小角散乱測定を行った。X 線小角散乱解析は X 線結晶構造解析に比べると低分解能であるため、溶液中の粒子径とおおまかな全体構造のみ推測できる。KHM-1 の慣性半径( $R_g$ )は 18.2~18.9 $\text{\AA}$ 、IMP-1 の慣性半径( $R_g$ )は 19.0~19.5 $\text{\AA}$  と IMP-1 の方が KHM-1 より広がっていた。より基質を取り込みやすくなるため、KHM-1 の方が IMP-1 より溶液構造は広がると推測していたが、KHM-1 の溶液中構造と IMP-1 の溶液中構造を重ね合わせた結果、IMP-1 の方が KHM-1 より広がっている可能性があることが分かった。

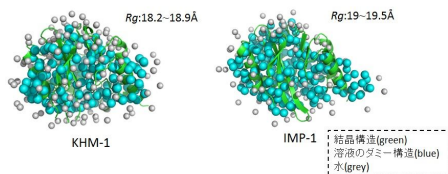


図3 KHM-1とIMP-1のX線小角散乱測定から推定される溶液構造の比較

### (3) KHM-1のHis170の役割

KHM-1とIMP-1の結晶構造を比較したところ、それぞれの活性中心近傍でアミノ酸置換が起きている部位として、8つのアミノ酸置換を特定した。KHM-1のHis170は、Zn(II)リガンドであるHis79と水素結合していた。しかしIMP-1では、170位はAspであり、やはりHis79と水素結合していた(図4)。

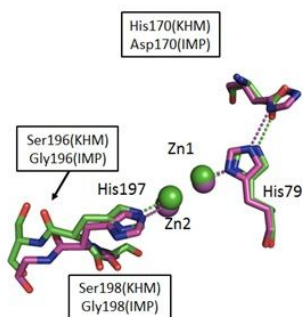


図4 KHM-1とIMP-1の活性中心近傍における結晶構造の比較において発見したアミノ酸変異箇所

そこでKHM-1(native)の170位にあるHisをAspに変異させた変異酵素(mutant)を調製して、nativeとmutantの速度論的パラメータによって、KHM-1のHis170の役割を検討した。nativeは、基質がアンピシリンのとき、触媒活性( $K_m/k_{cat}$ )が $1.9 \times 10^4 (M^{-1} \cdot s^{-1})$ 、セフォタキシム<sup>8</sup>のとき $1.7 \times 10^8 (M^{-1} \cdot s^{-1})$ であったが(J. Sekiguchi, *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2008)、mutantはそれぞれ、 $2.8 \times 10^4 (M^{-1} \cdot s^{-1})$ 、 $8.7 \times 10^5 (M^{-1} \cdot s^{-1})$ であった。このKHM-1のHis170をAspに置換した効果は、セフェム系を基質にした時に現

れ、速度論的パラメータ $K_m$ 値は変化せず、 $k_{cat}$ 値が低下したことであることが分かった。このことから、KHM-1のHis170は、基質認識よりも加水分解活性に影響を与えていることが分かった。

### (5) 本研究の総括

MBLは、ほとんどすべてのβ-ラクタム剤を加水分解するZn(II)含有酵素である。特に、活性中心に含まれるZn(II)イオンの個数の違い(1個か2個か)や、活性中心を形成するアミノ酸の変異によって、MBL阻害剤の開発が遅れている。本研究では、MBLであるKHM-1を研究対象として、KHM-1の高触媒化機構を、様々な物理化学的手法を用いて、アミノ酸相同性が高いIMP-1と比較することで解明することを目的とした。

KHM-1の結晶構造から、活性中心にあるZn(II)イオンは、1つは結合しているが、2つは結合していない可能性が示唆された。溶液中におけるKHM-1の活性中心のZn(II)イオンの個数について、今後検討したい。この検討結果によっては、KHM-1のセフェム系に対する高触媒化は、活性中心のZn(II)イオンの個数によって決まる可能性がある。

KHM-1の溶液構造は、X線小角散乱から推定した。KHM-1の慣性粒径はIMP-1より小さいことが分かった。これは結晶構造では、KHM-1とIMP-1ではほとんど二次構造に変化がなかったが、溶液構造ではKHM-1は、IMP-1よりコンパクトであることが分かった。この影響は、活性中心のZn(II)イオンの個数なのか、KHM-1にある特定の分子内結合なのか、今後検討する。

KHM-1の活性中心近傍には、IMP-1と比べて8カ所のアミノ酸変異があることを、結晶構造の比較から確認することができた。特にKHM-1のHis170は、Zn(II)リガンドであるHis79と水素結合しており、活性中心にあるZn(II)イオンに影響

を与えているように考えた。IMP-1 では 170 位は Asp であり、結晶構造では His79 と水素結合していたので、KHM-1 の His170 を Asp に変異させた。その結果、KHM-1 の H170D 変異体 (mutant) は、KHM-1 (native) と比べて、 $K_m$  値は変化しなかったが、 $k_{cat}$  値が基質によって 1/100 ~ 1/10 へと低下していることが分かった。今後は、IMP-1 の 170 位を Asp から His へ置換することで、IMP-1 変異体の  $k_{cat}$  値が上昇するか検討したい。

本研究は、MBL に対して結晶構造の情報を基盤に、X 線小角散乱による溶液構造と触媒活性に影響を与えそうなアミノ酸の特定を行うことができた。特に MBL の活性中心近傍にあるアミノ酸 (KHM-1 では His170) が、活性中心の Zn(II) イオンに化学的影響を与えている可能性が出てきた。この可能性は、MBL の触媒機構の解明だけでなく、Zn(II) 酵素の触媒亢進化へと繋がられる。

## 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 0 件)

[学会発表] (計 1 件)

伊東理生、安田健二、西並 隆、古賀涼子、藤田美歌子、切替照雄、山縣ゆり子、黒崎博雅、山口佳宏、「基質特異性向上の解明を目指したメタロ- $\beta$ -ラクタマーゼ KHM-1 の結晶構造解析と速度論的解析」、第 33 回日本薬学会九州支部大会、2016 年 12 月 3 日、鹿児島大学郡元キャンパス (鹿児島県・鹿児島市)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

山口研究室 (酵素機能化学)

<http://yamaguchi-labo.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

和知野 純一 (WACHINO, Jun-ichi)

名古屋大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号: 00535651

### (4) 研究協力者

切替 照雄 (KIRIKAE, Teruo)

藤田 美歌子 (FUJITA, Mikako)

清水 伸隆 (SHIMIZU, Nobutaka)

山縣 ゆり子 (YAMAGATA, Yuriko)

黒崎 博雅 (KUROSAKI, Hiromasa)