

2015A6554

BL44XU

IMP-6 メタロー β-ラクタマーゼの結晶構造解析

Crystallographic Analysis of IMP-6 Metallo-β-Lactamase

山本 惠三Keizo Yamamoto

奈良県立医科大学化学教室
Department of Chemistry, Nara Medical University

IMP-6 メタロー β-ラクタマーゼ (IMP: *imipenemase*、イミペネム分解酵素) は、IMP-1 から S196G のアミノ酸置換により生じた酵素である。IMP-1 ではイミペネム、メロペネムに対する活性が同程度であるのに対し、IMP-6 はメロペネムに対する活性が、イミペネムに対する活性の約 7 倍に増加する。本研究では、IMP-6 の基質特異性が変化した原因を探るために、X 線結晶構造解析を試みた。その結果、分解能は不十分ながら、基質との疎水性相互作用の変化が原因であることが示唆された。

キーワード： β-ラクタマーゼ、基質特異性、結晶構造解析

背景と研究目的：

β-ラクタム系抗菌薬は、その安全性や有用性から臨床の現場で最も頻繁に使用されている抗菌薬である。ところが、使用の拡大が選択圧となり、細菌の抗菌薬耐性の機序の高速な進化をもたらしている。その最も重要なメカニズムが β-ラクタマーゼの産生である。β-ラクタマーゼは β-ラクタム系抗菌薬の β-ラクタム環を加水分解し、不活化する酵素である。β-ラクタマーゼは A~D の 4 種類に分類される[1]。クラス A, C, D は活性中心にセリン残基を持つ酵素であるが、クラス B は活性中心に 1、あるいは 2 個の亜鉛イオンを有する金属酵素であり、メタロー β-ラクタマーゼ(MBLs)と称される。MBLs はペニシリン、第 1~第 4 世代セフェム、カルバペネムに対する加水分解活性を持ち、一般の β-ラクタマーゼ阻害剤に対する耐性を有し、遺伝子の平行移動を起こしやすいことから、特に臨床的な興味を持たれている[2]。MBLs は構造と、亜鉛イオンに対するリガンドのアミノ酸配列により、サブクラス B1, B2, B3 に分けられている[3]。

IMP-1 はサブクラス B1 に属し、1994 年に日本において *Serratia marcescens* と *Pseudomonas aeruginosa* による産生が初めて認められた酵素である[4]。以降、IMP 型 MBLs は 2018 年 2 月までに 71 種の亜種の DNA 配列が登録されている。IMP-1 はカルバペネム系抗菌薬の内、臨床でよく使用されるイミペネム ($k_{cat}/K_m=1.2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) とメロペネム ($k_{cat}/K_m=1.5 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$) に対してほぼ同等の加水分解活性を示す[4]。一方、2001 年に日本で発見された IMP-6 は IMP-1 の Ser196 が Gly に置換された酵素であり、イミペネムに対する k_{cat}/K_m が $0.61 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ であるのに対し、メロ

ペネムに対する k_{cat}/K_m が $4.2 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ と高く、メロペネムに対する加水分解活性が、イミペネムに対する活性の約 7 倍に増加している[5]。S196G のアミノ酸置換により、IMP-6 の構造が IMP-1 からどのように変化し、基質特異性が変化するのを探るために、IMP-6 を結晶化し、X 線結晶構造解析を試みた。

実験：

発現ベクター pET28a に IMP-6 遺伝子をクローニングし、大腸菌 BL21(DE3) を形質転換した株を用いて IMP-6 を高発現させた。培養した形質転換体を超音波破砕機を用いて破砕、遠心分離した上清を陽イオン交換カラムクロマトグラフィー (Macrorep High S Support (BIO-RAD)、及び CM-Toyopearl 650S (Tosoh)) に添加し、電気泳動的に単一にまで精製した。精製した IMP-6 の N 末端アミノ酸配列を決定したところ、報告されている IMP-6 のアミノ酸配列と一致した[5]。精製タンパク質を用いて市販の結晶化溶液キットを用いたスクリーニングを行った。最終的にハンギングドロップ法を用い、5 mM HEPES pH 7.3 中でタンパク質濃度 20 mg/mL の溶液と、結晶化母液として 0.13 M ammonium sulfate, 0.1 M MES pH 6.0, 24 % polyethylene glycol monomethyl ether 5000 を等量混合して 15°C で静置することにより、 $0.1 \times 0.1 \times 0.1 \text{ mm}$ の立方体状結晶を得た。

得られた結晶を 20 % PEG200 を含む結晶化母液に浸漬し、BL44XU において、100 K の窒素気流下、露光時間 0.5 秒、振動角 1° 、波長 0.9000 \AA 、カメラ長 400 mm で回折データを収集した。検出器は MAR300HE (Rayonix) を使用した。その結果、分解能 3.00 \AA までの回折データを収集した。得られた回折データは、プログラム HKL2000 で処理した。

IMP-6 の構造は、IMP-1 (PDB code: 1DD6) の構造を用い、CCP4 suite のプログラム Molrep を用いて分子置換法により求めた。得られた初期解を CCP4 suite のプログラム REFMAC 5.5 により、分解能 $50.00 - 3.00 \text{ \AA}$ の範囲で精密化した。

結果及び考察：

複数個の結晶について回折データの測定を行ったが、いずれも分解能 3.00 \AA を越える良好なデータは得られなかった。最もよいデータについての統計値を表 1 に示した。結晶の空間群は $P2_12_12_1$ 、格子定数は $a=49.09 \pm 0.01 \text{ \AA}$ 、 $b=78.55 \pm 0.01 \text{ \AA}$ 、 $c=261.51 \pm 0.01 \text{ \AA}$ であり、非対称単位中には 4 分子の IMP-6 が存在した。

表 1. 回折強度データ統計値

Resolution (\AA)	50.00–3.00 (3.05–3.00)
Observed reflections	152777 (7305)
Unique reflections	21905 (1790)
Average $I/\sigma(I)$	6.7 (2.2)
Completeness (%)	99.9 (100.0)
Redundancy	7.0 (7.0)
$R_{\text{merge}}^{\#}$ (%)	21.5 (75.4)

$$\#R_{\text{merge}} = \frac{\sum_{hkl} \sum_i |I(hkl)_i - \langle I(hkl) \rangle|}{\sum_{hkl} I(hkl)}$$

分子置換法により求めた電子密度図は、シグナル配列が除かれた、228 アミノ酸からなる成熟型 IMP-6 の内、Leu4-Glu219 の主鎖すべてと 8 割程度の側鎖について帰属が可能であった。しかしながら分解能が不十分であったため、活性中心に存在するはずの 2 原子の Zn^{2+} イオンと水分子は観測できなかった。また、 R_{work} / R_{free} は、0.249/0.369 までしか精密化できなかった。

図 1 に IMP-1 (1DD6) と IMP-6 の主鎖の構造を重ね合わせた図を示した。両者の構造は非常に似通っており、主鎖全体の RMSD は 0.430 Å であった。アミノ酸配列において、IMP-1 と IMP-6 が異なるのは Gly196 (IMP-6) のみである。この位置は、活性中心を構成する 2 原子の亜鉛イオンのうち、 $Zn2$ に配位している His197 の N 末側にある。このアミノ酸残基の $C\alpha$ における変位は僅かに 0.27 Å であった。ところが、アミノ酸置換が生じた部位と反対側の N 末端ドメインにおいて、 β -sheet2 の C 末端部分に続く loop1 領域 (His37-Pro50) では最大 1.39 Å

(Glu41)、また Phe69 でも 1.00 Å の変位が観測された。前者は疎水性相互作用により基質と相互作用する領域、後者は基質と相互作用する疎水性ポケットを形成するアミノ酸残基の 1 つとして知られている [6, 7]。従って、IMP-6 におけるメロペネムに対する活性の上昇は、Ser196→Gly のアミノ酸置換による、基質との疎水性相互作用の変化によるものであることが示唆された。また、アミノ酸置換の位置と、構造が大きく変化した位置が異なることから、IMP 型メタロー β -ラクタマーゼは潜在的な構造の柔軟性があり、僅かなアミノ酸置換が導入されることによって構造が変化し、活性に影響を与えることが予想された。

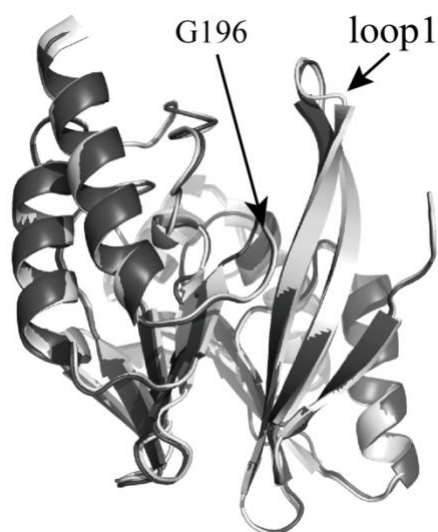


図 1. IMP-1 (dark gray) と IMP-6 (pale gray) の構造比較

今後の課題：

IMP-6 の構造を原子レベルで解析するためには、より分解能が高く、良好な回折データを収集する必要がある。しかしながら、実験期間中には良好な結晶を得ることができなかった上、結晶化の再現ができなくなった。従って、一旦構造解析を中断し、結晶化条件の再検索から実験をやり直すこととした。

参考文献：

- [1] R. P. Amber, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.*, **289**, 321-331 (1980).
- [2] N. Laraki et al., *Antimicrob Agents Chemother.*, **43**, 902-906 (1999).
- [3] M. Galleni et al., *Antimicrob Agents Chemother.*, **45**, 660-663 (2001).
- [4] E. Osano et al., *Antimicrob Agents Chemother.*, **38**, 71-78 (1994).
- [5] H. Yano et al., *Antimicrob Agents Chemother.*, **45**, 1343-1348 (2001).
- [6] N. O. Concha et al., *Biochemistry*, **39**, 4288-4298 (2000).
- [7] Y. Yamaguchi et al., *Biol. Pharm. Bull.*, **38**, 96-101 (2015).

©JASRI

(Received: March 23, 2018; Early edition: June 22, 2018;
Accepted: July 3, 2018; Published: August 16, 2018)