
高感度酸素絶対測定による組織や細菌の薬剤
感受性検査法の開発

(課題番号 15590485)

平成15年度～平成16年度科学研究費補助金
(基盤研究(C)(2)) 研究成果報告書

平成17年6月

研究代表者 石田哲夫
(滋賀医科大学・医学部・助教授)



2004011538

1. 課題番号 15590485

2. 研究課題 高感度酸素絶対測定による組織や細菌の薬剤感受性検査法の開発

3. 研究組織

研究代表者：石田哲夫 (滋賀医科大学・医学部・助教授)

研究分担者：田中裕之 (滋賀医科大学・医学部・助手)

4. 交付決定額 (配分額)

(金額単位：千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 15 年度	2,200	0	2,200
平成 16 年度	1,400	0	1,400
総計	3,600	0	3,600

5. 研究発表

(1) 学会誌等

- Ishida, T., Tanaka, H., and Horiike, K. Quantitative structure-activity relationship for the cleavage of C3/C4-substituted catechols by aprototypal extradiol catechol dioxygenase with broad substrate specificity. *J. Biochem.* 135, 721-730 (2004)
- 石田哲夫. 非ヘム 2 価鉄イオン単核錯体を利用する酵素群 (2-His-1-carboxylate 酵素の O₂ を利用した多彩な反応) *化学と生物* 42 巻 (2004)

(2) 口頭発表

- 石田哲夫、田中裕之、堀池喜八郎
Substituent effects on the binding of phenols and catechols to catechol 2,3-dioxygenase
第 76 回日本生化学会 平成 15 年 10 月 17 日
- 堀池喜八郎、石田哲夫、田中裕之
Molecular basis of substrate specificities and a common reaction mechanism of extradiol dioxygenase
第 76 回日本生化学会 平成 15 年 10 月 17 日

3. 田中裕之、山本篤、石田哲夫、田中裕之
Distribution of D-amino-acid oxidase activity and D-serine metabolism in rat brain
第 76 回日本生化学会 平成 15 年 10 月 16 日
4. 山本篤、田中裕之、石田哲夫、松田昌之、堀池喜八郎
Distribution of D-asparatate oxidase activity in rat and hog brains
第 76 回日本生化学会 平成 15 年 10 月 17 日
5. 石田哲夫、田中裕之、山本篤、堀池喜八郎
Frontal-gel-chromatographic analysis of protein-ligand interaction
第 77 回日本生化学会 平成 16 年 10 月 14 日
6. 堀池喜八郎、石田哲夫、田中裕之、山本篤
Substrate recognition mechanism of catechol 2,3-dioxygenase
第 77 回日本生化学会 平成 16 年 10 月 14 日

6. 研究成果

6.1. 研究目的

本研究では、(1) 反応系の酸素濃度を自由に変える方法と (2) 反応系の酸素消費速度を高感度かつ連続的に絶対測定する方法とを確立し、この両者に基づいて、組織や細菌の薬物感受性を様々な酸素濃度条件下での酸素消費速度から検査する方法を開発することを目指した。

本研究の基礎は、カテコール 2,3-ジオキシゲナーゼ (Mpc) とその基質の一つである 4-クロロカテコール (4-CC) とからなる我々が見つけた酸素濃度絶対測定系である (J. Biochem. 131, 523-531 (2002))。Mpc の 4-CC に対する反応速度定数は、 k_{cat} 値が 211 s^{-1} 、基質に対する K_M 値が $1.0 \text{ }\mu\text{M}$ 、酸素分子に対する K_M 値が $16 \text{ }\mu\text{M}$ であり、これらの値は、 μM レベル未満の低酸素領域においても、4-CC が酸素濃度より過剰に存在しさえすれば、すべての溶存酸素分子が等量の生成物 5-クロロ-2-ヒドロキシムコン酸セミアルデヒド (CHMSA) に取り込まれるまで、比較的少量の Mpc の触媒作用で迅速に進むことを保証している。また、他のカテコール基質からの生成物が、容易に異性化してすぐに退色していくのに対し、CHMSA は、極めて異性化しにくく、長期間 (何日間も) 安定である。本研究では、Mpc-CHMSA 系のこれらの特性を生かして、測定系の開発を進めた。

6.2. 酸素濃度ゼロ緩衝液の供給システム

酸素濃度ゼロの緩衝液を必要なときに即座に調製することは、応用範囲も広い基礎技術であり、緩衝液の酸素濃度を任意にコントロールするために必要な技術でもある。本研究で以下の方法を確立した。本方法は、特別な装置を必要とせず、汎用性が高い。

(方法)

① 緩衝液への 4-CC の添加

空気飽和の状態にある目的の緩衝液 (25°C) に、4-CC を最終濃度が 2~5 mM になるように加える。

② シリンジへの緩衝液の充填

緩衝液をできるだけ密閉性の高いシリンジ (50 ml かそれ以上の容量のポリプロピレン製ディスポシリンジでも可) に吸い取り、気泡を追い出した後、高濃度 Mpc 保存液 (mM レベルの酵素濃度) 約 10 μ L をシリンジ出口から加える。

③ トラップカラムの接続

未反応の 4-CC と酸素分子を取り込んだ生成物 CHMSA を吸着除去するカラムをシリンジに接続する。トラップカラムは、逆相系樹脂と強アニオン交換樹脂を 5 × 50 mm のカラムにこの順で充填して手作りする。例えば、Cosmosil 75C18-PREP を約 300 μ L と Super Q Toyopearl 約 700 μ L を充填する。

④ 反応系への酸素ゼロ緩衝液の送液

正確な流量で送液する必要がある場合は、シリンジポンプを使用する。流速の精度を要しない場合は、手でシリンジを押して送液する。

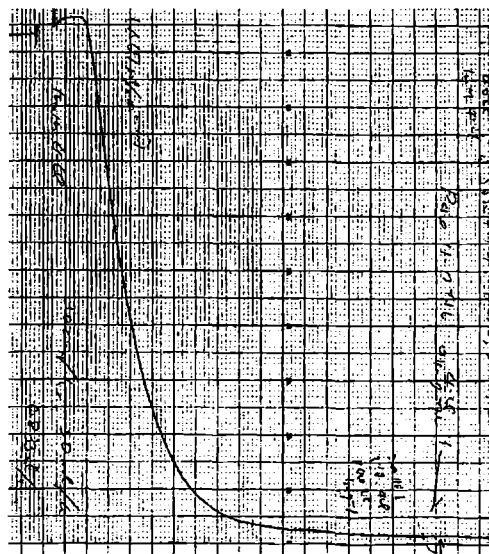
(本方法の特徴)

- ・アルゴンガスボンベや真空ラインなど、特別な装備を必要としない。
- ・酸素ゼロを迅速に達成できる。(シリンジ内の緩衝液は、Mpc を加えて数秒以内にゼロになる。
- ・長時間持続して酸素ゼロ緩衝液を供給できる。(シリンジ内に大気から流入する酸素分子は、瞬時に Mpc-CHMSA 系で消去されたため)

実際に酸素濃度ゼロの緩衝液が供給できていることを、酸素電極を用いて確認した結果を図 1 に示す。酸素電極を装着した容量 2.0 mL の反応槽に 0.83 mL/min の流速で 50 ml ディスポシリンジから送液した。

本方法で酸素ゼロの生理食塩水をカテーテルから送液することで、酸素要求性の高い組織や細胞のみに選択的にダメージを与えることも可能である。

[O₂] = 250 μM



[O₂] = 0 μM

図 1

6. 3. Mpc 固定化カラムの作成

還流反応系の酸素濃度を連続測定するためには、反応系からの流出液の酸素濃度を測定する必要がある。そのためには、流出液に酸素濃度ゼロの 4-CC 液を混合してから Mpc 固定化カラムを通過させ、生じた CHMSA の量を HPLC 用のモニターで測定すればよい。この方法を実現するためには、高い酵素活性を安定して示す耐圧性のある Mpc 固定化ゲルが必要である。

一般に Mpc のように非ヘム 2 価鉄イオンを活性部位に必要とする酵素は、空気飽和の条件下では時間が経つにつれて失活する。そこで、本研究では、2-ヒドロキシピリジン N-オキシド (2-HPNO) が Mpc の強結合拮抗阻害剤 ($K_d = 160 \text{ nM}$) であることを見出し、2-HPNO を安定化剤として用いることで、目的とする Mpc 固定化ゲルを作成することに成功した。

(作成方法)

遠心管 (15 mL 容量) の中で、100 mg の Mpc と 700 mg (乾燥ゲルの重量) の tresyl Toyopearl とを、200 μM の 2-HPNO を含む 1 M リン酸カリウム緩衝液 (pH 8) 7 mL 中で 4 時間、遠心管をゆっくり反転回転させながら室温で反応させる。

この方法で、ゲル 1 mL 当たり約 15 mg の Mpc を結合した Mpc 固定化ゲルが得られた。Mpc 固定化ゲルの活性は、200 μM の 2-HPNO を含む緩衝液中 4°C で保存することで、4 ヶ月以上経過しても、安定に保持される。

Mpc 固定化ゲルを内径 1.0 mm、長さ 3 cm のピーク製チューブに充填し (ゲル容量約 20 μL)、その活性を評価した結果を図 2 に示す。

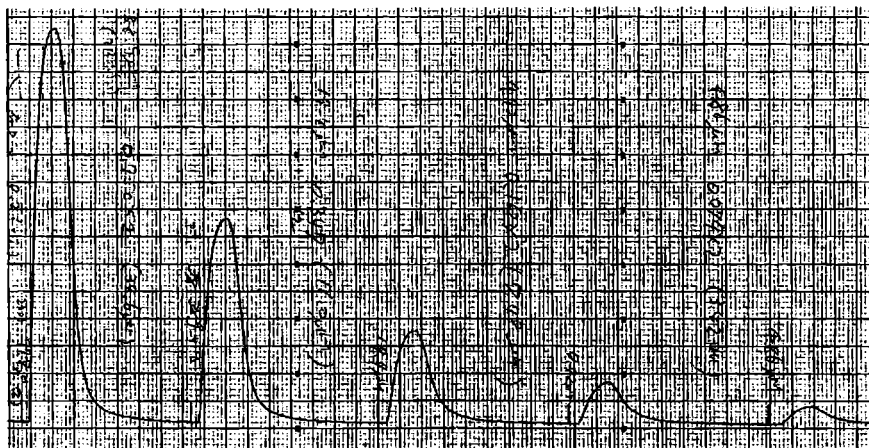




図 4

特に図 4 の実験は、本研究の目的である酸素濃度制御下での酸素消費速度の連続測定装置のプロトタイプでもある。任意の酸素濃度を作り出して供給できることが分かったので、今後、実際のサンプルでの測定を実現するためには、酸素の透過に対する密閉性の高い専用の還流型反応装置を開発する必要がある。

6.5. 世界初の 100 μL スケールの frontal gel chromatography の実現

専用の還流型反応装置を開発する試みの中で、100 μL スケールのサンプル量で frontal gel chromatography を行なうことに成功した。ポストゲノム時代のタンパク質の機能解析において、タンパク質-リガンド相互作用の解析は重要な位置を占めている。frontal gel chromatography は、タンパク質-リガンド混合液中の遊離リガンド濃度を直接正確に測定できる比類のない方法で、これにより、結合曲線を直接求めることが可能である。結合曲線から、タンパク質-リガンド相互作用の化学量論と関係する結合定数を決定することができる。これは、カロリーメトリーや固定化レセプターに生じる質量変化を検出する各種の方法（表面プラズモンを利用するピアコア装置など）では不可能なことである。

我々は、frontal gel chromatography のマイクロ化に一貫して取り組んできたが (J. Biochem. 122, 258–263; ibid. 129, 899–907; 第 77 回日本生化学会ポスター発表)、確実にフロントルパターンを得るためには、なお 500 μL 程度のサンプルが必要であった。今回、本研究の中で、通常セミマイクロ対応 HPLC 装置を利用して、約 100 μL のサンプルで frontal gel chromatography を行なう方法を確立した。

(方法)

① 分析に用いるカラム

HPLC 用のゲルろ過用ゲル(排除限界分子量が 10 万未満のもの、本研究では TSKgel G2000SW を使用) を内径 1.0 mm、長さ 50–150 mm のカラムに充填する。

② サンプルの導入

内径 0.25 mm、長さ 5 cm のピークチューブ (容量 250 μ L) をサンプルループに使用し、試料の後端がサンプルループ内に留まっている間にサンプルループを流路から切り離す。

③ 検出方法

セル容積が 5 μ L のセミマイクロ用 UV-Vis 検出器を使用するため、カラムからの溶出液に T ジョイントを用いて蒸留水を 0.1 mL/min の流速で混合してから検出器に導入する。(マイクロ専用検出器の光路長は短いので、通常の見出器をこのように用いても専用装置と同等の感度が得られる)

④ 送液方法

数 μ L/min ~ 数十 μ L/min の流量範囲で正確な送液ができるポンプで、脈圧の少ないものを使用する(検出時に脈圧によるノイズが入るので)。高圧対応のシリンジポンプが最適。

以下に、1.0 mm \times 150 mm の TSKgel G2000SW を用いて得られた典型的なクロマトグラムを示す。



図 5 ヒト血清アルブミン-ワーファリン混合液 (234 μ L)

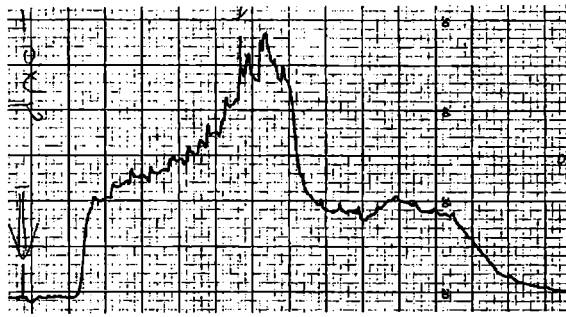


図6 Mpc-o-ニトロフェノール混合液 (234 μL)

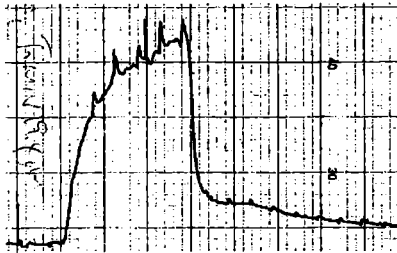


図7 卵白リボフラビン結合タンパク質-FMN 混合液 (231 μL)



図8 卵白リボフラビン結合タンパク質 M (231 μL)

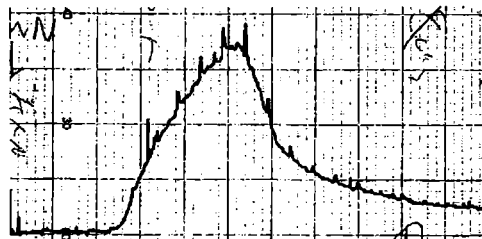


図9 FMN (231 μL)

図7の結果からも分かるように、タンパク質との結合が強い場合には、リガンドは単独で分析したときよりも早く溶出する。従って、クロマトグラムの前端を利用すれば、相互作用の強弱をより少ないサンプルで評価することができる。また、流速が10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 程度なので、質量分析器を直結して、リガンドの溶出を検出することも可能である。

6.6. Mpc-2-ヒドロキシピリジン N-オキシド (2-HPNO) 複合体の結晶化と結晶構造解析

Mpc-アセトン複合体の結晶構造解析 (Structure 7, 25-34 (1999)) を成功させた後、この結晶に基質など他のリガンドを入れようとするとう結晶が壊れるなどのため、構造の精密化や活性部位の詳細な解明は進められなかった。しかし、本研究で Mpc カラムを作成する中で、以下の新たな結晶化条件を見つけた。

(方法)

- ① hanging drop 法を使用する。Drop の量は 10 μL 、リザーバ緩衝液は 1.0 mL。
- ② Mpc 濃度：10 mg/ml
- ③ 沈殿剤：1.8-1.9 M 硫酸アンモニウム
- ④ 緩衝液：0.1 M Tris-HCl、pH 8.0、0.5 M NaCl
- ⑤ 緩衝液と試料の両者に 0.2 mM の 2-HPNO を加える。
- ⑥ 20°C で静置する。

以上の方法で、3~4日で、0.2~0.4 mm の大きさの柱状結晶が得られた。現在京都大学の喜田昭子先生のご協力で、この結晶の構造解析が進行中である。以下に予備的な結果を示す。

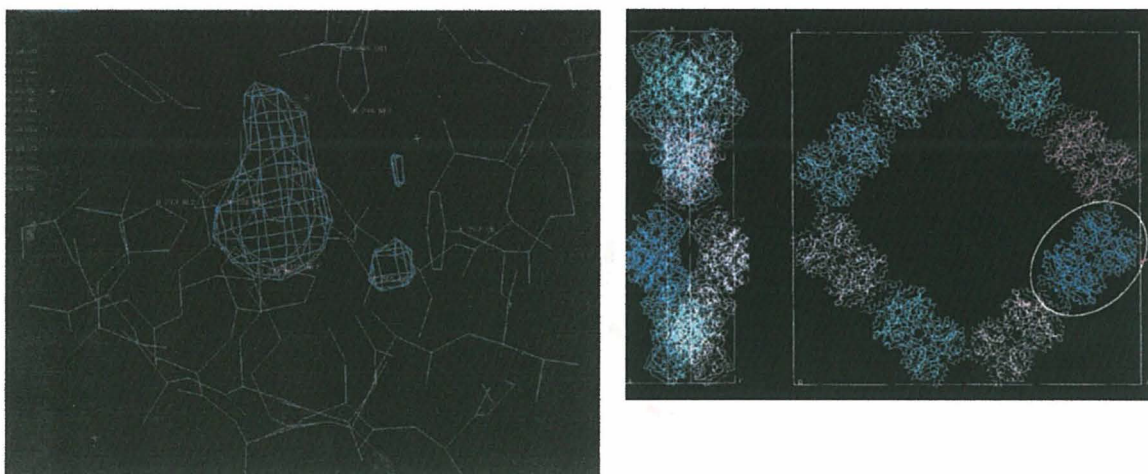


図10 Mpc-2-HPNO 複合体の構造

図10の右図から分かるように、この結晶は、単位格子の中心部を大量の水が占め、酵素は辺縁に位置する特異なもので、そのため構造の精密化が困難である。左図に示すように2-HPNOと思われる電子密度が明らかに認められるが、精密な原始座標の決定にはなお工夫を要する段階である。

6. 7. Mpc と 28% のアミノ酸配列相同性を示す *Thermus Thermophilus* HB8 由来遺伝子 (T1521) がホモプロトカテク酸 2,3-ジオキシゲナーゼ (HPCD) をコードすることの証明と発現タンパク質の機能解析

Mpc は、60°C ではすぐに白濁して変成・失活する。そこで、京都大学の前河友紀らとの共同研究で、ゲノム解析された好熱菌 *T. Thermophilus* HB8 由来遺伝子 T1521 を大腸菌で発現させたタンパク質の機能解析を行なった。

表1に、本酵素の基質特異性を示す。

表1

Substrate	K_{mA} (μM)	K_{mO_2} (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_{mA} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	k_{cat}/K_{mO_2} ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)
homoprotocatechuate	7.71	15.4	0.46	6.0×10^4	3.0×10^4
catechol	3430	387	1.8	5.3×10^2	4.7×10^3
4-chlorocatechol	368	637	0.57	1.5×10^3	8.8×10^2

また、図11に本酵素の活性部位の構造を示す。

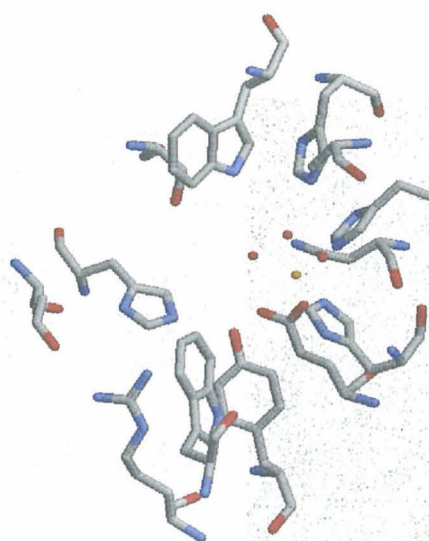


図11 T1521の活性部位の構造

この構造が決定された後、*Brevibacterium fuscum* 由来ホモプロトカテク酸 2,3-ジオキシゲナーゼの結晶構造が報告された。T1521 の活性部位の構造は、Mpc の活性部位よりもこの HPCD のものに酷似していた。

以上の機能解析と構造の両面から、T1521 が HPCD であることが結論できた。本酵素は、90℃で約 1 時間インキュベーションしても失活しない。また、約 60℃で、最大活性を示す。さらに、空気飽和の緩衝液中に長期間放置してもほとんど失活しないだけでなく、過酸化水素に暴露しても活性を保持する (Mpc は瞬時に失活する)。この酸化に対する 2 価鉄イオン中心の安定性は、T1521 の酸素結合部位が Mpc よりもかなり親水性であることと関連していると予想され、現在実験的な証明を進めている。

なお、T1521 は Mpc よりも触媒能がかなり低いいため、少なくとも通常温度領域では Mpc-4-CC の代わりとしては使用できない。

7. 今後の展開

本研究で、酸素濃度の制御と絶対測定に必要な基礎的方法を確立できた。しかし、これらを現実の試料に応用するためには、酸素分子に対して完全遮蔽された還流型反応装置を作成する必要がある。マイクロ流路をビルトインした装置の開発が他の分野でも進められているが、本研究の成果は、これらのマイクロ流路に組み込んで利用することも原理的に可能であり、そのためにも本研究の送液系のマイクロ化と大気中酸素分子からの遮蔽の方法の開発が必要である。

最後に、今回の研究補助金の交付に対し、深く感謝します。