

## 臨床分離大腸菌からの $\beta$ -lactamase の精製ならびに その性質に関する研究

山中頼子・田島政三・中沢昭三

京都薬科大学微生物学教室

(昭和 48 年 2 月 26 日受付)

### I. 緒 言

$\beta$ -lactamase は現在までに多くの細菌について見いだされ精製がなされてきた<sup>1-7)</sup>。その中でグラム陰性菌のもので R 因子により遺伝的に支配されるものとしては、1966 年 DATTA と RICHMOND<sup>8)</sup> により *E. coli* strain TEM から精製されたのを始めとして、1969 年に YAMAGISHI ら<sup>9)</sup> により *E. coli* から、また 1970 年に LINDQUIST と NORDSTROM<sup>10)</sup> により *E. coli* から、さらに、また NEU と WINSHELL<sup>11)</sup> によつて *S. typhimurium* と *E. coli* から精製がなされてきた。*Staphylococcus* や *Bacillus* 属の  $\beta$ -lactamase が Cephalosporin 系のものをほとんど基質と出来ないのにくらべこれら R 因子の  $\beta$ -lactamase の多くは Penicillinase (PCase) 作用と同時に Cephalosporinase (CSase) 作用をも有している。今回我々が *E. coli* strain No. 24 から単離精製した  $\beta$ -lactamase は R 因子性のものであり、PCase, CSase 両作用を有する。この両作用を有する  $\beta$ -lactamase が PCase と CSase として分離し得るのか、または両活性を有する単一酵素によるのかを明らかにする目的で単離、精製を行ない、その性質を検討した。

### II. 材料および方法

#### 1. 実験材料

##### 1) 使用菌株

臨床分離 *E. coli* strain No. 24 を用いた。この菌株は R 因子を有し、Penicillin, Cephalosporin 系薬剤および Tetracycline, Chloramphenicol, Streptomycin, Sulfamethoxazole に耐性を示しているが、Kanamycin には耐性を示していない。

##### 2) 培地および培養条件

菌の培養は Nutrient broth に 0.2% glucose を添加したものを使用した。培養温度は 37°C、通常の培養は、接種菌量として前培養菌液を 10% の割に加え、2 L の振盪フラスコで 12 時間振盪培養を行なった。大量培養の場合は、18 時間前培養菌液を 10% の割に接種し、100 L タンクでタンク培養 20 時間行なった。菌体は遠心により集め、0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) で洗浄後使用した。

##### 3) 使用薬剤

Penicillin 系薬剤は明治製菓から、Cephalosporin 系薬剤は塩野義製薬から分与された力価の明らかなものを使用した。

##### 4) その他の材料

Lysozyme (M. W. 14,600) は日本新薬から分与されたもの、Pepsin (M. W. 35,500) は Difco のものを使用した。カラムクロマト材料として、DEAE-Cellulose powder (Capacity 1.03 mEq/g) Brown Co. および Sephadex G-100, G-75 (40~120  $\mu$ ) Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden を使用した。

### 2. 実験方法

#### 1) 酵素活性測定

Bioassay の場合は、被検菌として *B. subtilis* PCI-219 を用いる cup 法で、4 mcg の基質を 37°C、1 時間に 50% 不活化する量を 1 unit とした。Chemical assay は PERRET の方法<sup>12)</sup> に従がい、iodometric assay method で行なった。この場合 0.1 M phosphate buffer (pH 7.2) 中 37°C 1 時間で 1  $\mu$ mole の Penicillin G (PC-G) を Penicilloic acid に分解する酵素活性を 1 unit とした。Kinetics は NOVIK の microiodometric assay method<sup>13)</sup> を使用した。

#### 2) 蛋白量の測定

カラムクロマト溶出液中の蛋白量は、280 m $\mu$  での O. D. を測定して表わした。蛋白の定量は bovine serum albumin 水溶液を標準として LOWRY ら<sup>14)</sup> の方法で求めた。

#### 3) 抗血清の調整

FREUND の incomplete adjuvant を用い粗酵素を家兎に免疫して得られた抗血清で酵素分画の純度、活性の阻害等を調べた。

### III. 実験結果

#### 1. 精製過程

Table 1 に示す順序に従がつて精製を行なった。

Stage 1 乾燥菌体 50 mg/ml の濃度の 0.1 M phosphate buffer 懸濁液を 0°C 下音波処理 (20 KC, 15 分) を行ない、この破碎菌液を遠心 (19,500 $\times$ g 20 分) し、

Table 1. Summary of purification of  $\beta$ -lactamase from *E. coli* No. 24

Stage	Procedure	Total activity (units)	Specific activity (units/mg protein)	Recovery (%)	No. of times purification
1	Ultrasonic disintegration	13,985,000	N. T.	—	—
2	Precipitate on 80% sat. with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	14,364,000	1,174.96	100	1
3	Streptomycin treatment	10,657,500	2,956.56	74.20	2.52
4	Sephadex G-100	9,549,600	38,556.20	66.48	32.81
5	Sephadex G-100 repeated	9,205,500	67,119.94	64.09	57.12
6	Chromatography on DEAE-cellulose	6,566,300	412,974.84	45.71	351.48
7	Starch zone electrophoresis	5,341,000	940,316.90	37.18	800.29
8	Sephadex G-75	5,003,300	979,119.37	34.83	833.31

その上清を得る。

Stage 2 この上清を硫酸で 80% 飽和溶液とし、生じた沈殿を遠心分離(19,500×g 20分)により集め、4°C 下蒸留水、次に 0.0016 M phosphate buffer (pH 7.2) 中で脱塩透析を行なった。

Stage 3 透析内液を 0.0016 M phosphate buffer を用い蛋白量 10 mg/ml に調整し、0°C 下 0.5 mg/mg protein 量の Streptomycin<sup>15)</sup> を加え、含まれている核酸を除いた。

Stage 4,5 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) で平衡化した Sephadex G-100 カラムを用いゲル濾過を 2 回行なう。この段階で大部分の活性を有しない蛋白が除かれた。

Stage 6 0.01 M phosphate buffer (pH 7.2) で平衡化した DEAE-Cellulose カラムを用い、0.01 M, 0.05 M, 0.1 M の phosphate buffer, 最後に 0.1 M phosphate buffer + 0.1 M NaCl で stepwise に溶出した結果、活性は 0.05 M phosphate buffer ですべて溶出されてきた。

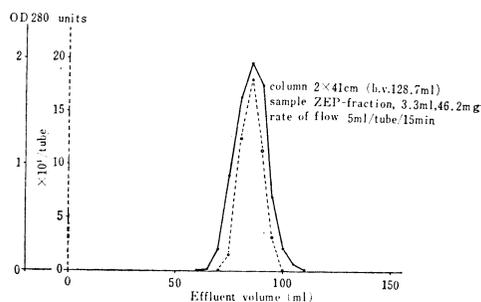
Stage 7 Stage 6 で得られた活性分画を veronal buffer (pH 8.0,  $\mu=0.05$ ) を用いて、ゾーン電気泳動を行なった。3×1.5×40 cm のトレイで 10 mA, 24 時間泳動した時、蛋白質のピークは原点からプラス側に 2 つのピークになるが、活性部分は前者のピークとほぼ一致した。

Stage 8 この段階で得られた溶出パターンを Fig.1 に示す。蛋白のピークと活性のピークは完全に一致した。以上のようにして得られた精製酵素は免疫電気泳動法において 1 本の沈降弓となり、活性と一致した。

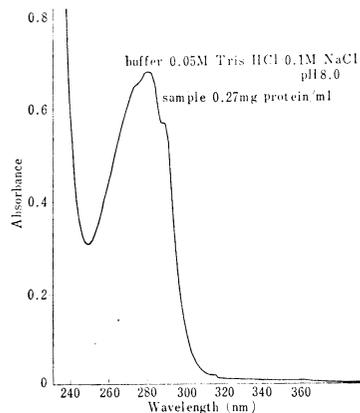
## 2. 精製酵素の諸性質

1) 分子量の測定 Sephadex G-75 を用い ANDREUS ら<sup>16)</sup> の方法で測定した。Buffer は 0.05 M Tris-HCl (pH 8.0) を用い、分子量既知の試料として pepsin (M.

Fig. 1 Gel filtration on Sephadex G-75



Sephadex G-75 column equilibrated against 0.05 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) was used. Each fraction was assayed for protein (●—●) and enzyme activity (○---○).

Fig. 2 Ultraviolet spectrum of  $\beta$ -lactamase from *E. coli* No. 24

The enzyme, 0.27 mg/ml was dialyzed against 0.01 M phosphate buffer, pH 7.2.

W 35,500) 20 mg/ml, Lysozyme (M. W. 14,600) 4 mg/ml を用いた。この測定結果、分子量は約 23,800

であつた。

2) 等電点 寒天ゲル電気泳動法により等電点 4.7 の bovine serum albumin を対照として測定した結果、等電点は 5.3 であつた。

3) UV スペクトラム 精製酵素の UV スペクトラムは pH 7.2 において 280 m $\mu$  に吸収極大を持ち、290 m $\mu$  に small shoulder を持つ。0.01 M phosphate buffer 中 1% 酵素溶液の 280 m $\mu$  での extinction coefficient は 25.4 である。

4) 酵素学的性質 PCG を基質とした時の至適 pH は 6.2~7.2 であつた。至適温度は 37°C 付近である。熱安定性に関して 80°C 10 分で完全に失活するが、60°C においては 20 分で約 20% の失活しか見られず熱に対してかなり安定である。各種阻害剤 EDTA (ethylenediaminetetra acetic acid), PCMB (p-chloromercuribenzoate), Iodoacetate, Urea は各 1.0 mM の濃度ではまったく活性に影響を与えなかつた。また陽イオン (Cu<sup>++</sup>, NH<sub>4</sub><sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>, Zn<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup>) および陰イオン (Cl<sup>-</sup>, HPO<sub>4</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>-</sup>, CH<sub>3</sub>COO<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>) は共に 1.0 mM の濃度でまったく活性に影響が見られなかつた。しかし Iodine は 0.5 mM で 50% 阻害を示した。EDTA, PCMB で阻害を受けず、Iodine で阻害を受ける点は、YAMAGISHI ら<sup>9)</sup> の RGN 14 の PCase その他の R 因子による PCase と同様の性質である。

5) 精製酵素の Kinetics 精製酵素の 5 種の Penicillin 系薬剤および Cephaloridine (CER) に対する Km 値, Ki 値, V<sub>max</sub> 値を Table 2 に示す。これらの値もまた DATTA ら<sup>8)</sup> の RTEM, RGN 14<sup>9)</sup>, LINDQUIST ら<sup>10)</sup> の RI の PCase とよく似た傾向を示している。

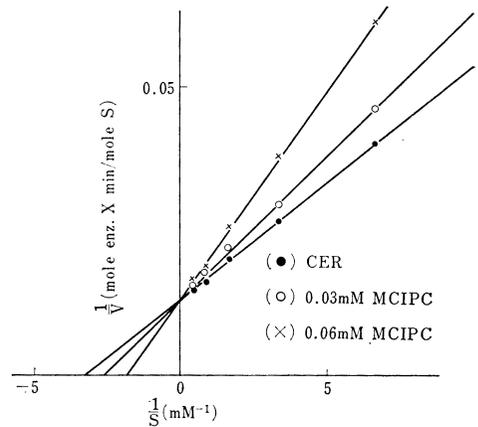
Fig. 3 は CER を基質とした時の Cloxacillin (MCI-PC) の Ki 値を求めた結果を示している。この場合 Ki 値は 80  $\mu$ M であり、また基質を PCG にした場合の MCI-

Table 2. Kinetics of hydrolysis of various penicillins and cephaloridine by purified  $\beta$ -lactamase

Substrate	V <sub>max</sub>	K <sub>m</sub> ( $\mu$ M)
Benzylpenicillin	$1.42 \times 10^4$	42
Ampicillin	$1.24 \times 10^4$	71
Phenethicillin	$2.2 \times 10^3$	38
6-Aminopenicillanic acid	$0.8 \times 10^4$	313
Cephaloridine	$3.7 \times 10^3$	300
Cloxacillin	—	Ki 40

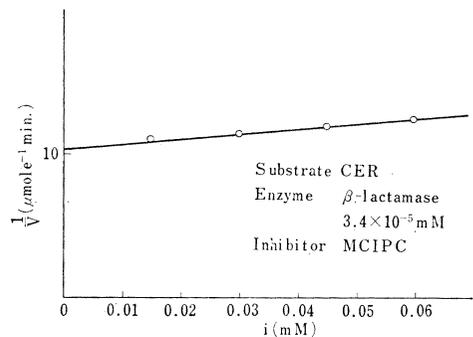
V<sub>max</sub> values are expressed as moles of substrate hydrolysed/mole of enzyme min. at 30°C and pH 7.2. Incubation was performed at 30°C. The amount of product was determined at room temperature by using NOVIK'S method.

Fig. 3 Inhibition of  $\beta$ -lactamase by cloxacillin



$s$  is the concentration of cephaloridine.  
Symbols: (•) Cephaloridine, (×) Cloxacillin 0.06 mM, (○) Cloxacillin 0.03 mM

Fig. 4 Stoichiometry of substrate and inhibitor



$i$  is in mM concentration of cloxacillin. Concentration of cephaloridine is 0.6 mM.

Symbols: — theoretical curve.

• :  $1/v$  values at each concentration

PC の Ki 値は 40  $\mu$ M であつた。その阻害型式は共に拮抗型阻害である。

阻害剤に MCI-PC を用いて基質 CER との Stoichiometry の実験結果を Fig. 4 に示す。阻害剤の各濃度と  $1/v$  値は、良い直線性を示し、阻害型式およびその阻害定数  $K_i$  が、この阻害剤の濃度範囲において変化しないとして得られる理論直線 (実線) によく一致している。このことは阻害剤がこの濃度範囲内では拮抗型阻害であり、 $K_i$  値も変わらず、1 分子の基質には 1 分子の阻害剤が関与していることがわかる。基質を PCG とした場合にも同様の結果が得られた。このことから PCG, CER, MCI-PC の活性部位が同一であることが示唆される。

#### IV. 考察ならびに結論

1. 酵素の存在部位 細胞表面近くに結合している酵

素は, Osmotic shock 法または Lysozyme-EDTA 処理で放出されてくることが知られている<sup>17,18)</sup>。この *E. coli* strain No. 24 の  $\beta$ -lactamase 活性は培養濾液中にはほとんど放出されず, Lysozyme-EDTA 処理でスフェロプラスト形成により, ほとんどすべての活性が遊離されてくる。従がつてこの  $\beta$ -lactamase は R 因子の  $\beta$ -lactamase が大部分そうであるように surface enzyme であることがわかる。

2. 他の  $\beta$ -lactamase との比較 我々が精製した酵素は分子量 23,800 と推定され, DATTA らの RTEM の PCase が 16,700, YAMAGISHI らの RGN 14 の PCase が 20,600 であるのにくらべ少し大きい値を示すが, LINDQUIST らの RI の PCase (M. W. 22,000) とよく似た分子量を示している。ただし, 測定法が異なるものもあるのではつきりしたことは言えない。等電点は 5.3 の酸性蛋白であり, RGN 14 の PCase の等電点とひじょうによく似ている。至適 pH は 6.2~7.2 にあり, ゆるやかなカーブを示す。これは, RTEM の PCase, RGN 14 の PCase と類似している。阻害剤に対する挙動において, EDTA, PCMB で影響を受けず, Iodine で阻害を受ける点等は, 今まで報告されている R 因子による  $\beta$ -lactamase と同様の傾向を示している。RGN 238<sup>9)</sup> の PCase は  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{NO}_2^-$  の陰イオンで強い阻害を受け, RGN 14, RGN 238 の PCase はまた  $\text{Cu}^{2+}$  でも阻害を受けるが, 我々の精製した酵素は, これらイオンによつて影響は見られなかった。基質特異性に関して RGN 14 の PCase, RI の PCase, また RTEM の PCase と同様の傾向を示している。ただし Km 値に関しては, RTEM の PCase にくらべ PCG, Aminobenzylpenicillin (AB-PC) に対する値はかなり高くなつている。また RGN 238, DALE<sup>20)</sup> による R-1818 の  $\beta$ -lactamase と異なり, この酵素は MCI-PC をほとんど不活化しない。精製酵素の UV スペクトラムは LINDSTRÖM ら<sup>19)</sup> の ampA を

持つ *E. coli* の PCase のそれとひじょうによく類似している。

3. PCase, CSase の異同 我々が精製した酵素は PCase と CSase の両作用を有しているが, その異同に関して以上得られた実験結果から, 次のようなことが言える。

i) 臨床分離 *E. coli* strain No. 24 はその基質特異性において PCase, CSase 両作用を持つものである。この  $\beta$ -lactamase の精製過程における両作用の相対活性比を Table 3 に示す。

精製過程において, 両基質に対する活性比に変化は認められず常にはば一定の値を示していた。このことは PCase, CSase という 2 種の別々の酵素が共存するのではなく単一酵素が両作用を有することを示している。

ii) MCI-PC による阻害実験結果から PCG, CER 両基質は共に MCI-PC によりまったく同様な拮抗阻害を受ける。これらのことから, 阻害剤に対する他の結合部位は存在せず, PCG, CER, MCI-PC は同一活性部位で結合すると考えられる。

iii) Stoichiometry の実験 (Fig. 4) から示されるように基質 1 分子は拮抗阻害剤 1 分子と当量的に反応することがわかる。このことは基質が PCG, CER どちらの場合についても言える。従がつて基質 PCG と CER の活性部位は阻害剤 MCI-PC の活性部位と同様である。

以上, i) ii) iii) のことから, 我々が精製した  $\beta$ -lactamase による PCase, CSase の作用発現は, それぞれ異なる酵素分子によるのではなく, 単一酵素分子が両作用を有する, かつその作用部位は同一であると考えられる。

#### 謝 辞

本研究にあたり協力いただいた足立親彦, 島谷とも子両氏に厚く感謝します。また, 酵素の精製にあたり, 種御助言いただいた東京大学医科学研究所の桑原博士, 内田博士に深謝致します。

#### 文 献

- 1) POLLOCK, M. R.: Enzyme destroying penicillin and cephalosporin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 292~301, 1964
- 2) TE-WEN CHANG & L. WEINSTEIN: Isolation and characterization and distribution of Cephalosporinase. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 278~282, 1963
- 3) POLLOCK, M. R.: The activity and specificity of inducers of penicillinase production in *Bacillus cereus*, strain NRRL 569. *Biochem. J.* 66 : 419~428, 1957
- 4) POLLOCK, M. R.; A. M. TORRIANI &

Table 3. Comparison of specific enzyme activity as PCase and CSase in  $\beta$ -lactamase from *E. coli* No. 24

Stage	Procedure	Specific enzyme activity		PCase CSase
		PCase	CSase	
1	Ultrasonic disintegration	30.96	3.6	8.6
2	Precipitate on 60% saturation with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and dialysis	38.93	4.3	9.0
3	Streptomycin treatment	89.6	10.3	8.7
4	Sephadex G-100	553.05	61.5	9.0
5	Chromatography on DEAE-cellulose	2790.6	306.6	9.1
6	Starch zone electrophoresis	5963.53	677.7	8.8
7	Sephadex G-75	6517.03	749.1	8.7

- E. J. TRIDGELL: Crystalline bacterial penicillinase. *Biochem. J.* 62 : 387~390, 1956
- 5) KOGUT, M.; M. R. POLLOCK & E. J. TRIDGELL : Purification of penicillin induced penicillinase of *Bacillus cereus* NRRL 569 : A comparison of purified penicillinase produced spontaneously by a constitutive mutant strain. *Biochem. J.* 62 : 391~401, 1955
  - 6) POLLOCK, M. R. : Purification and properties of penicillinase from two strains of *Bacillus licheniformis*: a chemical, physicochemical and physiological comparison. *Biochem. J.* 94 : 666~675, 1965
  - 7) RICHMOND, M. H. : Purification and properties of exopenicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* 88 : 452~459, 1963
  - 8) DATTA, N. & M. H. RICHMOND: The purification and properties of penicillinase whose synthesis is mediated by an R-factor in *Escherichia coli*. *Biochem. J.* 98 : 204~209, 1966
  - 9) YAMAGISHI, S.; K. OHARA, T. SAWAI & S. MITSUHASHI : The purification and properties of penicillin  $\beta$ -lactamase mediated by transmissible R-factors in *Escherichia coli*. *J. Biochem.* 66 : 11~20, 1969
  - 10) LINDQUIST, C. & K. NORDSTRÖM : Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. VII. Purification and characterization of a penicillinase mediated by the R factor RI. *J. Bacteriol.* 101 No. 1 : 232~239, 1970
  - 11) NEU, H. C. & E. B. WINSHELL: Purification and characterization of penicillinase from *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.* 139 : 278~290, 1970
  - 12) SUTHERLAND, R. & G. N. ROLINSON : Characteristics of methicillin-resistant *Staphylococci*. *J. Bacteriol.* 87 : 887~899, 1964
  - 13) NOVIC, R. P. : Micro-iodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83 : 236~240, 1962
  - 14) LOWRY, O. H.; N. J. ROSEBROUGHT, A. L. FARR & R. J. RANDALL : Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193 : 265~275, 1950
  - 15) OXENBURGH, M. S. SNOSWELL: Use of streptomycin in the separation of nucleic acid from protein in a bacterial extract. *Nature* 201 : 1416~1417, 1965
  - 16) ANDREWS, P. : Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel-filtration. *Biochem. J.* 91 : 222~233, 1964
  - 17) MALAMY, M. & B. L. HORECKER : The localization of alkaline phosphatase in *Escherichia coli* K 12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5 : 104~108, 1961
  - 18) NEU, H. C. & L. A. HEPPEL : The release of enzymes from *Escherichia coli* by osmotic shock and during the formation of spheroplasts. *J. Biol. Chem.* 240 : 3685~3692, 1965
  - 19) LINDSTRÖM, E. B.; H. BOMAN & B. B. STEELE : Resistance of *Escherichia coli* to penicillins. VI. Purification and characterization of the chromosomally mediated penicillinase present in amp<sup>-</sup>A containing strains. *J. Bacteriol.* 101 No. 1 : 218~231, 1970
  - 20) DALE, J. W. : Characterization of the  $\beta$ -lactamase specified by the resistance factor R-1818 in *E. coli* K 12 and other Gram negative bacteria. *Biochem. J.* 123 : 501~505, 1971

## PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF A $\beta$ -LACTAMASE FROM CLINICALLY ISOLATED *E. COLI* STRAIN NO. 24

YORIKO YAMANAKA, MASAZO TAJIMA and SHOZO NAKAZAWA

Department of Microbiology, Kyoto College of Pharmacy, Kyoto, Japan

The  $\beta$ -lactamase mediated by the R factor in clinically isolated *E. coli* strain No. 24 has been purified and characterized.

The enzyme was purified by the following procedure : gel filtration on Sephadex G-100, chromatography on DEAE-cellulose, starch gel electrophoresis and gel filtration on Sephadex G-75. The molecular weight was estimated to be 23,8000 by gel filtration on Sephadex G-75. By starch gel electrophoresis, the isoelectric point was found at pH 5.3. The MICHAELIS constants for benzylpenicillin, ampicillin, phenethicillin, 6-aminopenicillanic acid and cephaloridine were determined.

The enzyme showed a broad specificity of the action against both penicillin and cephalosporin derivatives, and the ratio of this activity as penicillinase and cephalosporinase did not change through the purification steps. Cloxacillin, the semisynthetic penicillin, acted as a competitive inhibitor of the hydrolysis of benzylpenicillin and cephaloridine.

These results and other our studies suggest that both activities as penicillinase and cephalosporinase present in the same active site on a single enzyme.