

臨床分離セファロスポリン系抗生物質耐性ブドウ球菌の産生する
β-lactamase の精製, ならびにその性質に関する研究

松田真人・浜洲泰久・花村敏嗣

浜尾 晃・中澤昭三

京都薬科大学微生物学教室

(昭和 49 年 9 月 7 日受付)

I. 緒 言

先に, 教室の山中等は患者由来の大腸菌 No. 24 の産生する β-lactamase を精製し, その性質を明らかにした¹⁾。それによれば, Gram 陰性菌の場合は一般に, β-lactamase は cephalosporinase 活性を有することが知られているけれども大腸菌 No. 24 の場合, penicillinase 活性と cephalosporinase 活性が同一活性部位で単一 β-lactamase によって発現されると報告している。いっぽう, Gram 陽性菌においては, 産生する β-lactamase は penicillinase 的な性質を有することが知られている²⁾。Bacillus cereus においては penicillinase と cephalosporinase, 2つの β-lactamase を産生し, cephalosporinase は補欠分子族として Zn²⁺ を必要とする金属酵素であり, 両酵素においては性質には著しい差異があると報告されている³⁾。さて, ブドウ球菌においては現在患者から分離される株のほとんどは Penicillin-G に対して高度耐性を有し, penicillinase を産生するとされているが cephalosporin 系抗生物質に対しては高度の感受性を示して来た⁴⁾。今回私達は患者由来のブドウ球菌 (Staphylococcus aureus) から cephalosporin 系抗生物質にも耐性を示す株を 1 株分離し, その株の産生する β-lactamase を精製し, 単離してその性質について検討した。

II. 材料および方法

1. 使用菌株

患者由来 Staphylococcus aureus No. 41 を用い, 比較菌株として penicillin 系抗生物質にだけ耐性の患者由来 Staphylococcus aureus No. 13 を用いた。No. 41 株は β-lactamase に対して安定な合成 penicillin を除く penicillin, tetracycline, chloramphenicol, streptomycin, kanamycin, macrolide 系抗生物質すべてなど, ほとんどの抗生物

質に対して耐性であるだけでなく, cephalosporin 系抗生物質にも耐性である多剤耐性菌である。この株は staphylocoagulase 活性を強く示し, DNase を産生し, Mannit 分解能を有する。

2. 培養ならびに粗酵素標品の調製法

37°C, 18 時間前培養した菌液を 1%-glucose 加普通ブイヨンに 10% になるように接種し, 37°C で振盪培養した後, 集菌し, Fig. 1 のように, 菌体を水洗後, 0°C, pH 7.2 で 0.25 M-phosphate buffer に 24 時間 suspend した上清を粗酵素標品とした⁷⁾。

3. 精製に使用した材料

DEAE-Sephadex A-50 (Pharmacia Sweden)

CM-Sephadex C-25 (Pharmacia Sweden)

Sephadex G-100 superfine (Pharmacia Sweden)

4. 実験方法

i) 酵素活性の測定

精製, 酵素産生誘導能, 物理的性状の検討における酵

Fig. 1 Preparation of β-lactamase from Staph. aureus

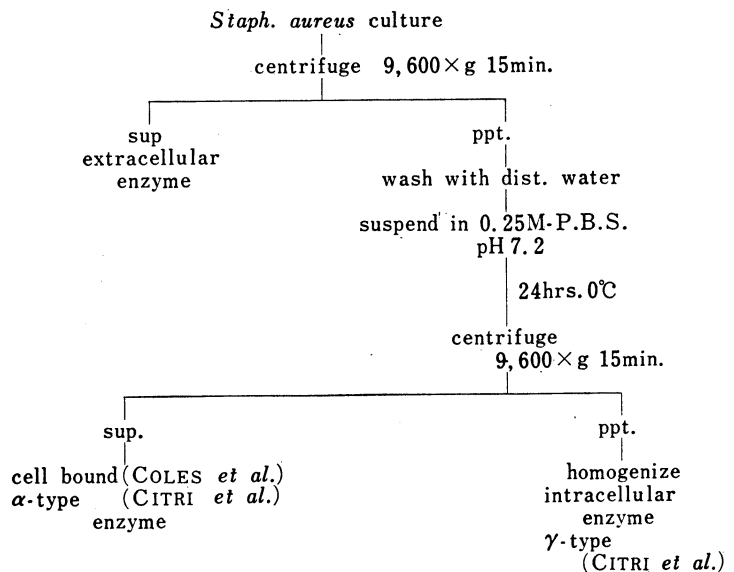


Table 1. Antibacterial activity
MIC($\mu\text{g/ml}$)

drug \ strain	No.41	No.13	209PJC
PCG	6.25	>100	0.022
ABPC	12.5	>100	0.09
CER	12.5	0.09	0.045
CET	25.0	0.78	0.09
CEX	>100.	12.5	1.56

素活性の測定は酵素と基質を混じ、37°C、60分間反応させた後、100°C 1分間加熱して反応を止め、残存している基質の力価を *Bacillus subtilis* PCI-219 を指示菌とし、cylinder-plate 法により測定する bioassay 法、基質特異性等、酵素学的性状における酵素活性の測定は NOVICK の microiodometric assay に従った chemical assay 法を用いた⁵⁾。

ii) 蛋白質量の測定

Column chromatography における各 fraction の 280 nm の吸収は Hitachi UV-VIS spectrophotometer を用いて測定し、酵素液中の蛋白質量は Bovine serum albumin を standard とする LOWRY の方法によって測定した⁸⁾。

iii) 抗血清の調製

FREUND の complete adjuvant と混じた蛋白質 0.2 mg/ml の粗酵素液を最初 0.2 ml 皮下注射し、4日後から1週間毎に3週間にわたって 0.2~0.5 ml 耳静脈注射、その6日後に 1 ml 注射した後、5日後から採血を行なうという日程で家兎を免疫した。

III. 実験結果

1. β -lactam 系抗生物質に対する感受性

No. 41 株は Table 1 に示すように、penicillin, cephalosporin 系抗生物質に耐性を示している。

Table 2. Enzyme inducibility of *Staph. aureus* no. 41 and 13

Strain		None-induced	PC G-induced	CER-induced
<i>Staph. aureus</i> no. 41	PCase	12.0	1040.0	11000.0
	CSase	1.55	8.0	147.0
	PCase	7.44	130.0	74.8
	CSase			
<i>Staph. aureus</i> no. 13	PCase	450.0	9600.0	74000.0
	CSase	1.8	30.0	148.0
	PCase	250.0	320.0	500.0
	CSase			

$\mu\text{g/ml}$ hydrolysis of PCG, CER

Table 3. Induction ratio of various penicillins and cephalosporins
1. penicillinase activity

Inducer	4 hrs.	8 hrs.	12hrs.
None	1.	1	1
Penicillin-G	2.8	1.4	8.2
6-APA	2.8	1.3	7.2
Ampicillin	4.5	8.1	10.0
7-ACA	4.1	4.9	8.8
Cephaloridine	18.8	38.7	100.0
Cephalothin	23.4	63.4	250.0
Cephalexin	23.2	105.6	350.0

Table 4. Induction ratio of various penicillins and cephalosporins
2. Cephalosporinase activity
hrs. after induction.

Inducer	4 hrs.	8 hrs.	12hrs.
None	1	1	1
Penicillin-G	1.6	1.3	1.3
6-APA	1.3	1.3	1.3
Ampicillin	2.8	3.3	2.4
7-ACA	1.3	1.6	1.6
Cephaloridine	2.0	2.4	2.8
Cephalothin	2.8	2.2	3.1
Cephalexin	140.8	141.0	145.0

しかし、非誘導時の菌から得た粗酵素標品の示す基質特異性は、cephalosporin 系抗生物質、とくに cephaloridine (CER) に対しては No. 13, No. 41 株の産生する β -lactamase とともに penicillin-G を 100 としたとき、5 ないし 6 と低く、両菌株における差異はみられず、薬剤感受性との一致はみられなかった。

2. 酵素誘導産生能

酵素産生の誘導能については2つの面、すなわち、感受性の異なる菌株による差異、そして誘導能の基質による差異について検討した。まず、菌株による差異は PCase/CSase (penicillinase 活性/cephalosporinase 活性) 活性比で比較した時、Table 2 に示すように、菌株によって被誘導能に明らかな差異がみられた。また No. 41 株における誘導に用いた基質による活性誘導率の差異について検討した結果、penicillin-G, cephaloridine

Table 5. Summary of purification β -lactamase from *Staphylococcus aureus* No. 41 CER-induced

Procedure	Total activity		Specific activity		Recovery(%)		Number of purification as PCase
	PCase	CSase	PCase	CSase	PCase	CSase	
1. 0.25M-phosphate buffer suspension	36,000,000	1,024,000	667	19.0	100	100	1
2. Salt out 0.3~1.0 sat.	25,200,000	764,000	—	—	70	75	
3. Chromatography on DEAE-Sephadex A-50	17,640,000	321,000	768	14.0	48	31	
4. Rechromatography on DEAE-Sephadex A-50	7,637,500	125,205	810	13.2	21	12	
5. Chromatography on CM-Sephadex C-25	1,183,000	14,378	—	—	3.2	1.4	
6. Gel filtration on Sephadex G-100	702,000	11,280	3191	51.3	1.9	1.1	48

を基質として測定した場合、penicillinase 活性は Table 3 に示すように、誘導しない場合を1とした時、penicillin 系抗生物質で約 10 程度、cephalosporin 系抗生物質で 100 以上という高値を示し、cephalexin (CEX) > cephalothin (CET) > cephaloridine (CER) の順である。これに対して cephalosporinase 活性は penicillin 系抗生物質でいずれも誘導した場合 1.5 程度、cephalexin を除く cephalosporin 系抗生物質では 3 程度であったが、cephalexin では 145 という高い値を示している (Table 4)。

このことから菌株による誘導能、そして酵素の産生を誘導する薬剤による誘導能に明らかな差異がみられ、薬剤感受性と酵素誘導能に一致がみられた。

3. β -lactamase の精製

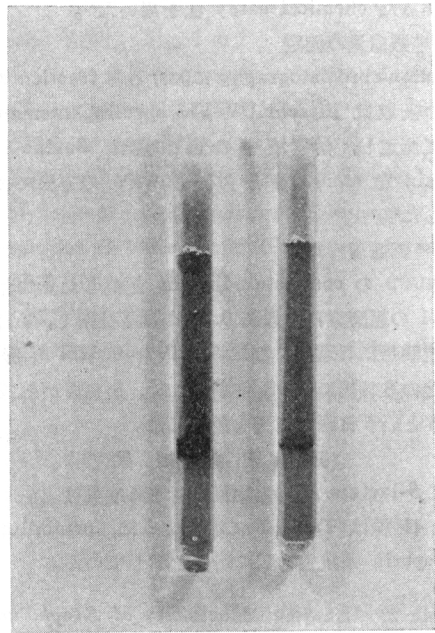
精製は Fig. 1 に示す過程を経て抽出した粗酵素から出発して行なった。(1) この粗酵素の 0.3~1.0 硫酸飽和分画を取り、(2) DEAE-Sephadex A-50 を用いて活性部分を分画し、(3) DEAE-Sephadex A-50 を用い単一 buffer で溶出した後、(4) CM-Sephadex C-25 で分画し、(5) Sephadex G-100 superfine を用いてゲル濾過した。以上の精製過程を Table 5 に示す。この酵素標品は carrier ampholine を用いて焦点電気泳動を行なった後、ディスク電気泳動で単一 band を得た。この標品で次に述べる超遠心分析を行なった (Fig. 2, Fig. 3)。

4. 精製酵素の諸性質

1. 分子量の測定

沈降速度法超遠心分析による測定の結果、ならびに sephadex G-100 を用い、pepsin, ribonuclease を reference とする ANDREWS らの方法⁶⁾を用いて分析した結果、この酵素は沈降定数約 2.3 S、概算分子量 22,000 ~ 24,000 と推定した。

Fig. 2 Disc electrophoresis at pH 6.0



2. 等電点

Fig. 4 に示すように、carrier ampholine を用いた焦点電気泳動で測定した結果、等電点は約 9.5 であった。

3. 酵素学的性質

この酵素の至適温度域は penicillinase 活性、cephalosporinase 活性ともに 37~45°C であるが、至適 pH 域は Fig. 5 に示すように、両活性において若干の差がみられた。また熱に対する安定性は、cephalosporinase 活性は pH 7, 37°C で 60 分後に 70% 失活し、penicillinase 活性は同条件で約 40% 失活した。しかし、cephalo-

sporinase 活性は pH 4 において同条件下 100% 活性に残存した。次に、各種阻害剤、ならびにイオンの影響を検討した結果、PCMB, Urea, ヨード酢酸, EDTA,

Fig. 3 Sedimentation pattern

The buffer used was 0.05 M-PBS pH 6.0, 5 min. after reaching a speed of 60,000 rpm.

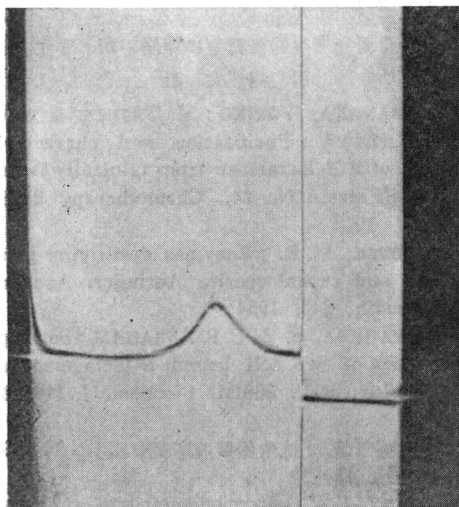


Fig. 4 Focus electrophoresis of β -lactamase from *Staph. aureus* No. 41 on carrier ampholine. (pH 3~10, 0.7%, 110 ml)

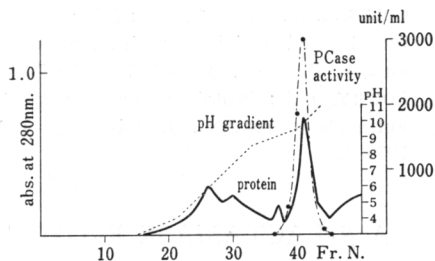
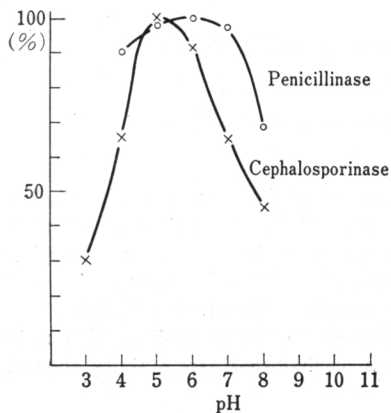


Fig. 5 pH-activity curve for the β -lactamase from *Staph. aureus* No. 41



Zn^{+2} , Mg^{+2} , Ca^{+2} , Na^+ , Cl^- , 各々 1 mM では全く酵素活性を阻害せず, 1 mM のヨードだけによって penicillinase 活性は 61%, cephalosporinase 活性は 42% 阻害を受けた。

4. 精製酵素の kinetics

この酵素の penicillin-G に対する K_m は $20.8 \mu M$, V_{max} は $30^\circ C$, pH 5.8 で 10×10^8 mole of substrate hydrolyzed/mole of enzyme/min. であった。また, penicillinase 活性に対するヨードの阻害は Fig. 6 のように拮抗型の阻害を示している。これに対して, cephalosporinase 活性に対するヨードの阻害は Fig. 7 のように, 拮抗型の阻害を示さない。そしてこの阻害はアロステリックな阻害ではなかった。

Fig. 6 Inhibition of penicillinase by iodine

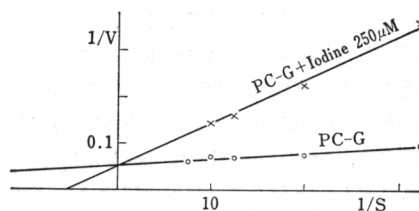


Fig. 7 Inhibition of cephalosporinase by iodine

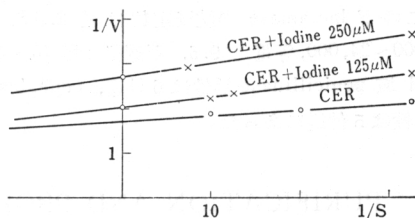
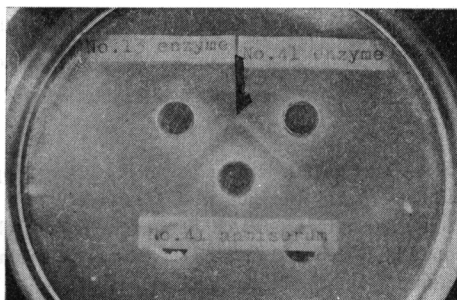


Fig. 8 Double diffusion test by OUCHTERLONY agar diffusion



5. 免疫学的検討

No. 41 株と No. 13 株の産生するそれぞれの酵素に対する免疫血清を作製し、各々の酵素を抗原として OUCHTERLONY の二重拡散法によるゲル内沈降反応を行ない検討した結果、沈降線は完全に融合し、免疫学的差異は見られなかった (Fig. 8)。

IV. まとめ

1. 患者由来の cephalosporin 系抗生物質に耐性を有するブドウ球菌の産生する β -lactamase を高度に精製し、単一標品を得た。
2. 酵素誘導能の実験から薬剤感受性と酵素産生誘導能は一致し、また cephalosporinase 活性発現においては誘導能は inducer 特異性が高いこと、また cephalixin はひじょうに誘導能が高いことがわかった。
3. また、この β -lactamase の penicillinase 活性、cephalosporinase 活性について調べた結果、至適 pH 域に若干の差異がみられた。各種イオン、阻害剤の影響について調べた結果、両活性はヨードだけによって阻害を受け、その阻害型式は penicillinase 活性の場合は拮抗型であったが cephalosporinase 活性の場合、拮抗型の阻害を示さず、cephalosporin は penicillinase 活性を拮抗的に阻害し、またこのヨードの阻害はアロステリックな阻害ではなかった。
4. 精製の段階に従がい penicillinase 活性、cephalosporinase 活性比が大きくなっているのがわかった。
5. この β -lactamase の沈降定数は約 2.3 S、分子量 22,000~24,000、等電点 9.5、至適温度域 37~45°C、至適 pH 域 penicillinase 活性は 6 付近、cephalosporinase 活性は 5 付近にあった。

6. Cephalosporin 耐性の発現は、基質特異性と薬剤感受性が一致しないことに見られるように、 β -lactamase 以外にも何らかの他の耐性機構が働いていることが考えられる。

謝 辞

本研究にあたり、研究の場と貴重な御助言をいただいた東京大学医科学研究所 内田元清博士、桑原誠之博士、日本新薬総合研究所生物研究室に深謝いたします。

引用文献

- 1) YAMANAKA, YORIKO; H. TAJIMA & SHOZO NAKAZAWA: Purification and characterization of a β -lactamase from clinically isolated *E. coli* strain No. 24. *Chemotherapy* 21(6): 1179, 1973
- 2) POLLOEK, M. R.: Enzymes destroying penicillin and cephalosporin. *Antimicrob. Agents & Chemoth.* 242, 1964
- 3) KUWAHARA, S. & E. P. ABRAHAM: Some properties of two cell bound β -lactamase from *Bacillus cereus* 569/M. *Biochem. J.* 115, 859, 1969
- 4) 中沢昭三著、「抗生物質の基礎知識」p.76, 1970, 第4版, 南江堂
- 5) NOVICK, R. P.: Microiodometric assay for penicillinase. *Biochem. J.* 83, 236, 1962
- 6) ANDREWS, P.: Estimation of the molecular weight of proteins by sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91, 922, 1964
- 7) COLES, N. W. & GROSS, R.: Liberation of surface-located penicillinase from *Staphylococcus aureus*. *Biochem. J.* 102, 742, 1967
- 8) LOWRY, O. H.: Protein measurement with the Folin-phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265, 1950

PURIFICATION AND PROPERTIES OF A β -LACTAMASE FROM CLINICALLY ISOLATED CEPHALOSPORIN-RESISTANT *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* NO. 41

MASATO MATSUDA, YASUHISA HAMASU, TOSHITSUGU HANAMURA,
AKIRA HAMAOKA and SHOZO NAKAZAWA

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

The β -lactamase from clinically isolated cephalosporin resistant *Staphylococcus aureus* strain No. 41 has been highly purified and characterized. The enzyme was purified by the following procedures: chromatography on DEAE-Sephadex A-50, chromatography on CM-Sephadex C-25, gel filtration on Sephadex G-100 and disc electrophoresis. From ultracentrifugation and gel filtration on Sephadex G-100, sedimentation coefficient was estimated to be 2.3 and molecular weight to be 22,000~24,000.

The isoelectric point was estimated to be 9.5 by electrofocusing on carrier ampholine. The optional pH range of penicillinase activity showed at around 6, while cephalosporinase activity showed at around 5.

The enzyme inducibility was proportionated to the MIC of the substrate, cephalosporin derivative had very high inducibility of the penicillinase and cephalosporinase activity, especially cephalexin had the highest inducibility,

Iodine inhibited the enzyme activity, acted as a competitive inhibitor to the hydrolysis of penicillin-G, not as a competitive one to the hydrolysis of cephaloridine, also this inhibition was not allosteric one.

The ratio of enzyme activity as penicillinase and cephalosporinase expanded through the purification step. But substrate specificity was not proportionated to the MIC to the substrate, and an existence of other mechanism of resistance to the cephalosporins was suggested.