

大腸菌におけるキノロン薬の DNA ジャイレース阻害作用機作

吉田 博明

大日本製薬生物科学研究所*

(平成4年3月3日受付・平成4年5月6日受理)

キノロン薬のジャイレース阻害作用機作を解明するために、DNA ジャイレースのキノロン耐性変異部位を明らかにし、各種ジャイレース蛋白を精製して、ジャイレース活性およびジャイレース-DNA 複合体とエノキサシンとの結合を調べた。大腸菌 KL 16 株由来キノロン耐性 *gyrA* 変異株 (10 株) の *gyrA* 遺伝子上の点変異は耐性度の高いものから順に、Ser-83 → Leu (4 株), Ser-83 → Trp, Asp-87 → Asn, Gly-81 → Cys, Ala-84 → Pro, Ala-67 → Ser および Gln-106 → His であった。これらの変異部位は GyrA 蛋白の N 末端付近に局在し、DNA との共有結合部位 Tyr-122 に近かった。KL 16 株由来キノロン耐性 *gyrB* 変異株 (13 株) は、耐性パターンから 2 つのタイプに分類された。第 1 タイプは調べたすべてのキノロンに耐性を示し、Asp-426 → Asn (9 株) の変異であった。第 2 タイプは酸性キノロンには耐性であるが両性キノロンには高感受性を示し、Lys-447 → Glu (4 株) の変異を有していた。*gyrA*, *gyrB* いずれの変異もコードする蛋白の表層構造の変化を惹起すると推定された。野生型および変異型 GyrA, GyrB 蛋白の大腸菌大量発現系を構築し、精製した蛋白から再構成したジャイレースのスーパーコイル活性を調べたところ、GyrA 変異ジャイレース ($A^{Leu-83} + B^{wild-type}$) および第 1 タイプ GyrB 変異ジャイレース ($A^{wild-type} + B^{Asn-426}$) は調べたすべてのキノロンに耐性を示したのに対し、第 2 タイプ GyrB 変異ジャイレース ($A^{wild-type} + B^{Glu-447}$) は酸性キノロンには耐性を示したが、両性キノロンには高感受性を示した。各ジャイレースのキノロン感受性是对応する変異株のキノロン感受性とよく相関していた。ジャイレース-DNA 複合体と 3H -エノキサシンとの結合をゲル濾過法により測定したところ、GyrA 変異ジャイレースでは野生株に比べ結合量は変わらないが結合親和性は約 1/10 に低下し、第 1 タイプ GyrB 変異ジャイレースでは結合量は約 1/7 に低下し、第 2 タイプ GyrB 変異ジャイレースでは結合量はほとんど変わらないが結合親和性は約 5 倍高くなっていた。この結果は各ジャイレースの感受性の変化を矛盾なく説明している。キノロンはジャイレース-DNA 複合体への結合によりジャイレース活性を阻害し、キノロンの結合量および結合親和性は GyrA および GyrB 蛋白により支配されていると考えられる。

Key words: DNA, ジャイレース, キノロン, キノロン耐性, ジャイレース阻害作用機作

キノロン薬は細菌感染症の治療に現在広く使用されている主要抗菌剤グループの一つである。Gellert ら¹⁾ および Sugino ら²⁾ がナリジクス酸やオキシリン酸が DNA ジャイレース活性を阻害すること、ナリジクス酸耐性株から精製した DNA ジャイレースはナリジクス酸、オキシリン酸に耐性であることを見出して以来、キノロン薬の作用の標的は DNA ジャイレースであろうと考えられるようになってきた。ニューキノロンについても標的酵素はオールドキノロン同様 DNA ジャイレースであると考えられている³⁾。しかし、キノロン薬は DNA ジャイレースとは結合せず、

DNA とは弱く結合することから、キノロン薬の作用機作は DNA との結合であるとの考えも出され⁴⁾。その分子レベルにおける作用機序については混乱が見られる現状である。Shen らは最近ジャイレース-DNA 複合体に新たなキノロン結合部位の生ずることを見出し⁵⁾、この部位が阻害作用発現に重要であり、キノロンはこの部位内に出現した切断 DNA の一本鎖部分に結合すると DNA ポケットモデルを提出している⁶⁾。我々のグループは大腸菌 *gyrA* および *gyrB* 遺伝子上のキノロン耐性変異の遺伝学的解析結果^{7,8)} から、キノロン-ジャイレース-DNA 三者相互作用に

* 大阪府吹田市江の木町 33-94

において酵素活性阻害上重要なのはジャイレースサブユニット上の特定部位の高次構造とキノロンの化学構造であることを明らかにし、キノロンとジャイレースサブユニットとの相互作用を仮定したキノロンポケットモデルを提唱している^{9,10}。今回、我々は精製した野生型および変異型 GyrA および GyrB 蛋白より再構成したジャイレースを用いて、キノロン感受性を調べると共に、³H-エノキサシンのジャイレース-DNA 複合体への結合性を調べ、いずれもキノロンポケットモデルを支持する結果を得たので、ここに報告する。〔本研究の一部は既発表であり、第2回上田記念感染症・化学療法研究奨励賞（1991年6月）の受賞対象とされたものである。〕

I. 材料と方法

1. 使用菌株およびプラスミド

gyrA および *gyrB* 遺伝子のクローニングに用いた野生型の大腸菌 KL 16 株はエール大学の Bachmann 博士より供与された。キノロン耐性 *gyrA* 変異株 (N-51, N-112, N-118, N-119, P-18, N-113, N-97, P-5, P-10, N-89) および *gyrB* 変異株 (N-24 および N-31 を含めて 13 株) は KL 16 株からキノロンを含む寒天平板上にて一段階で選択した。これら耐性株の *gyr* 変異の有無は野生型 *gyr* 遺伝子の導入によるキノロン感受性化試験により決定した^{9,10}。プラスミド pBR 322 および pHY 300 PLK は宝酒造より購入した。

2. 試薬

ナリジクス酸、オキソリン酸、シノキサシン、ピロミド酸、フルメキン、ピベミド酸、ノルフロキサシン、エノキサシン、オフロキサシン、シプロフロキサシン、トスキキサシンおよびスパルフロキサシンは大日本製薬(株)探索研究所にて合成した標品である。³H-エノキサシンはアマシャム社から購入した。

3. プラスミドの調製

Wilkie らの方法¹¹ もしくは Holmes らの方法¹² に準じて行った。

4. 塩基配列の決定

M 13 ファージを用いてジデオキシ法¹³ により行った。

5. MIC 測定

LB 寒天培地を用い¹⁴、日本化学療法学会最小発育阻止濃度測定法¹⁵ に準じて行った。

6. GyrA および GyrB 蛋白の大量生産

Fig. 1 に示したように、プラスミド pHTP 318¹⁶ から *trp* プロモーターを含む 1092 dp *Pst*I-*Dra*I DNA 断片を切り出した。これに *gyrA* の場合 (Fig. 1 A) は *Dra*I-*Sac*I サイト、*gyrB* の場合 (Fig. 1 B) は

*Dra*I-*Eco*RI サイトを両端に持つ合成 DNA を連結した後、制限酵素 *Sca*I で消化し、それぞれ 915 bp および 866 bp の DNA 断片を調製した。さらに、野生型 *gyrA* の場合はプラスミド pAW 012¹⁷ 由来の 7.3 kb *Sca*I-*Sac*I 断片、野生型 *gyrB* の場合はプラスミド pJB 11¹⁸ 由来の 5.3 kb *Sca*I-*Eco*RI 断片を調製し、上記の DNA 断片を連結して発現プラスミドを作製した。変異型 *gyrA* および *gyrB* の場合も同様にして発現プラスミドを作製した。その後、これらをクローン化 *gyr* 遺伝子の由来する元の大腸菌株に導入して Gyr 蛋白大量生産菌株とした。いずれもインドールアクリル酸 (20 μ g/ml) を添加した培地で 24 時間培養して、目的蛋白を大量生産した。

7. GyrA および GyrB 蛋白の精製

GyrA および GyrB 生産菌の培養液 (各々 0.5~2 リットル) から集菌後、Gellert らの方法¹⁷ により cleared lysate を調製し、除核酸、硫酸分画の後、5 リットルの緩衝液に対して 4 時間透析した。GyrA 蛋白は DEAE-セファロースカラム (2.6 \times 7 cm) およびヘパリンセファロースカラム (2.6 \times 5 cm) のクロマトグラフィーにより、GyrB 蛋白の場合はヘパリンセファロースカラム (2.6 \times 7 cm) およびヒドロキシアパタイトカラム (1 \times 7 cm) のクロマトグラフィーにより精製した。

8. DNA ジャイレースのスーパーコイル活性の測定

佐藤らの方法¹⁹ に準じ、精製 GyrA および GyrB 蛋白各々 20 単位より再構成した DNA ジャイレースを用いて活性を測定した。基質 DNA としてプラスミド pBR 322 ならびに pHY 300 PLK を使用した。ジャイレース 1 単位は、30°C、1 時間の反応でリラックス型基質の 50% をスーパーコイル型に変化させる酵素量である。GyrA の比活性は、GyrB (20 単位) の存在下で GyrA の量を約 20 単位から漸減し、スーパーコイル活性が 50% になる時の酵素量から算出した。GyrB の場合は、GyrA (20 単位) の存在下で同様にして求めた。なお、蛋白量は BCA 蛋白アッセイキット (Pierce 社) を用いて、牛血清アルブミンを標準として定量した。

9. ³H-エノキサシンとジャイレース-DNA 複合体との結合量の測定

Shen らの反応系⁵ を用いた。ただし、反応液 (全量 50 μ l) は GyrA および GyrB 蛋白 (各々 11 pmol)、*Eco*RI 消化直鎖 pBR 322 DNA (1 pmol) および ³H-エノキサシン (5~500 pmol, 1.8 \times 10⁵~1.8 \times 10⁶ dpm) を含むようにした。この反応液を

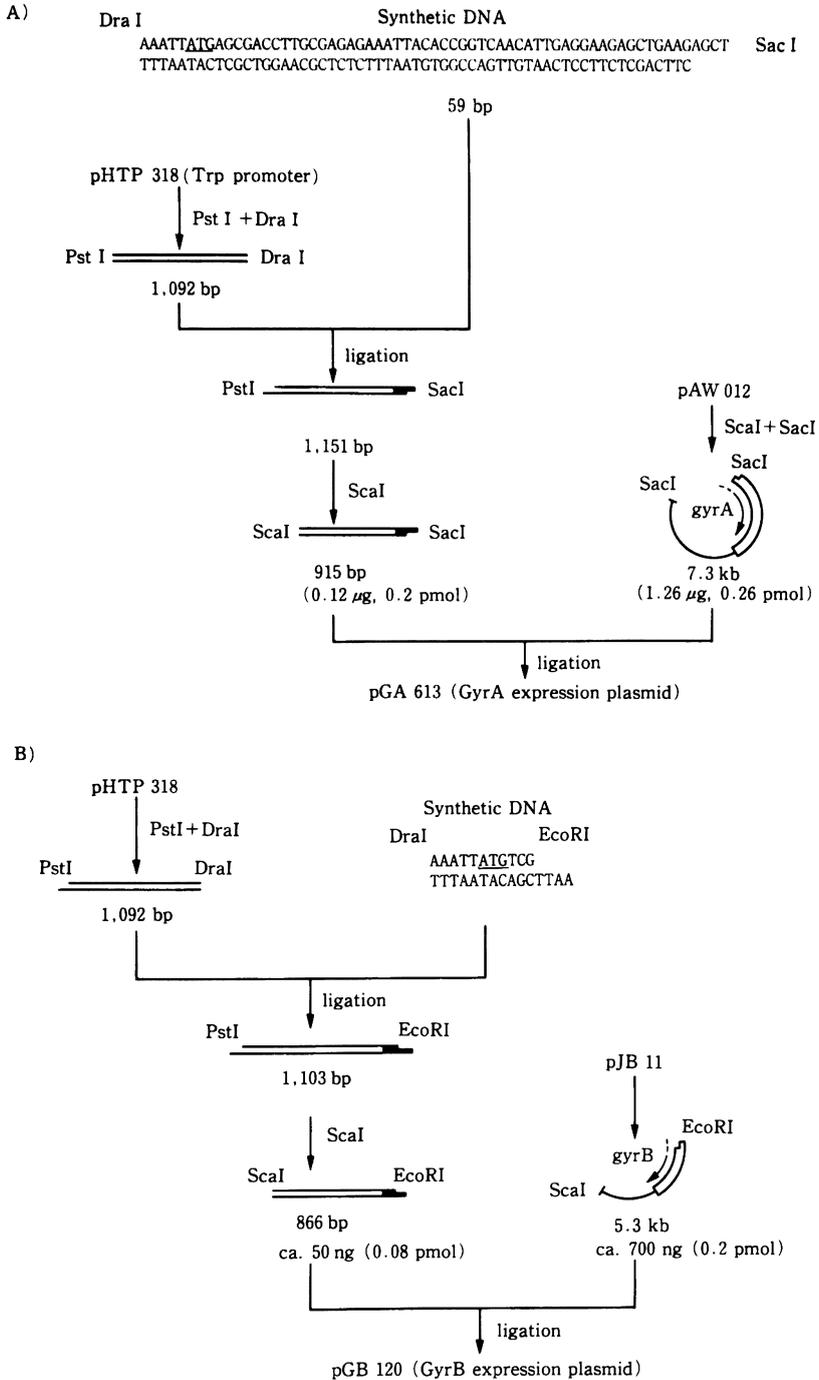


Fig. 1. Construction of the expression plasmids for the wild-type *Escherichia coli* GyrA (A) and GyrB (B) proteins.

30°C, 2時間インキュベート後, セファデックス G-50 カラム (約 1.4 ml 樹脂) によりゲル濾過し, void volume 画分 (高分子画分) の放射活性より複合体と結合した ^3H -エノキサシン量を算出した。

II. 結 果

1. 大腸菌 *gyrA* 遺伝子のキノロン耐性変異

大腸菌 KL 16 株のキノロン耐性 *gyrA* 変異株 (10 株) からクローン化した *gyrA* 遺伝子の塩基配列決定により, これら耐性菌の *gyrA* 遺伝子はいずれも点変異を有しており, GyrA 蛋白の単一アミノ酸の変化によりキノロンに耐性化していることが判明した (Table 1)。変異株は調べたキノロンに対して 2~125 倍の耐性を示している。耐性の最も高い 5 株のうち 4 株は N 末端より 83 番目のセリン (Ser-83) がロイシン (Leu) に, 1 株は Ser-83 がトリプトファン (Trp) に変化していた。次いで耐性の高い N-113 株は 87 番目のアスパラギン酸 (Asp-87) がアスパラギン (Asn) に, 相対的に耐性の低い N-97 株は 81 番目のグリシン (Gly-81) がシステイン (Cys) に, P-5 株は 84 番目のアラニン (Ala-84) がプロリン (Pro) に, P-10 株は 67 番目のアラニン (Ala-67) が Ser に, N-89 株は 106 番目のグルタミン (Gln-106) がヒスチジン (His) に変化していた。

これらの変異の存在する領域, すなわちアミノ酸番号 67 番目から 106 番目までの領域 (以後, キノロン耐性決定領域と称する) は GyrA 蛋白の N 末端近くにあり, ジャイレースの作用により一時的に切断された DNA との共有結合部位である 122 番目のチロシ

ン¹⁰⁾ の近くに位置している。GyrA 蛋白のキノロン耐性決定領域付近の局所構造をコンピューターを用いて解析すると, 変異はほとんどの場合, ターン周辺に位置しており, 親水性の極大部位の近くであった (データ省略)。このような部位は水溶液中では蛋白の表層を構成していると考えられる。したがって, キノロン耐性変異によるアミノ酸変化は GyrA 蛋白の表層部位に起きていると考えられる。また, 耐性の高い変異ほど局所高次構造の変化の大きい傾向が見られた。

2. 大腸菌 *gyrB* 遺伝子のキノロン耐性変異

大腸菌 KL 16 株のキノロン耐性 *gyrB* 変異株 (13 株) は, 薬剤感受性パターンから 2 種類に分類された (Table 2)。第 1 のタイプ (9 株) は調べたすべてのキノロンに耐性を示し, 第 2 のタイプ (4 株) はナリジクス酸, オキシソリン酸などの酸性キノロンに耐性を示すが, ピペミド酸やいわゆるニューキノロンなどの両性キノロンには親株以上の高感受性を示す。塩基配列の決定により, 第 1 のタイプの株 (9 株) はすべて Asp-426 → Asn, 第 2 のタイプの株 (4 株) はすべて Lys-447 → Glu の変異であることが判明した。

キノロン耐性決定領域は GyrB 蛋白のほぼ中央部に位置し, ν 蛋白 (GyrB 蛋白の C 末端側断片 [アミノ酸番号 394-804] で GyrA 蛋白と共にスーパーコILING 活性のないトポイソメラーゼ II' を形成する) の N 末端近くに存在している。コンピューター解析では, GyrB 蛋白のキノロン耐性変異も親水性ターン部位の近くに位置していることから, これらの変異により蛋白表層部位の変化が生じていると考えられる (デ

Table 1. Quinolone-resistant mutations in the *gyrA* gene of *Escherichia coli* KL 16

| Strain | MIC ($\mu\text{g/ml}$) | | | | Mutation |
|----------------|--------------------------|---------------|----------|--------------|-------------|
| | Nalidixic acid | Oxolinic acid | Enoxacin | Sparfloxacin | |
| KL 16 (parent) | 3.13 | 0.39 | 0.1 | 0.0125 | wild-type |
| N-51 | 400 | 6.25 | 1.56 | 0.2 | Ser-83→Leu |
| N-112 | 400 | 6.25 | 1.56 | 0.2 | |
| N-118 | 400 | 6.25 | 1.56 | 0.2 | |
| N-119 | 400 | 6.25 | 1.56 | 0.2 | |
| P-18 | 400 | 6.25 | 1.56 | 0.2 | Ser-83→Trp |
| N-113 | 200 | 3.13 | 1.56 | 0.1 | Asp-87→Asn |
| N-97 | 50 | 3.13 | 0.78 | 0.05 | Gly-81→Cys |
| P-5 | 25 | 1.56 | 0.39 | 0.025 | Ala-84→Pro |
| P-10 | 25 | 1.56 | 0.39 | 0.025 | Ala-67→Ser |
| N-89 | 12.5 | 0.78 | 0.2 | 0.025 | Gln-106→His |

Table 2. Quinolone-resistant mutations in the *gyrB* gene of *Escherichia coli* KL 16

| Strain | MIC ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | | | | | | | | | | Mutation |
|-------------------------------|---------------------------------|------|------|------|------|------|--------|------------------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|-------------|
| | Acidic quinolones ^a | | | | | | | Amphoteric quinolones ^b | | | | | | | |
| | NA | OA | CINO | PA | FLQ | PPA | NFLX | ENX | OFLX | CPFX | TFLX | SPFX | | | |
| KL 16 (parent) | 3.13 | 0.39 | 3.13 | 6.25 | 0.39 | 1.56 | 0.05 | 0.1 | 0.05 | 0.0125 | 0.0125 | 0.0125 | 0.0125 | 0.0125 | wild-type |
| Type 1 mutants (9 strains) | 50 | 1.56 | 12.5 | 100 | 1.56 | 12.5 | 0.39 | 0.78 | 0.39 | 0.1 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | 0.05 | Asp-426→Asn |
| Type 2 mutants (4 strains) | 50 | 1.56 | 12.5 | 50 | 1.56 | 0.39 | 0.0125 | 0.025 | 0.0125 | 0.0031 | 0.0031 | 0.0031 | 0.0031 | 0.0031 | Lys-447→Glu |

^a NA, nalidixic acid; OA, oxolinic acid; CINO, cinoxacin; PA, piromidic acid; FLQ, flumequine.

^b PPA, pipemidic acid; NFLX, norfloxacin; ENX, enoxacin; OFLX, ofloxacin; CPFX, ciprofloxacin; TFLX, tosufloxacin; SPFX, sparfloxacin.

ータ省略)。第1のタイプの変異では荷電と局所構造の変化が推測され、第2のタイプの変異では、荷電の変化のみが起きると推測される(データ省略)。

3. 精製 GyrA および GyrB 蛋白の純度と比活性

大腸菌 KL 16 株 (野生型), N-51 株 (*gyrA* 変異株), N-24 株 (第1タイプ *gyrB* 変異株) および N-31 株 (第2タイプ *gyrB* 変異株) よりクローン化した *gyrA* および *gyrB* 遺伝子を有するプラスミドから、材料と方法の項で述べたように、発現プラスミドを構築し GyrA および GyrB 蛋白を大量生産し、精製した。

野生型大腸菌 KL 16 株およびキノロン耐性 *gyrA* 変異株 N-51 の *gyrA* 遺伝子から生産された GyrA 蛋白 (以後 A^{KL16} および A^{N51} と記載) および KL 16 株、キノロン耐性 *gyrB* 変異株 N-24, N-31 の各 *gyrB* 遺伝子から生産された GyrB 蛋白 (以後 B^{KL16}, B^{N24} および B^{N31} と記載) は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動によるチェックでは、90%以上の純度であった。(Fig. 2)。しかし、DNA スーパーコイル活性で測定した各蛋白の比活性は A^{KL16}: 2.0×10^6 単位/mg, A^{N51}: 3.6×10^6 単位/mg, B^{KL16}: 8.5×10^4 単位/mg, B^{N24}: 2.3×10^4 単位/mg, B^{N31}: 3.6×10^4 単位/mg であり、GyrB 蛋白の比活性は GyrA 蛋白の比活性の 1/20~1/100 程度であった。この結果は GyrB 蛋白標

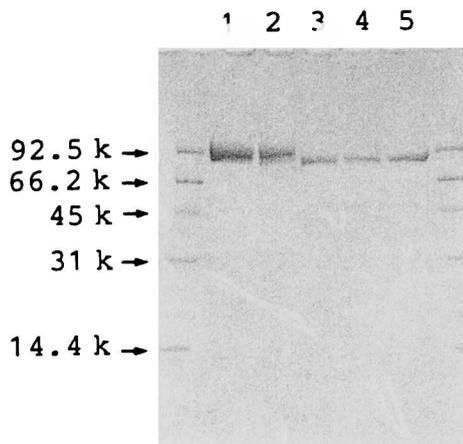


Fig. 2. SDS-polyacrylamide gel electrophoretogram of purified GyrA and GyrB proteins of *Escherichia coli*. About 1~2 μg proteins each were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. lane 1, GyrA of KL 16; lane 2, GyrA of N-51; lane 3, GyrB of KL 16; lane 4, GyrB of N-24; lane 5, GyrB of N-31.

品中には不活性蛋白が多量存在すること、GyrA 蛋白および GyrB 蛋白の比活性はいずれもキノロン耐性変異により大きく変化しないことを示している。

4. 再構成 DNA ジャイレースのキノロン感受性

Table 3 は、種々の再構成ジャイレースのスーパーコイル活性のキノロンによる阻害を 2 種のリラックス DNA を基質として調べたものである。スーパーコイル活性のキノロン感受性は、pBR 322, pHY 300 PLK いずれのプラスミド DNA を用いても大きな差は認められず、ジャイレースのキノロン感受性は DNA 分子の種類にはほとんど影響されなかった。

一方、GyrA 変異ジャイレース ($A^{N51}+B^{KL16}$) および第 1 タイプの GyrB 変異ジャイレース ($A^{KL16}+B^{N24}$) は調べたすべてのキノロンに耐性化していた。また、第 2 タイプの GyrB 変異ジャイレース ($A^{KL16}+B^{N31}$) はナリジクス酸、オキソリン酸のような酸性キノロンには耐性を示したが、エノキサシン、スパルフロキサシンのような両性キノロンには高感受性を示した。これは Table 1 および 2 に示す MIC 値から見た各変異株のキノロン感受性とよく相関している。

5. ^3H -エノキサシンとジャイレース-DNA 複合体との結合

^3H -エノキサシンのジャイレース-DNA 複合体との結合をゲル濾過法により調べた (Table 4)。ジャイレース、あるいは pBR 322 DNA 単独では、結合はほとんど見られなかった。一方、エノキサシンとジャイレース-DNA 複合体との結合は、GyrA 変異ジャイレース ($A^{N51}+B^{KL16}$) では野生型の場合とほぼ同量のエノキサシンの結合が見られたが、結合親和性は 1/10 に低下していた。第 1 タイプの GyrB 変異ジャイレース ($A^{KL16}+B^{N24}$) では野生型の約 1/7 量の結合しか見られなかった。両性キノロンには高感受性を示す第 2 タイプの GyrB 変異ジャイレース ($A^{KL16}+B^{N31}$) では結合量は野生型と同程度であったが、結合親和性は野生型より 5 倍高くなっていた。これらの変化はジャイレースのキノロン感受性の変化とよく相関している。

III. 考 察

遺伝学的解析の結果、ジャイレース上のキノロン耐性変異はキノロン耐性決定領域 (GyrA: アミノ酸番号 67-106, GyrB: アミノ酸番号 426-447) と名付けたジャイレースサブユニット上の極めて限られた領域に生じていた。GyrA のキノロン耐性決定領域は一次構造上 DNA との共有結合部位 Tyr-122¹⁹⁾ の近くにあるが、このこととキノロンが切断された DNA の再結

Table 3. Quinolone sensitivity of wild-type and mutant *Escherichia coli* gyrases in the supercoiling reaction

| Gyrase | Derivation of | | DNA | ID ₅₀ ($\mu\text{g/ml}$) for supercoiling | | | |
|--------------------|---------------|-------|-------------|--|---------------|----------|--------------|
| | GyrA | GyrB | | Nalidixic acid | Oxolinic acid | Enoxacin | Sparfloxacin |
| wild-type | KL 16 | KL 16 | pBR 322 | 50 | 3.13 | 3.13 | 0.39 |
| | | | pHY 300 PLK | 100 | 6.25 | 6.25 | 0.78 |
| GyrA mutant | N-51 | KL 16 | pBR 322 | >200 | 50 | 25 | 3.13 |
| | | | pHY 300 PLK | >200 | 100 | 25 | 6.25 |
| type 1 GyrB mutant | KL 16 | N-24 | pBR 322 | >200 | 100 | 25 | 3.13 |
| | | | pHY 300 PLK | >200 | 100 | 50 | 6.25 |
| type 2 GyrB mutant | KL 16 | N-31 | pBR 322 | >200 | 50 | 1.56 | 0.2 |
| | | | pHY 300 PLK | >200 | 50 | 3.13 | 0.2 |

KL16: *E. coli* KL 16 having the wild-type *gyrA* and *gyrB* genes.

N-51: *E. coli* N-51 having the mutant *gyrA* gene (Ser-83 to Leu).

N-24: *E. coli* N-24 having the type 1 mutant *gyrB* gene (Asp-426 to Asn).

N-31: *E. coli* N-31 having the type 2 mutant *gyrB* gene (Lys-447 to Glu).

pBR 322 and pHY 300 PLK: plasmids for *E. coli* and *B. subtilis*, respectively.

Table 4. Binding of ³H-enoxacin with the gyrase-DNA complexes

| Reconstituted gyrase | EcoRI-cleaved pBR 322 DNA | ³ H-Enoxacin bound (pmol) | Kd* (M) |
|---|------------------------------|---|------------------------|
| Wild type | | | |
| (GyrA ^{KL16} +GyrB ^{KL16}) | + | 0.62 | ca. 5×10 ⁻⁷ |
| | - | ≤0.025 | |
| GyrA mutant | | | |
| (GyrA ^{NS1} +GyrB ^{KL16}) | + | 0.63 | ca. 5×10 ⁻⁸ |
| | - | ≤0.046 | |
| Type 1 GyrB mutant | | | |
| (GyrA ^{KL16} +GyrB ^{N24}) | + | 0.091 | - |
| | - | ≤0.023 | |
| Type 2 GyrB mutant | | | |
| (GyrA ^{KL16} +GyrB ^{N31}) | + | 0.53 | ca. 1×10 ⁻⁷ |
| | - | ≤0.071 | |
| No gyrase | + | ≤0.065 | |

* Kd values for the binding of enoxacin were estimated by Scatchard plot analyses.

合を阻害する事実^{1,2)}を考えあわせると、両者は立体構造的にも隣接している可能性が高い。GyrBのキノロン耐性決定領域はDNAトポイソメラーゼII'のサブユニットであるν蛋白(GyrBのC末端断片)^{17,20)}のN末端側に位置するが、このことはDNAトポイソメラーゼII'活性がキノロン薬により阻害される事実²¹⁾と関係があるのかもしれない。キノロン耐性決定領域はコンピューター解析によりいずれも蛋白質の表層部位に位置し、変異によりそれらの局所高次構造や荷電状態が変化することが推定された。

野生型および変異型GyrAおよびGyrB蛋白を遺伝子工学的に大量生産し、高度に精製してスーパーコイル活性を測定すると、野生型、変異型のGyrA蛋白はいずれも2~4×10⁶単位/mgの高い比活性を示したが、GyrB蛋白2~9×10⁴単位/mgの相対的に低い比活性を示した。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動では、いずれの蛋白も90%以上の純度なので、精製不十分なため比活性が低い可能性は少ない。GyrB蛋白は大量発現時に不溶化するの、その抽出操作の際に不活性体ができやすいのかもしれない。キノロン耐性変異により各サブユニットの比活性があまり変わらないことは、それらの変異がスーパーコイル活性自体には大きな影響をおよぼさないことを示している。

再構成した野生型、変異型ジャイレースのキノロン感受性を2種のDNAを基質として測定したところ、

いずれのジャイレースのキノロン感受性もDNAの種類に関係なくほぼ同じであった。DNAの種類により切断部位の塩基配列は異なると推測されるので、この結果はDNA切断部位の塩基配列がジャイレースのキノロン感受性にはほとんど影響しないことを示唆している。一方、ジャイレースのキノロン感受性はジャイレースの種類およびキノロン薬の種類により大きく変化した。すなわちGyrA変異ジャイレースおよび第1タイプのGyrB変異ジャイレースは調べたすべてのキノロンに耐性化していたが、第2タイプのGyrB変異ジャイレースは酸性キノロンに耐性化すると同時に両性キノロンには高感受性化していた。これは対応するキノロン耐性変異株のキノロンによる増殖阻害に関する変化と同一方向の変化である。また、各キノロン薬のID₅₀値はMIC値とよく相関していた。したがって、ジャイレースのキノロン感受性はサブユニットの変異とキノロン薬の種類に依存していると考えられる。

³H-エノキサシンとジャイレース-DNA複合体の結合をゲル濾過法により調べた結果、各変異型ジャイレースのキノロン感受性の変化は、ジャイレース-DNA複合体のキノロン親和性あるいは結合量の変化と相関していることが判明した。また、用いた実験条件下では、³H-エノキサシンはDNA単独、ジャイレース単独とはほとんど結合せず、ジャイレース-DNA複合体にキノロン結合部位の出現することが再確認され

た。

DNA ポケットモデル⁹⁾とキノロンポケットモデル¹⁰⁾はキノロン-ジャイレース-DNA 三者複合体が形成される点では一致しているが、分子レベルの相互作用様式は互いに異なっている。すなわち、前者ではキノロンは切断された DNA の一本鎖部分の塩基と水素結合すると共にキノロン分子同志の重なり合いにより相互作用が強められると考えるのに対し、後者では DNA との結合は否定しないものの、キノロンとジャイレースサブユニットとの相互作用がより重要であると考えるのである。サブユニット上の変異によりキノロンのジャイレース-DNA 複合体への結合量あるいは親和性が大きく変化するという今回の実験結果は、キノロンとジャイレースサブユニットとの相互作用の存在を強く示唆している。

キノロンと GyrB 蛋白との分子レベルの結合様式に関し、我々はさきにキノロンの 7 位ピペラジニル基と GyrB 蛋白の 426 番目のアスパラギン酸 (第 2 タイプの変異 GyrB 蛋白では 447 番目のグルタミン酸の可能性もある。) のカルボキシル基とのイオン結合の可能性を指摘している¹⁰⁾。第 1 タイプ GyrB 変異ジャイレース (GyrB の 426 番目のアスパラギン酸がアスパラギンになることにより負荷電が消失する) ではエノキサシン結合性が低下し、第 2 タイプ GyrB 変異ジャイレース (GyrB の 447 番目のリジンがグルタミン酸になることにより正荷電から負荷電への変化が見られる) ではエノキサシン結合親和性が高くなるという今回の結果は、この可能性を実験的に裏付けるものである。キノロンと GyrA 蛋白との分子レベルの結合様式については今のところ不明であるが、GyrA 変異ジャイレース (GyrA の 83 番目のセリンがロイシンになっている) ではエノキサシン結合親和性が低下していることから、83 番目のセリン周辺のアミノ酸との結合の可能性が高い。

分子レベルの結合様式については今後さらに検討する必要があるが、現在までに得られている種々の実験結果はキノロンポケットモデルを強く支持している。

これらの一連の研究は大日本製薬(株)生物科学研究所の坊垣真弓、中村美佳、小島 毅、伊藤秀明、および山岸純一氏との共同研究である。御指導頂いた服部宏昭微生物研究部長、中村信一生物科学研究所長に深謝致します。

文 献

1) Gellert M, Mizuuchi K, O'Dea M H, Ito T, Tomizawa J: Nalidixic acid resistance: a second genetic character involved in DNA gyrase activ-

- ity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4772~4776, 1977
- 2) Sugino A, Peebles C L, Kreuzer K N, Cozzarelli N R: Mechanism of action of nalidixic acid: purification of *Escherichia coli* *nalA* gene product and its relationship to DNA gyrase and a novel nicking-closing activity. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 4772~4776, 1977
- 3) Wolfson J S, Hooper D C, Swartz M N: Mechanism of action of and resistance to quinolone antimicrobial agents. In Quinolone antimicrobial agents (Wolfson J S, Hooper D C eds.), p 5~34, American Society for Microbiology, Washington, D.C. 1989
- 4) Shen L L, Pernet A G: Mechanism of inhibition of DNA gyrase by analogues of nalidixic acid: the target of the drugs is DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 307~311, 1985
- 5) Shen L L, Kohlbrenner W E, Weigl D, Baranowski J: Mechanism of quinolone inhibition of DNA gyrase. J. Biol. Chem. 264: 2973~2978, 1989
- 6) Shen L L, Mitscher L A, Sharma P N, O'Donnell T J, Chu D W T, Cooper C S, Rosen T, Pernet A G: Mechanism of inhibition of DNA gyrase by quinolone antibacterials: a cooperative drug-DNA binding model. Biochemistry 28: 3886~3894, 1989
- 7) Yoshida H, Kojima T, Yamagishi J, Nakamura S: Quinolone-resistant mutations of the *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 211: 1~7, 1988
- 8) Yamagishi J, Yoshida H, Yamayoshi M, Nakamura S: Nalidixic acid-resistant mutations of the *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Mol. Gen. Genet. 204: 367~373, 1986
- 9) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Nakamura S: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 34: 1271~1272, 1990
- 10) Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanka L M, Nakamura S: Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 35: 1647~1650, 1991
- 11) Wilkie N M, Clements J B, Boll W, Mantei N, Lonsdale D, Weissmann C: Hybrid plasmids containing an active thymidine kinase gene of Herpes simplex virus I. Nucleic Acids Res. 7: 859~877, 1979
- 12) Holmes D S, Quigley M: A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. Anal. Biochem. 114: 193~197, 1981
- 13) Messing J: New M 13 vectors for cloning. Methods in Enzymol. 101: 20~78, 1983

- 14) Miller J H: Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N Y, 1972
- 15) 日本化学療法学会: 最小発育阻止濃度 (MIC) の測定法改定について。Chemotherapy 29: 76~79, 1981
- 16) Yamada M, Furutani Y, Notake M, Yamagishi J, Yamayoshi M, Fukui T, Nomura H, Komiya M, Kuwashima J, Nakano K, Sohmura Y, Nakamura S: Efficient production of human tumor necrosis factor in *Escherichia coli*. J. Biotechnol. 3: 141~153, 1985
- 17) Gellert M, Fisher L M, O'Dea M H: DNA gyrase: purification and catalytic properties of a fragment of gyrase B protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 6289~6293, 1979
- 18) Sato K, Inoue Y, Fujii T, Aoyama H, Inoue M, Mitsuhashi S: Purification and properties of DNA gyrase from a fluoroquinolone-resistant strain of *Escherichia coli*. Antimicrob. Agents Chemother. 30: 777~780, 1986
- 19) Horowitz D S, Wang J C: Mapping the active site tyrosine of *Escherichia coli*. DNA gyrase. J. Biol. Chem. 262: 5339~5344, 1987
- 20) Adachi T, Mizuuchi M, Robinson E A, Appella E, O'Dea, Gellert M, Mizuuchi K: DNA sequence of the *E. coli gyrB* gene: application of a new sequencing strategy. Nucleic Acids Res. 15: 771~784, 1987
- 21) Brown P O, Peebles C L, Cozzarelli N R: A topoisomerase from *Escherichia coli* related to DNA gyrase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 6110~6114, 1979

Mechanism of action of quinolones on *Escherichia coli* DNA gyrase

Hiroaki Yoshida

Bioscience Research Laboratories, Dainippon Pharmaceutical Co., Ltd.,
Enoki 33-94, Suita, Osaka 564, Japan

Seven point mutations were detected in 10 quinolone-resistant *gyrA* mutants of *Escherichia coli* KL 16, i.e., Ser-83 to Leu (4 strains), Ser-83 to Trp, Asp-87 to Asn, Gly-81 to Cys, Ala-84 to Pro, Ala-67 to Ser and Gln-106 to His. Among 13 quinolone-resistant *gyrB* mutants of *E. coli* KL 16, 2 point mutations were detected, Asp-426 to Asn (9 strains) and Lys-447 to Glu (4 strains). The former mutation (type 1) confers resistance to all the quinolones tested, while the latter mutation (type 2) results in resistance to acidic quinolones and hypersusceptibility to amphoteric quinolones. Almost all the *gyrA* and *gyrB* mutations are believed to occur on protein surfaces, based on computer analysis. Mutant DNA gyrases reconstituted from wild-type GyrA (or GyrB) and mutant GyrB (or GyrA) proteins were resistant to or hypersensitive to quinolones as expected from the MICs for the corresponding mutants. ³H-enoxacin was bound to gyrase-DNA complexes but not to gyrase alone or to DNA alone. The amount of enoxacin bound to the GyrA mutant gyrase-DNA complex was the same as that bound to the wild-type gyrase-DNA complex, but the binding affinity to the former was one-tenth of the binding to the latter. The amount of enoxacin bound to the type 1 GyrB mutant gyrase-DNA complex was one-seventh that bound to the wild-type complex. Enoxacin was bound to the type 2 GyrB mutant gyrase-DNA complex in the same amount as to the wild-type complex with five-times greater affinity for the former than the latter. These data suggest that quinolone-resistance of DNA gyrase can be explained by the decreased amount of quinolone binding or decreased quinolone binding affinity to gyrase-DNA complexes.