

【原著・基礎】

ヨウ素標識 penicillin V を用いたペニシリン結合蛋白の簡易迅速検出法

松本 佳巳¹⁾・石黒 香里¹⁾・俵 修一¹⁾・吉沢 幸夫²⁾¹⁾ 藤沢薬品工業株式会社新薬研究所*²⁾ 東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター

(平成 8 年 11 月 25 日受付・平成 8 年 12 月 20 日受理)

β -Lactam 薬の標的酵素ペニシリン結合蛋白 (PBPs) の検出法として、ヨウ素標識 penicillin V ($[^{125}\text{I}]$ PCV) を用いた簡易迅速法を考案した。 $[^{125}\text{I}]$ PCV の合成は、p-(trimethylstannyl) PCV を $[^{125}\text{I}]$ Na と反応させることにより容易に行うことができる。 $[^{125}\text{I}]$ PCV の検出は X 線フィルムに比べ高感度なイメージングプレート (IP) を用いるラジオリミノグラフィ (RLG) により行った。本法を膜面分調製時の超遠心の省略、96 ウェルマイクロプレートによる反応ステップの簡易化、ミニゲル電気泳動による泳動時間の短縮と組み合わせることにより PBPs 結合親和性を簡略かつ迅速に (3 日以内) 測定することができた。 $[^{125}\text{I}]$ PCV を用いて得られた PBPs の電気泳動像は、 $[^{14}\text{C}]$ penicillin G ($[^{14}\text{C}]$ PCG) で得られたパターンと類似していた。また、 $[^{125}\text{I}]$ PCV を用いて測定した cefoselis (FK037) と imipenem/cilastatin (IPM/CS) の PBPs 結合親和性は $[^{14}\text{C}]$ PCG を用いたときと大きく変わらず、本法は有用な代替法となると考えられた。

Key words: ペニシリン結合蛋白 (PBPs), $[^{125}\text{I}]$ Penicillin V, ラジオリミノグラフィ, 簡易迅速法

β -Lactam 系抗菌薬の作用点であるペニシリン結合蛋白 (PBPs) の検出は、従来 $[^{14}\text{C}]$ penicillin G ($[^{14}\text{C}]$ PCG) や $[^3\text{H}]$ PCG を用いたフルオログラフィにより行われている^{1,2)}。しかし、 ^{14}C は半減期が長いために比放射能が低く、 ^3H は放出される β 線のエネルギーが低いという欠点を持っている。そのため、実験操作が複雑なうえ、結果の判定に時間がかかることから PBPs 結合親和性の測定は重要性が高い割にはあまり実施されていないのが現状である。

半減期が短く放射線の検出しやすい ^{125}I で標識したペニシリンを用いれば、検出感度が飛躍的に向上し、短期間で結果が得られることは容易に想像できるが、市販の標識化合物がないことや、 ^{125}I を用いる際の技術的あるいは設備的問題からほとんど検討されていない。最近、p-(trimethylstannyl) Penicillin V (TMS-PCV) を $[^{125}\text{I}]$ Na と反応させることによりきわめて簡単に $[^{125}\text{I}]$ Penicillin V ($[^{125}\text{I}]$ PCV) を合成できることが示された³⁾。 $[^{125}\text{I}]$ PCV は PCG と構造的に大きく変わらず、 $[^{14}\text{C}]$ PCG や $[^3\text{H}]$ PCG に代えて $[^{125}\text{I}]$ PCV を用いても同様の PBPs 結合親和性のデータが得られる可能性が高いと考えられたため、 $[^{125}\text{I}]$ PCV による結果を $[^{14}\text{C}]$ PCG による結果と比較検討した。さらに、PBPs 結合親和性測定の汎用化を目的として、膜面分調製および反応ステップの簡略化、RLG による $[^{125}\text{I}]$ PCV の検出を試みた。RLG は従来の X 線フィルムに比べ約 100 倍高感度で定量性に優れた IP (富士フィルム) を用いた放射線測定法⁴⁻⁶⁾であり、従来法に比べ、PBPs 結合親和性を簡単迅速

かつ精度良く測定できると考えられた。

I. 材料と方法

1. $[^{125}\text{I}]$ Penicillin V

Blaszczak L C らの方法³⁾に準じ、Iodo-gen (Pierce chemical company, illinois)⁷⁾ 100 μg をコートした試験管中で p-(trimethylstannyl) PCV (藤沢薬品工業・新薬研究所) を $[^{125}\text{I}]$ Na と 30 分反応させ合成した (Fig. 1)。得られた原液は TLC でチェックした後 -80°C に保存し、要時に比放射能とペニシリンの濃度を $[^{14}\text{C}]$ PCG のそれらに合わせるように非放射性の I PCV

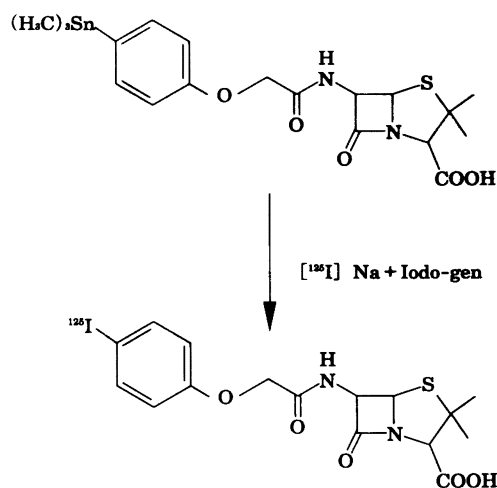


Fig. 1. Synthesis of $[^{125}\text{I}]$ Penicillin V.

溶液で希釈した。

2. 膜画分の調製

指数増殖期まで Trypticase Soy broth (BBL) で振盪培養した菌体を超音波破碎 (Insonator; Kubota) し、7,000 rpm, 4℃ で 10 min 遠心した上清, あるいはさらに 38,000 rpm, 4℃ で 1 h 遠心した沈査を再懸濁したものを膜画分とした。

Streptococcus pneumoniae の培養には 5% horse serum 加 Todd Hewitt broth を用いた。

3. PBP_s結合親和性の測定

反応は 96 ウェルマイクロプレート中で行った。膜画分 10 μl に各濃度の被検薬 1 μl を加え 10 分間 30℃ で反応後, ¹²⁵I あるいは ¹⁴C で標識したペニシリンを 2 μl 加えさらに 10 分間 30℃ でインキュベートした。10% Salkosyl 1 μl を加え室温で 20 分放置した後, 遠心せずに loading buffer 7.5 μl と β-mercaptoethanol 2.5 μl を加えた。ミニゲル電気泳動装置 (ATTO) を用い、25 mA/plate で 1.5 時間 SDS-PAGE を行った。泳動後のゲルを 50% メタノール 7% 酢酸で 20 分間固定した後, 5% メタノール 7% 酢酸で一度洗って乾燥させて IP に 1~7 日間曝射した。得られた結果は BAS 2000 システム (富士フィルム) で解析した。

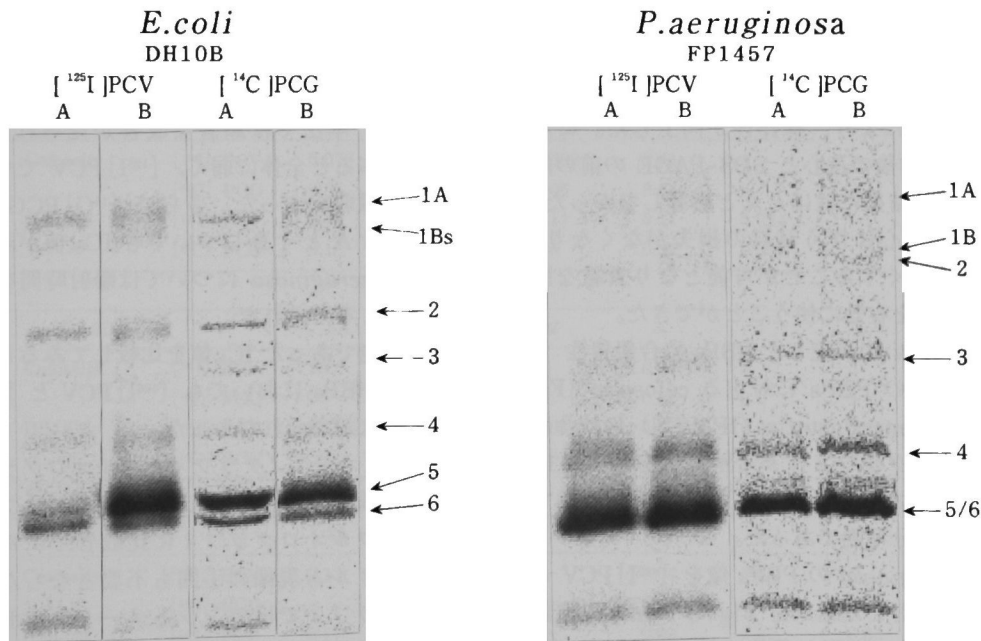
II. 結 果

1. 膜画分の超遠心の影響

超遠心による膜画分調製は手間と時間がかかることから, もっとも省略するメリットの大きいステップで

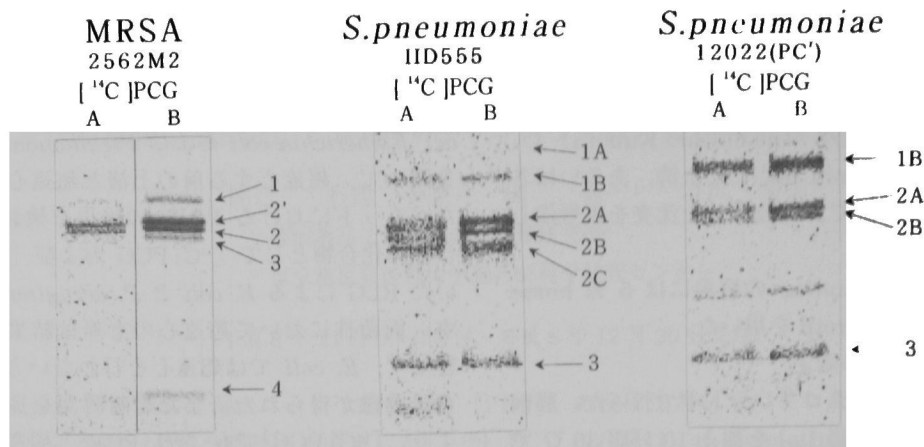
ある。従来法では超遠心による膜画分の濃縮精製は不可避であったが, 感度を上げることにより省略が可能であると考えられた。そこで, MRSA, *S. pneumoniae*, *Escherichia coli* および *Pseudomonas aeruginosa* を用いて, 超遠心する前の上清と超遠心して再懸濁したペレットにおける PBP_s の検出を検討した。Fig. 2 に標識化合物として [¹⁴C]PCG および [¹²⁵I]PCV を用いた RLG による *E. coli* と *P. aeruginosa* の結果を示す。両菌株において超遠心の有無は結果にほとんど影響せず, *E. coli* では超遠心を行わない方がむしろ明瞭な泳動像が得られた。また曝射時間を長くすることにより, [¹⁴C]PCG でも [¹²⁵I]PCV と同程度の画像強度が得られた。Fig. 3 にはグラム陽性菌である MRSA と *S. pneumoniae* の [¹⁴C]PCG による結果を示す。これらの菌株, 特に MRSA においては超遠心を行うことにより PBP が濃縮される傾向があり, 同じ曝射時間では超遠心した膜を用いた方が鮮明な画像が得られた。グラム陽性菌ではグラム陰性菌に比較して PBP_s 量が元来多い傾向にあり, 超遠心で濃縮するまでもなくグラム陰性菌よりも短時間で PBP_s が検出できることから, これらの菌種においても超遠心を省略しても大きな問題はないと判断した。RLG を用いれば, 明瞭なバンドを得るまでに要する時間には差があるものの, [¹⁴C]PCG でラベルした時も [¹²⁵I]PCV でラベルした時も超遠心による膜画分の濃縮精製は省略が可能であった。

2. 反応ステップの簡略化の影響



A : Before ultracentrifugation
B : After ultracentrifugation

Fig. 2. Differences observed between PBP_s labeled with [¹²⁵I]PCV and [¹⁴C]PCG in *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*: Effect of ultracentrifugation.



A : Before ultracentrifugation
B : After ultracentrifugation

Fig. 3. Differences observed between PBPs labeled with [^{14}C]PCG in MRSA and *Streptococcus pneumoniae*: Effect of ultracentrifugation.

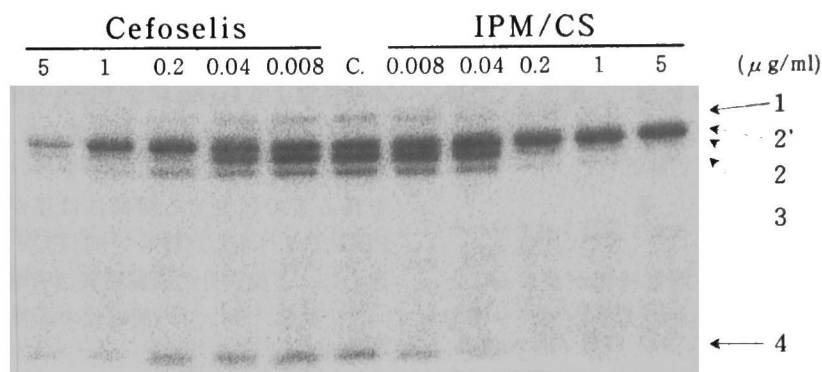


Fig. 4. Affinity of cefoselis and imipenem for PBP2 of MRSA 2562M2.

反応をマイクロチューブに換えて 96 ウェルマイクロプレートで行うことにより、操作性が向上した。これに伴い Salkosyl 添加後の遠心と SDS-PAGE の前の熱処理を省略したが、結果にはほとんど影響しなかった。また、この改変で遠心に伴う試料の損失がなくなり、反応液の容量を小さくすることが可能となり貴重な膜画分やアイソトープを有効に使うことができた。

3. [^{125}I]PCV を用いて測定した PBPs 結合親和性

Fig. 4 に MRSA の PBPs に対する cefoselis (FK 037) および imipenem cilastatin (IPM/CS) の結合親和性のラジオルミノグラフィによる解析像を示す。14 時間曝射後の結果であるが、すべてのバンドが検出でき IC_{50} 値の計測が十分可能であった。

E. coli と *P. aeruginosa* の PBPs 像を [^{125}I]PCV と [^{14}C]PCG で比較検討した結果を Fig. 5 に示す。標識化合物の違い以外はすべて同じ条件で行い、 ^{125}I は 1 日、 ^{14}C は 7 日間 IP に曝射した。 [^{125}I]PCV と [^{14}C]PCG において両菌株で泳動パターンはほぼ同様であったが、わずかに 1 日間の曝射にもかかわらず [^{125}I]PCV の方がバンドが全体的に濃い結果であった。*P. aeruginosa* の

膜の PBPs 活性は弱く、従来法では感光に数か月を要していた。本法では顕著な改善が見られたものの *E. coli* に比べると全体に弱く、 [^{125}I]PCV でも PBP 2 のバンドは微弱であった。さらに [^{14}C]PCG では分子量の大きな 1A と 1B についても IC_{50} 値が計測できなかった。*P. aeruginosa* については曝射時間を延長する必要があると考えられた。

計測可能であった IC_{50} 値を比較してみると (Table 1)、いずれの PBPs においても [^{125}I]PCV と [^{14}C]PCG で大きな差は認められなかった。

4. ラジオルミノグラフィとフルオログラフィの比較

今回の検討はすべてラジオルミノグラフィにより行ったが、フルオログラフィに比較し、ゲルの後処理が簡単でフィルム現像の手間も不要となった。また、フルオログラフィではデンストメーターで測定したバンドの濃さは頭打ちになりやすく定量性に乏しかったが、IP では放射能をより広い範囲にわたり正確に測定することが可能であり、定量性が高まった。

III. 考 察

β -Lactam 薬の抗菌力を左右する因子には、1. PBPs

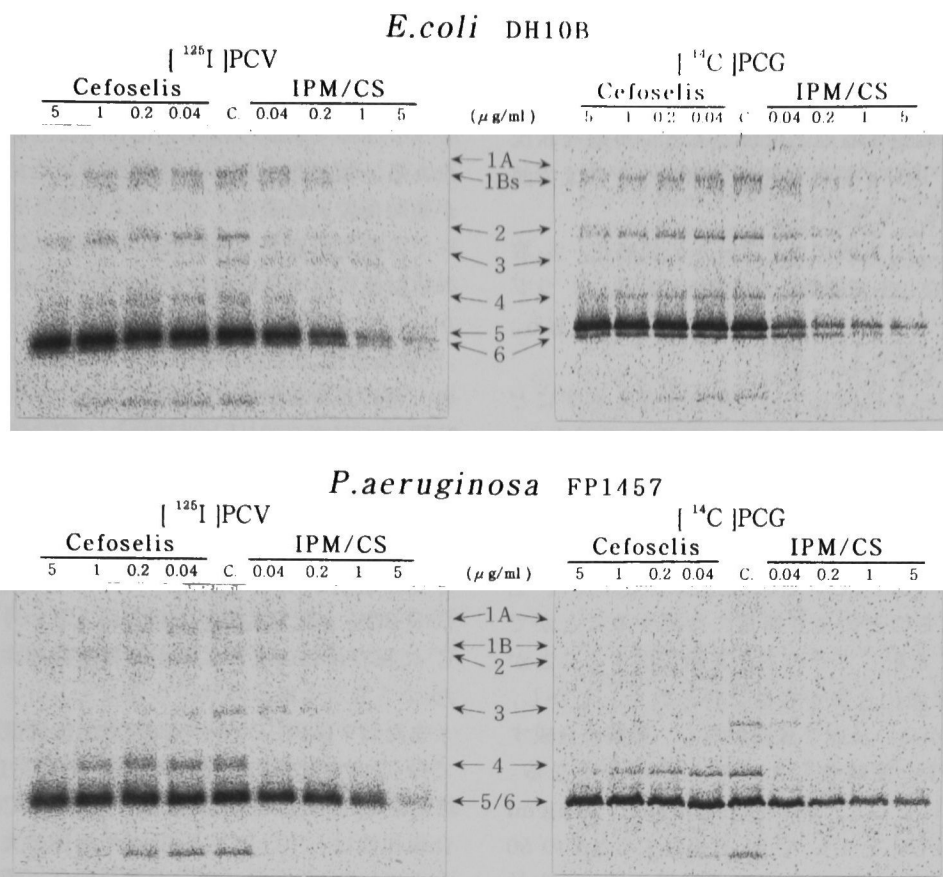


Fig. 5. Affinity of cefoselis and imipenem for PBP_s of *Escherichia coli* DH10B and of *Pseudomonas aeruginosa* FP1457.

Table 1. Comparison of IC₅₀ values obtained from assays using [¹²⁵I]PCV and [¹⁴C]PCG

(IC₅₀: μg/ml)

		PBP _s						
MRSA		1	2'	2	3	4		
Cefoselis	[¹²⁵ I] PCV	0.076	1.65	0.068	0.31	>5		
	[¹⁴ C] PCG	0.07	3	0.06	0.58	>5		
IPM/CS	[¹²⁵ I] PCV	0.16	>5	0.11	0.11	0.024		
	[¹⁴ C] PCG	0.16	>5	0.5	0.22	0.051		
		PBP _s						
<i>E. coli</i>		1A	1Bs	2	3	4	5	6
Cefoselis	[¹²⁵ I] PCV	1.2	1.1	>5	<0.04	>5	>5	>5
	[¹⁴ C] PCG	2.7	1.5	>5	<0.04	3.9	>5	>5
IPM/CS	[¹²⁵ I] PCV	0.115	0.31	<0.04	>5	<0.04	0.25	0.53
	[¹⁴ C] PCG	0.17	0.31	0.04	>5	<0.04	0.13	0.62
		PBP _s						
<i>P. aeruginosa</i>		1A	1Bs	2	3	4	5/6	
Cefoselis	[¹²⁵ I] PCV	0.13	3	-	<0.04	1.6	>5	
	[¹⁴ C] PCG	-	-	-	<0.04	1.45	>5	
IPM/CS	[¹²⁵ I] PCV	0.17	0.20	-	0.09	<0.04	0.85	
	[¹⁴ C] PCG	-	-	-	<0.04	<0.04	0.70	

- : not calculated

IPM/CS: imipenem cilastatin

結合親和性, 2. β -lactamase 安定性, 3. 外膜透過性の3つが考えられている。なかでももっとも重要であるにもかかわらず, PBP_s 結合親和性はその測定法の煩雑さ故にルーチンに測定することはほとんど不可能な状況にある。そこで PBP_s 結合親和性の測定をどこまで簡略・迅速化できるかを検討した。

主な改良点は, 1. 実験プロトコルの簡略化, 2. 放射能測定の容易な ^{125}I で標識した PCV の利用, 3. ラジオルミノグラフィによる放射線の測定の3つである。まず個々について述べる。

実験プロトコルに関しては, 精度を落とさずにとどこまで省略できるかに観点を置いて簡略化を試みた。ほとんどの改良点は従来法にも応用可能であるが, 超遠心による膜画分の精製の省略はラジオルミノグラフィによる感度の上昇に負うところが大きい。

^{125}I PCV は TMS-PCV を Iode-gen 存在下で ^{125}I Na と反応させることにより簡単に合成することができ, 精製せずに希釈してそのまま実験に供することができる純度の標識化合物が容易に得られた。しかし, ^{125}I は放射活性が高い反面半減期が短く, 頻繁に合成するとなれば操作を簡略化したメリットがなくなる。Blaszczak ら³⁾によると, 387.5 GBq/mMol, 28 $\mu\text{g/ml}$ の濃度の ^{125}I PCV を 4°C で 21 日保存するとその 50% が分解するとされている。この半減期では, 1 か月毎にヨードラベルを行う必要があり, あまり実用的でないと考えられた。その後, Preston らは, 4°C で 60 日間は使用に耐えることを示した⁸⁾が, PCV の濃度低下により泳動パターンに影響が出ることが推測された。そこで, ラベルに用いる TMS-PCV の量を少なくして比活性の高い ^{125}I PCV を合成した。これを小分けしてドライアイスエタノールで瞬間凍結後 -80°C に保存し, 要時溶解して ^{125}I の半減期を加味し非放射性的の

IPCV で適当な濃度に希釈して用いるようにした。この方法で保存した場合, 約半年間は使用に耐え頻繁にラベルする必要はなくなった。

ラジオルミノグラフィを用いることによる利点は3点ある。増感剤を用いる必要がないためゲルの後処理が短時間で済むこと, フィルム現像とデンシトメーターでの測定が不要で後の解析が容易なこと, そして IP の放射能に対する直線性が良いため定量性が X 線フィルムに比べ格段に優れていることである。

Table 2 に改良法の従来法との比較を示した。改良法の一番の長所は時間の短縮にあり, 試料調製に要する時間が 4 日から 2 日と半減され, IP へのゲルの曝射時間が数時間から 1 日で十分であり 1/20 以下に短縮された。*P. aeruginosa* についてはまだ十分とは言えないが, 従来法に比較すると著明に改善されており, 曝射時間を少し延長することにより対応できると考えられる。 ^{125}I PCV が化学的に不安定であるという欠点も, -80°C に保存することによりある程度緩和することができた。

また ^{125}I PCV で得られた電気泳動像は ^{14}C PCG で得られたパターンと類似しており, ^{125}I PCV を用いて測定した cefoselis (FK037) と IPM/CS の PBP_s 結合親和性は ^{14}C PCG を用いたときと大きく変わらなかった (Table 1) ので, ^{14}C PCG の代わりに ^{125}I PCV を用いても問題ないと考えられた。

検出感度をさらに上げる試みとして, 比活性の高い ^{125}I PCV を用いて同様の検討を行った結果, 著しい感度の上昇が見られたが, 得られた PBP_s のパターンは ^{14}C PCG を用いた時と一部食い違いが見られた (Data not shown)。これは, 放射活性を一定にしたときの ^{125}I PCV の濃度が ^{14}C PCG に比べて極端に低くなるために, ペニシリンの PBP_s へのアフィニティ

Table 2. Comparison of the new method with the ordinary method

	Simple and rapid method	Ordinary method
Labeled penicillin	^{125}I PCV	^{14}C PCG or ^3H PCG
Preparation of membrane	no ultracentrifugation	38,000rpm, 1 h, 1~2 times
Reaction	96-well micro titer plate, no centrifugation	micro tube, 10,000 rpm 15 min
Electrophoresis	mini-gel: 11 cm \times 9 cm 1.5 h.	gel size: 15 cm \times 18 cm 6 h.
Detection of radioactivity	radioluminography	fluorography
IC ₅₀ -assay	BAS 2000	densitometer
Period (experiment)	2 days	4 days
(exposure)	1~3 days	7~60 days
Advantages	<ul style="list-style-type: none"> · simple and easy · rapid · high quantity 	<ul style="list-style-type: none"> · labeled compounds are available · stable (long half-life)
Disadvantages	<ul style="list-style-type: none"> · unstable (short half-life) · labeled compound not available 	<ul style="list-style-type: none"> · complicated · time-consuming · low quantity

の強弱が増幅された結果であることが推測された。PBP を高感度にかつ安全に検出するために、蛍光⁹⁾や digoxigenin¹⁰⁾, biotin¹¹⁾ を結合させたペニシリンも検討されているが、いずれも分子が大きくなるため PBP 結合親和性が異なる可能性が考えられ、PCG では検出されないバンドが見られたりバンドの強弱に違いが見られている。目的によっては、それらも有用であると考えられ、簡略化したプロトコールが適応できればさらに迅速な方法が可能になると思われる。

今回の検討はあくまでも簡易迅速化に焦点をおき、短時間で IC₅₀ 値が測定できることを目指した結果、必ずしも画像の鮮明度は満足できるものではなかった。特に [¹²⁵I]PCV は、放射活性が強いためバンドの境界が不鮮明になりやすい傾向がみられた。鮮明画像を追求する方法は、簡易迅速化をある程度犠牲にすれば従来法との組み合わせにより可能である。すなわち、本法は部分的に従来法に応用することができ、[¹²⁵I]PCV が使えない状況においても [¹⁴C]PCG を用いたラジオルミノグラフィによりかなりの時間短縮が可能となる。本法にも上記のような欠点はあるが、煩雑で時間のかかる PBP 結合親和性測定を簡易迅速化できたことで、β-lactam 薬の作用機作、耐性機作の研究への応用の機会が増えることが期待される。

本論文は、第 43 回日本化学療法学会総会 (1995 年 6 月) において発表し、編集委員会より学会誌に投稿するよう推薦を受けたものである。

文 献

- 1) Spratt B G, Parsee A B: Penicillin-binding proteins and cell shape in *E.coli*. *Nature* 254: 516~517, 1975
- 2) Williamson R, Tomasz A: Antibiotic-tolerant

mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are not deficient in autolytic activity. *J.Bacteriol.* 144: 105~113, 1980

- 3) Blaszcak L C, Halligan N G, Seitz D E: Radioiododestannylation. Convenient synthesis of a stable penicillin derivative for rapid penicillin binding protein (PBP) assay. *J.Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals* 27: 401~406, 1988
- 4) Amemiya Y, Miyahara J: Imaging plate illuminates many fields. *Nature* 336: 89~90, 1988
- 5) 浜岡 勤: X 線フィルムを使わない新時代のオートラジオグラフィー. *細胞工学* 9: 456~462, 1990
- 6) 吉沢幸夫, 古田悦子, 名竹孝志, 他: Floating Radioluminography. *RADIOISOTOPES* 45: 161~165, 1996
- 7) Fraker P J, Speck J C Jr: Protein and cell membrane iodinations with a sparingly soluble chloroamide, 1, 3, 4, 6-tetrachloro-3a, 6a-diphenylglycoluril. *Biochem.biophysic.research commu.* 80: 849~857, 1978
- 8) Preston D A, C Y E Wu, Blaszcak et al: Biological characterization of a new radioactive labeling reagent for bacterial penicillin-binding proteins. *Antimicrob.Agents Chemother.* 34: 718~721, 1990
- 9) Galleni M, Lakaye B, Lepage S, et al.: A new, highly sensitive method for the detection and quantification of penicillin binding proteins. *Biochem.J.* 291: 19~21, 1993
- 10) Weigel L M, Belisle J T, Radolf J D, et al.: Digoxigenin-ampicillin conjugate for detection of penicillin-binding proteins by chemiluminescence. *Antimicrob. Agents Chemoth.* 38: 330~336, 1994
- 11) Dargis M, Malouin F: Use of biotinylated β-lactams and chemiluminescence for study and purification of penicillin-binding proteins in bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 38: 973~980, 1994

A simple and rapid method for detecting penicillin-binding proteins using ^{125}I -labeled penicillin V

Yoshimi Matsumoto¹⁾, Kaori Ishiguro¹⁾, Shuichi Tawara¹⁾
and Yukio Yoshizawa²⁾

¹⁾ New Drug Research Laboratories, Fujisawa Pharmaceutical Co., Ltd., Osaka, Japan

²⁾ Isotope Research Center, The Jikei University School of Medicine

A simple and rapid method to detect target enzymes of β -lactams (the penicillin-binding proteins (PBPs)), using ^{125}I -labeled penicillin V (^{125}I PCV) was constructed. ^{125}I PCV was easily synthesized by incubation of p-trimethylstannyl PCV with ^{125}I Na. ^{125}I PCV was detected by radioluminography (RLG) using an imaging plate (IP) which is more sensitive than an X-ray film. Use of ^{125}I based RLG in combination with a preparation of a membrane fraction without ultracentrifugation, and use of a 96-well microtiter plate and a mini-gel electrophoresis system made it possible to determine the affinity of β -lactams for PBPs easily in a short time (less than 3 days). Electrophoretic patterns of PBPs detected by ^{125}I PCV were similar to those detected by ^{14}C penicillin G (^{14}C PCG). Binding affinities of cefoselis (FK037) and imipenem/cilastatin for PBPs from MRSA and *Escherichia coli*, determined with ^{125}I PCV were similar to those determined with ^{14}C PCG. In conclusion, using ^{125}I PCV instead of ^{14}C PCG provides a useful alternative for assay of binding affinity of β -lactams for PBPs.