

緑膿菌プロテアーゼに対する matrix metalloproteinase 阻害薬の効果

古作 和寛¹⁾, 前田 尚之²⁾, 横山 富久³⁾, 井上 達也³⁾
吉田由美子³⁾, 細川 常通²⁾, 澤 充¹⁾

¹⁾ 日本大学医学部眼科学教室, ²⁾ 三共(株)安全性研究所, ³⁾ 三共(株)第一生物研究所

要 約

Matrix metalloproteinase (MMP) 阻害薬として開発された CS-610 の緑膿菌プロテアーゼに対する効果を *in vitro* で検討した。実験には緑膿菌 IID-1117, -1030, -1130 株を使用した。これらの菌株はアルカリプロテアーゼ (1143~4977 unit/ml I 型コラゲナーゼ換算等量), エラスターゼ (13.6~22.6 unit/ml I 型コラゲナーゼ換算等量) を培養液内に産生していた。培養液の zymography で CS-610 はアルカリプロテアーゼを IC₅₀

(50% inhibition concentration) = 1.06~29.0 ($\times 10^{-8}$ M), エラスターゼを IC₅₀ = 1.0 未満~33.3 ($\times 10^{-8}$ M) で阻害した。CS-610 は *in vitro* で緑膿菌プロテアーゼ阻害効果を有すると考えられた。(日眼会誌 102: 83-87, 1998)

キーワード: Matrix metalloproteinase 阻害薬, 緑膿菌, アルカリプロテアーゼ, エラスターゼ

The Effect of Matrix Metalloproteinase Inhibitor on Pseudomonal Proteinases

Kazuhiro Kosaku¹⁾, Naoyuki Maeda²⁾, Tomihisa Yokoyama³⁾, Tatsuya Inoue³⁾
Yumiko Yoshida³⁾, Tsunemichi Hosokawa³⁾ and Mitsuru Sawa¹⁾

¹⁾ Department of Ophthalmology, Nihon University School of Medicine.

²⁾ Laboratory Animal Science and Toxicology Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

³⁾ Pharmacology and Molecular Biology Research Laboratories, Sankyo Co., Ltd.

Abstract

We examined the effect of CS-610, a newly developed matrix metalloproteinase (MMP) inhibitor, on pseudomonal proteinases *in vitro*. Alkaline proteinase (1143~4977 unit/ml Type I collagenase equivalent) and elastase (13.6~22.6 unit/ml Type I collagenase equivalent) were obtained from strains of *P. aeruginosa* of IID-1117, IID-1030 and IID-1130. Zymographic analysis of cultured broth of *P. aeruginosa* demonstrated that CS-610 inhibited alkaline proteinase with

an IC₅₀ (50% inhibition concentration) of 1.06~29.0 ($\times 10^{-8}$ M) and elastase with an IC₅₀ of 1.0~33.3 ($\times 10^{-8}$ M). CS-610 is a potent inhibitor of pseudomonal proteinases. (J Jpn Ophthalmol Soc 102: 83-87, 1998)

Key words: Matrix metalloproteinase inhibitor, *Pseudomonas aeruginosa*, Alkaline proteinase, Elastase

I 緒 言

Matrix metalloproteinase (MMP) は組織細胞, 食細胞によって産生される細胞外マトリックスを構成するタンパク質を分解する酵素の総称である¹⁾。MMP は生理的条件下で生物の発生, 分化, 組織形成, 修復に関与する一方, 組織破壊を伴う疾患ではその要因となり得ることが知られている^{1,2)}。現在, MMP はその分子構造, 基質により 12 種に分類され^{1,2)}、角膜組織では実質細胞由来の MMP-2、上皮細胞由来の MMP-9 の発現が確認されている³⁾。近年, それらの創傷治癒, 角膜潰瘍への関与が注目される⁴⁾

とともに, MMP 阻害薬 (MMPI) による潰瘍治療の可能性が検討されている^{5~8)}。MMP は活性中心部に亜鉛を有することを特徴の一つとするため^{1,2)}、MMPI の多くはその構造中に亜鉛キレート分子を有する^{5~9)}。今回, 我々の検討した CS-610 はヒドロキサム酸基をキレート分子とする MMPI である^{7~9)} (図 1)。CS-610 は線維芽細胞由来コラゲナーゼ, ストロメリシンなどの内因性 MMP に高い特異性を有する⁹⁾。また, MMP と同様に活性中心に亜鉛を有し, metalloenzyme¹⁰⁾ に分類され, 角膜潰瘍と関係が深いとされる緑膿菌エラスターゼ^{11,12)} に対しても阻害効果が認められている^{8,9)}。しかし, 緑膿菌が産生しエラス

別刷請求先: 173 東京都板橋区大谷口上町 30-1 日本大学医学部眼科学教室 古作 和寛
(平成 9 年 5 月 6 日受付, 平成 9 年 9 月 11 日改訂受理)

Reprint requests to: Kazuhiro Kosaku M.D. Department of Ophthalmology, Nihon University school of Medicine.
30-1 Ouyaguchi-Kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo 173, Japan

(Received May 6, 1997 and accepted in revised form September 11, 1997)

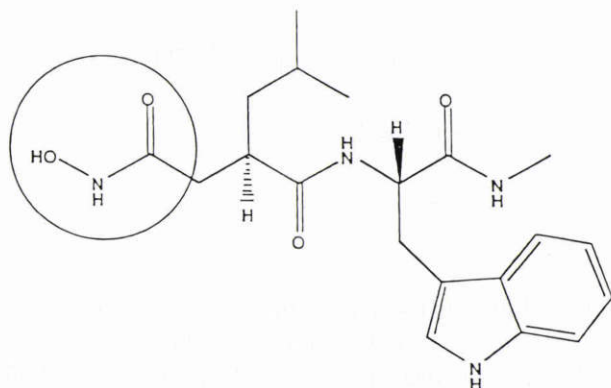


図1 CS-610の構造式.

円で囲んである部位はヒドロキシサマ酸基を示す.

ターゼと同様に,角膜潰瘍の要因であるアルカリプロテアーゼに対する効果は不明である.我々は本邦においてCS-610を角膜潰瘍治療に応用するに当たり,*in vitro*でのCS-610の緑膿菌エラスターゼ,アルカリプロテアーゼに対する効果を緑膿菌IID-1117, -1030, -1130株を用いて検討した.

II 実験方法

1. 緑膿菌培養液の調整

緑膿菌菌株(IID-1117, -1030, -1130)は東京大学医科学研究所から供与を受けた.菌を培養液(Mueller-Hinton broth 500 ml, カルシウム 50 μ g/ml, マグネシウム 20 μ g/ml)にエーゼを用いて播種し, 11 フラスコ中で 24 時間, 37 $^{\circ}$ C で振盪培養した.培養後, 培養液から菌体成分を除去するために培養液を 1,700 g, 4 $^{\circ}$ C で 30 分間遠心分離し, さらに, 上清をポアサイズ 0.45 μ m のフィルター(Falcon)で濾過した.濾過後の試料の一部をドルガルスキー培地を用いて 37 $^{\circ}$ C, 72 時間培養し, 菌の発育がないことを確認した後, 測定に用いた.測定まで培養液は分注し, -80 $^{\circ}$ C で保存した.

2. Zymography による培養液中のプロテアーゼの検出, 定量, CS-610 の阻害効果の検討

1) プロテアーゼの検出

Zymography は既報³⁾に準じて行った.0.1% のガゼイン(和光純薬), またはゼラチン(和光純薬)を含有する 100 $\times$ 100 $\times$ 1 mm 大の 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel(SDS)を用い, 各菌株から得た培養液 5 μ l を sample buffer(Tris SDS Seprazol[®], 第一化学薬品)とともに 4 $^{\circ}$ C で 200 V, 1 時間電気泳動をした.次に, 酵素活性を妨げるゲル内の SDS を置換するために 2.5% Triton X-100(和光純薬)中でゲルを 60 分間洗浄した後, 37 $^{\circ}$ C の緩衝液(50 mM Tris-HCl pH 6.8, 10 mM Ca^{2+})中で 21 時間酵素反応を行った.反応後ゲルを 0.05% の Coomassie brilliant blue R-250[®](Bio Rad)で染色し, プロテアーゼの活性を示すバンドを検出した.

2) プロテアーゼ活性の定量

各培養液 0.05, 5 μ l, I 型コラゲナーゼ(SIGMA)5, 25, 50 unit/ml 各 5 μ l を同一ゲルにおいて 1)と同様にガゼイン zymography を行った.得られたゲルをデンシトグラフ[®](アトー(株))を用いて明暗反転させた後, プロテアーゼ活性バンドをデンシトメトリーした. I 型コラゲナーゼの活性バンドの濃度から検量線を作製し, 培養液の各プロテアーゼ活性バンドの活性量を I 型コラゲナーゼ換算等量で算出した.

3) CS-610 の阻害効果の検討

各菌株の培養液 5 μ l を同一のガゼインゲルで 1)と同様に電気泳動を行った後, 酵素反応に用いる緩衝液中に CS-610 を 0, 10⁻⁸, 10⁻⁶, 10⁻⁴, 10⁻³M 添加した zymography を行った.得られた活性バンドを 2)と同様にデンシトメトリーし, CS-610 無添加の活性バンドの濃度を 100% として, CS-610 各濃度添加時における活性バンドの濃度の比率を求めて抑制曲線を作製した.グラフから活性バンドの濃度を 50% に減弱させる CS-610 の濃度, IC₅₀ (50% inhibition concentration)を算出した.

III 結果

1. Zymography によるプロテアーゼ活性の検出

IID-1117, -1030 株の培養液中には分子量 56 kDa, 33 kDa に, IID-1130 株は 56 kDa のみにゼラチナーゼおよびガゼイナーゼ活性を示すバンドを認めた(図 2 A, B).

2. プロテアーゼ活性の定量

I 型コラゲナーゼ 5~50 unit/ml において, I 型コラゲナーゼ活性バンドの濃度は酵素濃度依存性に増加を認めた(図 3).

56 kDa の活性バンドは表 1 に示すように, I 型コラゲナーゼ活性として 3 株で高値を示した.一方, 33 kDa の活性バンドは IID-1117, -1030 株の 2 種でのみ検出され, かつ, その活性度は 56 kDa の活性バンドに比べ低値であった. IID-1130 株から 33 kDa の分子量にプロテアー

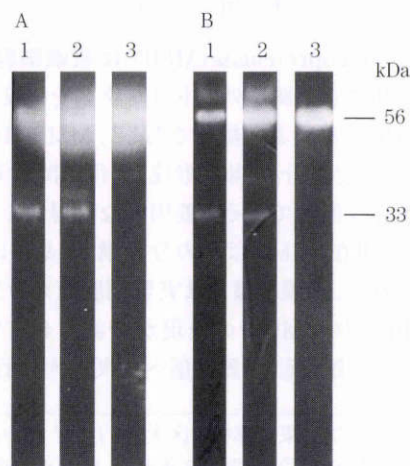


図2 A:ゼラチン zymography, B:ガゼイン zymography.

lane 1: IID-1117, 2: IID-1030, 3: IID-1130

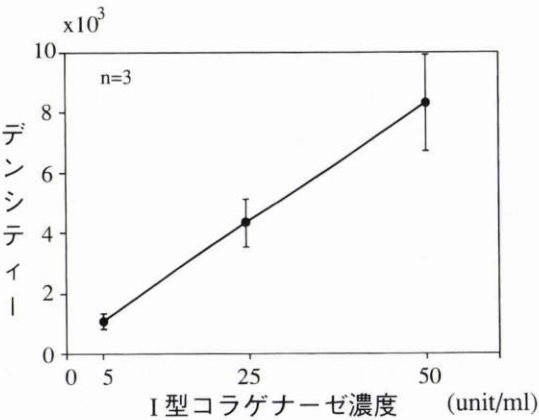


図3 各濃度I型コラゲナーゼのデンシティー.

ゼ活性は検出されなかった(表1).

3. CS-610 の阻害効果

CS-610を添加したガゼイン zymography で各菌株の 56, 33 kDa のプロテアーゼ活性バンドはCS-610の濃度に依存し減弱した(図4 A~C).

デンシトリーでは 56 kDa の活性バンドの濃度は CS-610 の 10⁻⁴M の添加で各菌株とも 10% 以下に低下し, 33 kDa のバンドは CS-610 の 10⁻⁴M の添加でバンドの検出はされなかった(図5 A,B).抑制曲線から CS-610 は 56, 33 kDa のプロテアーゼ活性を表2に示すように低濃度で阻害し,そのプロテアーゼ阻害力は3菌株間で同等であった(表2).

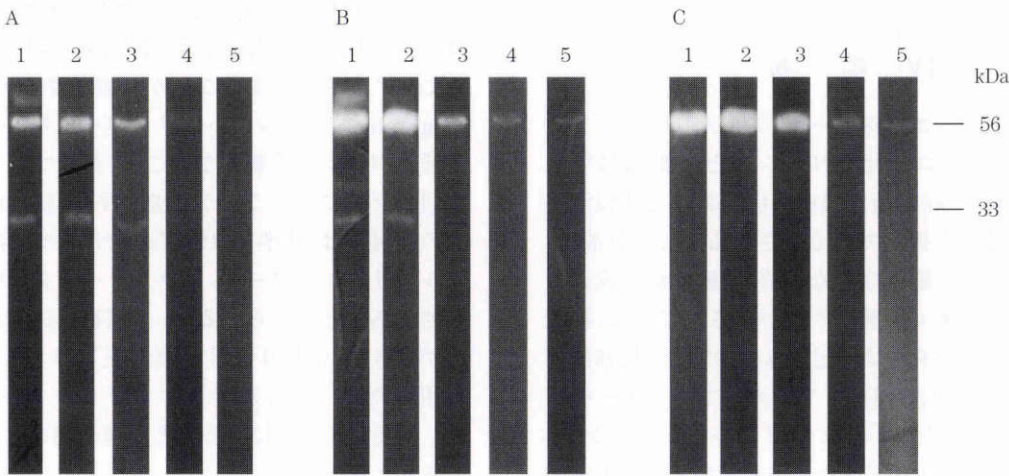


図4 CS-610を添加したガゼイン zymography.
A: IID-1117, B: IID-1030, C: IID-1130
CS-610 濃度 (M) lane 1: 0, 2: 10⁻⁸, 3: 10⁻⁶, 4: 10⁻⁴, 5: 10⁻³

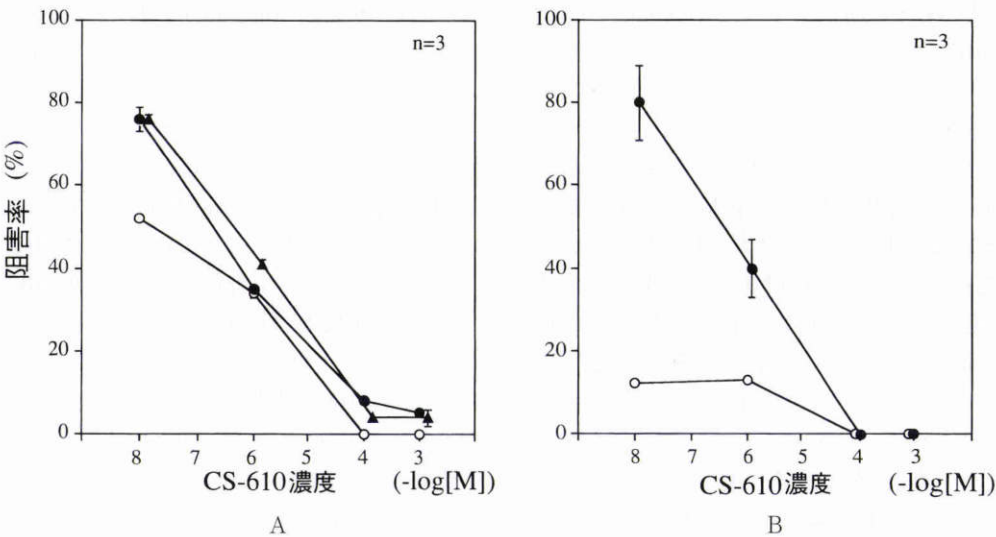


図5 ガゼイン zymography おける CS-610 無添加を 100 としたときの各 CS-610 濃度の活性バンドのデンシティー.

A: 56 kDa, B: 33 kDa ○: IID-1117, ●: IID-1030, ▲: IID-1130

表 1 プロテアーゼ活性量

菌株	分子量	
	56 kDa	33 kDa
IID-1117	1143 ± 222	13.6 ± 5.54
IID-1030	4977 ± 625	22.6 ± 4.55
IID-1130	4490 ± 1222	検出されず

単位：unit I 型コラゲナーゼ ml/ n=3

表 2 56, 33 kDa プロテアーゼに対する CS-610 の IC₅₀

菌株	分子量	
	56 kDa	33 kDa
IID-1117	1.06	<1.0
IID-1030	24.7	33.3
IID-1130	29.0	—

単位：10⁻⁸M n=3

IV 考 按

緑膿菌の産生するエラスターゼ、アルカリプロテアーゼはコラーゲン、プロテオグリカンなどの細胞外マトリックスを分解し、緑膿菌角膜感染症における角膜潰瘍形成に重要な役割を担っているとされる⁽¹⁾⁽¹²⁾。それ故、これらプロテアーゼの酵素学的な性質、角膜潰瘍形成における役割について多くの報告^{(13)~(16)}がなされている。緑膿菌プロテアーゼの分子量は同定された DNA の塩基配列からエラスターゼは 33 kDa⁽¹³⁾、アルカリプロテアーゼは 49 kDa⁽¹⁴⁾とされ、また、両者はガゼイン、ゼラチン zymography で検出されるプロテアーゼである⁽¹⁵⁾⁽¹⁶⁾。本実験に用いた緑膿菌 IID-1117、-1030、-1130 株からは 33 または 56 kDa の 2 種類のガゼイナーゼおよびゼラチナーゼを有するプロテアーゼが検出された。Zymography の分子量から 33 kDa の酵素活性バンドはエラスターゼと考えられる。しかし、我々と同様な手技で、Twining ら⁽¹⁵⁾は緑膿菌 PA-01、-103、-158、-388 株に対する検討において分子量 163 kDa、また Matsumoto ら⁽¹⁶⁾は緑膿菌 RPS、599 A 株について 110 kDa、Barletta ら⁽⁸⁾は緑膿菌 W-186 株について 123 kDa をエラスターゼとして報告している。それらの報告では、DNA の塩基配列から予測されるエラスターゼ分子量と異なる理由として酵素が複合体を形成している可能性を推察している。緑膿菌エラスターゼは菌株、培養条件の違いで、その形態が異なると考えられ、形態による酵素学的な差異については、今後検討を要する点である。3 株すべてに検出された 56 kDa の緑膿菌プロテアーゼの報告は今までない。しかし、この分子量は 49 kDa とされるアルカリプロテアーゼ⁽¹⁴⁾、また Twining ら⁽¹⁵⁾、Ma-tsumoto ら⁽¹⁶⁾の報告による 53 kDa のアルカリプロテアーゼと近い分子量である。緑膿菌において、これらアルカリプロテアーゼの現在までの報告はエラスターゼと比較するとほぼ同分子量であり、また、緑膿菌プロテ

アーゼについて 50 kDa の近傍でアルカリプロテアーゼ以外のプロテアーゼの報告はない。故に本実験で検出された 56 kDa のプロテアーゼはアルカリプロテアーゼと考えられるが、今後はプロテアーゼの同定のために特異抗体などの開発が望まれる。以上から、緑膿菌 IID-1117、-1030 株はエラスターゼおよびアルカリプロテアーゼ産生株、IID-1130 株はアルカリプロテアーゼ産生、エラスターゼ非産生株であると考えられた。

エラスターゼ活性の定量方法は酵素抽出後カラムクロマトグラフィーを用いてエラスターゼ分子量の分画を分離し、ガゼイン分解能を測定することで得る方法が報告⁽¹⁷⁾されている。今回、我々は zymography 上で基準プロテアーゼとガゼイン分解能とを比較することで、アルカリプロテアーゼ、エラスターゼ活性の定量を行った。この方法は、実験条件によってプロテアーゼの分子量が異なっても直接 zymography のゲルを観察し対象するプロテアーゼ活性を測定でき、また、複数のプロテアーゼを 1 枚のゲルで比較することが可能であった。しかし、zymography でのデンストノメトリーは複数のプロテアーゼ活性バンドが重複しないこと、基準プロテアーゼを常に同一ゲルにおくことが必要である。緑膿菌プロテアーゼの検討では、基準プロテアーゼとして分離抽出されたアルカリプロテアーゼ、エラスターゼを用いることが理想的であると考えられるが、今回我々はそれらを得ることができず、代わりに活性値が既知の I 型コラゲナーゼを用いた。しかし、基準とするプロテアーゼ、zymography の条件を一定にすることで菌株間の比較は十分可能であると考えた。

本実験の菌培養液はアルカリプロテアーゼ、エラスターゼ活性を合わせて 1,156.6~4,999.6 unit/ml I 型コラゲナーゼ換算等量の活性を示した。Gray ら⁽¹²⁾は実験的角膜潰瘍を 3.5 unit/ml のコラゲナーゼを用いて作製しており、本実験の培養液中には角膜潰瘍を誘発する十分な活性を有する酵素が存在すると考えられた。

Zymography で CS-610 はアルカリプロテアーゼ、エラスターゼの両者を薬剤濃度依存性に阻害した。それらに対する CS-610 の IC₅₀ は、アルカリプロテアーゼ 1.0~29.0 × 10⁻⁸M、エラスターゼ 1.0~33.3 × 10⁻⁸M であった。CS-610 のエラスターゼに対する阻害力については既に Grobelny ら⁽⁹⁾が Ki(抑制定数)=2.0 × 10⁻⁸M を報告しており、今回我々の結果はそれらと同等であった。CS-610 のアルカリプロテアーゼに対する報告は我々が初めてであり、その阻害効果が確認された。また、過去に MMP 阻害薬として *in vitro*, *in vivo* で緑膿菌プロテアーゼ阻害効果が検討されている thiol-based peptide は、エラスターゼを Ki=300 nM⁽⁶⁾、2-mercaptosuccinyl-L-phenylalanyl-L-leucine は Ki=200 nM⁽⁷⁾で阻害することが報告されている。CS-610 は、これらと同等のエラスターゼ阻害力を有し、角膜潰瘍でもその効果が期待される。しかし、実際の

角膜潰瘍への応用では組織への薬剤浸透性, 作用時間などを含めた検討が必要であり, *in vivo* の角膜潰瘍モデルにおける潰瘍抑制効果が今後の検討課題である。

稿を終えるに当たり, 日本大学医学部微生物学教室小野魁教授, 宇野正恒講師の御協力に感謝します。

本研究は角膜潰瘍治療薬開発研究班(金井 淳班長)の一部として行われた。

文 献

- 1) Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden MK, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De-carlo A, et al: Matrix metalloproteinase: A review. Crit Oral Biol Med 4: 197—250, 1993.
- 2) 鈴木紘一: プロテアーゼと生体機能. 現代科学 増刊 22. 東京化学同人, 東京, 56—69, 1993.
- 3) Fini ME, Girard MT: Expression of collagenolytic/gelatinolytic metalloproteinases by normal cornea. Invest Ophthalmol Vis Sci 31: 1779—1788, 1990.
- 4) Matsubara M, Zieske JD, Fini ME: Mechanism of basement membrane dissolution preceding corneal ulceration. Invest Ophthalmol Vis Sci 32: 3221—3237, 1991.
- 5) Kessler E, Spierer A, Blumberg S: Specific inhibition of Pseudomonas aeruginosa elastase injected intracorneally in rabbit eyes. Invest Ophthalmol Vis Sci 24: 1093—1097, 1983.
- 6) Burns FR, Paterson CA, Gray RD, Wells JT: Inhibition of pseudomonas aeruginosa elastase and pseudomonas keratitis using a thiol-based peptide. Antimicrob Agents Chemother 34: 2065—2069, 1990.
- 7) Schultz GS, Stern GA, Chegini SN, Grant MB, Galardey RE, Grobelny D, et al: Treatment of alkali-injured rabbit corneas with a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases. Invest Ophthalmol Vis Sci 33: 3325—3331, 1992.
- 8) Barletta JP, Angella G, Balch KC, Dimova HG, Stern GA, Moser MT, et al: Inhibition of pseudomonal ulceration in rabbit corneas by a synthetic matrix metalloproteinase inhibitor. Invest Ophthalmol Vis Sci 37: 20—28, 1996.
- 9) Grobelny D, Poncz L, Galardey RE: Inhibition of human skin fibroblast collagenase, thermolysin, and pseudomonas aeruginosa elastase by peptide hydroxamic acids. Biochemistry 31: 7152—7154, 1992.
- 10) Clark VL, Bavoil PM: Methods in enzymology vol. 235 Bacterial Pathogenesis. Academic Press, Rochester, 554—555, 1994.
- 11) Wretling B, Pavlovskis OR: Pseudomonas aeruginosa elastase and its role in pseudomonas infections. Rev Infect Dis 5: S998—S1004, 1983.
- 12) Gray LD, Kreger AS: Rabbit corneal damage produced by Pseudomonas aeruginosa infection. Infect Immun 12: 419—432, 1975.
- 13) Bever RA, Iglewski BH: Molecular characterization and nucleotide sequence of the Pseudomonas aeruginosa elastase structural gene. J Bacteriol 170: 4309—4314, 1988.
- 14) Okuda K, Morihara K, Atsumi Y: Complete nucleotide sequence of the structural gene for alkaline proteinase from Pseudomonas aeruginosa IFO 3455. Infect Immun 58: 4083—4088, 1990.
- 15) Twining SS, Kirschner SE, Mahnke LA, Frank DW: Effect of pseudomonas elastase, alkaline protease, and exotoxin A on corneal proteinases and proteins. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 2699—2712, 1993.
- 16) Matsumoto K, Shams NBK, Hanninen LA, Kenyon KR: Cleavage and activation of corneal matrix metalloproteinases by Pseudomonas aeruginosa proteases. Invest Ophthalmol Vis Sci 34: 1945—1953, 1993.
- 17) Kreger AS, Gray LD: Purification of Pseudomonas aeruginosa proteases and microscopic characterization of pseudomonal proteases-induced rabbit corneal damage. Infect Immun 19: 630—648, 1978.