

1007 セフェム系抗生物質のクラス A β -lactamase 抵抗性由来の解明

○ 藤井康之^{1,2}、畑晶之³、沖本憲明⁴、根矢三郎³、星野忠次³（産総研¹、バイオ産業情報化コンソーシアム²、千葉大薬³、理研⁴）

【序論】Class A β -lactamase(CAB)は β -lactam 系抗生物質を加水分解するため、薬剤耐性の原因となる。CAB の基質である β -lactam 系抗生物質は主にペニシリン系とセフェム系に分類される。CAB によるセフェム系抗生物質の加水分解速度はペニシリン系のそれと比べ非常に低い(<10%)事が明らかにされている[1]。この実験結果は、セフェム系抗生物質は CAB の触媒能に対する抵抗性を持つことを意味する。然しながら、この原因は未だ明らかにされていない。CAB 不感受性の抗生物質を開発するには、この抵抗性の由来を理解する事が不可欠である。本研究では、セフェム系抗生物質の CAB 抵抗性の原因を解明するために、セフェム系抗生物質-CAB の共有結合体について分子動力学(MD)シミュレーションを実行した。また、セフェム系抗生物質-CAB 結合体の構造的な特徴を顕在化させるための比較対照を得る目的で、penicillin G(penG)-CAB 結合体についての MD シミュレーションを行った。さらに、セフェム系抗生物質の脱アシル化反応メカニズムを解明するため、MD シミュレーションの結果を用いて構築した活性部位モデルを用い量子化学計算を行った。

【方法】セフェム系抗生物質セファロリジン(CER)と CAB の変異体との共有結合体の結晶構造が公開されている(pdb code: 1GHM)。この結晶構造の変異体 CAB を自然型に変えるため、変異アミノ酸残基を自然型の残基に置換した。この構造について約 8000 個の水分子を球状に発生させた。以上の修飾作業によって生じた不自然な原子間反発を取り除くために、系についてのエネルギー極小化計算を行った。このエネルギー極小化構造を MD シミュレーションの初期構造とした。システムの温度は MD シミュレーションによって 5K から 300K まで徐々に上昇させた。運動方程式における積分時間は 1.0fs とした。高い計算精度を期するため、クーロン項および van der Waals 項のカットオフ距離は無限大に設定した。エネルギー極小化計算と MD シミュレーションには AMBER ver.6.0 を用いた。PenG-CAB 結合体の MD シミュレーションは同様に行った。このシミュレーションによって得た CER-CAB 結合体の平衡構造から活性部位を抜き出し、反応モデル系を構築した。CER の脱アシル化反応経路を解明するために、この反応モデル系について密度汎関数理論による量子化学計算を実行した。基底関数には 6-31G(d,p)を用いた。反応経路上の遷移状態(TS)の構造最適化には共役勾配法を用いた。得られた TS 構造について振動解析を行い、虚の振動が唯一存在することを確認した。この振動の方向とその逆方向に沿う固有反応座標(IRC)を解き、反応経路を決定した。

【結果・考察】初めに、各結合体において観察された活性残基間の相互作用系についての比較を行った。PenG-CAB の結合体では触媒反応の生起に重要な Lys73N ζ -Ser70O γ 間の水素結合が維持されたのに対し、CER-CAB の結合体では当該水素結合が解消していることが分かった。以前の研究によって、脱アシル化反応の完結には Ser70 への H⁺供給が不可欠であり、penG-CAB の結合体では Lys73 が Ser70 へ H⁺を供給し、penG が脱アシル化する事が明らかにされた[2]。しかし CER-CAB 結合体では、Lys73N ζ -Ser70O γ 間の水素結合が解消しているため、Lys73 から Ser70 への H⁺移動は生起しないと考えられる。以上から判断するに、CER-CAB 結合体の脱アシル化反応における Ser70 への H⁺供給経路は penG-CAB のそれとは異なると考えられる。次に、各結合体における基質-酵素間相互作用について比較を行った。その結果、CED の 4 位カルボキシル基は Lys234 と水素結合を形成していることが分かった。この水素結合は、CED-CAB 結合体に特異的であった。従って、CER の脱アシル化反応における Ser70 への H⁺供給反応には、この水素結合が関与していると考えられる。以上の結果から、左に示す H⁺供給反応メカニズムを予測した。このメカニズムの理論的正当性を確認するために、量子化学計算を用いて、各素反応の遷移状態を決定し、それらの活性化エネルギーを評価した。その結果、最も高い活性化エネルギーを持つ素反応は第二段階素反応で、その活性化エネルギーは約 14.1kcal/mol であった。PenG-CAB における Lys73 から Ser70 への H⁺移動反応の活性化エネルギーは僅か 3.9kcal/mol であった[2]。従って、CER の脱アシル化反応は penG のそれよりも明らかに不利であることが分かった。

【結論】セフェム系抗生物質の抵抗性の由来は、脱アシル化反応の効率の低さによる。

[1] Jacob, F.; Joris, B.; Dideberg, O.; Dusart, J.; Ghuyssen, J.-M.; Frère, J.-M. *Protein Engineering* **1990**, *4*, 79-86.

[2] Fujii, Y.; Hata, M.; Hoshino, T.; Tsuda, M. *J. Phys. Chem. B* **2002**, *106*, 9687-9695.

