

# *Enterobacter cloacae* Ent385 臨床分離株由来 AmpC $\beta$ -ラクタマーゼの X線結晶構造解析

## Structure study of AmpC $\beta$ -lactamase isolated from *Enterobacter cloacae* Ent385 clinical strain

河合聡人<sup>\*a</sup>, 土井洋平<sup>\*b</sup>

藤田医科大学 医学部 微生物学講座

〒470-1192 愛知県豊明市沓掛町田楽ヶ窪 1-98

Akito KAWAI and Yohei DOI

Department of Microbiology, Fujita Health University School of Medicine  
1-98 Dengakugakubo Kutsukake-cho, Toyoake, Aichi, 470-1192, Japan

### 1 はじめに

AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生細菌は、第三世代セファロsporinやセファマイシンにも耐性を示す。近年、 $\beta$ -ラクタマーゼ阻害剤であるアビバクタム (AVI) が開発された。この AVI と第三世代セファロsporinであるセフトラジジム (CAZ) との合剤は、AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ産生細菌に対しても有効で、その治療実績を向上させた。しかし、CAZ-AVI 合剤による治療が実施されるとこれに耐性を示す細菌の報告も増加してきた。最近我々の研究グループでは CAZ-AVI 合剤に耐性を示す *Enterobacter cloacae* Ent385 臨床分離株 (Ent385 株) を単離した。この Ent385 株は CAZ-AVI 合剤に加え、新規シデロフォアセファロsporinであるセフィデロコール (FDC) に対しても低感受性を示した [1]。この薬剤耐性機構を明らかにするため、まず Ent385 株のゲノム解析を行ったところ、染色体にコードされる AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼ (AmpC<sup>Ent385</sup>) に A294 と P295 の欠失、L296V 変異が確認された。この AmpC<sup>Ent385</sup> を発現する組換え大腸菌を調製すると、Ent385 株と同様に CAZ-AVI 合剤へ耐性、FDC の低感受性を示した。そして、AmpC<sup>Ent385</sup> 酵素の速度論解析を行った結果、CAZ、FDC の触媒効率がそれぞれ 1000 倍、20 倍向上していることが明らかになった。このことから Ent385 株の CAZ-AVI 合剤、FDC への感受性低下に主として AmpC<sup>Ent385</sup> が関与していることが示唆された。そこで、AmpC<sup>Ent385</sup> の立体構造を決定し、CAZ-AVI 合剤、FDC に対する薬剤低感受性化機構の構造化学的な解明を試みた。

### 2 実験

AmpC<sup>Ent385</sup> の単結晶は、硫酸アンモニウムを主とした結晶化条件で析出させた。AmpC<sup>Ent385</sup>-CAZ 複合体、AmpC<sup>Ent385</sup>-AVI 複合体の共結晶は AmpC<sup>Ent385</sup> の単結晶を 10 mM の薬物を含む結晶化溶液中に 3 時間浸すことで調製した。PF BL-17A の実験ステーションを利用し、波長 0.98 Å の X 線を用いて回折データを収集した。得られた回折データは XDS プログラム

を用いて処理した。構造解析は Molrep プログラムを用いた分子置換法で行い、Coot プログラムを用いたモデル構築、phenix.refine プログラムを用いて構造精密化を行い、最終構造を決定した。

### 3 結果および考察

AmpC<sup>Ent385</sup> 単体、AmpC<sup>Ent385</sup>-CAZ 複合体、AmpC<sup>Ent385</sup>-AVI 複合体の立体構造をそれぞれ 1.40 Å、1.65 Å、1.60 Å 分解能で決定した。CAZ、AVI 複合体の構造は活性残基である Ser64 に基質が結合した反応中間体 (アシル複合体) 構造を示した。これらの構造を重ね合わせた時の *r.m.s.d.* 値は 0.16–0.18 Å で、基質結合によって AmpC<sup>Ent385</sup> の構造は変化しないことがわかった。また、AmpC<sup>Ent385</sup> は主に水素結合を介して CAZ や AVI の分子全体を認識していて、これらの結合様式はこれまでに立体構造が報告された他の AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼで観察された結合様式に類似していた。AmpC<sup>Ent385</sup> の構造をこれまでに報告された AmpC  $\beta$ -ラクタマーゼの中で最も相同性の高い P99  $\beta$ -ラクタマーゼ (identity 84%, PDB ID: 5xhr [2]) の構造と比較すると、H9 ヘリックスから R2 ループの構造が大きく異なっていて、AmpC<sup>Ent385</sup> では H10 ヘリックスが消失していた (図 1)。この構造変化により、従来型の酵素と比較し、AmpC<sup>Ent385</sup> では基質結合部位が溶媒領域にまで拡張し、セファロsporin R2 側鎖が結合する部位での基質と酵素の立体障害が解消されていた。

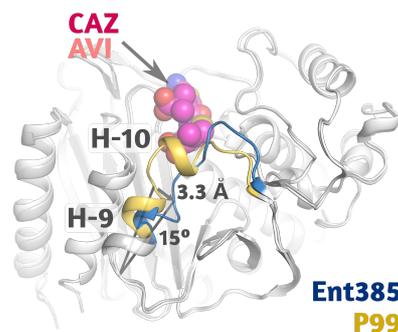


図 1 AmpC<sup>Ent385</sup> (青) と P99 (黄) の構造比較

#### 4 まとめ

従来の酵素と比較し、AmpC<sup>Ent385</sup>の基質認識機構は同様であった。しかし、2つのアミノ酸が欠失したことで、H10ヘリックスが消失し、H9ヘリックスからR2ループの構造が大きく変化していた。この構造の変化により、基質結合部位が従来の酵素より拡張されたことでCAZおよびFDCの分解効率が向上し、Ent385株の薬剤耐性、低感受性化に繋がったものと考えられる。

#### 謝辞

放射光実験でお世話になりましたPFスタッフの皆様に深く感謝申し上げます。

#### 参考文献

- [1] A. Kawai *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **64**, e00198-20 (2020)
- [2] X. Pan *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **61**, e01288-17 (2017).

\*<sup>a</sup> kawai-a@fujita-hu.ac.jp

\*<sup>b</sup> yoheidoi@fujita-hu.ac.jp