

CMY-185 β -ラクタマーゼの X 線結晶構造解析 Crystal Structure of CMY-185 Beta-Lactamase

河合聡人^{*a}, 土井洋平^{*b}

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

CMY-185 は ceftazidime/avibactam 合剤へ高度耐性を示す大腸菌臨床分離株が所持していたプラスミド性クラス C β -ラクタマーゼ CMY-2 の 4 アミノ酸変異体 (A114E、Q120K、V211S、N346Y) である。我々の研究グループは CMY-185 が有する 4 つの変異に関して、単変異から四変異まで、全ての組み合わせの変異型酵素をコードする遺伝子を調製し、それぞれ実験室系大腸菌 TOP10 株へ導入し、薬剤感受性を調べた。結果、これらの変異は N346Y 変異を主軸に他の変異が重複するほど ceftazidime/avibactam への耐性が強化されることがわかった [1]。また、酵素速度論解析の結果、N346Y の導入で avibactam の阻害活性が 1/1,000 に低下し、さらに A114E や Q120K の変異が重なることで、1/10,000~1/20,000 へと低下することがわかった [2]。一方 V211S は ceftazidime の分解回転数を向上させることがわかった [2]。そこで、各変異の ceftazidime/avibactam 耐性の表現型に関する分子機構を原子レベルで解明するため、CMY-185 単体、及び ceftazidime 複合体の X 線結晶構造解析による立体構造の決定を試みた。

2 実験

CMY-185 の単結晶は、PEG20,000 を用いた結晶化条件で析出させた。ceftazidime 複合体の共結晶は CMY-185 単体の結晶を 100 mM ceftazidime 溶液に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

CMY-185 単体の立体構造を 1.35 Å、ceftazidime 複合体の立体構造を 2.40 Å 分解能で決定した。CMY-185 単体の立体構造とこれまでに解析されていた CMY-2 (PDB : 1zc2) や CMY-136 (PDB : 6g9t) を重ねた時の RMSD 値は 0.45 Å、0.52 Å で、これらの酵素の構造に大きな違いは観察されなかった。ceftazidime が結合すると、CMY-185 の変異した Y346

残基が 108 度回転し、隣接する H-10 ヘリックスの領域のアミノ酸残基が disorder していた (図 1)。これは、複合体形成によって ceftazidime と酵素の間に生じる立体障害を回避するため Y346 残基の回転が起こり、その結果 H-10 ヘリックスが崩壊したと考えられた。酵素速度論解析の結果を踏まえるとこの構造変化は avibactam では生じないことが予想される。加えて、過去の他のクラス C β -ラクタマーゼと ceftazidime 及び avibactam の複合体構造から考察すると、avibactam は硫酸基を重点的に認識されるのに対し、ceftazidime は分子全体を万遍なく認識されることから、この相互作用様式の違いが構造変化の駆動力の差に繋がっていることが考えられた。

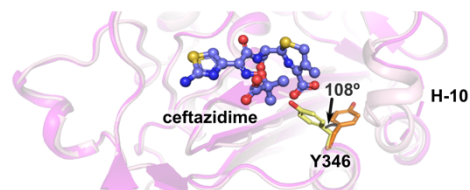


図 1 CMY-185 の立体構造

単体 (ピンク、黄色スティック)、ceftazidime 複合体 (マゼンタ、橙色スティック) ceftazidime は青色 ball-and-stick で描いた。

4 まとめ

ceftazidime/avibactam 合剤の高度耐性に関与する CMY-185 の立体構造を決定した。その結果、分子認識の違いを利用して ceftazidime の分解活性を保持したまま、avibactam による阻害を回避する分子機構を解明した。

謝辞

放射光実験でお世話になりました PF スタッフの皆様へ深く感謝申し上げます。

参考文献

- [1] W. Shropshire C., et al., *J. Antimicrob. Chemother.*, **78**, 2442–2450 (2023)
- [2] A. Kawai et al., *mBio*, **15**, e02874-23 (2024)

*^a kawai-a@fujita-hu.ac.jp

*^b yoheidoi@fujita-hu.ac.jp