

Citrobacter freundii 由来メタロ-β-ラクタマーゼ (KHM-1) の結晶構造 Crystal structure metallo-β-lactamase (KHM-1) from *Citrobacter freundii*

山口佳宏^{1,2*}, 西並 隆², 安田健二², 切替照雄³, 山縣ゆり子⁴, 黒崎博雅⁴

¹熊本大学環境安全センター, 〒860-8555 熊本市中央区黒髪 2 丁目 40-1

²熊本大学工学部, 〒860-8555 熊本市中央区黒髪 2 丁目 39-1

³国立国際医療研究センター研究所, 〒162-8655 東京都新宿区戸山 1-21-1

⁴熊本大学大学院生命科学研究部, 〒862-0973 熊本市中央区大江本町 5-1

1 はじめに

メタロ-β-ラクタマーゼ (MBL) は、臨床で汎用されているほとんどすべての β ラクタム剤を加水分解する Zn 酵素である。MBL 阻害剤の研究開発は世界中で行われているが、実際に臨床で使われているものはない。そのため MBL 産生菌が医療環境から除菌されずに世界中を拡散し続けており、社会問題まで発展している。MBL の活性中心は、2つの Zn 結合部位 (Zn1 サイトと Zn2 サイト) があるが、Zn リガンドのアミノ酸配列によって subclass B1 から B3 まで分類されている[1]。このように同じ MBL でも、活性中心の Zn リガンドの配列の違いや活性中心の微細な構造変化によって、MBL 阻害剤の開発が難航している。

KHM-1 は、2008 年に報告された *Citrobacter freundii* のプラスミド上から単離された subclass B1 の MBL である[2]。しかし同じ subclass B1 に属する IMP-1 と比較して、KHM-1 はセフェム系 β ラクタム剤に対して加水分解活性が非常に高い。この原因を詳細に理解するために、KHM-1 の結晶構造を解析することにした。

2 実験

KHM-1 は大腸菌で発現させて、種々のカラムクロマトグラフィー技術を用いて精製することができた。また精製された KHM-1 は、製品化されたキットを利用したスクリーニングと結晶化条件の最適化を行うことで、蛋白質 X 線結晶構造解析に適した結晶を調製することができた。

KHM-1 の結晶は、mono-Zn 型 (Cys 酸化型と Cys 還元型)、di-Zn 型の 3 種類調製することができ、分解能はそれぞれ 1.80 Å、1.94 Å、2.00 Å であった。空間群は 3 種類とも P4₁ であった。構造決定は、分子置換法によって行い、search model として IMP-1 の構造 (PDB code:1DD6) を使った。

3 結果および考察

KHM-1 の全体構造は MBL に特徴的な αββα 構造であり、KHM-1 の二次構造は IMP-1 と比較してほとんど変わりがなかった。KHM-1 の活性中心は、

MBL で共通に見られる 2つの Zn 結合サイト (Zn1 サイト、Zn2 サイト) が観察できた。Zn1 サイトは 3つの His、Zn2 サイトは Asp、Cys、His で構成されているが、Zn2 サイトの Zn(II)イオンが遊離して、Cys が酸化されていることが電子密度から分かった (mono-Zn 型 Cys 酸化型)。そこで KHM-1 の結晶化条件に還元剤である tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP)を加えたところ、Zn2 サイトの Zn(II)イオンは遊離していたが、Cys は酸化されなかった (mono-Zn 型 Cys 還元型)。これらのことから、KHM-1 の Zn2 サイトの Zn(II)イオンは、活性中心から遊離しやすいことが分かった。

IMP-1 の結晶構造では、活性中心に 2つの Zn(II)イオンが結合しているため、活性中心の比較のために KHM-1 の di-Zn 型の構造解析を試みた。KHM-1 の結晶化条件に Zn(NO₃)₂を加えたところ、活性中心に 2つの Zn(II)イオンの電子密度を確認することができた (di-Zn 型)。しかし Zn2 サイトの Zn(II)イオンの occupancy が 0.7 であったことから、KHM-1 の Zn2 サイトの Zn(II)イオンは遊離しやすいことが分かった。IMP-1 と KHM-1 (di-Zn 型) の構造を重ね合わせて比較したところ、KHM-1 の活性中心は IMP-1 に比べて広がっていることが分かった。このことが KHM-1 の加水分解活性を高めた 1つの要因であると考えた。

参考文献

- [1] K. Bush, G. A. Jacoby, *Antimicrob. Agents Chemother.*, 54(3), 969-976 (2010)
- [2] J. Sekiguchi *et al.* *Antimicrob. Agents Chemother.*, 52(11), 4194-4197 (2008)

*yyamagu@gpo.kumamoto-u.ac.jp