

β-ラクタマーゼの X 線結晶構造解析 Crystal structure determinations of beta lactamases

内田 朗¹、石井良和²、高橋重一¹、佐藤浩之¹

¹東邦大学理学部、〒274-8510 千葉県船橋市三山 2-2-1

²東邦大学医学部、〒143-8540 東京都大田区大森西 5-21-16

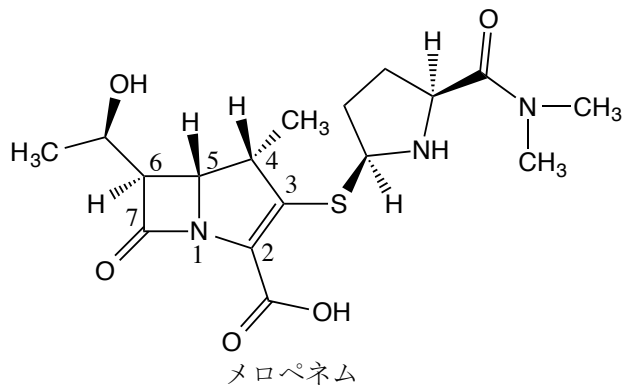
Akira Uchida, Yoshikazu Ishii, Shigekazu Takahashi and Hiroyuki Satoh

Faculty of Science, Toho University, 2-2-1 Miyama, Funabashi, Chiba 274-8510, Japan

Faculty of Medicine, Toho University, 5-21-16 Omori-nishi, Ota-ku, Tokyo 143-8540, Japan

1 はじめに

戦後、ペニシリンをはじめとする抗菌薬の開発により、細菌の感染による死亡率が劇的に減少したが、一方で薬剤の大量使用によって薬剤耐性を持つ病原性細菌が急速に増加しており、医療現場において大きな問題になっている。病原性細菌の薬剤に対する重要な耐性機構の1つがβ-ラクタマーゼ (BL) によるβ-ラクタム系抗菌薬の不活化である。BL はアミノ酸配列の違いにより A から D の4つのクラスに分けられる。BL のアミノ酸配列に変異が生じて基質特異性が拡張した BL が基質特異性拡張型β-ラクタマーゼ (ESBL) である。ESBL 産生株に対する感染症治療の第一選択薬はカルバペネム系抗菌薬であるが、この抗菌薬に対しても耐性を示すクラス D BL 産生株が見いだされている。本研究ではクラス D に属する BL OXA-24 およびカルバペネム系抗菌薬であるメロペネムとの複合体の構造解析を行った。

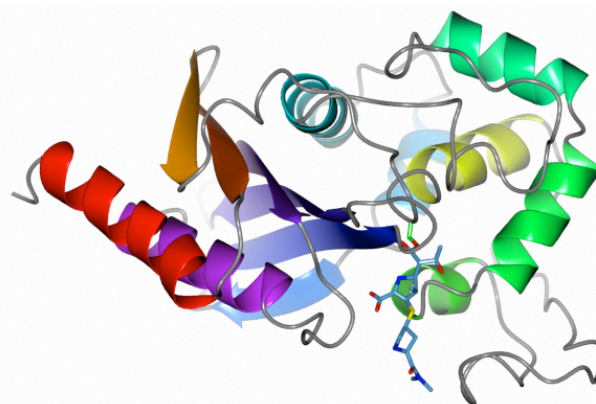


2 実験

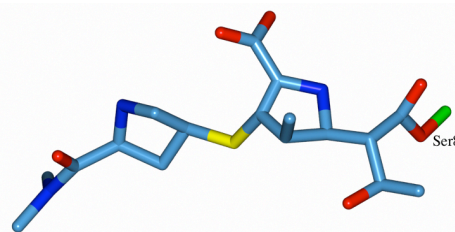
OXA-24 の遺伝子を pET28(+) に組み込んだ後、大腸菌 BL21 株に導入した。大量発現した OXA-24 を Ni カラムで精製した後、さらにゲル濾過クロマトグラフィーにより精製を行った。ソーキング法では結晶性が低下したため、メロペネムを含んだ条件で OXA-24 との共結晶化を試み、複合体を得ることに成功した。PF BL-1A および PF-AR NW12 で測定を行い、1.92Å 分解能のデータを得た。構造は 2JC7 をサーチモデルとした分子置換法によって得られた。

3 結果と考察

複合体の活性部位の電子密度から、メロペネムはβ-ラクタム環が開環し、Ser81 がβ-ラクタム環のカルボニル基の炭素原子と結合することにより OXA-24 とアシル複合体を形成していることが示唆された。β-ラクタム環に隣接していたピロリン環は、ラクタム環の開裂に伴う互変異性化によりΔ²ピロリンからΔ¹ピロリンに変化しており、Δ²ピロリンでは平面内にあった硫黄原子が環外へ変位している。この変位は OXA-13 メロペネム複合体とは逆になっており、OXA-24 と OXA-13 ではアシル複合体を形成するときの3位の炭素原子の立体配置が逆になっており、異なるメカニズムで複合体を形成することが明らかになった。



OXA-24 メロペネム複合体



複合体中のメロペネム

謝辞

PF のビームラインスタッフの方々には大変お世話になりました。深く感謝いたします。

* auchida@biomol.sci.toho-u.ac.jp