

【総説】

 β ラクタム系薬の開発

石黒正路

財団法人サントリー生物有機化学研究所*

(平成16年5月7日受付・平成16年6月15日受理)

β ラクタマーゼの変異による広範な β ラクタム剤への親和性と基質分解能の向上,そして変異による PBP の β ラクタム剤への親和性の低下によって β ラクタム系抗菌薬に対する耐性が獲得されており, β ラクタム剤にはこれらの耐性を克服できる新しい誘導体の開発が望まれる。すなわち,変異した PBP に対して高い親和性を示し,変異した β ラクタマーゼ(ESBL)に抵抗性を有する構造をもつ β ラクタム剤がデザインされる必要がある。

X線結晶解析により,PBP および多くの β ラクタマーゼの結晶構造が明らかとなり,また MRSA の PBP2a や β ラクタム系抗菌薬の親和性が低下した PBP2x のミュータントの立体構造も明らかにされている。このような構造情報から得られる重要なアミノ酸残基の役割の解明とコンピュータによるドッキングシミュレーションを組み合わせることによって, β ラクタム剤の加水分解機構を解明でき,これをもとに MRSA に対して親和性を有し, β ラクタマーゼに安定な 5,6 シスペナム化合物などのデザインが可能となっている。

Key words: β -lactamase, computer-assisted design, crystal structure, penicillin-binding protein, proteomics

β ラクタム薬はバクテリアの細胞壁合成酵素 (penicillin-binding proteins, PBP または D-Ala-D-Ala transpeptidase) の活性を選択的に阻害することによって,抗菌活性を示すことはよく知られている。しかし,最近ではバクテリアが β ラクタム薬耐性となる機構として, PBP の基質認識部位が変化し,細胞壁合成のための基質となるペプチドグリカンが認識するが,その阻害剤である β ラクタム薬には親和性を示さない構造となっていることが示されている¹⁾。

一方, β ラクタム薬に対する耐性菌が産生する β ラクタマーゼは β ラクタム薬に高い親和性を示して不活性化する。このような β ラクタマーゼ産生耐性菌に対してはこれに親和性を示さない新しい β ラクタム薬をデザインすることで対処されてきたが,最近では β ラクタマーゼの基質認識部位の変異によって広範な β ラクタム薬を不活性化する能力を有する β ラクタマーゼ (ESBL) が出現している²⁾。

最近の X線結晶構造解析の進歩により多くの β ラクタマーゼの立体構造が解明され,さらに PBP についても β ラクタム薬が反応するドメインの立体構造が明らかになって,これらの酵素が β ラクタム薬と反応する立体構造モチーフがアミノ酸配列上のホモロジー以上によく似ていることが明らかになっている³⁾。このような知見をもとに,耐性菌から見出された β ラクタマーゼや PBP のアミノ酸配列から変異部位が及ぼす基質認識の変化について,酵素と β ラクタム薬の

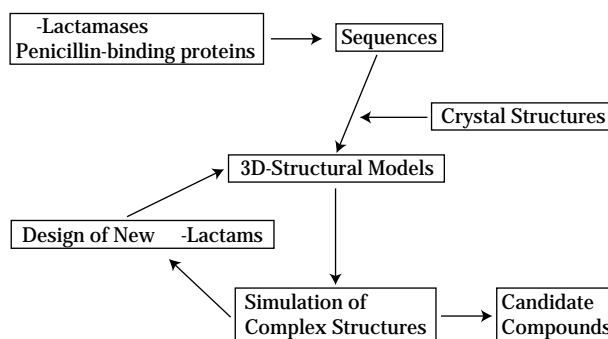


Fig. 1. β -lactam design based on structural proteomics.

複合体形成能をコンピュータ・シミュレーションにより推測することも可能となっている⁴⁾。すなわち, PBP に親和性をもち, β ラクタマーゼに対しては加水分解を受けない β ラクタム剤をコンピュータ上で仮想的にスクリーニングできる。Fig. 1 に示すように, 結晶構造やコンピュータ・シミュレーションによって作成した β ラクタマーゼや PBP の立体構造はこれら酵素の反応性や基質特異性を解明するうえで非常に重要でありポストゲノム時代における創薬プロテオミックスの重要な位置を占めている。

*大阪府三島郡島本町若山台 1 1 1

I. PBP の構造と基質認識

PBP の D-Ala-D-Ala 転移酵素ドメインの立体構造は *Streptococcus pneumoniae* の PBP2x とその変異体および MRSA の PBP2a が解明されている^{1,5)}。PBP2a と PBP2x の活性部位を重ね合わせて比較すると Fig. 2 のようになり、明らかに基質結合部位が狭くなっていることがわかる。このような構造変化が β ラクタム薬の親和性の減少をもたらしていることが容易に想像できる。一方、PBP2a は細胞壁合成の基質であるペプチドグリカンの D-Ala-D-Ala 部分に対する親和性を保持しており、ペプチド転移酵素としての機能を果たしている。 β ラクタム薬はこのペプチド部分の模倣体として作用すると考えられていることからペプチド部分の構造によりよく似た β ラクタム薬のデザインによって PBP2a に対して親和性の高い、すなわち MRSA に対して抗菌活性を示す β ラクタム薬が得られると期待される。

PBP2a との複合体モデルから得られるペプチドの構造とペネム系 β ラクタム薬であるファロペネム⁶⁾ (Fig. 3 の化合物 1) を重ね合わせると構造的に対応しない部位が存在する (Fig. 4)。ファロペネムのヒドロキシエチル基にさらにメチル基を付加した化合物 3 はすべての菌に対して活性を低下させるため Fig. 4 の重ね合わせの結果と併せて考えると 5, 6 トランスヒドロキシエチル基は酵素の限られた空間に結合すると推測された。これは MRSA において基質の結合部位が縮小してヒドロキシエチル基の結合空間がさらに限定されることを示している。このヒドロキシエチル基はペプチドが占める位置とは大きく異なるため、ペプチドに対応した置換基のデザ

インが親和性の獲得に必須であると考えられ、この条件を満足する置換基として 5, 6 トランス配置のヒドロキシエチル基を 5, 6 シス配置に変換した異性体が Fig. 5 に示すようにペプチドの占める空間に対応すると推測された。Table 1 には 5, 6 シス体 (Fig. 3 の化合物 2) の

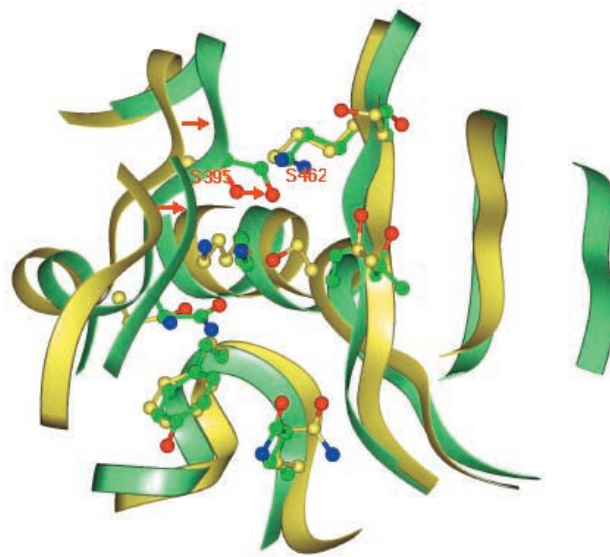


Fig. 2. Superimposed structures of PBP2a and PBP2x substrate-binding sites. Main skeletons of enzymes are shown by ribbon models and selected residues at the binding site by the ball-and-stick model. Arrows indicate differences in enzyme loops.

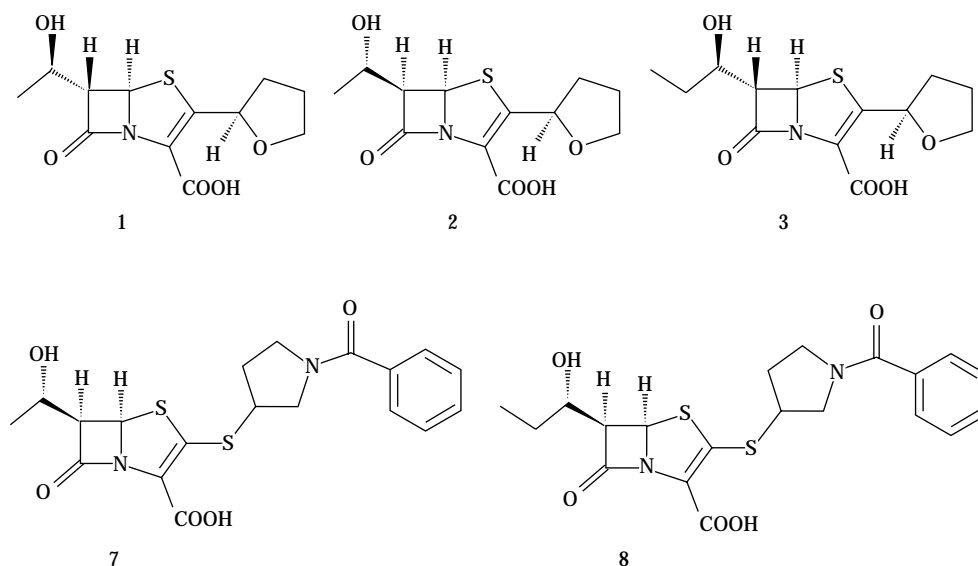


Fig. 3. Penem β -lactam derivatives.

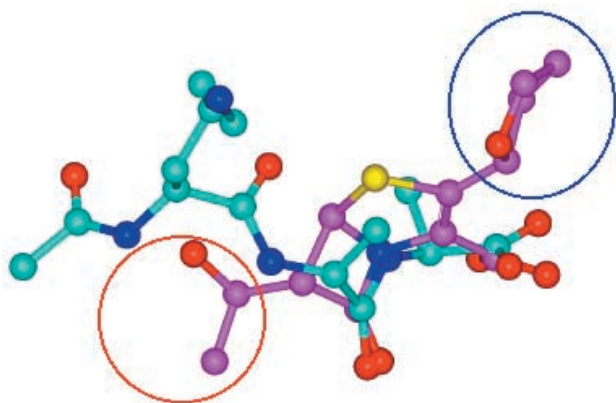


Fig. 4. Superimposition of faropenem and peptide moiety (AcLys-D-Ala-D-Ala-OH) Hydroxyethyl and tetrahydrofuryl groups of faropenem are circled.

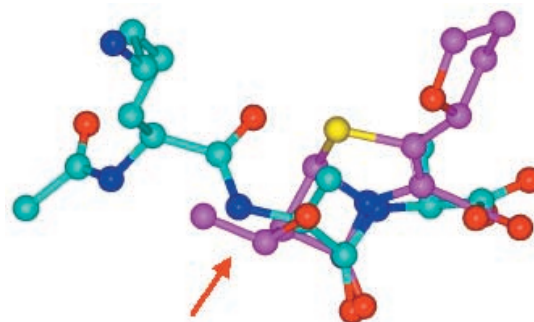


Fig. 5. Superimposition of 5,6-cis-penem (dark) and peptide moiety (AcLys-D-Ala-D-Ala-OH)

Table 1. *In vitro* antibacterial activity (MIC, $\mu\text{g/mL}$) of penem derivatives

Bacteria	1	2	3	8
<i>S. aureus</i> 209P JC-1	0.10	0.39	0.78	0.10
<i>S. aureus</i> (MRSA)	> 100	6.25	> 100	3.13
<i>S. epidermidis</i> ATCC 14990	0.05	0.10	0.39	< 0.025
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	0.78	0.39	25	1.56
<i>E. faecium</i> ATCC 8043	6.25	3.13	> 100	3.13
<i>E. avium</i> 14	50	12.5	> 100	0.39
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	< 0.025	0.05	0.78	0.05
<i>M. luteus</i> ATCC 9341	0.10	0.10	1.56	0.10
<i>E. coli</i> NIHJ JC-2	0.39	3.13	100	0.20
<i>E. coli</i> KC-14	0.10	0.78	6.25	0.20
<i>E. coli</i> KC-14/RGN 823 *	0.10	100	12.5	0.78
<i>C. freundii</i> GN 7391 *	25	> 100	> 100	6.25
<i>E. cloacae</i> NCTC 9394 *	1.56	> 100	> 100	0.78
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 15380	0.20	1.56	12.5	0.39
<i>S. marcescens</i> IFO 3736	6.25	25	> 100	3.13
<i>P. vulgaris</i> IFO 3851	3.13	1.56	100	0.78
<i>M. Morganii</i> IFO 3848	0.78	3.13	25	3.13
<i>P. rettgeri</i> IFO 3850	0.78	3.13	25	6.25
<i>P. aeruginosa</i> PAO-1	> 100	> 100	> 100	12.5
<i>P. aeruginosa</i> IFO 3445	> 100	> 100	> 100	12.5

* β -lactamase producing organisms

MRSA に対する活性を示す。

II. 変異による β ラクタマーゼの基質認識の変化

β ラクタマーゼによる β ラクタム薬の加水分解は Fig. 6 に示す 2 段階で生じる。まず、第一段階では β ラクタム薬 (ここではペニシリン誘導体, 4) と β ラクタマーゼの活性中心のセリン残基との反応によるアシル中間体 (5) が形成される。このアシル中間体は水分子と反応して不活性化された加水分解物 (6) ともとの酵素に変換される。この 2 つの反応段階から β ラクタマーゼによる加水分解に抵抗するには、 β ラクタム薬が酵素に取り

込まれない構造をもつが、アシル中間体のアシル基が加水分解に抵抗する構造をもつ必要がある。後者の場合は β ラクタマーゼに対する阻害活性をもつことになる。ペニシリンやセファロsporin 誘導体では β ラクタマーゼに対する親和性を減少して β ラクタマーゼに取り込まれない構造がデザインされている。一方、ペネムやカルバペネム誘導体では β ラクタマーゼと容易に反応するため、形成するアシル中間体が安定になる構造がデザインされてきている。

最近の基質拡張性 β ラクタマーゼ (ESBL) は基質結合

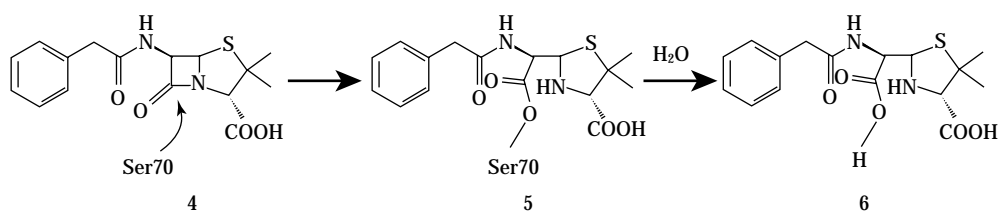
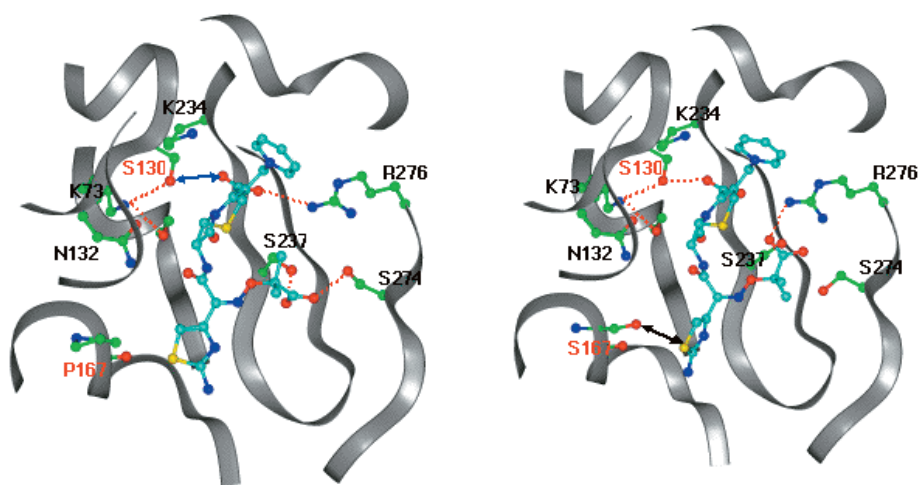
Fig. 6. Hydrolysis of penicillin by β -lactamase.

Fig. 7. Complex structures of ceftazidime in CTX-M-14 (left) and CTX-M-19 (right). Hydrogen bonds are indicated by dotted lines.

部位周辺のアミノ酸残基の変異によって、今まで親和性を示さなかったセファロスポリン誘導体などに対して親和性を獲得している。例えばクラス A β ラクタマーゼ CTXM-14 はセフトアジジム(CAZ)を加水分解できないが、Pro167 を Ser 残基に変異させた CTXM-19 は CAZ を加水分解できるようになる。これら 2 種の β ラクタマーゼの立体構造モデルについて CAZ との結合をシミュレートしたそれぞれの複合体モデルから、CTXM-14 では結合した CAZ の 4 位カルボン酸が Ser130 と有効な相互作用ができずアシル中間体の形成が促進されないが、CTXM-19 では変異した Ser167 と CAZ のアミノチアゾール基との立体的な相互作用によりアシル中間体の形成が促進されると推測された (Fig. 7)¹⁾。

β ラクタム薬と Ser130 残基の相互作用によってアシル化反応が開始される重要な相互作用であるため、Pro167 の Ser 残基への変異の役割が理解でき、Pro167 の位置がアミノチアゾール基を有するセファロスポリンやアズトレオナムなどの β ラクタム薬の認識に重要であることがわかる。

一方、ペネムやカルバペネム誘導体を容易に加水分解する ESBL ではアシル中間体を容易に加水分解する機能

が獲得されてきている。これにはアシル中間体のアシル基の動きやすさがアシル基の加水分解と関連する変異が生じている。

III. β ラクタマーゼに対して 安定なシスペナムのデザイン

Table 1 に示すように 5, 6 トランス体(1)を 5, 6 シス体(2)に変換すると MRSA に対して抗菌活性を獲得する。しかし、シス体(2)は β ラクタマーゼ産生菌に対して活性を失う。これはシス体への変換によって β ラクタマーゼと反応したアシル中間体が容易に加水分解されることによる⁷⁾。アシル中間体の立体構造モデルを用いて、シスおよびトランス体のアシル中間体と水との反応性を分子動力学法を用いてシミュレーションを行うと、トランス体では水分子がアシル基と反応しにくい、アシル基の動きやすさに制限が少ないシス体のほうが水分子と反応しやすいことが示唆された (Fig. 8)。このアシル基の動きやすさは、 β ラクタム薬の 2 位の置換基によって制限されると予測された。そこで、2 位置換基を変換した誘導体をデザインしてアシル基の動きに制限を加えられる誘導体を分子動力学法を用いてスクリーニングしたところ、誘導体 7 (Fig. 3) に関連する化合物群が β ラク

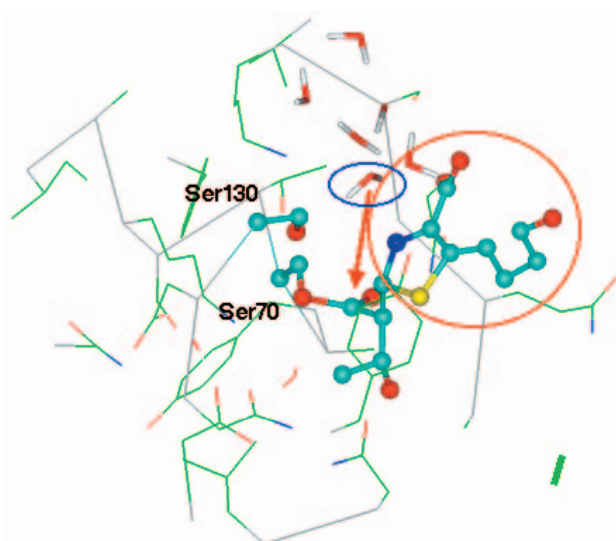


Fig. 8. Conformation of acyl-moiety (large circle) of acyl-enzyme and hydrolytic water molecule(small circle). The arrow indicates the direction of hydrolytic water molecule attack.

マーゼに対して安定であると予測され、誘導体7はMRSAおよび β ラクタマーゼ産生菌に対する良好な抗菌活性を示した。また、5,6トランス体ではヒドロキシエチル基がPBPの結合部位に最も適した置換基であったが、5,6シス体ではさらに大きな置換基をもつ誘導体8 (Fig. 3)でも同様に良好な抗菌活性を示した (Table 1)。これは5,6シス体と5,6トランス体で同様な置換基が異なる結合部位に結合することを示している、当初予想したとおりに5,6シス体はペプチドの構造をより模倣してPBPに結合しているものと考えられる (Fig. 4)。

IV. 終わりに

β ラクタム薬が相互作用する酵素、PBPと β ラクタマーゼは変異によって β ラクタム薬への親和性を変化させ耐性を獲得している。これらの変異酵素は臨床からいち早く分離され、変異部位が特定されている。一方、酵素の結晶化および結晶構造解析が進められて、現在では豊富な立体構造情報が得られており、変異によって変

化する基質スペクトルの拡張機構も明らかにされてきている。このような点から、変異PBPに対して親和性を保持し、 β ラクタマーゼに対して安定な β ラクタム薬を合理的にデザインできる可能性が高くなっている。ここでは紹介しなかったが、 β ラクタム薬に対する耐性として薬物排出機構が挙げられる。この薬物排出に関与する排出蛋白質の立体構造情報も得られるようになってきている⁸⁾。このような排出蛋白質の阻害剤の開発も含め、ポストゲノム時代として β ラクタム薬の開発領域では、標的とする酵素の立体構造や複合体構造などの情報が網羅的に蓄積され構造プロテオミクスとして検証されることにより、 β ラクタム薬およびその関連の薬の開発がより合理的に進められていくものと期待される。

文 献

- 1) Lim D, Strynadka N C J: Structural basis for the β -lactam resistance of PBP2a from methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Nature Struct Biol* 11: 870 ~ 876, 2002
- 2) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, et al: Cloning and the Sequence of Cefotaxime-hydrolyzing class A β -Lactamase gene isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2269 ~ 2275, 1995
- 3) Gordon E, Mouz N, Duee E, et al: The crystal structure of the penicillin-binding protein 2x from *Streptococcus pneumoniae* and its acyl-enzyme form: Implication in drug resistance. *J Mol Biol* 299: 477 ~ 485, 2000
- 4) Kimura S, Ishiguro M, Ishii Y, et al: Role of a mutation at position 167 of CTX-M-19 in ceftazidime hydrolysis. *Antimicrob Agents Chemother* 48: 1454 ~ 1460, 2004
- 5) Dessen A, Mouz N, Gordon E, et al: Crystal structure of PBP2x from a highly penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae* clinical isolate. *J Biol Chem* 276: 45106 ~ 45112, 2001
- 6) 石黒正路, 西原達郎, 田中里枝: 新規経口性ペネム β ラクタム抗菌薬: ファロムの創製. *薬学雑誌* 121: 915 ~ 927, 2001
- 7) Ishiguro M, Imajo S: The role of water molecules in the deacylation of acylated structures of class A β -lactamase. *Drug Desin Discovery* 16: 131 ~ 143, 1999
- 8) Murakami S, Nakashima R, Yamashita E, et al: Crystal structure of bacterial multidrug efflux transporter AcrB. *Nature* 419: 587 ~ 593, 2002

Structure-based Design of New β -lactam Antibiotics

Masaji Ishiguro

Suntory Institute for Bioorganic Research, 1 1 1 Wakayamadai,
Shimamoto-cho, Mishima-gun, Osaka, Japan

β -lactamases acquire substrate spectrum extension by mutating residues at the substrate-binding site, whereas penicillin-binding proteins reduce the affinity with β -lactams by mutating residues at this site. Alteration in the recognition of β -lactams by these penicillin-interacting enzymes must be clarified and new β -lactams designed that have high affinity with penicillin-binding proteins and are stable against extended spectrum β -lactamases. Based on crystal structures of penicillin-binding proteins and β -lactamases, we can deduce the roles of residues at the substrate-binding site and design new β -lactams. With the aid of computational methods, faropenem, a 5,6-trans-penem, was converted to 5,6-cis-penems that show anti-MRSA activity and stability against β -lactamases.