

【総説】

 β -ラクタマーゼの構造から考える耐性獲得機構—オキシイミノ系およびカルバペネム系 β -ラクタム剤を中心に—

額賀路嘉

城西国際大学薬学部*

(平成 25 年 8 月 1 日受付・平成 25 年 8 月 28 日受理)

活性中心にセリンをもつクラス A およびクラス C β -ラクタマーゼは、全体構造および活性中心構造に類似性があるものの、脱アシル化の機構に大きな違いが存在する。すなわち、クラス A β -ラクタマーゼは活性中心ポケットの底から、上に打ち上げるようにアシル基カルボニル炭素を求核攻撃するのに対し、クラス C は溶媒側、つまり上方向から活性中心ポケット内に落ちてくるように求核攻撃を行う。また、 β -ラクタム系薬が臨床的に利用されるようになって以来、新規 β -ラクタム系薬が開発され、耐性菌が出現することが繰り返されている。その典型的な例が第三世代セファロsporin系薬を主な標的とした基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (ESBL) やカルバペネム系薬を加水分解するカルバペネマーゼの出現である。本総説では、脱アシル化水に注目して、オキシイミノ系薬とカルバペネム系薬がなぜ、クラス A, C β -ラクタマーゼに対して安定なのか、その一方で、ESBL やカルバペネマーゼはなぜ分解活性を獲得したのかを X 線結晶構造解析の結果より、検討していく。

Key words: drug-resistance, oxyimino cephalosporin, carbapenem, extended spectrum β -lactamase

β -ラクタマーゼは細菌が産生する、 β -ラクタム系抗生物質加水分解酵素であり、ラクタム環を構成するアミド結合を加水分解、開裂させ、抗菌活性を失わせる、細菌の β -ラクタム系薬耐性の主要因である。

β -ラクタマーゼはさまざまな菌種の細菌が染色体やプラスミド上にその遺伝子を持ち、数多くの種類が存在しており、基質特異性や、アミノ酸配列などに基づき分類されている¹⁾。最も多く使われている分類法はアミノ酸配列の相同性によるもので、 β -ラクタマーゼをクラス A, B, C, D の 4 つのクラスに分類している。クラス B β -ラクタマーゼは活性中心に亜鉛イオンをもつ金属 β -ラクタマーゼである。クラス B β -ラクタマーゼは、一昔前までは一部のグラム陽性菌の染色体性 β -ラクタマーゼとして知られていたが、現在は、NDM-1 や IMP-1 などに代表されるプラスミド性のクラス B β -ラクタマーゼが多くのグラム陰性細菌にも広がり、臨床上大きな問題となっている。その理由の一つには、このクラス B β -ラクタマーゼが、カルバペネムなど、セリン β -ラクタマーゼに安定性の高い薬剤に対する分解活性をもつという特徴にある。クラス B を除く、クラス A, C, D は活性中心にセリン残基をもつセリン β -ラクタマーゼである。クラス A はグラム陰性菌のプラスミド性およびグラム陽性菌の染色体性のペニシリナーゼに多い β -ラクタマーゼである。クラス C はグラム陰性菌の染色体性 β -ラクタマーゼの多くが含まれ、一般的にセファロsporinナーゼであるといわれている。クラス D β -ラク

タマーゼはオキサシリン分解型のペニシリナーゼである。

これらの β -ラクタマーゼによる耐性菌に対抗するために、さまざまな β -ラクタム系薬がつくられ、使われてきた。その代表例として、セフトキシムやセフトジジムに代表される第三世代セファロsporin系薬と、Last Resorts と形容されることもあるカルバペネム系薬があげられる。これらの薬剤に対してはすでに ESBL やカルバペネマーゼといった β -ラクタマーゼが報告され、これらの薬剤が有効でない耐性菌が出現、拡散している。本総説では、クラス A β -ラクタマーゼとクラス C β -ラクタマーゼの X 線結晶構造解析によって明らかとなった 3 次元構造をもとに、これらの β -ラクタム系薬がなぜ、 β -ラクタマーゼに対して安定なのか、またなぜ、これらの薬剤を分解できる新型 β -ラクタマーゼが出現しているのかについて考えていきたい。

I. クラス A, C β -ラクタマーゼの 立体構造と反応機構の相違点

クラス A, C β -ラクタマーゼの全体構造には類似性がある (Fig. 1a, b)。セリン β -ラクタマーゼはすべてもしくはほとんどが α ヘリックスからなる α ドメイン (左半分) と縦に数本の β シート構造が走ることが特徴的な α ヘリックスと β シート構造からなる α/β ドメイン (右半分) から構成され、その境界領域に活性中心ポケットが存在する。その活性中心ポケット内には、クラス A β -ラクタマーゼとクラス C ではアミノ酸配列の相同性

*千葉県東金市求名 1 番地

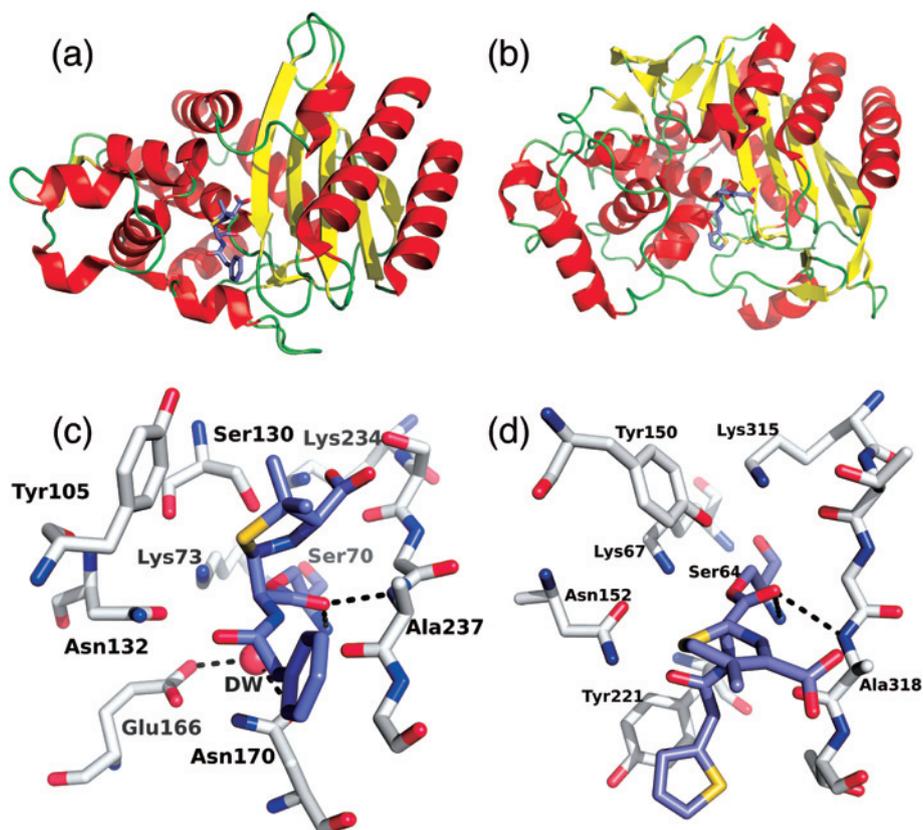


Fig. 1. Ribbon structure of the class A (a) and class C β -lactamases (b) complexed with good substrates, penicillinG (a) and cephalothin (b). Active site structures are shown in (c) and (d), respectively (PDB: 1FAG²⁷ and 1KVM¹⁸). Deacylation water and Glu166 for (c) were placed manually.

は1%以下であるにもかかわらず、活性中心Serのまわりに性質の似たアミノ酸が配置されている。このような構造上の類似性があるにもかかわらず、クラスAとCの酵素反応機構、特に脱アシル化反応のメカニズムは大きく異なっている。

すべてのセリン β -ラクタマーゼはアシル中間体を経由する2ステップメカニズムで加水分解反応が進行する。基質となる β -ラクタム系薬は溶媒中から β -ラクタマーゼの活性中心ポケット内に結合し、ミカエリス複合体を形成する。その後、活性中心セリン残基の側鎖の水酸基による β -ラクタム環内のカルボニル炭素への求核攻撃が起こり、ラクタム環開裂とともに、活性中心セリンと基質が共有結合で結ばれる。この反応のことをアシル化反応と呼び、共有結合で結ばれた中間体をアシル中間体と呼ぶ。この後、脱アシル化水 (deacylation water (DW)) と呼ばれる水分子が再度、セリンと結合しているアシル基のカルボニル炭素を求核攻撃をする。これにより、アシル基が切断され、分解産物が遊離し、酵素反応が終了する (Fig. 2)。

ミカエリス複合体、アシル中間体を通じて、ラクタム環もしくは、アシル中間体のアシル基のカルボニル酸素は2つの主鎖のアミノ基と水素結合を形成する。この構

造をオキシアニオンホールと呼ぶ (Fig. 1c, d 黒の点線部分)。オキシアニオンホールにはカルボニル基の分極を促すという役割もあるが、基質 β -ラクタム分子を酵素反応が進みやすくするために分子を固定する、たとえば、魚を切りやすいように固定するためのまな板としての役割とも言える。

X線結晶解析により、得られたクラスA、C β -ラクタマーゼの構造には類似性があるにもかかわらず、その詳細構造には決定的な違いがある。クラスA β -ラクタマーゼの活性中心には活性中心Ser70の周りに触媒残基と呼ばれるLys73, Ser130, Asn132, Glu166, Lys234, Thr/Ser235, Ala238 (アミノ酸番号はクラスA β -ラクタマーゼの標準番号²⁾)などが存在し、それぞれ基質結合や触媒反応に直接、間接的に関与している。そのポケットの底の部分には活性中心ポケットの底には脱アシル化水とみられる水分子が必ず存在し、アシル化、脱アシル化両方の一般塩基触媒と考えられているGlu166と水素結合を形成している (Fig. 1c)。一方、クラスC β -ラクタマーゼでは活性中心Ser64の周りにはLys67, Tyr150, Lys315, Thr316, Ala318 (PDB: 1BLS³⁾, P99 β -ラクタマーゼのアミノ酸番号) などクラスA β -ラクタマーゼのほとんどの活性中心残基と対応するアミノ酸残基がほ

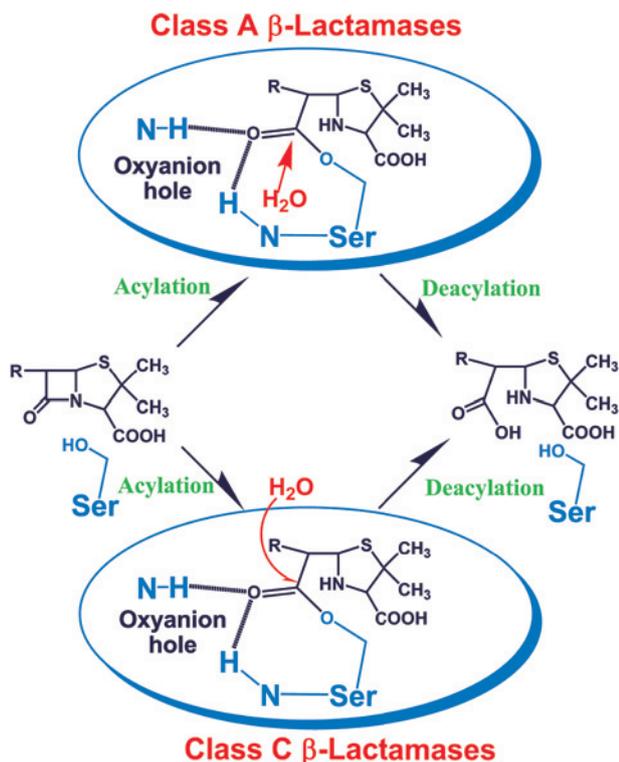


Fig. 2. Schematics of the two step mechanism of class A and C β -lactamases.

ほに対応する位置にみられ、類似した酵素と考えることもできる (Fig. 1d)。しかしながら、脱アシル水とみられる水分子は活性中心ポケット内には存在せず、クラス A β -ラクタマーゼでの Glu166 に相当する残基は存在していない。脱アシル化水が活性中心構造中にみられるか否かが決定的な相違点である。

このような構造情報から、クラス A β -ラクタマーゼとクラス C とでは触媒反応、特に脱アシル化反応が大きく異なると考えられる。アシル中間体を活性中心から切り離す際には、脱アシル化水がアシル基のカルボニル炭素を求核攻撃を行う必要がある。脱アシル化水による求核攻撃が活性中心の底から打ち上げるようにして攻撃するのがクラス A β -ラクタマーゼであり、溶媒側、つまり、カルボニル炭素の上の方から下方へ落ちてくるようにやってくるのがクラス C β -ラクタマーゼなのである。以下、脱アシル化水の位置と攻撃方向という違いに基づいてオキシイミノ系薬とカルバペネム系薬のクラス A、C β -ラクタマーゼへの反応性について考えていきたい。

II. オキシイミノ系 β -ラクタム剤

1. オキシイミノ系 β -ラクタム剤の特徴

セフトキシムやセフトジジムなどの第三世代セファロsporin系薬や、アズトレオナムなどのモノバクタム剤は広域な抗菌スペクトルをもち、特にグラム陰性細菌に有効な β -ラクタム剤である。その構造中、セファロsporin母核の7位側鎖中には、アミノチアゾール基に代

表される芳香環構造に加え、メトキシイミノ基に代表されるオキシム構造が導入されている (Fig. 3) (本総説中では、側鎖にオキシム構造をもつ第二、第三世代セファロsporin系薬、およびモノバクタム系薬をあわせてオキシイミノ系 β -ラクタム剤もしくはオキシイミノ系薬と表記する)。それらの配置はオキシムの二重結合が単結合を挟んで芳香環につながっており、7位側鎖の芳香環からオキシム構造にかけては平面上に原子が並ぶという拘束がかかっている。結果、自由度の低い大きな官能基が存在している。これらの巨大かつ平面的な側鎖のため、 β -ラクタム剤に安定であるという説明がされてきたが、「巨大な側鎖があるため安定である」という説明はクラス A とクラス C β -ラクタマーゼにとってそれぞれ異なる意味をもっている。

2. オキシイミノ系 β -ラクタム剤とクラス A β -ラクタマーゼ

1) オキシイミノ系 β -ラクタム剤のクラス A β -ラクタマーゼ安定性要因

オキシイミノ系薬は nonESBL タイプのクラス A β -ラクタマーゼに対して時には測定できないほどのとても高い K_m と低い k_{cat} 値を示している。これは基質の活性中心への結合しにくいことを示唆しており、オキシイミノ系薬の巨大な側鎖が、多くのクラス A β -ラクタマーゼの活性中心ポケットに入りきれずに、結合しにくく、結果、親和性が低いことを示している。この性質のため、酵素-ラクタム剤複合体を形成させることができず、複合体の X 線結晶解析は報告がない。

2) 基質特異性拡張型クラス A β -ラクタマーゼのオキシイミノ系 β -ラクタム剤分解要因

筆者らの研究グループは代表的なアミノ酸置換による ESBL、SHV-2 β -ラクタマーゼの構造を 0.91 \AA の超高分解像度で決定した⁴⁾。SHV-2 β -ラクタマーゼは SHV-1 を野生型として A238S アミノ酸置換によりわずかながらもオキシイミノ系薬に対して分解活性を獲得している。この 238 位というアミノ酸は、Fig. 1c の活性中心ポケットの右下側、 $\beta 3$ と呼ばれる β シートの N 末側に位置している (Fig. 4a)。この位置は、セファロsporin系薬の7位側鎖、つまりオキシム構造部分が結合すると予想される領域である。

SHV-2 の構造解析の結果、nonESBL である SHV-1 と ESBL である SHV-2 には全体的な変化、活性中心ポケットに存在する触媒残基に大きな違いは観察されなかった。しかしながら、変異部位周辺に重要な 2 つの変化が起こっていた (Fig. 4a, b)。その一つには、238 位がセリン残基に置換することにより、 $\beta 3$ 末端部分から $\beta 4$ のはじまりにかけての 238~241 位の領域の主鎖のトレースと水素結合ネットワークが変化していた。SHV-1 では、238 位の主鎖のアミノ基が Ω ループ上の Asp170 の主鎖カルボニル酸素との間に水素結合している。

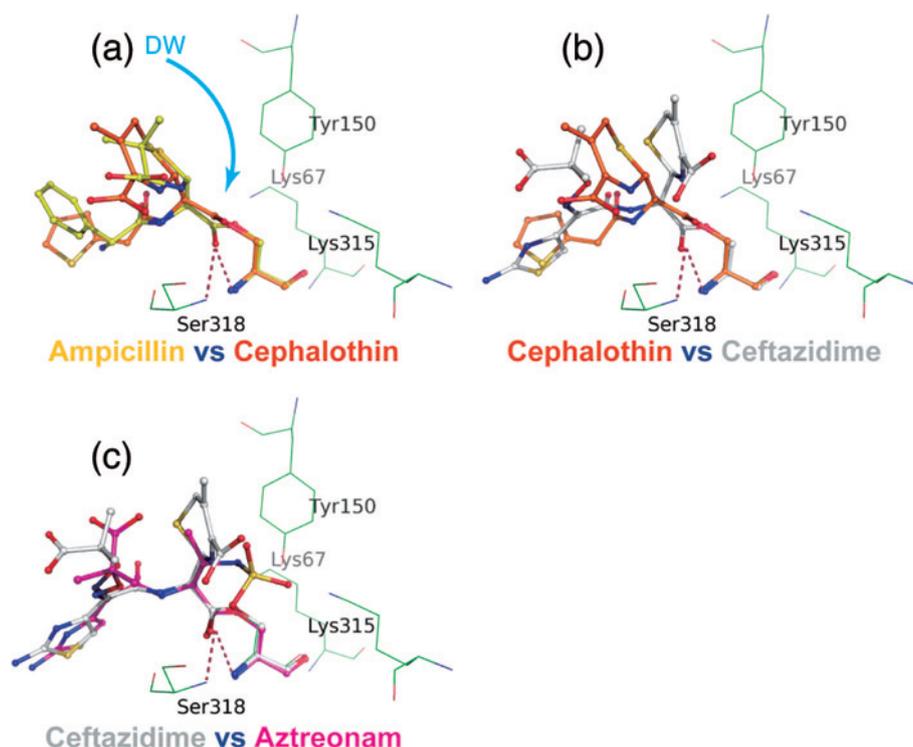


Fig. 5. Comparison of the class C β -lactamase acyl-intermediate with cephalothin (1KVM¹⁸), ampicillin (1LL9²⁸), ceftazidime (1IEL¹⁷) and aztreonam (1FR6²⁹).

また、アミノ酸置換によらない広域 β -ラクタマーゼ型のクラス A ESBL として、Toho-1⁵や CTX-M⁶、*Proteus vulgaris* K1⁷ β -ラクタマーゼの X 線結晶構造が報告されている。特に Toho-1 では、脱アシル化が進まない変異酵素を利用することにより、セフォタキシムアシル中間体の構造が報告されており⁸、オキシム構造が活性中心ポケットに収まっている様子が明らかとなっている。これらの例から、もともと、平面的かつ大きなオキシミノ側鎖をポケットに納めることができなかつた多くのクラス A β -ラクタマーゼのなかにはアミノ酸置換を繰り返すことにより、結合可能となったものが現れたのが TEM 型や SHV 型の ESBL であり、クラス A のなかでもはじめから、結合可能、加水分解可能であったものが、選択圧によりプラスミド性となったものが Toho-1 タイプの ESBL であると考えられる。

3. オキシミノ系 β -ラクタム剤とクラス C β -ラクタマーゼ

1) オキシミノ系 β -ラクタム剤のクラス C β -ラクタマーゼに対する安定性

クラス A の場合とは異なり、クラス C β -ラクタマーゼに対するオキシミノ系薬の K_m 、 K_i 値は非常に低く、かつ k_{cat} 値が著しく低い。このことは、オキシミノ系薬はクラス C β -ラクタマーゼの活性中心ポケットに速やかに結合することを示している。つまり、オキシミノ系薬の巨大な側鎖の存在で結合できないという説明は間違いということになる。このような酵素的な性質は、

脱アシル化速度が低いこと、すなわち、安定なアシル中間体の存在も同時に示している。

つまり、アシル中間体が安定に存在することになり、X 線結晶解析のよいターゲットとなりえる。 β -ラクタマーゼ複合体の X 線結晶解析では、soaking という方法を採用する機会が多い。これは結晶を、沈殿剤などの存在下で阻害剤の溶液中、数十分から数時間浸透、結合させる時間をおき、その後、液体窒素気流のなかで素早く凍結するのである。この方法では、結晶中の多くの分子を複合体にするためには高濃度の阻害剤を利用する必要があり、親和性の低い薬剤やすぐに分解してしまうような薬剤では複合体の状態で凍結することが難しい。実際、アズトレオナム、セフトジジムなどいくつかのオキシミノ系薬とクラス C β -ラクタマーゼ複合体の構造解析が PDB データベースには登録されている。

2) 立体構造から見たオキシミノ系 β -ラクタム剤のクラス C β -ラクタマーゼ安定性

オキシミノ系薬が安定なアシル中間体を形成する理由を脱アシル化水との関係で検討したい。Fig. 5 にはクラス C β -ラクタマーゼの良好基質とオキシミノ系薬とのアシル中間体の構造を示してある。Fig. 5 は Fig. 1 に示した活性中心残基の標準配置からすると右横から左側方向を見ていることになる。すなわち活性中心ポケットの底が下側となり手前に Lys315 や Ser318 が、Ser64 と結合した基質の向こう側には Lys67, Tyr150 を見ることができる。クラス C β -ラクタマーゼは脱アシル化水が

求核攻撃のターゲットであるカルボニル炭素の真上から落ちてくるように活性中心に侵入してくる。Fig. 5aには良好基質のアンピシリンとセファロチンのアシル中間体を示した。これらの場合は求核攻撃を受けるカルボニル炭素の真上に十分なスペースが存在し、矢印に示した経路で水が入ることに何ら問題はない。実際には、溶媒から水が降りてきて、Lys67やTyr150と水素結合し、一時的に保持され、脱アシル化水カルボニル炭素を求核攻撃していくと考えられている。そのためのスペースが十分に存在している例がFig. 5aである。

一方、Fig. 5bに示したセフトラジウムの場合には、脱アシル化水のためのスペースが6員環が立ち上がってきていることで消されている。セフトラジウムでは、活性中心ポケットにオキシム構造を格納することができず、ポケットの外側にせり上がった構造をとっている。ポケットからはみ出たことが原動力となり、6員環部分がTyr150側に(右側に)倒れ込み、カルボニル炭素の上に覆い被さるかにように配置される。さらにFig. 5cのアズトレオナム複合体では、倒れ込む6員環がない代わりに、スルホン酸部分が、まさにカルボニル炭素の真上に位置して、上方からの水分子を完全に隠している。セファロチンではカルボニル炭素の上方はオープンで、セフトラジウムでは遮られ、アズトレオナムでは完全に隠されている。これは脱アシル化の速度がこの順に遅くなっていることと一致している。オキシミノ系 β -ラクタム剤では、アシル中間体となった薬剤が自己の分子の一部を使って、カルボニル炭素を脱アシル化水から求核攻撃を受けないように身を挺して守っているのである。

3) 基質特異性拡張型クラスC β -ラクタマーゼ

世界初の基質特異性拡張型(ESBL型)クラスC β -ラクタマーゼが*Enterobacter cloacae* GC1株より1992年に日本で分離された。その耐性化要因は染色体性クラスC β -ラクタマーゼのアミノ酸配列中、たった一カ所の挿入変異であった。GC1 β -ラクタマーゼの Ω ループと呼ばれる部分にあるA-V-Rというアミノ酸配列が重複変異によりA-V-R-A-V-Rとなり、結果、3アミノ酸が挿入されていた⁹⁾。その挿入配列はA-V-Rである必要はなく、A-A-Aでも同様で、挿入アミノ酸数も1, 2, 3, 4と増えるに従い、オキシミノ系薬への分解活性が上昇した¹⁰⁾。しかしながら、この分解活性上昇は確かに耐性レベルを上げることに寄与しているものの、酵素の進化とは言いがたい。つまり、 k_{cat} 値が上昇するものの、同時に K_m 値も上昇してしまうので、 k_{cat}/K_m ベースではほとんど変化がないのである。触媒活性と、親和性のバランスを変えることで耐性レベルを上昇させていると言える。

この β -ラクタマーゼの立体構造は1999年、X線結晶解析により明らかとされた¹¹⁾。従来から知られているnonESBLである*E. cloacae* P99由来クラスC β -ラクタマーゼ³⁾と比較すると、異なる部分はほぼなかった。唯一、

異なるのであれば、 Ω ループ上のいくつかのアミノ酸の電子密度がほとんど見えなかったということであった。

見えないとはどのように考えられるのか? X線結晶解析とは結晶にX線を当て、その回折像をデータとして立体構造を決定する。つまり、X線が当たっている部分に存在するタンパク質分子全部の平均構造を観察していることになる。それが見えないということは、そこにペプチド鎖がなくなっている、すなわち切れてしまっているということではない。分子によって、さまざまな構造をとっていて、特定の位置にそのアミノ酸が存在しない。すなわち、その部分は「動きがある」と解釈するのが妥当である。実際、X線結晶解析のPDBの座標データには温度因子と呼ばれる値が含まれていてその値がその部分で高いということも、この考えに矛盾しない。しかしながら、運動性が高い領域があるとなぜオキシミノ系 β -ラクタム剤を分解できるのかという疑問はアポ酵素の解析からは答えはでなかった。

4) 基質特異性拡張型クラスC β -ラクタマーゼのオキシミノ系 β -ラクタム剤分解戦略

GC1 β -ラクタマーゼは分解速度が早く、オキシミノ系薬複合体の結晶構造を解析することはできなかった。これを解決するため、筆者らの研究グループは、セフトラジウムの7位側鎖と同じ構造をもつホスホン酸誘導体(Fig. 3)を準備し、複合体のX線結晶解析を行った^{12,13)}。これにより、セフトラジウムの7位側鎖の結合形態を観察しようというアイデアである。実際得られた複合体構造はGC1 β -ラクタマーゼとnonESBL型クラスC β -ラクタマーゼとで大きな違いを示していた(Fig. 6a)。nonESBL型では従来発表されていたセフトラジウム複合体と同じように7位側鎖に相当する部分は活性中心ポケットには入ることができず、溶媒側、Fig. 6aの手前側に反り上がっている。この配置ではホスホン酸誘導体ではなく、セフトラジウムの場合には6員環部分はカルボニル炭素の上方に傾いて脱アシル化水の求核攻撃を邪魔することが期待される。一方、ESBL型GC1 β -ラクタマーゼの場合は、もともと運動性が高いと考えられた Ω ループ部分がnonESBLとはまったく異なる位置に動いていた。酵素化学の分野では誘導適合という言葉がある。基質が結合する時に活性中心ポケットの形が変わるという概念であるが、まさに一目見てわかる誘導適合がGC1 β -ラクタマーゼで起こっていた。

誘導適合は Ω ループの主鎖のトレースを大きく変えていた。nonESBL型では Ω ループ上のTyr221が活性中心ポケットの底部分を形成している。 Ω ループの誘導適合の結果、Tyr224(GC1番号)はまったく別の場所に動き、もとの底部分が抜けて新しいポケットが生まれていた。これは7位側鎖を受け入れるのに十分な大きさで、GC1:ホスホン酸誘導体複合体ではオキシム側鎖がそのポケットに格納されていた(Fig. 6a, b)。この場

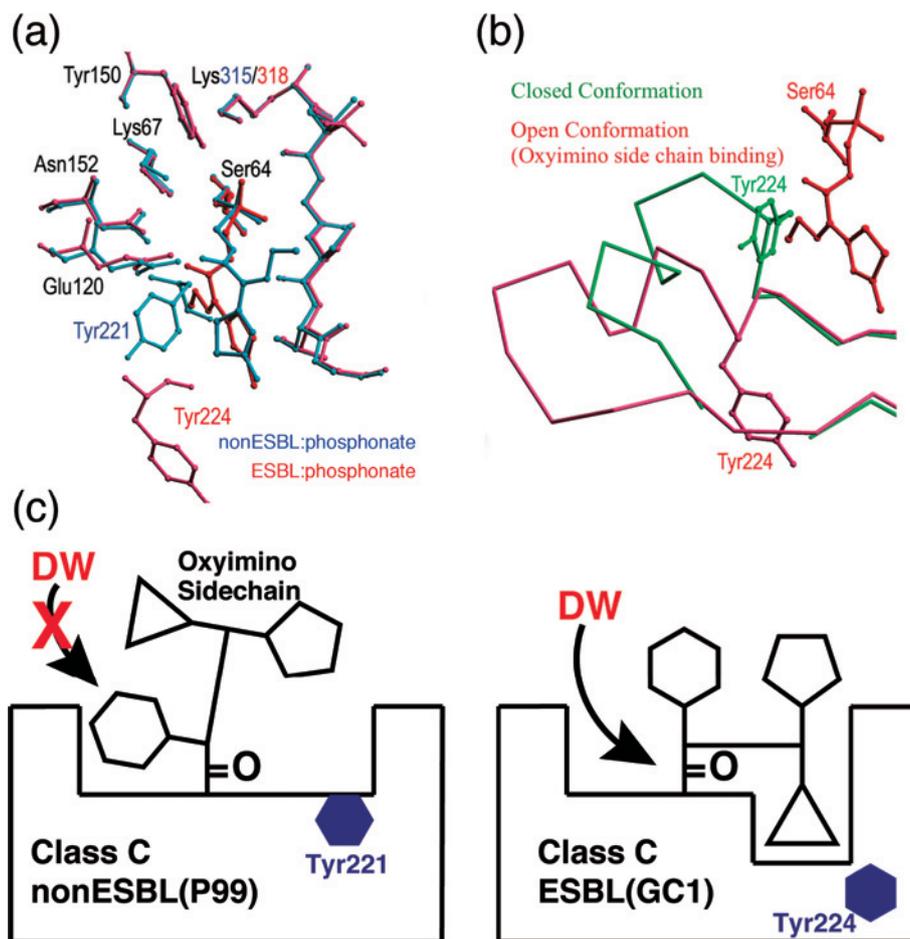


Fig. 6. (a) Overlay of the acylphosphonate in the class C ESBL *E. cloacae* GC1 (green, PDB: 1RGY) and nonESBL *C. freundii* GN346 β -lactamase (red, PDB: 1RGZ)¹³⁾. (b) Conformational change in the ω loop of the GC1 β -lactamase upon binding of the phosphonate (red), ligand-free conformation is shown in green (PDB: 1GCE)¹¹⁾. (c) Schematics of acyl-intermediate of P99 (nonESBL) and GC1 (nonESBL) β -lactamases with oxyimino β -lactam.

合、6員環はカルボニル炭素側に倒れ込むことなく、脱アシル化水の求核攻撃を邪魔しないことが推測された。GC1の Ω ループは3アミノ酸挿入変異により、運動性と自由度が高められ、オキシイミノ側鎖が来た時にはその主鎖トレースが変化し、本来存在していなかったオキシイミノ側鎖結合ポケットを形成する。ただし、このオキシイミノ側鎖結合ポケット内で、特定の水素結合や静電的相互作用は観察されなかった。このことが、親和性を上昇させなかった理由の一つであろう。結果、nonESBL型では、オキシイミノ部分がポケットからせり出してしまうことで6員環部分が図中右側に倒れ込んで脱アシル化水分子の通り道をふさいでしまうのに対して、GC1 β -ラクタマーゼでは、活性中心にオキシイミノ基がポケットに入り込むので右側に傾かない。つまりセファロチンのような良好基質と同様な脱アシル化の進行が期待できる (Fig. 6c)。

GC1 β -ラクタマーゼ以来、クラスC β -ラクタマーゼでは、3アミノ酸挿入変異だけではなく、 Ω ループ上のさ

まざまな挿入、欠失、1アミノ酸変異により類似の基質特異性拡張現象が観察されている¹⁴⁾。第三世代セフェムやモノバクタム剤はクラスC β -ラクタマーゼの変化による耐性が起こりやすい薬剤であったと言える。

5) 第四世代セファロsporin系薬

現在では、セフェピム (cefepime) やセフピロム (cefpirome) といった第四世代セファロsporin系薬も利用されている。これらの7位側鎖は第三世代セファロsporin系薬のセフォタキシムと同一で、オキシイミノ系 β -ラクタム剤に含まれるが、クラスC β -ラクタマーゼに対する挙動はまったく異なる。すなわち、クラスC β -ラクタマーゼに対する安定性は第三、第四世代共通に、 β -ラクタマーゼ安定性が高いのだが、第四世代セファロsporin系薬は、大きな K_m 値と検出可能な k_{cat} 値を示す¹⁵⁾。このことから、第四世代セファロsporin系薬は第三世代であるセフォタキシムと比較して、クラスC β -ラクタマーゼに対する親和性が低く、アシル化速度の低下し、また検出可能な脱アシル化速度が示していることが推測

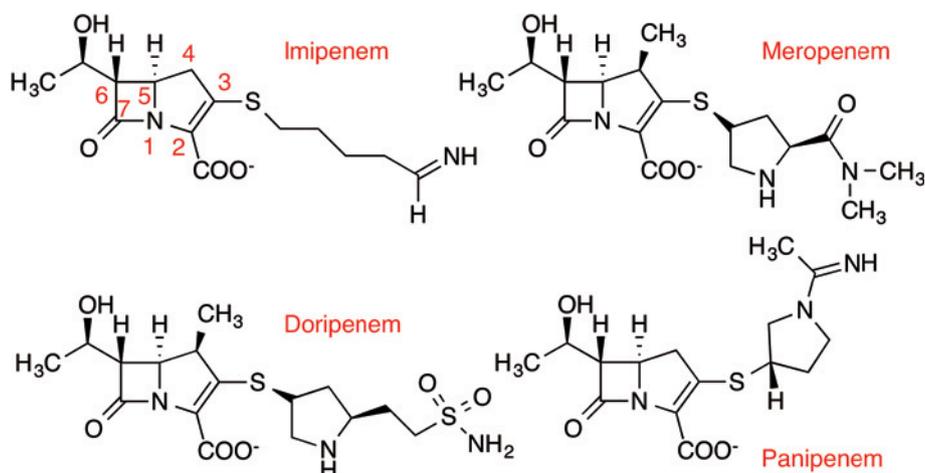


Fig. 7. Chemical structure of carbapenems.

される。

第四世代セファロsporin系薬に共通するのは3位側鎖に正電荷をもった比較的大型の官能基が導入されていることであり (Fig. 3), クラス C β -ラクタマーゼ安定性は主に酵素と基質との親和性およびアシル化反応に起因すると考えられる。ここで注目すべきは、セリン β -ラクタマーゼとの反応において、アシル化反応の途中で多くのセファロsporin系薬の3位側鎖は脱離してしまうという点である¹⁶⁾。セファロチンやセフォタキシム、セフタジムの3位側鎖はアシル化反応の過程で脱離し、アシル中間体を形成した際には炭素1つを除いてなくなってしまう。これまで得られているX線結晶構造からも3位側鎖は観察されていない^{17,18)}。親和性が低い薬剤は、複合体構造は得られにくいいため、X線結晶解析は実際には難しいが、セフェピムもセフォタキシムもアシル中間体構造は同じなのである。すなわち、その先の脱アシル化プロセスは同じであると予想される。そのため、第四世代セファロsporin系薬のクラス C β -ラクタマーゼ安定性の主要因は、ミカエリス複合体形成からアシル化反応までにあるという見方ができる。

III. カルバペネム系 β -ラクタム剤

カルバペネム系薬は β -ラクタム剤のなかでも最後の手段 (last resort) として利用されている。その理由は、ターゲットであるペニシリン結合タンパク質への高い結合性ととともにセリン β -ラクタマーゼに対して非常に高い安定性をもっていることである。このセクションではカルバペネムがクラス A, C β -ラクタマーゼに高い安定性をもつ理由をそのアシル中間体構造から検討する。また、クラス A カルバペネマーゼはなぜカルバペネムを分解できるのか、現在まで報告のないクラス C β -ラクタマーゼからカルバペネマーゼが出現する可能性はあるのか構造生物学的観点から考えてみたい。

カルバペネム系薬のセリン β -ラクタマーゼへの反応 (カルバペネマーゼ以外) では、クラス A, C とともに、カ

ルバペネム系薬の K_m (K_i), k_{cat} とともに低い値を示す。アシル化反応が速やかに進行し、脱アシル化反応が非常に遅いもしくはほとんど起こらないということが特徴である。そのため、アシル中間体の寿命が大変長く、分解されにくい。クラス A, C 両方に対して同様な挙動をしていることが特徴的である。また、この性質はX線結晶解析の研究対象となりやすいことを示している。

カルバペネムとセリン β -ラクタマーゼとで形成されるアシル中間体の注目すべき特徴が、2つあげられる。その1つはすべてのカルバペネムに共通している6R-1R-hydroxyethyl基の役割である。一般的なペニシリン系薬やセファロsporin系薬とは異なり、カルバペネム系薬のこの6位側鎖はコンパクトで比較的シンプルな構造をしている (Fig. 7)。もう1つは2種類の互変異性体が存在するという点である。有機化学的な説明は省略するが、 Δ_1 -pyrroline, Δ_2 -pyrroline と呼ばれる互変異性体を考えることができ、これらの存在はアシル中間体構造より推測され^{19,20)}、ラマンスペクトルの解析からも確認されてきた (Fig. 8)。構造という観点で見た時に、5員環のC3まわりの二重結合の位置が変化し、C3が sp^2 混成軌道か sp^3 かということが違ってくる。そのため、C3まわりの構造、特にそこから延びる側鎖がN1, C2, C3, C4と同一平面から出発するのか、それとも四面体型となるのかという違いが現れるため、その結合形態が大きく異なる。

1. カルバペネム系 β -ラクタム剤とクラス A β -ラクタマーゼ

1) カルバペネム系 β -ラクタム剤のクラス A β -ラクタマーゼに対する安定性

非カルバペネマーゼのTEM-1 β -ラクタマーゼ: イミペネム複合体のX線結晶構造は1998年にMaveyraudらにより発表されている²¹⁾。その構造中、最も注目すべきは、1998年以前のすべてと現在までのほとんどすべてのセリン β -ラクタマーゼ: β -ラクタム剤複合体で確認されているオキシアニオンホールが形成されていなかった

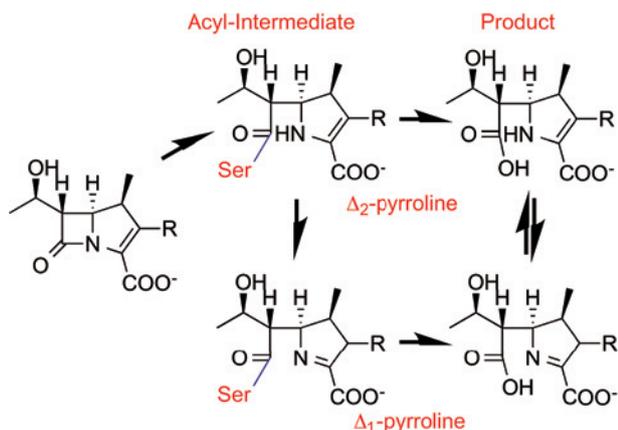


Fig. 8. The reaction scheme between a generalized carbapenem and serine β -lactamase.

ことである。オキシアニオンホールはアシル化、脱アシル化の両反応中で、それぞれ、セリン水酸基や脱アシル化水によるカルボニル炭素の求核攻撃を促進させる役割がある。この構造が存在しないとすれば、酵素反応機構が推進されるうえで致命的なダメージとなるはずである。ただし、発表されたのはアシル中間体であるので、アシル化反応は速やかに進み、ラクタム環開裂に伴ってオキシアニオンホールが破壊されたと考えるのが妥当である。

一方、筆者らのグループは2008年にSHV-1 β -ラクタマーゼ：メロペネム複合体を原子レベルといわれる1.05 Å解像度でX線結晶構造を行った²²⁾。この構造では、オキシアニオンホールが破壊されている状態は約50%で残りの50%はオキシアニオンホールを形成していた(Fig. 9a)。X線結晶構造は、結晶中の数多くの分子の平均構造を観察しているため、オキシアニオンホール付近の2種類の構造が重なって観察されていて、おおよその比率も計算することも可能である。2つの構造は結晶中、溶液中とも存在していることも報告されている²³⁾。しかしながら、先のTEM-1：イミペネムの構造では、オキシアニオンホールが破壊されて活性がほとんどゼロになるというわかりやすい説明ができた。しかし、半分は破壊、半分は通常では、半分の活性は残るのではないかという疑問が残る。この疑問に対しては原子レベル解像度の利点を使って説明が可能となった。Fig. 9bにこの時の脱アシル化水付近の電子密度と水素結合ネットワークを示した。6R-1R-hydroxyethyl基の水酸基はAsn132および脱アシル化水と水素結合している。通常解像度のX線結晶解析では水素原子の電子密度を観察することができないため、活性中心がどのような水素結合ネットワークをつくっているかを推測するのは難しい。しかしながら、原子レベルの解像度では(通常1 Åに近い領域)、水素原子由来の電子密度が特に、原子位置がしっかりと固定されている場合に観察されるようになる。われわれの構造は

1.05 Åであり、多くの水素原子由来の電子密度が観察された。運がよいことに分子型カルボキシル基をもつGlu166を観察することができた。これによりFig. 9cのような水素結合ネットワークを予想することができた。このなかの脱アシル化水は、非共有電子対の向きが通常基質の場合とは異なり、ほぼ反対方向を向いてしまい、求核攻撃できない状況にある。簡単に言うと、脱アシル化水をカルボニル炭素を求核攻撃するミサイルに例えると、良好基質ではミサイル(脱アシル化水)はターゲット(カルボニル炭素)の方向を向いているのに対し、メロペネム複合体では発射台におかれているミサイルの向きが目標とは異なる方向を向いてしまっていて求核攻撃できない配置になっている。通常解像度で解析された構造では、そこにミサイルがあることはわかるのであるが、1.05 Å解像度の構造はその向きまで明らかにすることができ、より詳細な説明を行うことができた。

また、この構造中の開裂したメロペネムは Δ_2 -pyrroline型であり、C3周りの構造は基質のメロペネムと同様であった。さらにC3から延びる側鎖の構造はそのほとんどが電子密度として見るができなかった。これはこの側鎖の自由度が高く、一カ所に固定されていないことを示している。この側鎖構造はSHV-1との相互作用には役割は小さいと考えることができる。

これらの結果、カルバペネムのクラスA β -ラクタマーゼ安定性の要因は2つあることが明らかとなった。第一はアシル中間体において一定の割合でオキシアニオンホールが破壊されていることである。第二に、6R-1R-hydroxyethyl基と脱アシル化水との直接の水素結合により、脱アシル化水の向きが変わってしまっただけで脱アシル化が起こりにくくなっていることである。オキシアニオンホールができるかできないかは、結晶構造中と水溶液中でも異なることもわかっている。また、古く、互変異性体の存在がアシル中間体の安定性と関係があるということがいわれてきたが、あまり関係がないようである。

2) クラスAカルバペネマーゼ

先に掲載された井深氏の総説にクラスAカルバペネマーゼの立体構造についての記述があるので詳しくは参照していただきたい²⁴⁾。昨年、SFC-1クラスAカルバペネマーゼの変異体を利用したメロペネムのミカエリス複合体(S70A)とアシル中間体(E166A)のX線結晶構造が発表された。さらに、分子動力学法を利用した分子シミュレーションにより、野生型酵素のメロペネムミカエリス複合体およびアシル中間体の様子が解析された。これによると、SFC-1のミカエリス複合体やアシル中間体では6R-1R-hydroxyethyl基中の水酸基は脱アシル化水とは水素結合せずに、代わりにAsn132の側鎖N原子と水素結合していた。SHV-1やその他のカルバペネム感受性酵素とは異なり、SFC-1の活性中心ポケット内にメロペネムアシル中間体が形成されても、脱アシル化水の求

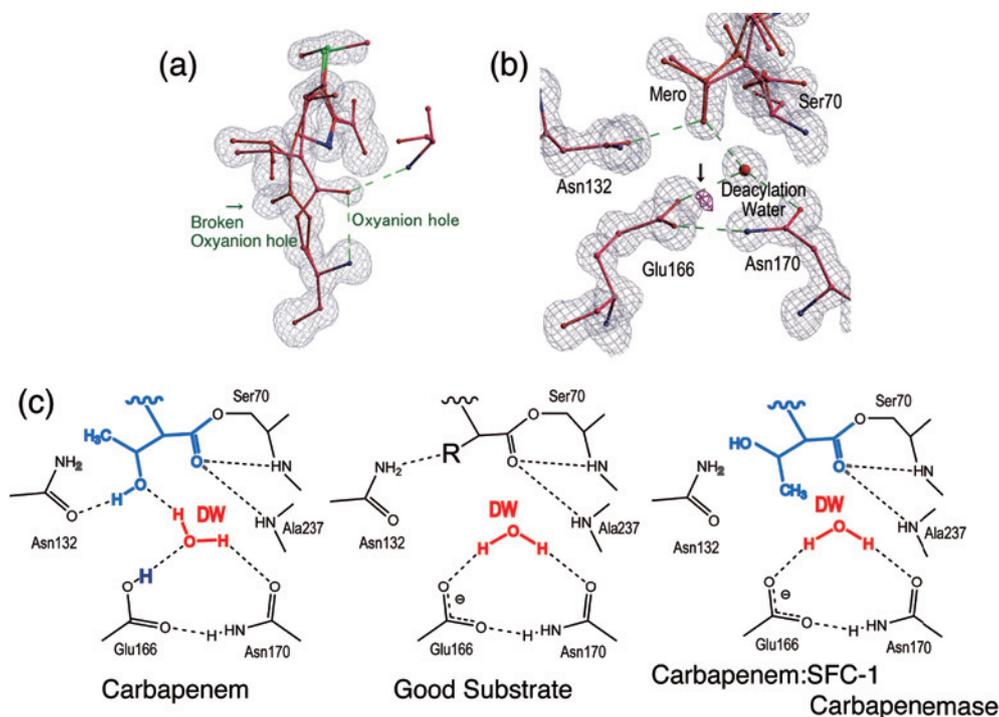


Fig. 9. Electron density map of SHV-1 acyl-intermediate with meropenem. (a) Acylated Ser70 with meropenem and oxyanion hole. (b) Environment of the deacylation water molecule in SHV-1 acyl-intermediate with meropenem. Red electron density map (fo- f_c , 2.5σ) is for the hydrogen atom of protonated Glu166. (c) Deduced hydrogen bond network around deacylation water for carbapenem-bound acyl-enzyme, a good substrate and carbapenem bound SCF-1 carbapenemase.

核性は保持されていると考えられる (Fig. 9c 右)。SFC-1 クラス A カルバペネマーゼではカルバペネム系薬の6位側鎖中の水酸基と脱アシル化水との間の水素結合がなくなり、良好基質と同様な脱アシル化反応が可能になったことがカルバペネマーゼたる理由だと考えられる。

2. カルバペネム系 β -ラクタム剤とクラス C β -ラクタマーゼ

大腸菌由来の AmpC β -ラクタマーゼのイミペネム複合体の X 線結晶構造は 2002 年に Beadle らにより発表されている²⁵⁾。その構造中のオキシアニオンホールは TEM-1: イミペネム複合体の場合と同様に形成されておらず、カルボニル酸素は通常オキシアニオンホールの位置からほぼ 180 度逆転した場所に存在していた。また、イミペネムアシル中間体は Δ_2 -pyrroline であり、アシル中間体中の C3 炭素は基質イミペネムと同様に、 sp^2 混成軌道をとっていた。Beadle らはこの構造を根拠に、オキシアニオンホールが形成されないことがイミペネムのクラス C β -ラクタマーゼ安定性の主要因であると結論づけている。

筆者らのグループはドリペネム、パニペネム、また予備的な実験であるがイミペネムの3種類のカルバペネムと *E. cloacae* P99 由来クラス C β -ラクタマーゼとの複合体構造の X 線結晶解析を行っているが、現在の所、3つのカルバペネム全部でオキシアニオンホールが 100% 形

成されていることが確認されている²⁶⁾。つまり、オキシアニオンホールが形成されているにもかかわらず、カルバペネムとのアシル中間体は、少なくとも複合体の X 線結晶解析が可能ほど安定している。クラス A と同様、オキシアニオンホール以外の理由を考える必要がある。

カルバペネム系薬のクラス C β -ラクタマーゼ安定性の要因は、ある意味、アズトレオナムととても似ている。クラス C β -ラクタマーゼの脱アシル化反応においては、オキシアニオンホールの形成により、ラクタム環が開いてできたカルボニル基はまな板の上に固定され、そのカルボニル炭素に向かって上方から水分子が落ちてくる。アズトレオナムのようなオキシイミノ系薬では、水分子が落ちてくる道筋を自らの体(分子)の一部を使ってブロックすることがアシル中間体安定性(脱アシル化水による求核攻撃が起こりにくいこと)の要因であった。同様な現象が、ドリペネムやパニペネムと P99 クラス C β -ラクタマーゼアシル中間体の X 線結晶構造から推測された。Fig. 10 にセファロチン、アズトレオナム、ドリペネム、イミペネム (AmpC) のそれぞれが P99 β -ラクタマーゼとアシル中間体を形成している様子を示した。セファロチンと異なり、ドリペネムと形成されたアシル中間体では、その5員環がカルボニル炭素の上方をカバーしている様子をはっきりとわかる (Fig. 10a)。それは

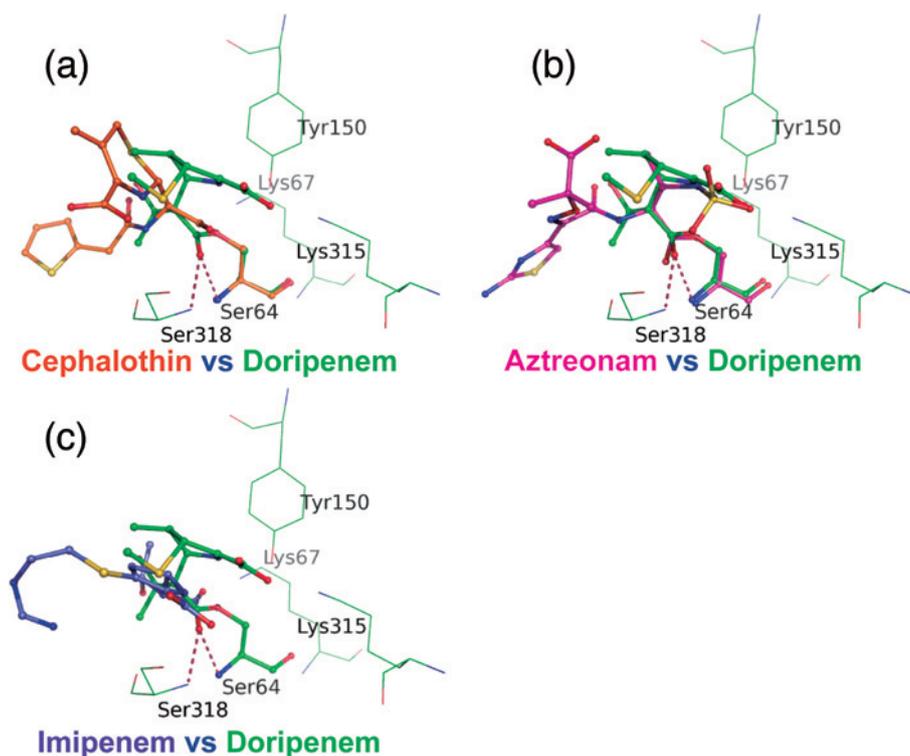


Fig. 10. Comparison of the class C β -lactamase acyl-intermediate with cephalothin (1KVM¹⁸), aztreonam (1FR6²⁹), doripenem²⁶ and imipenem (1LL5²⁵).

アズトレオナムの場合、スルホ基の部分が完全にカルボニル炭素の上に覆い被さり、上方からの攻撃から防御している部分と重なっている (Fig. 10b)。ドリベネムやパニペネムの場合、その5員環部分がちょうど、カルボニル炭素の上に覆い被さるように位置し、脱アシル化水による攻撃から防御する形をとっているのである。この点で、オキシイミノ系薬と、カルバペネム系薬のクラスC β -ラクタマーゼに対する安定性には類似点があると考えられる。

一方、AmpC:イミペネム複合体では、このようなコンフォメーションをとっていない (Fig. 10c)。オキシアニオンホールが形成されておらず、すなわちまな板の上にカルボニル基はのっていない。また、5員環とそこから延びる3位側鎖の位置はドリベネムやパニペネムとは異なっていて、脱アシル化水のブロックという点では不十分であると考えられる。AmpC:イミペネム複合体の構造の結果からはアシル中間体においてオキシアニオンホールが形成されないことがイミペネム複合体の安定性の要因と結論づけることができる。

また、C3炭素周辺の立体配置に影響する互変異性体については AmpC:イミペネム複合体では Δ_2 -pyrroline, P99:ドリベネムの場合は Δ_1 -pyrroline, P99:パニペネムでは Δ_2 -pyrroline, であり、酵素活性との関連性がないように思われる。つまり、アシル中間体の安定性と互変異性体の種類とは相関性は低いと考えられる。

クラスC β -ラクタマーゼのカルバペネム安定性の要因として、①5員環を中心とする部分がカルボニル炭素の上部を覆い隠し脱アシル化水による求核攻撃からブロックすること、②アシル中間体におけるオキシアニオンホールの不形成のどちらか、もしくは両方があげられる。菌体内ペリプラズム空間ではどちらの寄与が大きいのかは不明である。①の要因が主であるとすると、将来のクラスCカルバペネムゼの出現も危惧される。アズトレオナムと類似の要因でカルバペネム安定性が達成されているという事実は、アズトレオナムでは Ω ループ上の変異により、比較的容易に分解活性が上昇してしまったという過去の現実とどうしても重なり合ってしまうのである。

謝 辞

研究遂行にあたり、ご協力いただきました共同研究者の皆様へ厚く御礼申し上げます。この総説は、2012年10月に行われた第61回日本感染症学会東日本地方会学術講演会、第59回日本化学療法学会東日本支部総会、第95回日本細菌学会関東支部総会合同学会内のシンポジウム9、「 β ラクタマーゼ学：構造・活性からその特徴を科学するシンポジウム」において発表した内容に基づいて書かれました。シンポジウムの企画、運営ならびに投稿を推薦していただいた東邦大学医学部、石井良和教授に感謝いたします。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Bush K, Jacoby G A: Updated functional classification of β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2010; 54: 969-76
- 2) Ambler R P, Coulson A F, Frère J M, Ghuysen J M, Joris B, Forsman M, et al: A standard numbering scheme for the class A β -lactamases. *Biochem J* 1991; 276: 269-70
- 3) Lobkovsky E, Billings E M, Moews P C, Rahil J, Pratt R F, Knox J R: Crystallographic structure of a phosphonate derivative of the *Enterobacter cloacae* P99 cephalosporinase: mechanistic interpretation of a β -lactamase transition-state analog. *Biochemistry* 1994; 33: 6762-72
- 4) Nukaga M, Mayama K, Hujer A M, Bonomo R A, Knox J R: Ultrahigh resolution structure of a class A β -lactamase: on the mechanism and specificity of the extended-spectrum SHV-2 enzyme. *J Mol Biol* 2003; 328: 289-301
- 5) Ibuka A S, Ishii Y, Galleni M, Ishiguro M, Yamaguchi K, Frère JM, et al: Crystal structure of extended-spectrum β -lactamase Toho-I: insights into the molecular mechanism for catalytic reaction and substrate specificity expansion. *Biochemistry* 2003; 42: 10634-43
- 6) Chen Y, Bonnet R, Shoichet B K: The acylation mechanism of CTX-M β -lactamase at 0.88 Å resolution. *J Am Chem Soc* 2007; 129: 5378-80
- 7) Nukaga M, Mayama K, Crichlow G V, Knox J R: Structure of an extended-spectrum class A β -lactamase from *Proteus vulgaris* KI. *J Mol Biol* 2002; 317: 109-17
- 8) Shimamura T, Ibuka A, Fushinobu S, Wakagi T, Ishiguro M, Ishii Y, et al: Acyl-intermediate structures of the extended-spectrum class A β -lactamase, Toho-I, in complex with cefotaxime, cephalothin, and benzylpenicillin. *J Biol Chem* 2002; 277: 46601-8
- 9) Nukaga M, Haruta S, Tanimoto K, Kogure K, Taniguchi K, Tamaki M, et al: Molecular evolution of a class C β -lactamase extending its substrate specificity. *J Biol Chem* 1995; 270: 5729-35
- 10) Nukaga M, Taniguchi K, Washio Y, Sawai T: Effect of an amino acid insertion into the omega loop region of a class C β -lactamase on its substrate specificity. *Biochemistry* 1998; 37: 10461-8
- 11) Crichlow G V, Kuzin A P, Nukaga M, Mayama K, Sawai T, Knox J R: Structure of the extended-spectrum class C β -lactamase of *Enterobacter cloacae* GCl, a natural mutant with a tandem tripeptide insertion. *Biochemistry* 1999; 38: 10256-61
- 12) Kumar S, Adediran S A, Nukaga M, Pratt R F: Kinetics of turnover of cefotaxime by the *Enterobacter cloacae* P99 and GCl β -lactamases: two free enzyme forms of the P99 β -lactamase detected by a combination of pre- and post-steady state kinetics. *Biochemistry* 2004; 43: 2664-72
- 13) Nukaga M, Kumar S, Nukaga K, Pratt R F, Knox J R: Hydrolysis of third-generation cephalosporins by class C β -lactamases. Structures of a transition state analog of cefotaxime in wild-type and extended spectrum enzymes. *J Biol Chem* 2004; 279: 9344-52
- 14) Jacoby G A: AmpC β -lactamases. *Clin Microbiol Rev* 2009; 22: 161-82
- 15) Hiraoka M, Masuyoshi S, Mitsuhashi S, Inoue M: Cephalosporinase interactions and antimicrobial activity of BMY-28142, ceftazidime and cefotaxime. *J Antibiot* 1988; 41: 86-93
- 16) Mazzella L J, Pratt R F: Effect of the 3'-leaving group on turnover of cephem antibiotics by a class C β -lactamase. *Biochem J* 1989; 259: 255-60
- 17) Powers R A, Caselli E, Focia P J, Prati F, Shoichet B K: Structures of ceftazidime and its transition-state analogue in complex with AmpC β -lactamase: implications for resistance mutations and inhibitor design. *Biochemistry* 2001; 40: 9207-14
- 18) Beadle B M, Trehan I, Focia P J, Shoichet B K: Structural milestones in the reaction pathway of an amide hydrolase: substrate, acyl, and product complexes of cephalothin with AmpC β -lactamase. *Structure* 2002; 10: 413-24
- 19) Zafaralla G, Mobashery S: Facilitation of the $\Delta_2 \rightarrow \Delta_1$ pyrroline tautomerization of carbapenem antibiotics by the highly conserved arginine-244 of class A β -lactamases during the course of turnover. *J Am Chem Soc* 1992; 114: 1505-6
- 20) Taibi P, Mobashery S: Mechanism of turnover of imipenem by the TEM β -lactamase revisited. *J Am Chem Soc* 1995; 117: 7600-5
- 21) Maveyraud L, Mourey L, Kotra L P, Pedelacq J D, Guillet V, Mobashery S, et al: Structural basis for clinical longevity of carbapenem antibiotics in the face of challenge by the common class A β -lactamases from the antibiotic-resistant bacteria. *J Am Chem Soc* 1998; 120: 9748-52
- 22) Nukaga M, Bethel C R, Thomson J M, Hujer A M, Distler A, Anderson V E, et al: Inhibition of class A β -lactamases by carbapenems: crystallographic observation of two conformations of meropenem in SHV-1. *J Am Chem Soc* 2008; 130: 12656-62
- 23) Kalp M, Carey P R: Carbapenems and SHV-1 β -lactamase form different acyl-enzyme populations in crystals and solution. *Biochemistry* 2008; 47: 11830-7
- 24) Ibuka A: Extended-spectrum β -lactamase: a strategy to expand substrate specificity from the viewpoint of structural biology. *日化療会誌* 2013; 61: 287-91
- 25) Beadle B M, Shoichet B K: Structural basis for imipenem inhibition of class C β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 2002; 46: 3978-80
- 26) Nukaga, et al: manuscript in preparation
- 27) Strynadka N C, Adachi H, Jensen S E, Johns K, Sielecki A, Betzel C, et al: Molecular structure of the acyl-enzyme intermediate in β -lactam hydrolysis at 1.7 Å resolution. *Nature* 1992; 359: 700-5
- 28) Trehan I, Morandi F, Blaszczyk L C, Shoichet B K: Using steric hindrance to design new inhibitors of class C β -lactamases. *Chem Biol* 2002; 9: 971-80
- 29) Oefner C, D'Arcy A, Daly J J, Gubernator K, Charnas R L, Heinze I, et al: Refined crystal structure of β -lactamase from *Citrobacter freundii* indicates a mechanism for β -lactam hydrolysis. *Nature* 1990; 343: 284-8

Bacterial resistance mechanisms to oxyimino β -lactams and carbapenems on the basis of the β -lactamase structure

Michiyoshi Nukaga

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Josai International University, 1 Gumyo, Togane, Chiba, Japan

Class A and C β -lactamases are similar in their entire three dimensional and active site structures, however their deacylation mechanisms are quite different. In the case of class A β -lactamases, deacylation water is positioned at the bottom of the active site pocket and attacks the carbonyl carbon of the substrate in an upward direction. On the other hand, the deacylation water of class C β -lactamases attacks the carbonyl carbon in a downward direction from the solvent. The difference is very important to understand the reaction mechanism of what we call "slow substrate" type β -lactams. Alternatively, the disease-causing bacteria are in an evolutionary rat-race with the new type of antibiotics. Oxyimino β -lactams and carbapenems are widely used β -lactam antibiotics that resist hydrolysis by serine β -lactamases. Furthermore, extensive use of oxyimino β -lactams and carbapenems resulted in the emergence of ESBLs (Extended Spectrum β -lactamases) and carbapenemases, respectively. In this review, we discuss why oxyimino β -lactams and carbapenems resist hydrolysis by wild-type class A and C β -lactamases and why ESBLs and class A carbapenemases can hydrolyze them, respectively, on the basis of the difference in their deacylation mechanisms.