

【総 説】

Extended-spectrum β -lactamase, 構造生物学的見地からみた基質特異性拡張戦略

井 深 章 子

山形大学理学部物質生命科学科*

(平成 25 年 4 月 1 日受付・平成 25 年 4 月 5 日受理)

薬剤耐性菌が生産する β -ラクタマーゼは、アミノ酸配列の相同性に基づいて A から D の 4 クラスに分類され、各クラスの酵素は基質特異性にも特徴があるとされてきた。しかし、より広い範囲の薬剤に対して分解活性を示す基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-spectrum β -lactamases : ESBL) が報告されている。クラス A 酵素は一般にペニシリン系薬に対する分解活性が高いとされてきたが、オキシミノセファロスポリン系薬分解能を有する ESBL が現在までに数多く出現した。さらに“last resort”と称されるカルバペネム系薬に対する分解活性を有するクラス A 酵素も複数報告されており、使用薬剤に対応する酵素の“分子進化”が顕著である。本総説では特にクラス A β -ラクタマーゼを対象とし、 β -ラクタマーゼの ESBL、カルバペネマーゼ活性獲得のメカニズムを立体構造の面から紹介する。

Key words: extended-spectrum β -lactamases, carbapenemases, structure

薬剤耐性菌が生産する β -ラクタマーゼは、そのアミノ酸配列から Ambler らによって A から D の 4 クラスに分類される¹⁾。クラス A, C, D に属する酵素はセリン残基を活性触媒基とするセリン β -ラクタマーゼであり、一方クラス B 酵素は亜鉛要求性の金属 β -ラクタマーゼである。4 つのクラスは基質特異性の面でも特徴があるとされ、クラス A はペニシリン系薬に対し高い分解活性を示すペニシリナーゼ、クラス B はカルバペネム分解性、クラス C はセファロスポリン系薬に対し高い特異性を示すセファロスポリナーゼ、クラス D はオキサシリナーゼとして知られてきた。しかしながら、より広い範囲の薬剤に対して分解活性を示す基質特異性拡張型 β -ラクタマーゼ (Extended-spectrum β -lactamases : ESBL) が出現し、世界中で数多く報告されてきた。クラス A では ESBL に加えてカルバペネム系薬を分解する酵素も複数報告され問題視されている^{2,3)}。

一般に酵素の触媒機能や基質認識機構を論じるうえで、酵素の立体構造情報を得ることは大きなアドバンテージとなる。薬剤の作用・分解に関連する酵素の場合、ドラッグデザインにつながる重要な情報を提供することにもなる。 β -ラクタマーゼについては現在までに多くの X 線結晶構造解析が行われており、A から D の各クラスに属する複数の β -ラクタマーゼに加え、 β -ラクタム剤の本来のターゲット酵素である細胞壁合成酵素トランスペプチダーゼ (ペニシリン結合タンパク質, PBP) の結晶構造も解明されており、立体構造と基質特異性・触媒能の関係、多様な酵素群の分子進化過程について議論がなされている。クラス A, C, D および PBP では、

全体構造のトポロジーが共通であることが確認できる (Fig. 1)^{4,5)}。これらのタンパク質群は、共通の全体構造を保ちつつ多様な基質特異性を有しているのである。

I. クラス A ESBL

クラス A の ESBL には、大きく分けて 2 つのタイプが存在する。まず 1 つ目は、TEM-1 や SHV-1 など非 ESBL 型の親酵素にアミノ酸変異が起きたことで基質特異性が拡張した酵素群である⁶⁾。この酵素群では多くの場合、基質結合に関与するアミノ酸の置換により基質認識に変化が起き、結果として基質特異性が広がったと考えられる⁷⁾。一般に、これらのアミノ酸置換による酵素全体あるいは基質結合部位の立体構造にはほとんど変化がみられない。

2 つ目のグループは、従来のペニシリン分解酵素とのアミノ酸配列相同性が低い酵素群である。細菌の染色体上にコードされていた基質特異性の広い β -ラクタマーゼがプラスミド伝達性となることで広く伝搬し、その過程においてアミノ酸置換を起こしてバリエーションを生じたと考えられる⁸⁾。このタイプの代表例としては、高いセフトキシム分解活性を有する CTX-M 型酵素群が挙げられ、このファミリーに属する酵素はすでに 100 種類以上が報告されている^{6,9)}。1 つ目のグループとの間の一次構造 (アミノ酸配列) の同一性はおよそ 40% 前後かそれ以下であり、分子として構造面で明確な違いを有すると予想された。

*山形県山形市小白川町 1-4-12

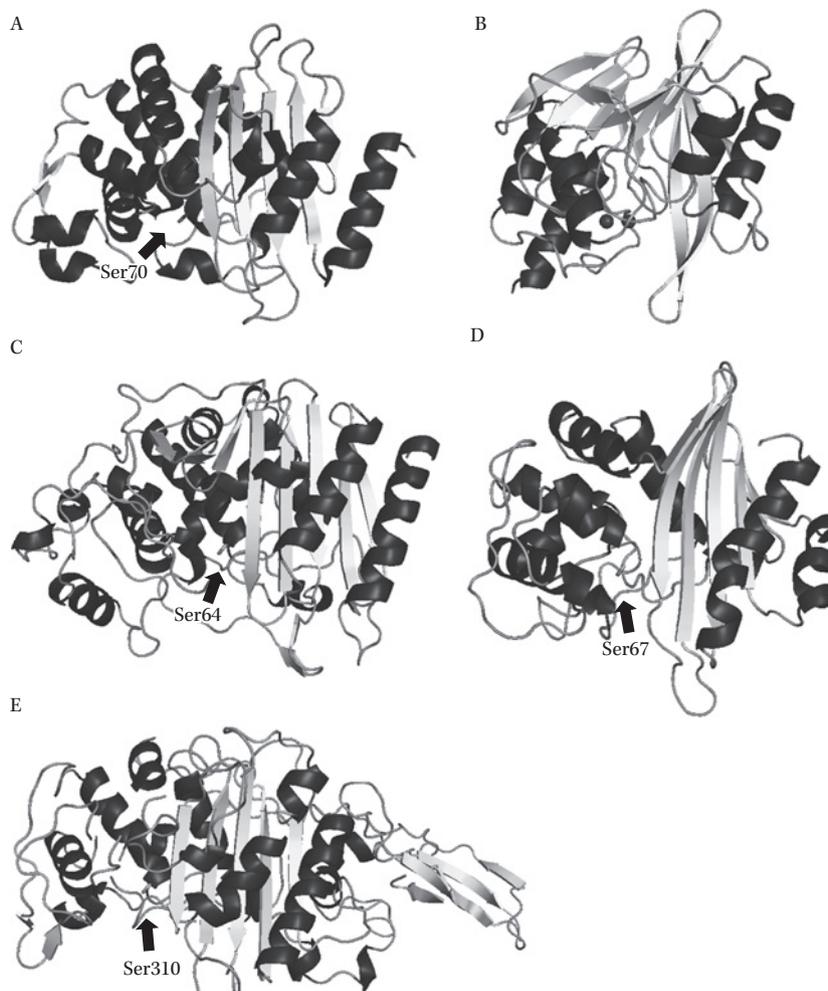


Fig. 1. Three-dimensional structure of β -lactamases. PDB accession numbers are in the parentheses. A: class A β -lactamase Toho-1 (1IYS)¹²⁾, B: class B β -lactamase VIM-4 (2WHG)²⁴⁾, C: class C β -lactamase AmpC (1KE4)²⁵⁾, D: class D β -lactamase OXA-10 (1K4F), E: PBP2 from *Neisseria gonorrhoeae* (3EQU)²⁶⁾. In A, C to E, active-site Ser residue is indicated as stick model with black arrow. In B, Zn atoms are indicated as grey spheres.

1. CTX-M型ESBL Toho-1 (CTX-M-44)における基質特異性拡張メカニズム

β -ラクタマーゼ Toho-1 (CTX-M-44) は、東邦大学医療センター大森病院において患者の尿より単離された薬剤耐性大腸菌が生産する β -ラクタマーゼであり、高いセフトキシム分解活性を有する ESBL として 1995 年に報告された¹⁰⁾。その立体構造が従来の酵素とどのように異なるのか興味をもたれたが、結晶構造解析の結果、Toho-1 の全体構造は非 ESBL の酵素の構造と非常に類似しており、明らかな差異は確認できなかった^{11,12)}。そこでわれわれのグループでは Toho-1 の基質特異性拡張メカニズムとして、以下の 2 つの仮説を立て実験的に検証した。

第一に、Toho-1 の基質結合部位は非 ESBL よりも柔軟性が高く、それゆえに大きな置換基を有する基質を結合・加水分解することができるかと予想した。結晶構造解

析により得られる立体構造は、あくまでも結晶タンパク質分子の平均像、静止画像であり、“柔軟性”の情報を結晶構造解析から直接得ることはできない。そこで基質結合部位に共有結合（ジスルフィド結合）を導入し、人為的に酵素の一部を固定することでこの仮説を検証した。基質結合部位に存在する 238 番目のグリシン残基をシステイン残基に置換した変異型酵素 G238C においては、新たに導入した 238 番目のシステイン残基と既存の 69 番目のシステイン残基との間にジスルフィド結合が形成された。結晶構造解析から、このジスルフィド結合導入による基質結合部位の構造変化は生じないことが確認された (Fig. 2)。この変異型酵素では、オキシイミノセファロsporin 系薬に対して選択的に活性が低下した。一方、基質結合部位から離れた箇所にジスルフィド結合を導入した変異型酵素 A77C/G123C ではこのような基質特異性の変化はみられず、基質結合部位の柔軟性の重要性が

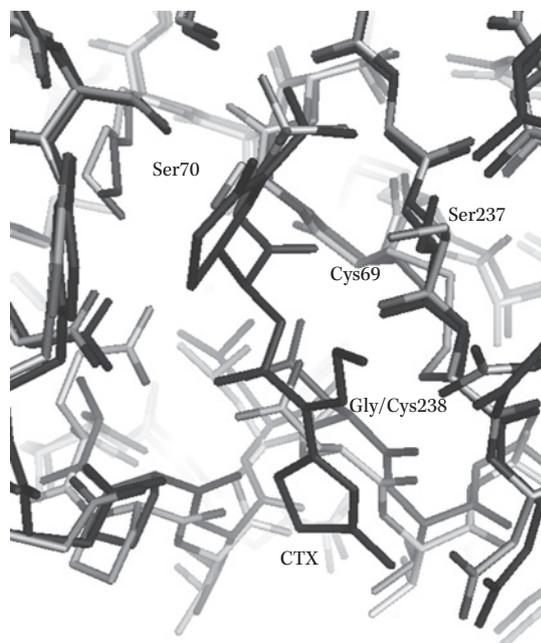


Fig. 2. Substrate-binding site of Toho-1 mutant G238C (PDB accession number: 1WE4). It is superimposed on the structure of Toho-1 acyl-intermediate with cefotaxime (PDB accession number: 1IYO), shown in dark grey.

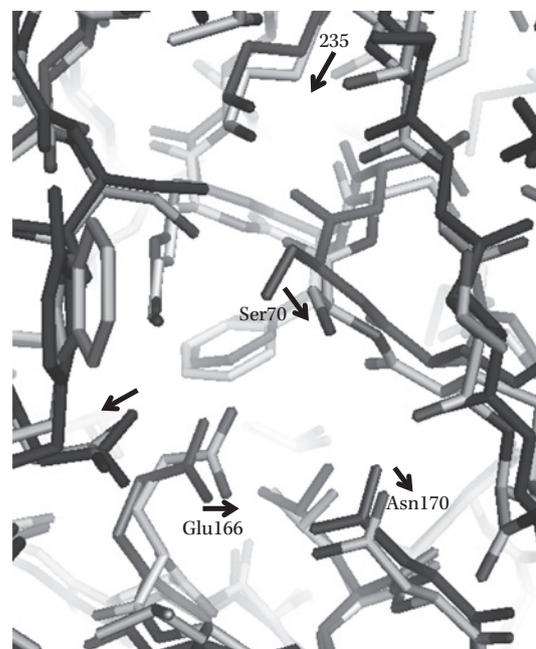


Fig. 3. Substrate-binding cleft of carbapenemase KPC-2 compared with that of TEM-1 (grey). In KPC-2, several amino acid residues shift to the direction indicated with arrows²³.

示唆される結果となった¹³。

第二の仮説として、Toho-1 と非 ESBL 型酵素のアミノ酸の同一性が 40% であり、60% のアミノ酸は異なることから、CTX-M 型酵素のみにおいて保存されているアミノ酸残基が基質認識・結合に重要である可能性が考えられた。実際に薬剤を結合したアシル化酵素の結晶構造から、Toho-1 において基質結合に関与するアミノ酸残基の候補を絞ることができた¹⁴。それらのアミノ酸残基を置換した変異型酵素の速度論的解析を行った結果、変異型酵素における基質特異性は TEM 型や SHV 型の ESBL でみられたほど劇的には変化せず、CTX-M 酵素で保存されている基質結合部位の一つ一つのアミノ酸残基の基質特異性拡張への影響は限定的であった¹⁵。

以上の結果から、CTX-M 型酵素における基質特異性拡張は、基質結合部位の高い柔軟性と、基質結合部位付近のアミノ酸置換の総合的な効果によるものと推測された。

2. 酵素の熱安定性が細菌の薬剤耐性に与える影響

基質結合部位から離れた箇所にジスルフィド結合を導入した Toho-1 変異型酵素 A77C/G123C は、野生型 Toho-1 と速度論的性質にはほとんど差がみられない。このことは A77C/G123C と野生型酵素では触媒能に差がないことを意味する。しかし、A77C/G123C を生産する大腸菌においては、野生型 Toho-1 生産菌よりも複数の抗生物質に対して MIC 値が大きくなる傾向がみられた。A77C/G123C のタンパク質分子としての熱安定性は野

生型酵素より有為に高いことから、細菌の薬剤耐性には、細菌が生産する酵素の熱安定性向上も寄与することが示唆された¹⁶。酵素の安定化による生産菌の薬剤耐性向上は、TEM など他の β -ラクタマーゼにおいても起きている可能性があると考えられる。

II. クラス A カルバペネマーゼ

カルバペネムは β -ラクタマーゼに分解されにくく“last resort”と称されるが、近年はカルバペネム分解能をもつ酵素(カルバペネマーゼ)の出現が相次いでいる。クラス B β -ラクタマーゼの IMP, VIM, NDM-1、一部のクラス D 酵素に加え、クラス A においても複数のカルバペネマーゼが報告されており、カルバペネム分解機構の解明は急務である^{17,18}。

1. クラス A カルバペネマーゼ

現在、複数のクラス A β -ラクタマーゼがカルバペネム分解能をもつと報告されている。KPC (*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase) ファミリーは 10 以上の酵素がデータベースに登録されており、互いに 1 から数アミノ酸が異なる⁶。GES (Guiana extended-spectrum) ファミリーには 20 以上の酵素があるが、カルバペネム分解活性が非常に低い酵素が混在する。SME (*Serratia marcescens* enzyme) には 3 つの酵素があり、それぞれ 1-2 アミノ酸が置換されている¹⁹。IMI (imipenemase) には 2 つの酵素があり、2 アミノ酸が異なる。NMC-A (non-metallo-carbapenemase-A) は IMI 酵素と 8 アミノ酸が異なる酵素である。これに加え、SHV-38, *Serratia fonticola*

由来 SFC-1 もカルバペネム分解能をもつと報告されている¹⁸⁾。KPC, IMI, SME, NMC-A はアミノ酸配列の相同性が非常に高い一方、他のカルバペネマーゼとの相同性はカルバペネム非分解性の酵素との相同性と同程度である。

クラス A カルバペネマーゼ共通の特徴として早くから指摘されたのは、Cys69-Cys238 間のジスルフィド結合であった²⁰⁾。SME-1 では Cys69 および Cys238 部分のコードンにランダム変異が導入され、このジスルフィド結合はカルバペネムだけではなくアンピシリンやセフトキシムなどすべての β -ラクタム剤分解に必須であることが示唆された²¹⁾。この結果から、カルバペネマーゼのジスルフィド結合は活性触媒部位の構造維持に重要であると考えられる。

2. GES ファミリーの特徴

GES カルバペネマーゼでは、カルバペネム分解活性に関与する可能性のある特徴として次の点が挙げられている。カルバペネム分解活性をもたない GES-1 においては 170 番目の残基がグリシンであり、カルバペネム分解能を有する GES-4 および GES-5 についてはセリン残基であることから、170 番目のアミノ酸残基がカルバペネム分解に重要であると考えられる。基質とのドッキングシミュレーションからは、GES-1 の場合はイミペネムのカルボニル基の炭素原子と Ser70 側鎖の酸素原子間の距離が大きすぎて求核反応には好ましくないのに対し、GES-2 においては 170 番目のアスパラギン残基が活性触媒部位の水分子を安定化する可能性が示唆されている²²⁾。

3. クラス A カルバペネマーゼの立体構造上の特徴

X 線結晶構造解析により、すでに KPC-2, GES-1, SME-1, NMC-A の立体構造が明らかになっている。GES ファミリーでは、カルバペネム分解活性が低い GES-1 の立体構造が解析されている。

これらの酵素と非カルバペネム分解性クラス A β -ラクタマーゼの全体立体構造はよく類似している。しかし基質結合部位を詳細に解析すると、いくつかの特徴があることが確認された。KPC-2, SME-1, NMC-A では、Ser70 の位置がシフトすることで、活性部位のクレフト(溝)が浅くなる。次に、Asn132 と Asn170 のシフトにより、その間の距離が遠くなり、抗生物質の 6 α 置換基の結合するスペースが広がる傾向がみられた (Fig. 3)²³⁾。これらの残基位置が従来の酵素とはわずかに異なることで、これらのクラス A β -ラクタマーゼはカルバペネム分解活性を獲得したと考えられる。GES-1 の結晶構造解析に基づいたシミュレーションにおいても、GES-1 と比較してカルバペネム分解能を有する GES-2 では、基質結合クレフトにおけるイミペネム結合位置が GES-1 よりも 1.5 Å 溶媒側に動くことが示された²²⁾。クラス A カルバペネマーゼにおいては、以上に述べたクレフトの形状変化、クレフトへの基質結合位置のシフトが共通して起きてい

る可能性が高いと考えられる。

利益相反自己申告：申告すべきものなし。

文 献

- 1) Ambler R P, Coulson A F, Frere 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
- 2) Canton R, Akova M, Carmeli Y, Giske C G, Glupczynski Y, Gniadkowski M, et al: Rapid evolution and spread of carbapenemases among *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clin Microbiol Infect* 2012; 18: 413-31
- 3) Kouyama Y, Harada S, Ishii Y, Saga T, Yoshizumi A, Tateda K, et al: Molecular characterization of carbapenem-non-susceptible *Acinetobacter* spp. in Japan: predominance of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* clonal complex 92 and IMP-type metallo- β -lactamase-producing non-*baumannii* *Acinetobacter* species. *J Infect Chemother* 2012; 18: 522-8
- 4) Wilke M S, Lovering A L, Strynadka N C: β -Lactam antibiotic resistance: a current structural perspective. *Curr Opin Microbiol* 2005; 8: 525-33
- 5) Massova I, Mobashery S: Kinship and diversification of bacterial penicillin-binding proteins and β -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42: 1-17
- 6) Jacoby G, Bush K: β -Lactamase Classification and Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant Enzymes. <http://www.lahey.org/Studies/>
- 7) Knox J R: Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type β -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2593-601
- 8) Helfand M S, Bonomo R A: β -Lactamases: a survey of protein diversity. *Curr Drug Targets Infect Disord* 2003; 3: 9-23
- 9) Tzouveleki L S, Tzelepi E, Tassios P T, Legakis N J: CTX-M-type β -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14: 137-42
- 10) Ishii Y, Ohno A, Taguchi H, Imajo S, Ishiguro M, Matsuzawa H: Cloning and sequence of the gene encoding a cefotaxime-hydrolyzing class A β -lactamase isolated from *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39: 2269-75
- 11) Ibuka A, Taguchi A, Ishiguro M, Fushinobu S, Ishii Y, Kamitori S, et al: Crystal structure of the E166A mutant of extended-spectrum β -lactamase Toho-I at 1.8 Å resolution. *J Mol Biol* 1999; 285: 2079-87
- 12) Ibuka A S, Ishii Y, Galleni M, Ishiguro M, Yamaguchi K, Frere J M, 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
- 13) Shimizu-Ibuka A, Matsuzawa H, Sakai H: An engineered disulfide bond between residues 69 and 238 in extended-spectrum β -lactamase Toho-I reduces its activity toward third-generation cephalosporins.

- Biochemistry 2004; 43: 15737-45
- 14) 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-1, in complex with cefotaxime, cephalothin, and benzylpenicillin. *J Biol Chem* 2002; 277: 46601-8
 - 15) Shimizu-Ibuka A, Oishi M, Yamada S, Ishii Y, Mura K, Sakai H, et al: Roles of residues Cys69, Asn104, Phe160, Gly232, Ser237, and Asp240 in extended-spectrum β -lactamase Toho-1. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 284-90
 - 16) Shimizu-Ibuka A, Matsuzawa H, Sakai H: Effect of disulfide-bond introduction on the activity and stability of the extended-spectrum class A β -lactamase Toho-1. *Biochim Biophys Acta* 2006; 1764: 1349-55
 - 17) Bush K, Fisher J F: Epidemiological expansion, structural studies, and clinical challenges of new β -lactamases from gram-negative bacteria. *Annu Rev Microbiol* 2011; 65: 455-78
 - 18) Poirel L, Pitout J D, Nordmann P: Carbapenemases: molecular diversity and clinical consequences. *Future Microbiol* 2007; 2: 501-12
 - 19) Queenan A M, Torres-Viera C, Gold H S, Carmeli Y, Eliopoulos G M, Moellering R C Jr, et al: SME-type carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases from geographically diverse *Serratia marcescens* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 3035-9
 - 20) Raquet X, Lamotte-Brasseur J, Bouillenne F, Frere J M: A disulfide bridge near the active site of carbapenem-hydrolyzing class A β -lactamases might explain their unusual substrate profile. *Proteins* 1997; 27: 47-58
 - 21) Majiduddin F K, Palzkill T: Amino acid sequence requirements at residues 69 and 238 for the SME-1 β -lactamase to confer resistance to β -lactam antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47: 1062-7
 - 22) Smith C A, Caccamo M, Kantardjieff K A, Vakulenko S: Structure of GES-1 at atomic resolution: insights into the evolution of carbapenemase activity in the class A extended-spectrum β -lactamases. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 2007; 63: 982-92
 - 23) Ke W, Bethel C R, Thomson J M, Bonomo R A, van den Akker F: Crystal structure of KPC-2: insights into carbapenemase activity in class A β -lactamases. *Biochemistry* 2007; 46: 5732-40
 - 24) Lassaux P, Traore D A, Loisel E, Favier A, Docquier J D, Sohler J S, et al: Biochemical and structural characterization of the subclass B1 metallo- β -lactamase VIM-4. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; 55: 1248-55
 - 25) Powers R A, Shoichet B K: Structure-based approach for binding site identification on AmpC β -lactamase. *J Med Chem* 2002; 45: 3222-34
 - 26) Powell A J, Tomberg J, Deacon A M, Nicholas R A, Davies C: Crystal structures of penicillin-binding protein 2 from penicillin-susceptible and -resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae* reveal an unexpectedly subtle mechanism for antibiotic resistance. *J Biol Chem* 2009; 284: 1202-12

Extended-Spectrum β -Lactamase: a strategy to expand substrate specificity from the viewpoint of structural biology

Akiko Shimizu-Ibuka

Department of Science, Yamagata University, 1-4-12 Kojirakawa, Yamagata, Japan

β -Lactamases are bacterial hydrolytic enzymes that inactivate β -lactams. They are classified into four classes from A to D, based on the amino acid sequence. With the clinical use of many different β -lactams, β -lactamases that can hydrolyze a broad range of β -lactams have emerged. These enzymes with broad substrate specificity are called "Extended-spectrum β -lactamases (ESBL)". In class A, many ESBLs that can hydrolyze third-generation cephalosporins have been reported. Moreover, several enzymes with hydrolyzing activity toward carbapenems, the β -lactam antibiotics that are stable to most of the β -lactamases and are therefore known as the "last resort", have also emerged. Thus, the molecular evolution against new antibiotics seems to be ongoing. In this review, I focus on the structural features of class A enzymes, and introduce how these protein molecules acquire hydrolytic activity toward a broader range of β -lactams.