

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号：32601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21356

研究課題名(和文) OXA型カルバペネマーゼのカルボキシ修飾リジンによるカルバペネム分解機構

研究課題名(英文) Insights into Mobility and Stability of the OXA-58 Carbapenemase Structure with the N-zeta-Carboxylated Catalytic Residue Lysine.

研究代表者

齊野 廣道 (Saino, Hiromichi)

青山学院大学・理工学部・助教

研究者番号：40525549

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：カルバペネム系抗菌薬を分解する β -ラクタマーゼを産生する耐性菌が出現し、多剤耐性菌に有効な抗菌薬は開発途上にある。新規抗菌薬の開発に資するため、多剤耐性アシネトバクター由来の β -ラクタマーゼ OXA-58 の X線結晶構造解析を行った。結晶構造中で活性残基のリジンはカルボキシ修飾され水素結合のネットワークによって安定化されていた。カルボキシ修飾によって OXA-58 の活性・熱安定性は共に大きく向上し、カルバペネム耐性にとって重要な翻訳後修飾であることが示された。また、OXA-58 の基質結合部位の可動性のループが様々な基質の構造に適合することが多剤耐性の構造基盤であると示唆された。

研究成果の概要(英文)：OXA-58 is a carbapenem-hydrolyzing class D β -lactamase (CHDL) from the multi-drug resistant *Acinetobacter baumannii*. The nitrogen atom (N ϵ) of the catalytic residue Lys is spontaneously modified by N ϵ -carboxylation in the presence of the carboxy donor NaHCO₃. The increase of hydrolytic activity with the N ϵ -carboxylation (β -carbamic acid formation) has been well studied in class D β -lactamases, whereas its effect on protein stability has received little attention. We determined the crystal structure of OXA-58 in a novel crystal, and revealed the structure of the substrate-binding cleft in a closed state. The β -carbamic acid made hydrogen-bond network within the amino acid residues in the catalytic site. The β -carbamic acid was shown to increase not only OXA-58 hydrolytic activity but also OXA-58 stability through the formation of a hydrogen bond network connected to the β -loop structure, whereas the mobile loops accommodate the various β -lactams.

研究分野：構造生物学

キーワード：多剤耐性菌 カルバペネム β -ラクタマーゼ 抗菌薬 アシネトバクター OXA-58

1. 研究開始当初の背景

多剤耐性アシネトバクターから単離された OXA-58 は、 β -ラクタム系抗菌薬の最後の切札であるカルバペネムまでをも分解し、多剤耐性機序の中で最も警戒されるカルバペネマーゼの一種であり(1)、カルバペネマーゼ産生菌の拡大により、有効な抗菌薬の枯渇が危惧されている。2014 年 10 月、大阪で多剤耐性緑膿菌からクラス A カルバペネマーゼ GES-5 が国内で初めて検出され、院内感染によって 11 人が死亡した事例が大きく報道された。2013 年 3 月には OXA 型カルバペネマーゼ遺伝子を持つカルバペネム耐性腸内細菌に対する警告が米国 CDC から発せられ、特に欧州に広く分布している。多剤耐性アシネトバクターを含むカルバペネマーゼ産生菌は日本を含む 40 国以上で報告されている地球規模の問題である(2)。カルバペネマーゼ阻害剤は、 β -ラクタム系抗菌薬とともにカルバペネム耐性菌への対抗手段として重要である。

2. 研究の目的

多剤耐性菌に有効な抗菌薬開発に貢献することを目的とし、多剤耐性の原因酵素である OXA-58 の触媒反応機構を研究する。OXA-58 はクラス D β -ラクタマーゼに分類され、活性残基の一つであるリジンの側鎖末端アミンが、生理的炭酸イオン濃度でカルボキシ化され、カルバミン酸となる(1, 3)。OXA-型酵素はこのカルボキシ化によってカルバペネム加水分解活性が上昇するため、カルバペネム耐性にとって重要な翻訳後修飾であるが、その構造基盤の中でカルバミン酸が OXA-58 の活性と構造安定性に与える影響を研究した。

3. 研究の方法

大腸菌で組み換え発現した OXA-58 を精製し、炭酸水素ナトリウムを添加した状態で結晶化した。得られた結晶を液体窒素凍結し、BL26B1/Spring-8 理研構造ゲノムビームライン I に搬送し、インターネットを介したリモート測定システム(4)を使用して X 線回折実験とデータ収集を行った(課題申請番号 20130103, 20140091, 20150044)。結晶構造においてカルバミン酸と相互作用のあったアミノ酸をアラニンに置換した変異体を作成し、それぞれ標準基質ニトロセフィンに対する活性と、炭酸ナトリウムによる活性化・安定化効果を、ニトロセフィン加水分解活性によって評価し、野生型と比較した。

4. 研究成果

OXA-58 を炭酸イオン存在下で結晶化し、X 線結晶構造解析によって分解能 1.8 Å の結晶構造を得た(PDB ID: 5BOH)。OXA-58 の基質結合部位は、四つのループで構成されたクレフト構造であり、疎水性残基がコンパクトなアーチ状構造を形成していた。

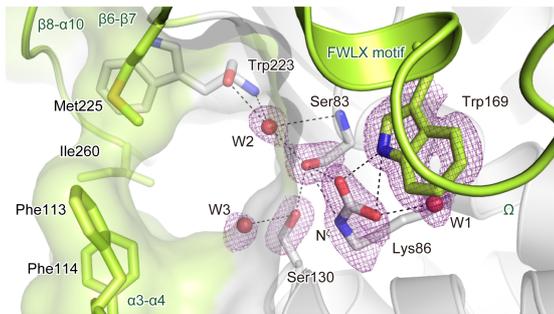
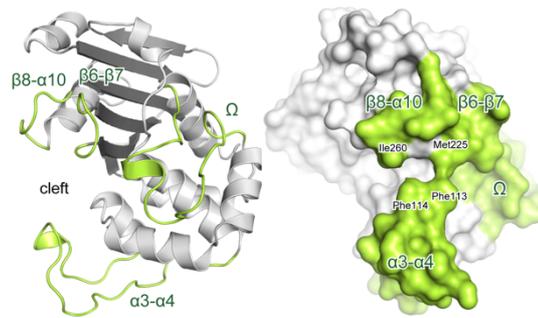


図 1. OXA-58 活性部位のカルボキシ修飾リジンと水素結合ネットワーク

結晶構造中で活性残基のリジンはカルボキシ修飾されており、活性部位内でカルボキシ基はもう一つの活性残基であるセリンに加え、OXA 型酵素に保存されているトリプトファン残基とも水素結合しており、この水素結合のネットワークが水中で通常では不安定なカルバミン酸を安定化していることが示唆された(図 1)。実際に、セリンとトリプトファンをアラニンに置換した変異体において活性と熱安定性が大きく低下し、カルボキシ修飾リジンを安定化する水素結合の形成は、OXA-58 の機能と構造の両面で重要であることが示された。活性の炭酸濃度依存性を評価すると、野生型はサブミリモル濃度の EC_{50} を示し、25 mM 程度の生理的炭酸イオン濃度で OXA-58 は十分にカルボキシ化され活性化状態であると示唆された(図 2, 3)。

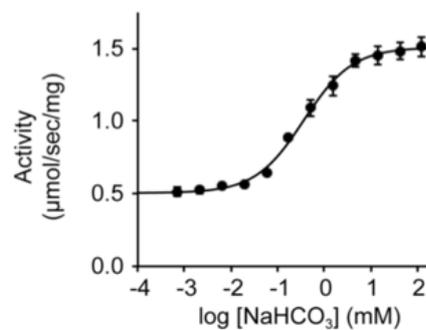


図 2. 炭酸イオンによるリジンカルボキシ修飾と OXA-58 の活性化

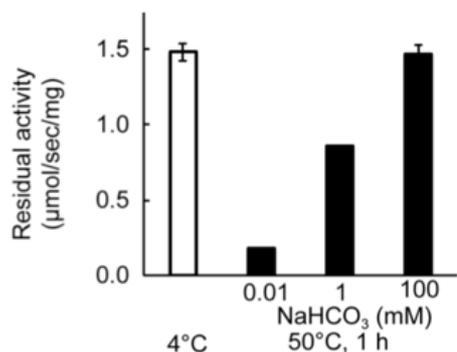


図 3. 炭酸イオンによるリジンカルボキシ修飾と OXA-58 の熱安定化

さらに、OXA-58 の基質結合部位の構造は、既報の結晶構造(5)とは異なっており、基質結合部位に可動性があることが示唆された(図 4)。特に基質結合部位を形成するループの構造が異なっており、この可動性のループが様々な基質の構造に適合することが、カルバペネムを含む β-ラクタム薬に対する多剤耐性の構造基盤であると考えられる。

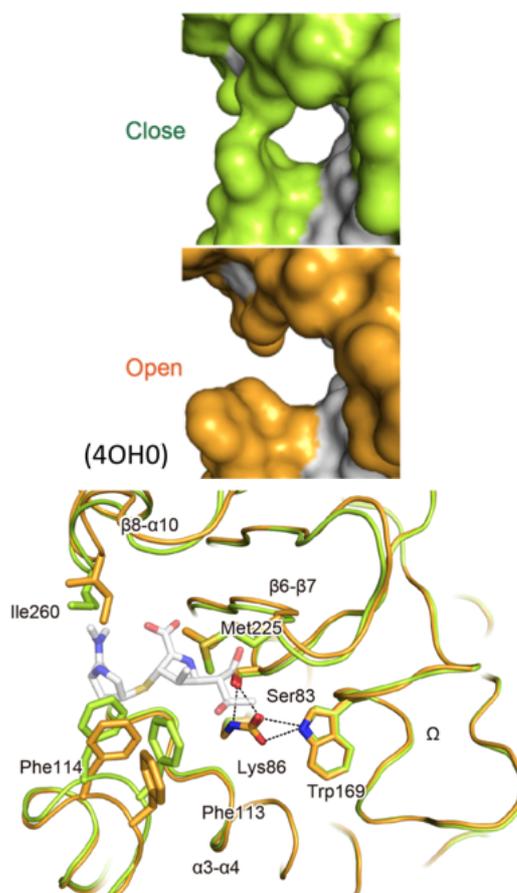


図 4. 基質結合クレフトの可動性領域と開閉による誘導適合

<引用文献>

- (1) Verma V, Testero SA, Amini K, Wei W, Liu J, Balachandran N, et al. Hydrolytic mechanism of OXA-58 enzyme, a carbapenem-hydrolyzing class D β-lactamase from *Acinetobacter baumannii*. *J Biol Chem*. 2011;**286**: 37292-37303.
- (2) Higgins PG, Dammhayn C, Hackel M, Seifert H. Global spread of carbapenem-resistant *Acinetobacter baumannii*. *J Antimicrob Chemother*. 2010;**65**: 233-238
- (3) Saino H, Sugiyabu T, Ueno G, Yamamoto M, Ishii Y, Miyano M (2015) Crystal Structure of OXA-58 with the Substrate-Binding Cleft in a Closed State: Insights into the Mobility and Stability of the OXA-58 Structure. *PLoS ONE* **10**(12): e0145869.
- (4) Okazaki N, Hasegawa K, Ueno G, Murakami H, Kumasaka T, Yamamoto M. Mail-in data collection at spring-8 protein crystallography beamlines. *J Synchrotron Radiat*. 2008;**15**: 288-291.
- (5) Smith CA, Antunes NT, Toth M, Vakulenko SB. Crystal structure of carbapenemase OXA-58 from *acinetobacter baumannii*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2014;**58**: 2135-2143.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Saino H, Sugiyabu T, Ueno G, Yamamoto M, Ishii Y, Miyano M (2015) Crystal Structure of OXA-58 with the Substrate-Binding Cleft in a Closed State: Insights into the Mobility and Stability of the OXA-58 Structure. *PLoS ONE* **10**(12): e0145869.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145869>

[学会発表] (計 2 件)

- ① 杉藪智大・似内靖・山本雅貴・石井良和・宮野雅司・齊野廣道「カルバペネム耐性 β-ラクタマーゼ OXA-58 を活性化・熱安定する活性残基リジン-カルボキシ修飾の構造基盤」日本結晶学会平成 27 年度年会 2015.10.17-18 大阪

- ② 齊野廣道・杉籾智大・石井良和・宮野雅司「カルバペネム耐性 β -ラクタマーゼ OXA-58 のカルバペネム分解機構」日本結晶学会平成 28 年度年会 2016. 10. 17-18 水戸

[その他]

Protein Data Bank (PDB) エントリ

PDB ID: 5BOH

Crystal Structure of OXA-58 with the Substrate-Binding Cleft in a Closed State

Saino, H., Sugiyabu, T., Miyano, M.

Released: 2015-12-30

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊野 廣道 (SAINO, Hiromichi)

青山学院大学・理工学部化学生命科学科・助教

研究者番号：40525549