

## β-ラクタマーゼの自由エネルギー面上における

## アシル化反応の理論的解析

(阪府大院理\*, RIMED\*\*) ○岡島 利幸\*, 麻田 俊雄\*, \*\*, 小関 史朗\*, \*\*

[序論] Class C β-ラクタマーゼは、セファロスポリン系抗生剤の β-ラクタム環を加水分解することで耐性を引き起こす酵素であり、セリンβ-ラクタマーゼに分類される。この耐性機構はアシル化反応と脱アシル化反応からなる。現在、Ser 残基側鎖のプロトンを引き抜く一般塩基として活性中心付近の Tyr や Lys 残基の側鎖または基質のカルボキシル基が提案されているが、詳細な反応機構は明らかになっていない (図 1)。そこで本研究では基質としてセファロチンを持つ Class C β-ラクタマーゼに対して自由エネルギー面上のアシル化反応の反応経路を検討したので報告する。

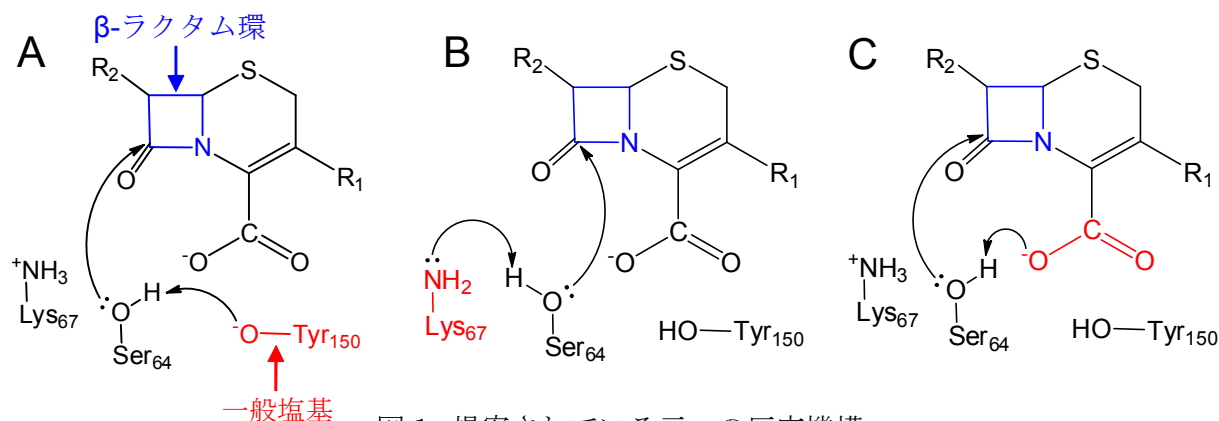


図 1. 提案されている三つの反応機構

[計算方法] Class C β-ラクタマーゼの初期構造には、X 線結晶構造解析から報告されている PDB コード 1KVL<sup>1</sup> の構造を用いた。その構造の周りに 11484 分子の水分子を配位させ、活性中心内のセファロチン(CLS)と Ser 残基の側鎖を QM 領域、その他を MM 領域とした。次に、溶媒和した系の自由エネルギー面上における反応経路を得るために、free energy gradient (FEG) 法<sup>2</sup>と nudged elastic band (NEB) 法を組み合わせた FEG-NEB 法を用いた。なお、QM/MM MD シミュレーションの QM 領域には RHF/6-31G(d)を適用し、MM 領域には Amber99 力場パラメータを採用した。

[結果] 一般に Tyr や Lys は、pH7 の条件下でともにプロトン化した状態で存在していることから Ser 残基側鎖のプロトンを引き抜く可能性は低いと考えられる。そこで、ここでは基質である CLS のカルボキシル基が一般塩基としての役割を果たすアシル化反応の反応経路 (図 1C) に着目した。FEG-NEB 法を適用する前の準備段階として、真空中の *ab initio* MO 計算によって得られたアシル化反応の経路と、その相対エネルギーを図 2 に示す。HF/6-31G(d) 法で最適化を行った結果、遷移状態が三つ存在した。この反応は三段階反応で進行し、一段階目の R から M1 への反応は、セリン側鎖のプロトン移動反応と、β-ラクタム環中のカルボニ

ル炭素への求核反応、二段階目の M1 から M2 への反応は、 $\beta$ -ラクタム環の開環反応で、三段階目の M2 から P1 への反応は、 $\beta$ -ラクタム環中の窒素原子へのプロトン移動反応であった。一段階目の反応はエネルギー障壁が最も大きく 31.5 kcal/mol とる律速段階と結論できる。一方、B3LYP 法や MP2 法を用いると反応障壁は三つ存在するものの、各障壁はそれぞれ大きく低下し、報告されている Class C  $\beta$ -ラクタマーゼのアシル化反応の実験値<sup>3</sup> 24.0 kcal/mol よりも低い結果を得た (図 2 参照)。

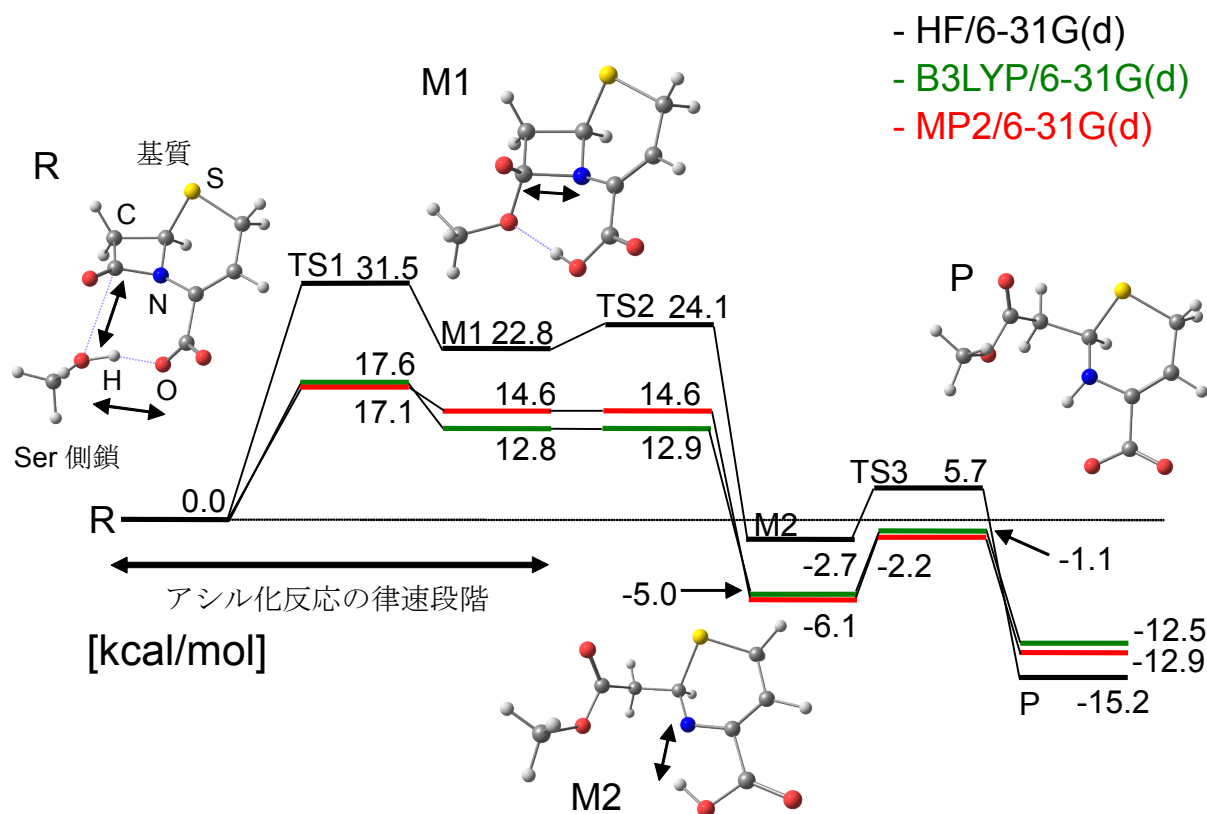


図 2. 真空中の *ab initio* MO 法を用いて得られたアシル化反応の反応経路

次に、アシル化反応の律速段階である R から M1 への反応経路に対して FEG-NEB 法を用いて最適化し、B3LYP/6-31G(d) 法を用いて、この反応経路に沿った自由エネルギー変化を計算した。その結果、Ser 側鎖の水酸基から CLS のカルボキシル基へのプロトン移動反応に最も高い遷移状態が存在し、その後四面体型中間体が生成されることが明らかになった。この遷移状態の活性化自由エネルギーは 25.7 kcal/mol であり、実験値 24.0 kcal/mol と近い値を得た。従って、一般塩基としての役割を果たすのは、CLS のカルボキシル基である可能性が高いと結論できる。他の反応機構を含めた詳細については、当日報告する。

[文献] 1. Beadle, B.M., Trehan, I., and Focia, P.J., *Structure*. **10**, 413-424 (2002).

2. Nagaoka, M., Okuyama-Yoshida, N., and Yamabe, T., *J.Phys.Chem.A*. **102**, 8202 (1998).

3. Galleni, M., Amicosante, G., and Frere, J.M., *Biochem. J*. **255**, 123-129 (1988).