

3P110

## QM/MM計算によるクラスA $\beta$ -ラクタマーゼとベンジルペニシリンのアシル化反応における塩橋内プロトン移動を考慮した新たな反応経路の提案

筑波大院数理・化

○駒井美保, 松井亨, 守橋健二

### QM/MM study for an acylation reaction of class A $\beta$ -lactamase and benzylpenicillin – A proposal for its new reaction mechanism including a proton transfer in a salt bridge

○Miho Komai, Toru Matsui, Kenji Morihashi

*Department of Chemistry, University of Tsukuba, Japan*

#### 【Abstract】

The acylation reaction of benzylpenicillin and  $\beta$ -lactamase is a well-known reaction, and many different studies related to the deactivations of antibiotics by bacterial enzymes have been reported. Neither its definitive mechanism nor the effect for its protein environment has not been proposed so far. We proposed a new mechanism as the most expected acylation reaction with a proton transfer between Lys73 N atom and Glu166 O atom, and assessed some effects of surrounding environments on an H atom of Lys73 involved in the reaction using PCM and scan calculations (M06-2X/6-31G(d,p) level) with various permittivity values. We also investigated a strong H-bond formed between Glu166 O atom and Lys73 N atom. The potential energy curves obtained from the PCM and scan calculations showed that the H atom of Lys73  $\text{NH}_3$  is transferred easily to the O atom of Glu166 in the environment with low permittivity values for stabilizing the energy.

#### 【序】

これまで多くの抗生物質が細菌に対する阻害剤として開発され、特に医薬品である抗菌薬によって細菌性感染症の治療法は飛躍的に発展した。しかし、こうした抗菌薬に対して細菌が自ら酵素を作り出し、これを抗菌薬と反応させることで不活性化させてしまう事例が報告されている。中でも、 $\beta$ -ラクタム系抗菌薬のひとつであるベンジルペニシリンとクラス A  $\beta$ -ラクタマーゼのアシル化は広く知られた反応だが未だ明確なメカニズムは提唱されておらず、そのタンパク質環境についても詳しいことはわかっていない。そこで、本研究では最も起こりうる反応として新たなメカニズムを提案し、さらに反応に関与すると考えられる Lys73  $\text{NH}_3$  の H 原子が 周囲環境の効果によってどのように振る舞うかを PCM 及び scan 計算によって評価し、Glu166 O 原子と Lys73 N 原子間に形成される強い水素結合についても検証する。

#### 【方法・結果・考察】

まず、これまで提唱されてきたメカニズム<sup>[1-3]</sup>及び Lys73 と Glu166 の  $\text{pK}_a$  値から初期構造として考える 4 つの構造、(a)Lys73 と Glu166[Charge-separated state]、(b)Lys73(脱プロトン化した Lys73)と Glu166[Deprotonated state]、(c)Lys73 と Glu166(プロトン化した Glu166)[Neutral state]、(d)Lys73 と Glu166[Protonated state]を考案し(Fig. 1)、それぞれに MD 計算を行った。この MD 計算では、2 ns (1,000,000 ステップ)で構造水緩和(0~300 K)を行い、さらに 2 ns (1,000,000 ステップ)で全体を緩和 (300 K)した。

MD 計算を行う前に Amber14 を用いて H 原子を付加し、水溶媒ボックス (TIP3PBOX 6.0 Å) 及びカウンターカチオンを設置し、エネルギー最小化計算を行っている。

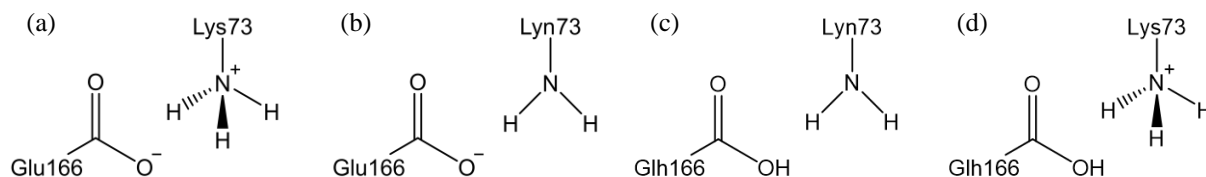


Fig. 1. Developed Four Structures for Initial Structure.

MD 計算後の結果を解析した RMSd 値及び各残基の原子間距離の平均値から、反応が最も起こりうる構造 ((a)構造) を特定した。

得られた構造に対し、QM/MM ONIOM 法(M06-2X/6-31G(d,p):AMBER)で構造最適化計算を行った。最適化後の構造(Fig. 2)から、Lys73 N 原子と Glu166 O 原子間の水素結合が通常(2.8-2.9 Å)よりも非常に短くなっており、また Lys73 NH<sub>3</sub> H 原子が Glu166 O 原子側に移動していることがわかった。この強い水素結合と H 原子移動に着目し、PCM 及び scan モデル計算(M06-2X/6-31G(d,p))を行うことで、Lys73 NH<sub>3</sub> H 原子に対する周囲環境の効果を評価した。

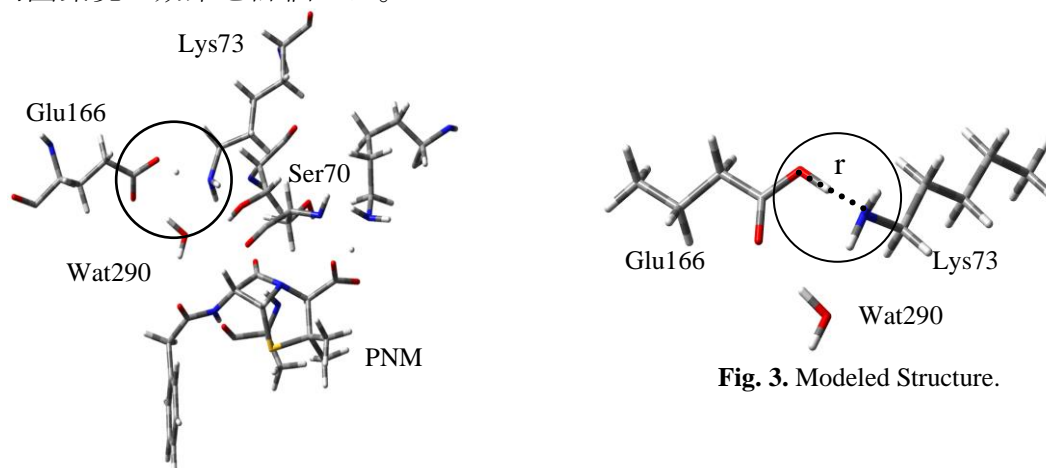


Fig. 2. Optimized Structure.

誘電率  $\epsilon$  の異なる極性溶媒(ガス( $\epsilon=1$ )、ジエチルエーテル( $\epsilon=4$ )、クロロベンゼン( $\epsilon=5.69$ )、ジクロロエタン( $\epsilon=8.93$ )、ジクロロメタン( $\epsilon=10.1$ )、水( $\epsilon=78$ ))中で PCM 及び scan 計算を行い、ポテンシャルエネルギー曲線(PEC)を得た。PEC を見ると、誘電率が低い溶媒中では Lys73 H 原子が Glu166 O 原子側に移動する方がエネルギー的に安定で、誘電率がより低くなると Lys73 から Glu166 に移動する際の障壁もより低くなり、今回ガスのような低い誘電率を持つ溶媒中では Lys73 に H 原子があるとエネルギー的に不安定であることがわかった。そのため、こういった誘電率の低い環境では Glu166 側への H 原子移動が容易に起こりうると考えられる。本研究のタンパク質環境、特に反応中心に関しては、周辺に Arg 等の正電荷を持つ残基が多く存在していることからわずかに疎水的環境であると考えられる。今回得られた PEC の結果から、本タンパク質環境ならば容易に H 原子移動が起こっていることが予想され、この H 原子移動をきっかけに反応が開始すると考えられる。

### 【参考文献】

- [1] J. C. Hermann, C. Hensen, L. Ridder, A. J. Mulholland, H.-D. Holtje, *J. Am. Chem. Soc.*, 2005, **127**, 4454-4465.
- [2] J. Pitarch, J. L. Pascal-Ahuir, E. Silla, I. Tunon, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.2*, 2000, 761-767.
- [3] N. Diaz, T. L. Sordo, K. M. Merz, D. J. Suarez, *J. Am. Chem. Soc.*, 2003, **125**, 672-684.