

基質脱アシル化反応機構

(千葉大院薬¹・産総研²・バイオ産業情報化コンソーシアム³)畑晶之¹・田中良和¹・藤井康之^{2,3}・石川英典¹・星野忠次¹・根矢三郎¹

【序】クラス C b-ラクタマーゼ(CCB)は、b-ラクタム剤、特にセファロスポリン系b-ラクタム剤のb-ラクタム環を加水分解し不活性化することによりb-ラクタム剤に対して耐性を引き起こす細菌産生酵素である。我々は以前、クラス A b-ラクタマーゼ(CAB)における脱アシル化反応メカニズムについて、詳細な検討を行った。その結果、活性部位に存在する Glu166 が、脱アシル化反応に関与する水分子を保持する役割を果たすこと[1]、脱アシル化反応には Glu166 のみならず Lys73 も関与すること[2]が明らかとなった。CCB は CAB と同じくセリン-b-ラクタマーゼであるため、同様の反応メカニズムが期待できる。しかし、CAB の Lys73 に相当する残基(Lys67)は存在するものの、Glu166 に相当する酸性アミノ酸残基は存在しない。いくつかの論文[3]では、Tyr150 側鎖水酸基が general base としての役割を果たすために周囲の環境により脱プロトン化状態にあると主張しているがメカニズムの解明には至っていない。そこで本研究では、理論計算により CCB の脱アシル化反応メカニズムを原子レベルで明らかにすることを試みた。

【方法】量子化学計算を行うためのモデル反応系を構築するため、まず、酵素 - 基質複合体の構造を分子力場計算により求めた。初期構造として、CCB - 阻害剤複合体の X 線結晶解析構造(PDB-code:1FCO)をもとに阻害剤を被加水分解基質に置換したものをを用いた。計算プログラムは AMBER6.0 である。分子力場計算により得られた構造から脱アシル化反応に重要と思われる残基(基質が結合した Ser64、Lys67、Tyr150、Glu272、Lys315、Ala318)および水分子を抜き出し、量子化学計算を行うためのモデル反応系を構築した。量子化学計算には *ab initio* MO 法(Hartree-Fock レベル)を用い、エネルギー勾配法によりポテンシャルエネルギー超曲面上の極小点および遷移状態構造を最適化した。遷移状態構造においては基準振動解析計算を行い、唯一の虚の振動が反応の方向にあることを確認した。そして、遷移状態構造から固有反応座標

計算を行い、最短最低エネルギー経路を求めた。反応の律速段階については、DFT 法(B3LYP レベル)を用いてポテンシャルエネルギーの再評価を行った。*ab initio* MO 法、DFT 法とも、基底関数系は 6-31G**である。計算の際、タンパク質内部の環境を再現するため、Onsager モデルによる自己無撞着反応場法を採用し、比誘電率を 20.0、cavity の半径を 5.98 とした。計算プログラムには Gaussian98 を使用した。

【結果および考察】本研究において、脱アシル化反応メカニズムは 2 つの素反応から構成されることがわかった。すなわち、(1) 四面体中間体生成反応、(2) 基質の脱離反応である。初期構造においては、Tyr150 側鎖は負に帯電している。また、脱アシル化に関与する水分子は Tyr150Oh と水素結合により相互作用し、Lys67Nz は、Tyr150Oh および基質と結合した Ser64 の Og と相互作用している。Lys315Nz は Tyr150Oh および Glu272Oe と水素結合により相互作用し、Ser64 と Ala318 主鎖の N 原子はオキシアニオンホールを形成して基質カルボニル酸素と相互作用している。この構造から Tyr150 側鎖の負電荷により水分子からプロトンを引き抜き、残る OH が基質カルボニル炭素に結合し、アシル酵素四面体中間体を形成する。次いで Lys67Nz から Ser64Og にプロトンが移動し、基質と酵素が解離する。一連の反応における律速段階は(1)の反応で、その活性化エネルギーは DFT 法により 30.47 kcal/mol と算出された。Tyr150Oh はアシル酵素複合体構造において非プロトン化状態で安定し、Lys67Nz 及び Lys315Nz と水素結合することで安定に保持されていた。通常 Tyr 側鎖は中性であるが、2 つの正電荷(Lys 残基)と相互作用することにより負に帯電した状態で存在できるのである。以上のことから、CCB では CAB における Glu166 のような酸性残基の代わりに、Tyr150 が general base として働いているのではないかと考えられる。

【参考文献】

- [1] M. Hata et al., *Chem. Pharm. Bull.*, **48**, 447-453 (2000)
- [2] Y. Fujii et al., *J. Phys. Chem. B*, **106**, 9687-9695 (2002)
- [3] 例えば、Oefner et al., *Nature*, **343**, 284-288 (1990); A. Dubas et al., *PROTEINS*, **25**, 473-485 (1996); J. Lamotte-Brasseur et al., *ibid.*, **40**, 23-28 (2000)