

29【P1】I-010

クラスC β -ラクタマーゼの基質脱アシル化反応機構

○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(¹千葉大院薬,²産総研,³パイオ産業情報化コンソーシアム)

【目的】クラス C β -ラクタマーゼ (CCB) は、 β -ラクタム剤、特にセファロスポリン系 β -ラクタム剤の β -ラクタム環を加水分解し不活性化する酵素である。我々は以前、クラス A β -ラクタマーゼ (CAB) における脱アシル化反応機構について詳細な検討を行ったが、CCB は CAB と同じくセリン- β -ラクタマーゼであるため、同様の反応機構が期待できる。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。代わりに CCB には Tyr150 が活性中心に存在し、CAB の Glu166 に対応する役割を果たすとされているが、機構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 の脱アシル化反応機構を原子レベルで明らかにすることを試みた。

【方法】計算には *ab initio* MO 法 (Hartree-Fock レベル) を用い、反応の最短最低エネルギー経路を求めた。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。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 Å とした。

【結果および考察】脱アシル化反応は (1) 四面体中間体生成反応、(2) 基質脱離反応、の 2 段階反応であることがわかった。律速段階は (1) で、その活性化エネルギーは 30.47 kcal/mol (DFT 法) であった。Tyr150 η 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、Lys67N ζ 及び Lys315N ζ 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 Tyr150 が general base として働いているのではないかと考えられる。