

抗菌薬耐性酵素が変異を重ねて高度耐性の表現型を獲得する巧みな分子メカニズムを原子レベルで解明

河合聡人^{1,2}, 土井洋平^{1,2,3}

¹ 藤田医科大学 医学部, ² 藤田医科大学 感染症研究センター, ³ ピッツバーグ大学 医学部

Structural Study for the Molecular Mechanism of an Enzyme Variant Acquired High-Level Resistance to the β -lactam/ β -lactamase Inhibitor Ceftazidime–Avibactam

Akito KAWAI^{1,2}, Yohei DOI^{1,2,3}

¹ Fujita Health University School of Medicine, ² Fujita Health University Center for Infectious Disease Research,

³ University of Pittsburgh School of Medicine

Abstract

代表的な抗菌薬耐性酵素である β -ラクタマーゼは酵素に 1～数個のアミノ酸変異が導入されることでその基質特異性が変化し、新規抗菌薬への耐性を獲得する。本稿では 4 つのアミノ酸変異が導入された CMY-185 β -ラクタマーゼの研究事例を紹介する。CMY-185 は単独の変異では抗菌薬耐性の表現型を示すには至らないが、4 つの変異 (A114E, Q120K, V211S, N346Y) が重複することで実臨床でも最新の抗菌薬への耐性、治療困難の原因となった酵素である。そして、構造解析、酵素速度論解析により CMY-185 が有したそれぞれの変異が協調的な役割を担うことで抗菌薬耐性能を発揮している様子が解明された [1]。

1. はじめに

「治療薬がない」2019 年年末からの COVID-19 パンデミックで人類誰しもが実感した脅威である。実は同様に、半世紀前のペニシリン発見から数々の治療薬が開発され、現在では治る病気と信じられている細菌感染症の治療においても抗菌薬耐性細菌による「(効く)治療薬がない」という危機的状況が迫っている。世界保健機関 (WHO) は抗菌薬耐性細菌を公衆衛生上最大の脅威の 1 つと警鐘を鳴らし、これに呼応して世界各国が対策を講じている。そして、今日の細菌感染症治療では、原因となっている細菌を特定、その細菌に適切な抗菌薬を適切な量と日数で治療する「抗菌薬の適正使用」を実施することで、抗菌薬耐性細菌の出現を抑える取り組みが今まで以上に求められている。しかし、抗菌薬を使用すればその抗菌薬に抵抗性を持つ細菌だけが生き残る「選択圧」環境を避けることはできず、現状では耐性細菌が出現すればそれらが蔓延する前に迅速に耐性メカニズムを解明し、治療法へ還元することで先手を維持することが 1 つの目標となっている。

2. CMY-185 の発見と薬剤感受性傾向

我々の研究グループは米国 MD アンダーソンがんセンターのグループと共同で、術後感染症治療中の患者で、検査結果に基づいて適正な抗菌薬で治療したにも関わらず抗菌薬耐性大腸菌が出現し、再度最適な抗菌薬の選択と治療を繰り返してもその度に変更した抗菌薬へ耐性を示

す大腸菌が出現した症例を報告した [2]。この症例で単離された大腸菌 3 株の全ゲノム解析の結果、これらの大腸菌は ST410 に分類され、コアゲノム SNP 解析により今回得られた 3 株は SNP 距離 <10 の範囲内にクラスタリングされる極めて酷似した大腸菌であることがわかった。しかし、第三代セファロスポリン系抗菌薬と β -ラクタマーゼ阻害薬の合剤であるセフトアジジム-アビバクタム合剤 (薬剤耐性傾向が特に強いグラム陰性細菌の治療に用いる最新の抗菌薬) にも耐性を示した大腸菌は、他の 2 株では認められなかった IncI γ /K1 プラスミドの所持が確認され、このプラスミド上に *bla*_{CMY-185} 遺伝子がコードされていた。CMY-185 はプラスミド性クラス C β -ラクタマーゼ CMY-2 の 4 アミノ酸変異体 (A114E, Q120K, V211S, N346Y) で、この症例で初めて見つかった酵素である。そして、この CMY-185 に含まれる 4 つの変異について、単変異体から 4 変異体まで全ての組み合わせの変異酵素を調製し、実験室系大腸菌 TOP10 株へ形質導入、薬剤感受性を調べたところ、セフトアジジム-アビバクタム合剤の最小発育阻止濃度 (MIC) が CMY-2 (変異なし) を導入した大腸菌が 0.12 mg/L を示したのに対し、単変異体 0.25–0.5 mg/L, 2 変異体 0.25–32 mg/L, 3 変異体 2–16 mg/L, 4 変異体 (CMY-185) 32 mg/L と変異の重複に伴い薬剤が効かなくなることが確認された。中でも N346Y 変異は、単変異体では 0.25 mg/L と大きな影響は見られないが、2 変異体になると A114E_N346Y 8 mg/L, Q120K_N346Y 32 mg/L,

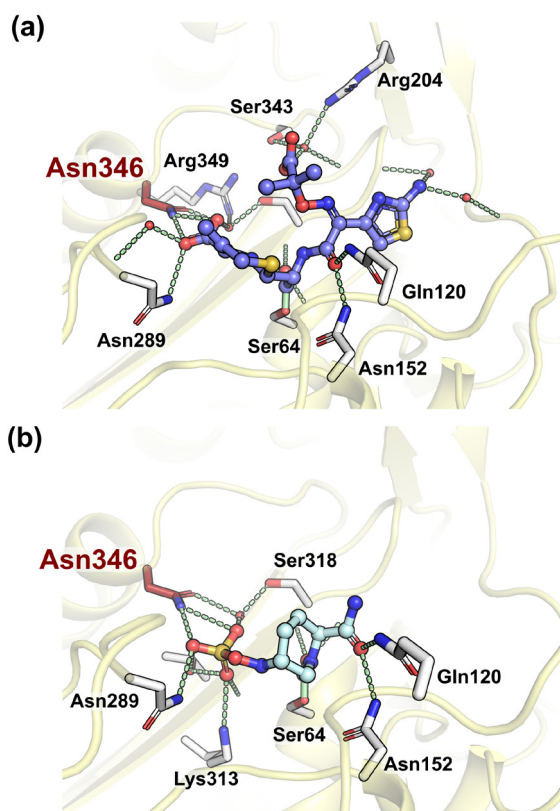


Figure 1 Interaction of ceftazidime (a) or avibactam (b) with class C β -lactamase (PDB codes 6lc8 and 6lc9 [4]). The ceftazidime (blue) and avibactam (cyan) molecules are shown as ball-and-stick representations and the Asn346 residues are colored red. Hydrogen bonds are shown as pale green dashed lines.

V211S_N346Y 4 mg/L と高値を示した。さらに 3 変異体では、N346Y 変異を有する 3 つの変異酵素で 16 mg/L, N346Y が無い A114E_Q120K_V211S で 2 mg/L を示したことから、CMY-185 は N346Y 変異を主軸に他の 3 つの変異が加わることで高度耐性酵素となることがわかった。この Asn346 残基はクラス C β -ラクタマーゼに保存されたアミノ酸で、水素結合を介してセフトアジジムの C8 カルボキシ基、アビバクタムの硫酸基を認識する重要なアミノ酸の 1

つであった [3,4] (Fig. 1)。したがって、N346Y 変異により側鎖が高高い構造へと変換されたことで薬剤との間に立体障害が生じ、 β -ラクタマーゼ阻害薬のアビバクタムが結合できなくなることが容易に想像できた。しかし、同時に抗菌薬のセフトアジジムも結合できず分解できないため、結果として細菌はセフトアジジムに感受性化するはずで耐性の表現型と矛盾した。そこで、N346Y 変異以外の他 3 つの変異がセフトアジジム分解を亢進する分子機構が存在すると考え、さらに CMY-185 の基質特異性変化に関する酵素研究を進めた。

3. 各種 CMY-2 変異体の酵素速度論パラメータ

Table 1 に各種 CMY-2 変異体のセフトアジジム分解及びアビバクタムによる阻害に関する酵素速度論パラメータをまとめた。 $K_{i,app}$ 値および k_2/K 値の比較から、N346Y 変異の導入は単変異体でアビバクタムが結合できなくなり、その阻害効果が著しく低下することが明らかになった。加えて、N346Y 変異に A114E 変異や Q120K 変異が加わると、アビバクタムの結合能がさらに減弱されることがわかった。一方セフトアジジムの分解では、N346Y や A114E_N346Y は CMY-2 と同等な親和性を有し、V211S, Q120K_N346Y, V211S_N346Y や CMY-185 では実験条件下でも明瞭な分解が観測できるようになった。また、V211S 単変異を有する CMY-2 変異体は CMY-42 と呼ばれ、独国で大腸菌臨床分離株が有した酵素である [5]。そして、CMY-42 は k_{cat} 値を向上させることでセフトアジジム分解を亢進することが報告されていて [5]、この CMY-42 と比べると V211S_N346Y や CMY-185 の k_{cat} 値は 1 桁落ちるものの、測定できなかった CMY-2 と比べると有意にセフトアジジム分解能の向上に寄与していることが示された。以上まとめると、N346Y 変異は A114E 変異や Q120K 変異と重複することでアビバクタム結合能を著しく減弱させ、一方でセフトアジジムへの親和性は維持できる。V211S 変異はアビバクタム阻害効果の変化には関与せず、 k_{cat} 値を亢進することでセフトアジジムの分解能を向上させていることがわかった。

Table 1 Table 1. Kinetic parameters of the CMY-2 variants

CMY-2 variants type	Ceftazidime			Avibactam		
	K_m (μM)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m ($\mu\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	$K_{i,app}$ (μM)	k_2/K ($\text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$)	k_{off} (s^{-1})
CMY-2	0.7 ± 0.1	N.D.	N.C.	$(6.3 \pm 1.2) \times 10^{-2}$	$(2.8 \pm 0.1) \times 10^4$	$(7.3 \pm 0.0) \times 10^{-5}$
CMY-42 (V211S)	74 ± 10	1.5 ± 0.2	$(2.0 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	$(3.4 \pm 0.6) \times 10^{-2}$	$(2.3 \pm 0.1) \times 10^4$	$(6.0 \pm 0.0) \times 10^{-5}$
N346Y	0.7 ± 0.2	N.D.	N.C.	41 ± 6	59 ± 6	$(6.0 \pm 0.0) \times 10^{-5}$
A114E_N346Y	0.4 ± 0.0	N.D.	N.C.	80 ± 9	41 ± 0.4	$(9.0 \pm 0.0) \times 10^{-7}$
Q120K_N346Y	5.3 ± 0.5	$(7.7 \pm 0.3) \times 10^{-2}$	$(1.5 \pm 0.2) \times 10^{-2}$	$(5.9 \pm 0.2) \times 10^2$	32 ± 0.4	$(4.0 \pm 0.0) \times 10^{-6}$
V211S_N346Y	37 ± 2	0.3 ± 0.0	$(9.0 \pm 0.7) \times 10^{-3}$	14 ± 4	66 ± 6	$(2.4 \pm 0.0) \times 10^{-6}$
CMY-185	2.2 ± 0.3	0.1 ± 0.0	$(5.3 \pm 0.7) \times 10^{-2}$	$(1.3 \pm 0.1) \times 10^3$	7.4 ± 0.3	$(4.8 \pm 0.0) \times 10^{-7}$

The values are the mean standard error of three independent measurements. N.D. = not detected; N.C.=not calculated. For a K_m value less than 1 μM , $K_{i,app}$ values are shown using cephalothin as the reporter substrate.

4. CMY-185 の立体構造と Tyr346 残基の基質センサーとしての役割

酵素速度論解析の結果は耐性菌の表現型に合致するが、疑問である N346Y 変異とセフトアジジムとの立体障害を回避する分子メカニズムは不明なままだった。そこで、CMY-185 の単結晶を調製し、この結晶をセフトアジジム溶液に浸すことで CMY-185-セフトアジジム複合体の共結晶を準備した。準備した結晶を PF の PX-BL に持ち込み X 線回折実験を行い、CMY-185 単体で 1.35 Å, CMY-185-セフトアジジム複合体を 2.40 Å で構造決定した (Fig. 2a)。CMY-185 単体の立体構造は CMY-2 の立体構造によく重なり (平均二乗偏差: 0.45 Å), 変異による全体構造への影響は観察されなかった。また、注目する Tyr346 残基も CMY-2 の Asn346 残基の側鎖構造が置き換わっただけだった。一方で CMY-185-セフトアジジム複合体の構造を観察すると、Tyr346 残基の側鎖は基質結合ポケットとは反対の向きに 108° 回転し、隣接する H-10 ヘリックス構造がディスオーダーしていた (Fig. 2b)。これはセフトアジジムの場合、CMY-185 が構造変化によりポケット内に基質を受け入れ、アビバクタムの場合 Tyr346 残基との立体障害でその結合を拒否していることを示唆していた。この分子メカニズムをクラス C β-ラクタマーゼとセフトアジジム及びアビバクタムの結合様式 [3,4] を踏まえて考察すると、アビバクタムは Asn346 残基を含む周辺のアミノ酸によって硫酸基が重点的に認識されるため (Fig. 1b), N346Y 変異の導入によりこの重点的な認識機構が崩れたことが致命傷となって結合できなくなったと考えられた。一方で、セフトアジジムは分子全体を酵素が認識しているため (Fig. 1a), 立体障害の原因となる N346Y 変異が導入されても他多数の相互作用の方が勝り、Tyr346 残基の方が回転によってセフトアジジムとの衝突を回避、その結果 H-10 ヘリックス構造の崩壊を伴う大きな構造変化が起ったと推測された。つまり、CMY-185 は酵素とそれぞれの薬剤の結合様式の違いを Tyr346 残基側鎖の回転に反映させる分子メカニズムによってセフトアジジムとアビバクタムを識別していることが明らかになった。

5. Glu114, Lys120, Ser211 残基の役割

結晶構造解析により CMY-185 の Tyr346 残基が基質センサーとして働くことがわかったが、他の変異については CMY-2 の構造と比較しても大きな変化が観察されず、明確な薬剤耐性への役割は不明だった。そこで、分子動力学計算を用いて時間変化も含めた分子構造変化の挙動を解析したところ、A114E, Q120K, V211S 変異の導入は CMY-2 では観察されない分子内水素結合または塩橋を安定的に形成することがわかった (Fig. 3)。そして、Glu114 残基は酵素内部で Gly115, Gly116, Leu117 及び Ser154 と水素結合ネットワークを形成することで酵素全体の剛体化が進み、全般的な酵素活性が減弱したことが推測された (Fig. 3a)。また、Lys120 残基は Asp123 残基と塩橋を形成していた (Fig. 3b)。従来 CMY-2 の Gln120 残基は ε 位のアミノ基でアビバクタムを認識するため (Fig. 1b), Q120K 変異では Lys120 残基が Gln120 残基の機能補完する可能性も考えられたが、Lys120 残基が Asp123 残基と塩橋を形成することで側鎖が基質ポケットとは違う方向に固定され、アビバクタム認識への関与が減弱することが示唆された。そして、Ser211 残基は Glu61 残基と水素結合を形成し、且つ、分子動力学計算中の 15% のスナップショットでセフトアジジムアミノチアゾール環のアミノ基との距離が 3.5 Å 以内にあることがわかった (Fig. 3c)。加えて、CMY-185 とセフトアジジム複合体の分子動力学計算結果では、CMY-2 とセフトアジジム複合体に比べて酵素に結合したセフトアジジム分子がポケット内で激しく動いていた。これは Ser211 残基がセフトアジジムのアミノ基を引っ張り、引き寄せるとことで、結合したセフトアジジムの動きを激しくしていると考えられ、この激しい動きが分解されたセフトアジジムの CMY-185 からの脱離反応を促進しているものと考えられた。

6. まとめ

本研究により CMY-185 が有した N346Y 変異は Tyr346 残基が各薬剤との相互作用の違いを H-10 ヘリックスの崩壊を伴う大きな構造変化に変換する分子センサーとしての機能を付与することが明らかになった。また、酵素として

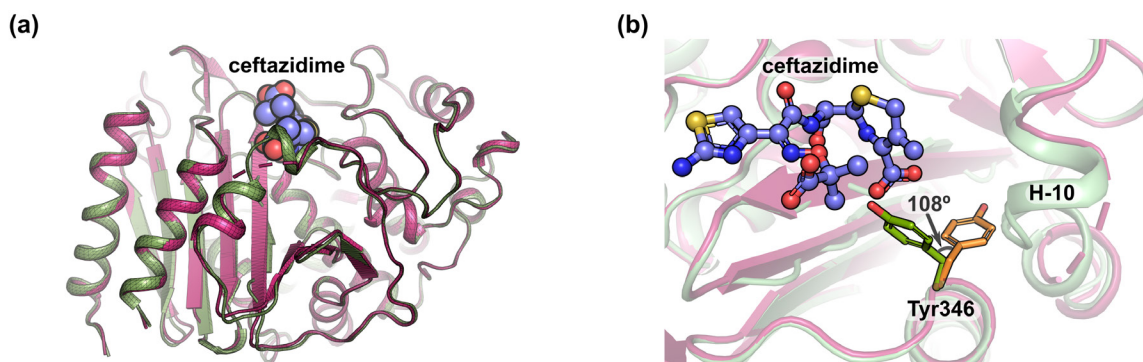


Figure 2 Crystal structure of CMY-185. (a) Overall structures of CMY-185 free form (green) and the complex form with ceftazidime (red). (b) Close-up view of the substrate binding pocket. The Tyr346 residues are shown as stick representations and colored green (free form) and orange (complex form with ceftazidime).

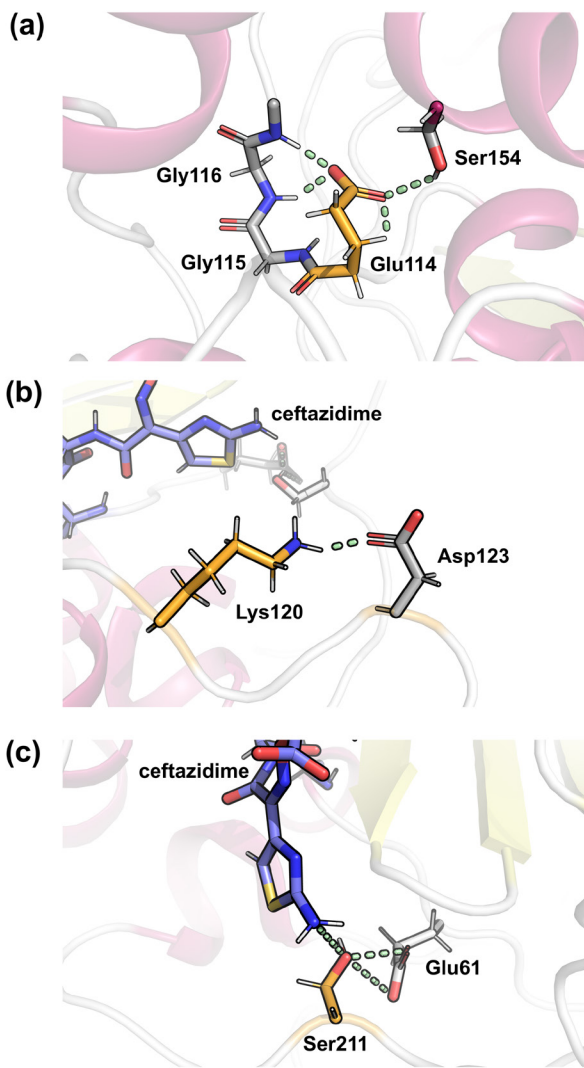


Figure 3 Snapshots during the molecular dynamics simulation of the CMY-185 complex with ceftazidime. Close-up views of the residues Glu114 (a), Lys120 (b), and Ser211 (c). Hydrogen bonds or salt bridges are shown as pale green dashed lines.

は不利な大きな構造変化は、他の3つの変異による抗菌薬耐性方向への機能増強によって実臨床でも問題となる抗菌薬耐性酵素と成ることが示された。このことは単独の変異で薬剤感受性変化が乏しい酵素であっても細菌にとって維持しやすい変異であれば、選択圧の中で次の変異が重なることで手に負えない抗菌薬耐性酵素に成り得る可能性を示している。今後も実臨床との連携を通じて、抗菌薬耐性メカニズムを解明する基礎研究から抗菌薬耐性問題の対策・解決に貢献したい。

謝辞

本研究はPF共同利用実験課題(2017G554, 2019G592)として、PF BL-1A および BL-17A で実施しました。本研究に限らず常に手厚いサポートを賜り、スタッフの皆様に深く感謝申し上げます。また、本研究成果は、臨床分離株の取得からゲノム解析を実施してくれたMDアンダーソンがんセンターのShelburne教授, Shropshire博士, CMY-

185に関連する変異体を調製し薬剤感受性を調べてくれたピッツバーグ大学のMcElheny氏をはじめ多くの共同研究者の協力、米国NIAID Grant R21AI151362, JSPS科研費JP23K06267, 公益財団法人武田科学振興財団の助成で得られました。改めて関係者各位にこの場を借りて感謝申し上げます。

引用文献

- [1] A. Kawai, W.C. Shropshire, M. Suzuki, J. Borjan, S.L. Aitken, W.C. Bachman, C.L. McElheny, M.M. Bhatti, R.K. Shields, S.A. Shelburne, and Y. Doi, *mBio* **15**, e0287423 (2024).
- [2] W.C. Shropshire, B.T. Endres, J. Borjan, S.L. Aitken, W.C. Bachman, C.L. McElheny, C.T. Wu, S.L. Egge, A. Khan, W.R. Miller, M.M. Bhatti, P. Saharashojane, A. Kawai, R.K. Shields, S.A. Shelburne, and Y. Doi, *J Antimicrob Chemother* **78**, 2442 (2023).
- [3] R.A. Powers, E. Caselli, P.J. Focia, F. Prati, and B.K. Shoichet, *Biochemistry* **40**, 9207 (2001).
- [4] A. Kawai, C.L. McElheny, A. Iovleva, E.G. Kline, N. Sluis-Cremer, R.K. Shields, and Y. Doi, *Antimicrob Agents Chemother* **64**, e00198 (2020).
- [5] M. Hentschke, S.D. Kotsakis, M. Wolters, P. Heisig, V. Miriagou, and M. Aepfelbacher, *Microb Drug Resist.* **17**, 165 (2011).

(原稿受付日: 2024年9月19日)

著者紹介

河合聡人 Akito KAWAI



藤田医科大学医学部 講師
〒470-1192
愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪 1-98
e-mail: kawai-a@fujita-hu.ac.jp

略歴: 2006年 熊本大学大学院薬学教育部博士前期課程修了, 崇城大学薬学部 助手, 助教, 藤田医科大学医学部 助教を経て2021年より現職。博士(薬学)。最近の研究: 抗菌薬耐性酵素の変異と基質特異性変化, ヒト血清アルブミンと薬物の相互作用解析。

土井洋平 Yohei DOI



藤田医科大学医学部 教授
〒470-1192
愛知県豊明市沓掛町田楽ケ窪 1-98
e-mail: yoheidoi@fujita-hu.ac.jp

略歴: 2004年 名古屋大学大学院医学系研究科博士課程修了, ピッツバーグ大学医学部 Assistant Professor, Associate Professor, 2017年より現職を兼任。2021年よりピッツバーグ大学医学部 Professor of Medicine を兼任。医学博士。最近の研究: 薬剤耐性細菌の疫学・分子機構, 治療標的の探索, 臨床研究。