



多剤耐性菌が産生する 抗菌薬不活化酵素群の構造解析

和知野 純一

名古屋大学大学院医学系研究科分子病原細菌学

1. 背景と研究目的

多種多様な抗菌薬に耐性を獲得した多剤耐性細菌が増加しており、その対策が喫緊の課題となっている。本研究では、細菌の広域セファロスポリン耐性機構の1つである Extended-spectrum β -lactamase (ESBL) の3次元構造をあきらかにすることを目的としている。取得した構造情報を元に ESBL の阻害剤を開発し、細菌感染症治療法開発の一助とすることが本研究の最終目標である。本研究では、ESBL の1つである TLA-3 の構造情報取得を試みた。

2. 実験内容

Native-TLA-3 を大腸菌に産生させ、陽イオン交換カラム、疎水相互作用カラム、ゲル濾過カラムを用い、Native-TLA-3 の精製を行った。精製した TLA-3 (15 mg/mL) と各種結晶化スクリーニングキット (INDEX HT, Crystal Screen 1&2 など) を用い、結晶化の初期条件を検討した。インキュベーションの温度は 20°C とした。作製した結晶を BL2S1 ビームラインに持ち込み、回折測定を行った。結晶化初期条件時のリザーバー溶液成分について再検討を行い、結晶化条件の最適化を行った。PER-1 β -lactamase の立体構造をモデルとし初期位相を決定、さらに、精密化およびモデル構築を行った。

3. 結果および考察

最終的に、精製した TLA-3 (15 mg/mL) とリザーバー溶液 (0.1 M sodium citrate, 2.4–3.0 M ammonium sulfate) を等量混和し、sitting-vapor diffusion method にて1週間、20°C でインキュベーションすることで再現性良く結晶を得ることができた。分解能は 1.6 Å であった。結晶学的諸性質を表 1 に示す。精密化後の R 値は 13.5 % であった。構築したモデルを図 1 に示す。

表 1. 結晶学的データの統計値

空間群	C_2
格子定数 [Å]	$a = 94.8, b = 67.9, c = 45.1$
格子定数 [°]	$\alpha = \gamma = 90.0, \beta = 94.2$
波長 [Å]	1.1200
分解能	55.2-1.59 (1.68-1.59)
独立反射数	38203 (5557)
完全性	99.8 (99.6)
R_{merge}	0.051 (0.181)
mean I/σ	24.7 (9.4)
冗長性	7.1 (6.9)

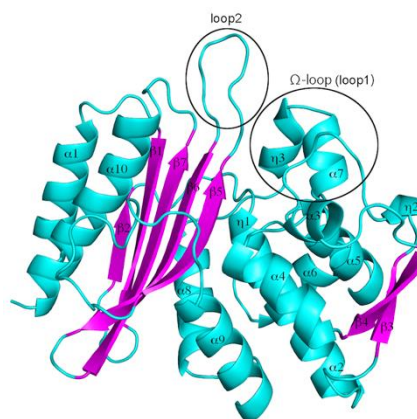


図 1. TLA-3 の構造

4. 参考文献

- Jin W, Wachino J*(Corresponding), Kimura K, Yamada K, Arakawa Y. New plasmid-mediated aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase, AAC(6')-Ian, and ESBL, TLA-3, from a *Serratia marcescens* clinical isolate. *J Antimicrob Chemother* 70(5):1331-7. 2015.