

Title	Structure analysis for determining the drug recognition mechanism of the multidrug efflux transporter MexY from <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Author(s)	王, 継業
Citation	大阪大学, 2026, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/105613
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 ＜a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"> 大阪大学の博士論文について をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

論文内容の要旨

氏 名 (王 継業)	
論文題名	Structure analysis for determining the drug recognition mechanism of the multidrug efflux transporter MexY from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (緑膿菌由来薬剤多剤排出トランスポーターMexYの薬剤認識機構の解明に向けた構造解析)
論文内容の要旨 In recent years, the global increase in multidrug-resistant bacteria that exhibit resistance to multiple classes of antibiotics has become a serious public health concern. These pathogens often acquire cross-resistance to major clinical antibiotics, including β-lactams, aminoglycosides, and fluoroquinolones, leading to treatment failure, severe complications, and increased mortality. Among such pathogens, <i>Pseudomonas aeruginosa</i> is a major cause of nosocomial infections and is known for its remarkable environmental adaptability and diverse resistance mechanisms, making it one of the most problematic species in clinical settings. One of the major contributors to its drug resistance is the overexpression of resistance–nodulation–cell division (RND)–type multidrug efflux complexes composed of three proteins: an outer membrane factor (OMF), a membrane fusion protein (MFP), and an RND transporter. The RND transporters assemble into trimers in the inner membrane and are responsible for drug selection and efflux using the proton motive force as the energy source. RND consists of three major structural regions: the Funnel-like domain, which stabilizes the trimer architecture; the Porter domain, which recognizes and binds drugs; and the transmembrane (TM) domain, which anchors the RND to the inner membrane and mediates proton translocation through the inner membrane. The Porter domain consists of four subdomains: PN1, PN2, PC1, and PC2, and coordinated structural rearrangements among these subdomains enable substrate recognition, binding, and extrusion. Studies of the RND transporter AcrB from <i>E.coli</i> have revealed that the three protomers adopt distinct conformations corresponding to the Access, Binding, and Extrusion states. These conformational states interchange sequentially among the protomers, establishing the “functional rotation mechanism” that ejects drug efflux. Among the RND transporters of <i>P. aeruginosa</i>, MexY is the only complex known to confer resistance to aminoglycoside antibiotics and is an important target for antimicrobial drug development. Recently, an apo-state MexY trimer structure at a resolution of 3.63 Å has been reported. And, unlike AcrB, the Porter domain of MexY has been described using Resting, Binding, and Extrusion. By contrast, in the Binding and Extrusion states of MexY homologs, the open clefts of MexY are unusually large. To determine whether this is the characteristic feature of its drug-recognition porter domain, we created a chimeric protein, MexBYB, by replacing the FL and TM domains of MexY with those of the homologous RND transporter MexB. In this study, we determined the cryo-EM structures of MexBYB in the absence (Apo-state) and presence of kanamycin (Ka-state) and performed a comparative structural analysis. Here, we present two different conformational structures, an asymmetrical one and a symmetry-like one, in the Apo-state and the Ka-state, respectively. By elucidating the conformational features of the Porter domain in these structures, our work provides new insight into the architecture of the Porter domain of MexY.	

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏 名 (王 継 業)			
	(職)	氏 名	
論文審査担当者	主 査	教授	中川敦史
	副 査	教授	上田昌宏
	副 査	教授	加藤貴之
	副 査	准教授	宮ノ入洋平

論文審査の結果の要旨

王継業氏は、日和見感染症の原因菌の1つである緑膿菌の薬剤耐性に関連するRND型薬剤排出蛋白質の中で唯一アミノグリコシド系抗生物質を排出するMexY蛋白質の基質認識機構の解明を目指した構造生物学研究を進めた。MexYは膜上で三量体として機能する事が知られているが、構造解析を行うために必要な安定な三量体として単離・精製することができていなかった。王氏は薬剤認識を行う領域であるPorter domainを含み、他の領域をホモログ蛋白質で安定な三量体を形成するMexBに置き換えたキメラ体MexBYBを用い、クライオ電子顕微鏡単粒子解析法により、MexBYBのアポ体と抗生物質カナマイシンをソーキングした試料について、5.82～3.55Å分解能での三量体の構造決定に成功した。特にカナマイシン存在下での試料については、3.6Å程度の分解能での構造決定を行った。MexYは三回対称を持つ対称構造、三回対称を持たない非対称構造の2つの状態を示し、さらに分子量の大きな異物・薬剤を認識できるようにPorter domainが広く開いており、この開口構造が基質認識に関わるporter domain自身の持つ特徴であることを明らかにした。これらの結果は、MexYの薬剤認識機構の解明と構造に基づく阻害剤の開発に向けた重要な成果である。またこの成果は、筆頭著者として国際的な学術専門誌 Acta Crystallographica Section Fにおいて発表している。

以上の理由により、博士の学位を授与するに値するものと認める。なお、チェックツール“iThenticate 2.0”を使用し、剽窃、引用漏れ、二重投稿等のチェックを終えていることを申し添えます。