The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	Function and Mechanism of Multidrug Efflux Transporters
Author(s)	Martijn, Zwama
Citation	大阪大学, 2018, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/69525
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、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

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（Martijn Zwama）	
論文題名	Function and Mechanism of Multidrug Efflux Transporters (多剤排出タンパク質の機能とメカニズムに関する研究)

論文内容の要旨

Today, the effectiveness of modern medicine is undermined by the rise of multidrug resistant bacteria. Since the introduction of antibiotics less than a hundred years ago, we have had the luxury of treating hospital and community acquired bacterial infections, lowering child mortality and increasing life-expectancy. After his discovery of penicillin, Alexander Fleming warned us for antimicrobial resistance during his Nobel Prize speech in 1945 and surely, resistance followed after each antibiotic introduction. Bacteria have been fighting back and antibiotics may soon no longer be an option to prevent or cure infections. Extreme selective pressure has accelerated the evolution of microorganisms to develop drug resistance and multidrug-resistant pathogens are now one of the biggest threats to contemporary human health.

The thesis includes the discussion on research I conducted about the substrate recognition and the discovery of a novel channel in a multidrug exporter. AcrB is the major multidrug exporter in *Escherichia coli*. Although drug-binding pockets and drug-translocation channels have been elucidated, the roles of multiple binding pockets and channels are still not clear. Here we present evidence for a substrate channel from the central cavity (channel 3) directly to the distal binding pocket in the binding monomer without going through the proximal binding pocket. Planar aromatic cations like ethidium bromide, berberine and rhodamine 6G prefer this channel. T37W/A100W central cavity double mutations increase the export of these drugs significantly. The export of these substrates is not affected by the presence of the channel 1- and 2-utilizing drugs, such as minocycline and erythromycin. In addition, a switch-loop mutant, in which the pathway from the proximal to the distal pocket is hindered, retains significant export activity only for these channel 3-utilizing drugs and this export is increased significantly for only these drugs when mutating residues Thr37 or Ala100 to arginine. This is the first evidence that several drugs use different pathways than other drugs. The usage of multiple entrances contributes to the transportation of a wide range of drugs with different physicochemical properties.

The overexpression of RND-type exporters is one of the main causes of multidrug resistance in Gram-negative pathogens. In this thesis, I discuss my research on the mechanism of an RND transporter. In RND transporters, such as *Escherichia coli*'s main efflux pump AcrB, drug efflux occurs in the porter domain, while protons flow through the transmembrane domain: remote conformational coupling. At the border of a transmembrane helix (TM8) and subdomain PC2, there is a loop which makes a hoisting movement by a random-coil-to-α-helix change, and opens and closes a drug channel entrance. This loop is supposed to play a key role in the allosteric conformational coupling between the transmembrane and porter domain. In this thesis, I show the results of a series of flexibility loop-mutants of AcrB. We determined the crystal structure of a three amino acid truncated loop mutant, which is still a functional transporter, and show that the short α-helix between Cβ15 and the loop unwinds to a random coil in the access and binding monomers and in the extrusion monomer it becomes a partially stretched coil-to-helix change. The loop has undergone compensatory conformational changes and still facilitates the opening and closing of the channel. In addition, more flexible mutated loops (proline mutated and significantly elongated) can still function during export. The flexibility in this region is however limited, as an even more truncated mutant (six amino acid deletion) becomes mostly inactive. We found that

the hoisting-loop is a highly flexible hinge that enables the conformational energy transmission passively.

In addition to these two main topics (which have been published or are under review), the thesis contains a brief overview on the history of drug development and will explain the mechanisms of multidrug resistance thoroughly giving many examples and focus on multidrug efflux pumps belonging to a variety of exporter families. After this, I focus on the RND family of multidrug exporters to introduce and express the importance of my research.

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（Martijn Zwama）			
論文審査担当者		（職）	氏　名
	主 査	教授	西野　邦彦
	副 査	教授	大久保　忠恭
	副 査	教授	高木　達也

論文審査の結果の要旨

近年、多剤耐性菌の出現により、化学療法が困難な感染症が増加して世界的に大きな問題となっている。アレキサンダー・フレミングによるペニシリンの発見以降、人類は様々な抗菌薬を開発してきたが、いずれの抗菌薬も臨床で使用されると薬剤耐性を示す細菌が出現することが問題となっている。特に現在では、複数の抗菌薬で治療することができない多剤耐性菌が出現し、これによる感染症は現代の人類の健康にとって最大の脅威の1つとなっている。

細菌の多剤耐性化の原因の一つとして、多剤排出タンパク質の存在がある。多剤排出タンパク質は複数の抗菌薬を認識し、細菌の中から外へ排出することにより、細胞質内の抗菌薬濃度を減少させ、その結果、細菌の薬剤感受性が低下する。本論文は、多剤排出タンパク質における基質認識機構と新規チャネルが明らかにしたものである。AcrBは、大腸菌（*Escherichia coli*）における主要な多剤排出タンパク質である。AcrB内に薬剤結合ポケットおよび薬剤輸送チャネルが存在することは、これまでの研究から明らかにされている。一方で、複数存在する結合ポケットおよびチャネルの役割は謎であった。本論文では、近位結合ポケット（薬剤の取り込み口に近い薬剤結合ポケット）を通過することなく、AcrB中心空洞から結合モノマー中の遠位結合ポケットまでの基質が輸送されるチャネル（チャネル3）が存在することが明らかにされた。エチジウムブロマイド、ベルベリンおよびローダミン6Gのような平面芳香族カチオンが、特に本チャンネルを経由して輸送されていることが分かった。AcrB 中心空洞 T37W / A100W 二重変異体では、これらの薬剤の輸送能が上昇していた。これらの薬剤の輸送は、ミノサイクリンおよびエリスロマイシンのようなチャネル1および2を通過する薬剤の存在によって影響されない。さらに、近位から遠位のポケットへの経路が妨げられるスイッチループ変異体においては、これらのチャネル3を通過する薬剤についてのみ、AcrBは排出活性を保持し、Thr37またはAla100をアルギニンに変異させたAcrBではこれらの薬剤に対してのみ排出能が上昇していることが分かった。本論文は、特定の薬剤が他の薬剤とは異なる経路でAcrBによって排出されていることを最初に示したものであり、多剤排出タンパク質による、異なる物理化学的特性を有する広範囲の薬剤の排出機構の理解に貢献するものである。

また、本論文では、AcrB内に存在する柔軟性ループ構造の役割について解析を行っている。AcrBを含むRND型排出タンパク質では、薬物排出はポータードメインで起こり、プロトンは膜貫通ドメインを通ると考えられている。AcrBの膜貫通ヘリックス（TM8）およびサブドメインPC2の境界には、ランダムコイルからαヘリックスへの変化によって巻き上げ運動を行い、薬剤チャネルの進入を開閉するループが存在する。このループは、膜貫通ドメインとポータードメインとの間のアロステリック立体配座結合において重要な役割を果たすと考えられている。本論文では、AcrBに存在する柔軟性ループ変異体の解析が行われており、また、ループに存在するアミノ酸を欠失した変異体の結晶構造が決定された。その結果、巻上ループが、受動的にエネルギー伝達を可能にする非常に柔軟なヒンジであることが示された。

Martijn Zwama氏によるこれらの研究は、細菌の抗菌薬耐性化に関与する多剤排出タンパク質の薬剤排出機構と構造の理解を深めるものであり、成果は、多剤排出タンパク質の基礎的理解のみならず、将来的に応用面でも耐性菌感染症を防ぐ薬剤の開発にもつながると考えられ、その価値は高く評価される。

以上の理由から、審査員の合議により、博士（薬科学）の学位論文に値するものと認める。