

氏名	MD. NAZMUL HUDA
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第2370号
学位授与の日付	平成14年 3月25日
学位授与の要件	自然科学研究科生体調節科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Molecular Genetic Analysis and Biochemical Characterization of Multidrug Efflux Pumps in <i>Vibrio cholerae</i> non-O1 ( <i>Vibrio cholerae</i> non-O1の多剤排出ポンプの解析)
論文審査委員	教授 土屋 友房 教授 篠田 純男 教授 森山 芳則

#### 学位論文内容の要旨

In this study, we report the gene cloning and characterization of three multidrug efflux pumps namely, *VcmA*, *VcrM* and *VcaM* from *V. cholerae* non-O1 NCTC 4716. Judging from the structural and functional properties, we conclude that both *VcmA* and *VcrM* are the members of MATE family. On the other hand, the structure and biochemical characteristics of *VcaM* suggest that it is a member of ABC-type multidrug transporter superfamily.

*Escherichia coli* cells transformed with a plasmid carrying the *vcmA* gene of *V. cholerae* non-O1 showed increased resistance against norfloxacin, ciprofloxacin, ofloxacin, daunomycin, doxorubicin, streptomycin, kanamycin, ethidium bromide, 4', 6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride, Hoechst 33342 and acriflavine.  $\text{Na}^+$  (or  $\text{Li}^+$ )-dependent efflux of ethidium bromide was detected in transformant cells. Efflux of  $\text{Na}^+$ , elicited by ethidium bromide, was observed from transformant cells. Thus, we concluded that the *VcmA* is a  $\text{Na}^+$ /drug antiporter.

Expression of the cloned *vcrM* gene of *V. cholerae* non-O1 in *E. coli* KAM32 caused the strain resistant to acriflavine, 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), Hoechst 33342, rhodamine 6G, tetraphenylphosphonium chloride (TPPCL) and ethidium bromide. Efflux of acriflavine via *VcrM* was dependent on  $\text{Na}^+$  or  $\text{Li}^+$ . Moreover, the  $\text{Na}^+$  efflux was illustrated by *VcrM* in the presence of TPPCL. Therefore, we concluded that like *VcmA*, *VcrM* is also a  $\text{Na}^+$ -coupled multidrug transporter.

*VcaM* is a structural and functional homolog of the human multidrug resistance P-glycoprotein MDR1 and Lactococcal *LmrA*. It is a 619-aa polypeptide (69 kDa) that has a putative topology of six transmembrane segments in the N-terminal hydrophobic domain, followed by an ATP binding site in the hydrophilic domain. The *VcaM* extrudes a number of structurally dissimilar drugs such as doxorubicin, daunomycin, tetracycline, norfloxacin, ciprofloxacin, 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) and Hoechst 33342. Efflux of Hoechst 33342 and doxorubicin from the cell by *VcaM* was assayed. The efflux activity was reversed by reserpine and sodium *ortho* vanadate, which are potent inhibitors of MDR1 and *LmrA*. Judging from the structural and functional characteristics, we concluded that *VcaM* is a new member of ABC-type multidrug transporter, a subfamily of ABC transporter.

## 論文審査結果の要旨

*Vibrio cholerae* はコレラの原因菌であり、バングラデシュを初め多くの国で依然として重大な感染症を起こし、場合によっては大流行を起こすことがある。コレラ患者に対して症状の軽減や流行の拡大を抑えるためにキノロン剤やテトラサイクリンなどの抗菌剤が使われるが、これらの抗菌剤に対する耐性菌が報告されだしている。耐性菌問題を解決する上で、耐性機構を知ることは極めて重要である。薬剤耐性機構にはいくつかあるが、複数の抗菌剤に対して同時に耐性化してしまう多剤排出ポンプが最も重要である。*V. cholerae* にも多剤排出ポンプがあるものと考えられる。筆者は *V. cholerae* non-O1 の染色体DNAから多剤排出ポンプの遺伝子をクローニングし、多剤排出ポンプの性質を解析した。3つの多剤排出ポンプ遺伝子を得、それらの塩基配列を決定し、排出タンパク質のアミノ酸配列を明らかにした。そして1つはABCタイプ、残り2つはMATEタイプの多剤排出ポンプであることを明らかにした。実際、それぞれの系の基質となる抗菌剤を用いて、確かに排出が行われることを確認した。特にABCタイプの多剤排出ポンプVcaMについて詳しく解析し、この多剤排出ポンプの基質特異性、エネルギー共役、レセルピンとバナジン酸による阻害などについて詳しく解析した。そしてこの多剤排出ポンプがヒトなどに存在する多剤排出ポンプMDR (P-Glycoprotein) とよく似た性質を持っていることを明らかにした。変異などによりこの多剤排出ポンプの機能が昂進すれば、菌は一挙に多数の抗菌剤に耐性となってしまうことになる。なお、VcaMはグラム陰性菌で見いだされた初のABCタイプの多剤排出ポンプである。

以上のように、この研究により *V. cholerae* non-O1 の多剤排出ポンプに関する重要な知見が得られた。この論文は学術上興味深いものであり、博士の学位に値するものと判断する。