

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：31201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18877

研究課題名(和文)プロトン輸送ATPaseを標的とする抗口腔病原細菌薬の開発

研究課題名(英文)Exploitation of proton pumping ATPase inhibitors in oral cavity pathogenic bacteria

研究代表者

關谷 瑞樹 (Sekiya, Mizuki)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号：70509033

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、口腔内病原細菌におけるプロトン輸送ATPaseの役割を検討し、阻害化合物の探索を行った。虫歯菌*S. mutans*の耐酸性にF型ATPaseが重要な役割を果たすこと、歯周病菌*P. gingivalis*においてA型ATPaseが栄養物の取り込みに関与する可能性を示唆した。また強力な阻害化合物を多数見出し、curcuminのF型ATPase阻害機構を明らかにした。さらに宿主側の破骨細胞において、骨吸収に必要なタンパク質の分泌にV型ATPaseが重要な役割を果たすこと、またその分子機構を示した。以上の結果から、プロトン輸送ATPaseは口腔内疾患の予防・治療薬の重要な標的となり得ると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the roles of proton pump ATPases in the principal causative agent of human dental diseases, *S. mutans* and *P. gingivalis*. We suggested that F-ATPase is an essential role in acid tolerance in *S. mutans*, and proton gradient and A-ATPase are important for the growth of *P. gingivalis*. We also found various inhibitors of bacterial proton pump ATPase and suggested their inhibitory mechanism and binding sites. Furthermore, we analyze the function of lysosomal proton pump V-ATPase in mammalian osteoclast, which associates with bone resorption in periodontal diseases. We found a novel role for the V-ATPase in secretory lysosome trafficking and an unexpected mechanistic link with Rab GTPases.

研究分野：機能生化学

キーワード：プロトン輸送ATPase F-ATPase A-ATPase ポリフェノール Curcumin 虫歯 歯周病

1. 研究開始当初の背景

プロトン輸送 ATPase (H^+ -ATPase) は、ATP 加水分解のエネルギーと共役し H^+ を輸送する、あるいは膜内外の H^+ 濃度勾配により ATP を合成する酵素である。F 型、V 型、A 型、P 型に分類され、F、V、A 型は構造や反応機構が類似している。F 型 ATPase は、ATPase 活性を持つ F_1 部分 ($\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$) と膜内で H^+ 送路を形成する F_0 部分 (ab_2c_{10-14}) からなる (図 1)。ATP の合成・分解に伴い、 $\gamma\epsilon c_{10-14}$ が他のサブユニットに対して回転するモーターであることが知られており、触媒反応はこの回転を介して H^+ 輸送と共役している。

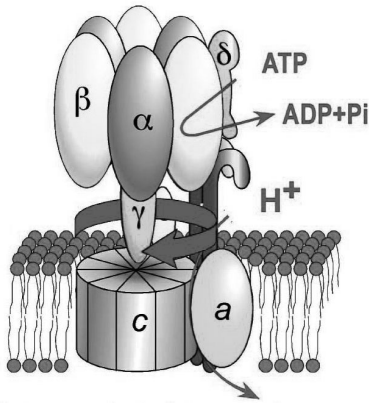


図 1 F 型 ATPase のモデル図

H^+ -ATPase は細胞内の ATP 合成や物質輸送等に関わるため、その阻害剤には強い殺菌・抗菌作用が期待できる。同酵素群は生物種間で構造は類似するがキネティクス等に相違点が存在する。実際に F 型 ATPase を標的とする bedaquiline が抗結核薬としてアメリカで上市されている。また、A 型 ATPase は細菌のみが有する酵素であり、細菌特異的な阻害薬の開発が期待できる。

口腔内には多様な微生物が存在しており、一部の細菌はう蝕、歯周病といった感染症の原因になっている。う蝕は *Streptococcus mutans* などの虫歯菌がエナメル質などを脱灰させ、歯を欠損させる疾患である。また、歯周病は *Porphyromonas gingivalis* などの歯周病菌によって歯周（歯肉、セメント質、歯根膜、歯槽骨）で引き起こされる炎症疾患である。う蝕、歯周病はいずれも歯の喪失につながることはもちろん、全身性の疾患にも深く関与していることが知られている。菌が体内に進入することで感染性心内膜炎や動脈硬化を引き起こす。したがって、口腔内病原細菌の除菌は喫緊に取り組むべき重要な課題である。以前より、虫歯菌や歯周病菌の生存・増殖に H^+ -ATPase が重要な役割を果たしている可能性が指摘されていた。虫歯菌の 1 種である *S. mutans* の低 pH における生育に、F 型 ATPase が関与すると推定されていた。また歯周病菌の 1 種である *P. gingivalis* は、 Na^+ 及び H^+ の濃度勾配を用いて細胞外からアミノ酸等の栄養素を取り込んでおり、濃度勾配の形成には A 型 ATPase

が関与していると考えられていた。したがって、 H^+ -ATPase の駆動機構を解明し、その特徴を理解することは同菌類を殺菌・除菌する薬剤を開発する手がかりになると考えた。

また、歯周病における歯槽骨の破壊は、炎症により活性化した宿主の破骨細胞の骨吸収により引き起こされる。V 型 ATPase はオルガネラの酸性化に関与する酵素で破骨細胞の骨吸収に大きな役割を果たしている。V 型 ATPase は 13 種類のサブユニットから構成され、そのうち 6 種のサブユニットにイソフォームがある (図 2)

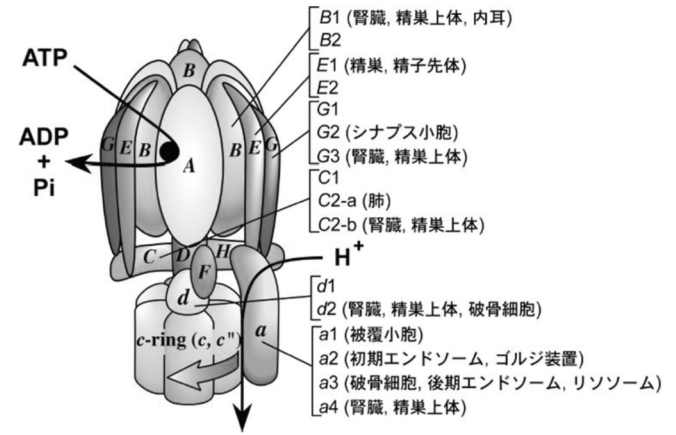


図 2 V 型 ATPase のモデル図とイソフォーム

中でも、a3 イソフォームは破骨細胞への分化により誘導され、骨吸収に必須であることが示されている。当研究室では、a3 イソフォームがプロトンポンプとして骨吸収窩の酸性化を担うだけでなく、破骨細胞に特徴的なリソソームの局在に必須であることを見出していた。したがって a3 イソフォームの局在機構の解明は歯周病による歯槽骨の破壊を予防する手がかりになると考えた。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまでに curcumin や piceatannol などのポリフェノール類が大腸菌 H^+ -ATPase の阻害を介して抗菌作用を示すことを見出していた (図 3)。これらの化合物は虫歯菌や歯周病菌の H^+ -ATPase についても阻害し、抗菌作用を示すことが期待できると考えた。

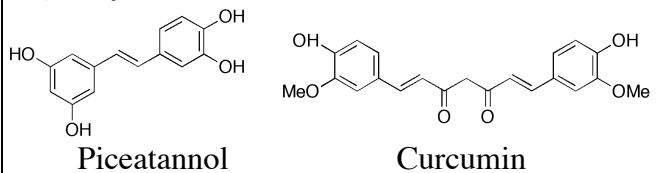


図 3 ポリフェノール類の化学構造

また、大腸菌 F 型 ATPase の回転駆動機構について、酵素一分子の動作を観察する実験系（一分子観察系）によりキネティクスを解析してきた。その結果、同酵素に関する重要な知見を多く得た。酵素の触媒反応に重要な

構造部位の特定や、化合物の阻害メカニズムの解明は、特異的な阻害剤のデザインに有用であると考えた。さらに、破骨細胞において V 型 ATPase のイソフォームやその局在に関わる因子を発現させる実験系を確立している。そこで本研究課題では以下の 3 点を目的に研究を行った。

(1) 虫歯菌、及び歯周病菌の H⁺-ATPase を精製し、阻害する低分子化合物を探索する。また、阻害化合物の抗菌作用を評価する。

(2) H⁺-ATPase の回転を伴う駆動機構を解析する。また、阻害化合物の阻害機構を明らかにする。

(3) V 型 ATPase の a3 イソフォームの局在に関わる因子を同定し、破骨細胞が骨吸収を行う分子機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) *S. mutans* F 型 ATPase の F₁ 部分及び *P. gingivalis* A 型 ATPase の A₁ 部分の精製を検討した。*P. gingivalis* A 型 ATPase の A₁ 部分については精製が困難であったため、A 型 ATPase が存在する膜画分を用いた。ポリフェノール類を中心に、試料を添加した際の H⁺-ATPase の活性を検討し、阻害する化合物を探索した。また、類縁体を用いて構造活性相関を検討し、作用のより強力な化合物を探索した。同時に、*S. mutans*、*P. gingivalis* に対する抗菌作用を評価する。さらに、*S. mutans* については pH 変化に対する感受性を検討した。

(2) 酵素の回転を一分子ずつ観察する実験系を用いて、F 型 ATPase の阻害化合物を添加した際の回転を観察した。阻害化合物には curcumin、及び citreoviridin を用いた。化合物が回転に及ぼす影響を評価するとともに、酵素の各種変異体を組み合わせ、化合物の作用部位や阻害メカニズムを検討した。さらに、結晶構造を用いたドッキングシミュレーションも用いて酵素と化合物の結合様式を推定した。

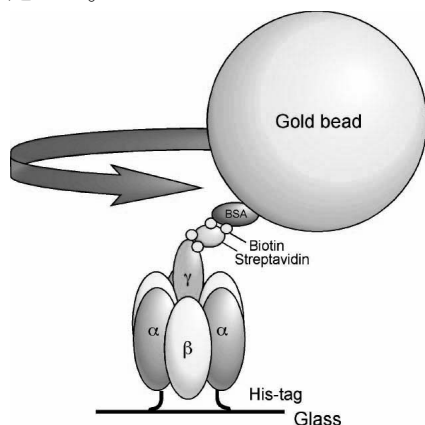


図 4 一分子観察のモデル図

(3) V 型 a3 イソフォームのノックアウトマウスの脾臓から得られたマクロファージを破骨細胞に分化させ、リソソームの局在を検討し、野性型と比較した。また、オルガネ

ラの輸送に関わる Rab タンパク質を過剰発現させた際の影響や、a3 イソフォームとの結合を検討した。

4. 研究成果

(1A) *S. mutans* の F 型 ATPase を阻害する化合物の探索と抗菌作用

S. mutans の F₁ 部分に対し、curcumin、及び piceatannol などのポリフェノール類は ATPase 活性を強く阻害した。また、酸性環境においても中性条件と同等の阻害作用を示した。続いて、piceatannol、curcumin 類縁体及び各種阻害剤の *S. mutans* の増殖に対する作用を検討した。中性の培地ではいずれの阻害剤も *S. mutans* の増殖を抑制しなかったが、酢酸により pH を 5.3 に低下させた培地では濃度依存的な増殖抑制作用を示した。さらに、低 pH における *S. mutans* の生存率を検討したところ、ピセタノール及びクルクミン類縁体は中性の培地では作用しないが、pH4.3 では生存率を低下させることを明らかにした。以上の結果から、*S. mutans* の 酵素活性と耐酸性には強い相関が認められ、F 型 ATPase は *S. mutans* の耐酸性に重要な役割を果たしていると考えられる。研究成果は、ConBio2017、薬学会年会などの国内学会で発表した。

(1B) H⁺ATPase 阻害剤の *P. gingivalis* に対する増殖抑制作用と膜 ATPase 阻害作用

イオノフォアの中でプロトンフォアである FCCP は *P. gingivalis* の増殖を抑制した。また、A 型 ATPase 阻害剤である diethylstilbestrol にも強い抗菌作用が見られた。同じスチルベン骨格を有するポリフェノール類 (スチルベノイド) について検討したところ、pterostilbene など強い作用を有するスチルベノイドを見出した (図 5)。A 型 ATPase に類似した構造を持つ F 型 ATPase の各種阻害剤も検討したところ、curcumin や citreoviridin などの阻害剤が *P. gingivalis* に対し、強い増殖抑制作用を示した (図 6)。さらにそれらの化合物は、*P. gingivalis* の膜画分の ATPase 活性を阻害した。以上の結果から、プロトン濃度勾配とそれを形成する A 型 ATPase は *P. gingivalis* の増殖に重要な役割を果たしていることが示唆され、歯周病の予防・治療の標的になりうると考えられる。研究成果は、Biochemical and Biophysical Research Communications 誌で発表した。

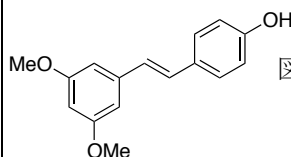


図 5 Pterostilbene の化学構造

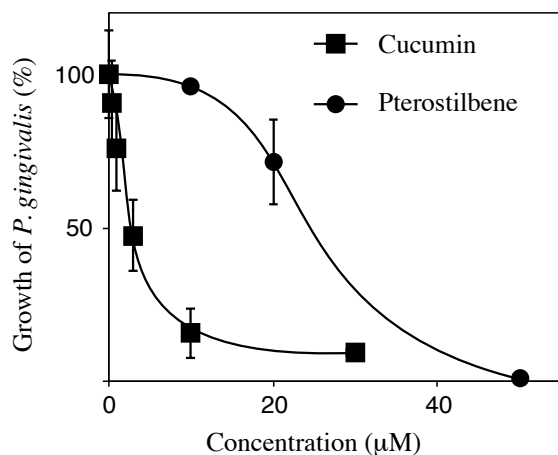
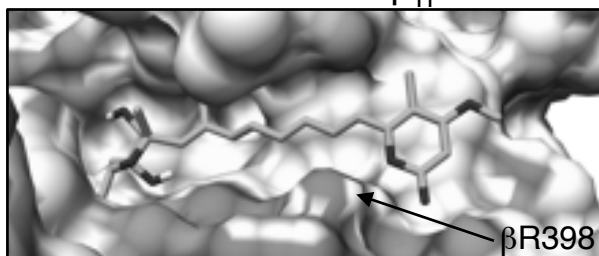


図6 ポリフェノール類の *P. gingivalis* に対する増殖抑制作用

(2) Citreoviridin 及び curcumin の F 型 ATPase 阻害メカニズムと α/β 相互作用の重要性

F 型 ATPase を阻害することが明らかとなっている citreoviridin 及び curcumin について F_1 部分における作用部位を推定するために、結晶構造をもとにドッキングシミュレーションを行った。その結果、両化合物とも α/β サブユニットの境界領域に結合することが推定された。シミュレーションから結合への関与が推定された β R398 に変異を導入したところ、citreoviridin 及び curcumin の阻害作用は減弱した。この結果はシミュレーションによる予測が正しいことを示唆している。

Citreoviridin – *E. coli* β_{TP}



Curcumin – *E. coli* β_{TP}

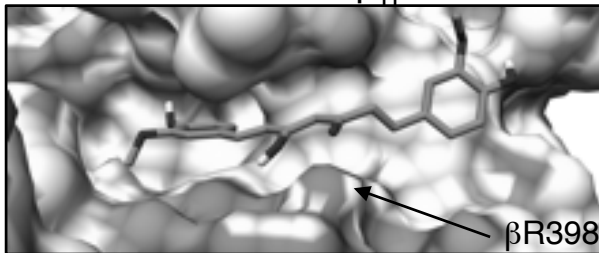


図7 Citreoviridin と curcumin の *E. coli* F_1 β サブユニット推定結合部位 (Sekiya et al, *Int. J. Biol. Macromol.* 99 (2017) 615-621 より転載)

また、citreoviridin、curcumin の存在下で F_1 の回転を解析したところ、catalytic dwell と呼ばれる反応過程が延長し、回転速度が低下することがわかった。Catalytic dwell に影響を与える各種変異 F_1 に対する化合物の作用を検討した結果、 β サブユニットの構造変化に障害がある β S174F 変異体に対して、citreoviridin、curcumin は相乗的に阻害活性を示した。このことから、両化合物は α/β サブユニット間の相互作用を障害することで、回転の駆動力となる β サブユニットの構造変化を妨げ、回転速度を低下させていると考えられる。

さらに、 α/β サブユニット間相互作用と β サブユニットの構造変化との相関性を明らかにすることを目的に、 α/β サブユニット間相互作用に重要と考えられるアミノ酸に変異を導入した。 α E402 に変異を導入したところ、変異 F_1 の回転速度が低下した。一方、 β サブユニットの構造変化を障害する β S174F 変異体との 2 重変異体、 α E402A/ β S174F F_1 は β S174F 変異体比べて回転速度が回復した。この結果から、 α/β 相互作用が弱まることで β S174F 変異により抑制された β サブユニットの構造変化がスムーズに行えるようになったと考えられる。以上から、 α/β サブユニット間相互作用は F_1 の回転に重要な役割を果たしており、阻害剤の標的として有用であることが示唆された。研究成果は、*International Journal of Biological Macromolecules* 誌で発表した。

(3) V 型 ATPase a3 イソフォームのリソソームの輸送における重要性

野性型と V 型 ATPase a3 イソフォームノックアウトマウスの破骨細胞について、電子顕微鏡等で観察した。野性型ではリソソームが細胞膜に局在していたのに対し、a3 ノックアウトでは、分泌リソソームの細胞膜への移動が見られなかった。また、リソソームの移動を開始するスイッチとして働く Rab タンパク質を探索した結果、Rab7 が a3 イソフォームを欠損するとリソソームに局在できなくなることを見出した。さらに V 型 ATPase は a3 イソフォーム選択的に Rab7 の GDP 型と結合することも見出した。

これらのことから、リソソームに存在する V 型 ATPase は、a3 イソフォームが Rab7 と結合することで Rab7 をリソソームに回収し、リソソームの移動を開始することが示唆された。研究成果は、*Scientific Reports* 誌で発表した。

ホームページ：プレスリリース 平成 30 年 5
月 1 日 骨粗鬆症など骨代謝異常症の治療
につながる骨吸収のメカニズムを解明
([http://www.iwate-med.ac.jp/wp-content
/uploads/20180501.pdf](http://www.iwate-med.ac.jp/wp-content/uploads/20180501.pdf))

6. 研究組織

(1) 研究代表者

研究代表者

關谷 瑞樹 (SEKIYA, Mizuki)

岩手医科大学・薬学部・助教

研究者番号： 70509033

(2) 研究協力者

[主たる渡航先の主たる海外共同研究者]

[その他の研究協力者]

岩本昌子准教授 (長浜バイオ大学・バイオサイエンス学部)

佐々木実教授 (岩手医科大学・歯学部)

阪本泰光准教授 (岩手医科大学・薬学部)