

令和 3 年 5 月 11 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06629

研究課題名(和文)プロトン輸送ATPaseを標的とした新規創薬アプローチ

研究課題名(英文)A novel approach to drug development targeting to proton pumping ATPase

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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題では、虫歯の原因菌である*S. mutans*、及び歯周病や食道ガンの発生に関与する*S. anginosus*におけるプロトン輸送ATPaseの役割、及び阻害剤による抗菌作用を検討した。これらの細菌は高い耐酸性を有する。F-ATPaseの阻害剤は、*S. mutans*、*S. anginosus* に対し酸性培地での増殖を選択的に抑制した。また、より低いpHの培地での生存率を低下させた。さらに、*S. anginosus* の同酵素の遺伝子欠損株では同様の表現型が見られた。以上の結果から、F-ATPaseは細胞質からのプロトンの排出によりこれらの細菌の耐酸性に関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の成果により、口腔内病原細菌である*S. mutans*、*S. anginosus*の耐酸性にプロトン輸送ATPaseが重要であることが示唆された。また、複数のポリフェノール化合物が同酵素を阻害し、これらの細菌の耐酸性を低下させることを明らかにした。プロトン輸送ATPaseは多数のサブユニットから構成される巨大分子であり、作用点の異なる阻害化合物を組み合わせることでより強力な抗菌作用が期待できる。また、ポリフェノール類は食品にも含まれるため、安全性が高い。本研究成果は、新たなう蝕・歯周病の予防薬、または口腔ケア用品の開発につながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We focused on proton-pumping ATPase as a target for novel anti-bacterial agents since the enzymes are essential for bacterial growth and survival and are composed of various subunits with many pharmacophores.

We studied the effects of inhibitors of proton-pumping F-ATPase on the growth and survival of oral pathogenic bacteria, *S. mutans* and *S. anginosus* under acidic conditions. F-ATPase inhibitors decreased the growth of these bacteria pH5.3. They also significantly reduced the colony-forming ability of them after incubation at pH 4.3, while showing less effect at pH 7.3. These observations indicate that *S. mutans* and *S. anginosus* are highly sensitive to F-ATPase inhibitors under acidic conditions. F-ATPase deficient *S. anginosus* exhibited essentially the same phenotype as that of wild-type with F-ATPase inhibitors, suggesting that F-ATPase plays an important role in acid tolerance of these bacteria.

研究分野：生物化学

キーワード：F-ATPase A-ATPase プロトンポンプ *S. anginosus* *S. mutans* 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 の加水分解で得られるエネルギーを利用してプロトンを輸送する、あるいは膜内外のプロトン濃度勾配により ATP を合成する酵素である。F 型、V 型、A 型、P 型に分類されるが、構造や反応機構は類似している。F 型 H^+ ATPase (F-ATPase) は、ATPase 活性を持つ F_1 部分 ($\alpha_3\beta_3$) と膜内でプロトン輸送路を形成する F_0 部分 (ab_2c_{10-14}) からなる (図 1)。ATP の合成・分解に伴い、 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、触媒反応はこの回転を介してプロトン輸送と共役している。同酵素は近年、病原性細菌の生存・増殖における重要性が示唆されており、創薬の標的として注目されている。実際に、F-ATPase を標的とする抗菌薬として、bedaquiline が海外で抗結核薬として上市されている。また一部の病原性細菌は A 型 H^+ ATPase (A-ATPase) を有する (図 1)。これらの細菌における同酵素の生理学的な役割は明らかでないものも多いが、細胞外からの栄養素の取り込みや、酸性環境での生存・増殖に関与すると推定されている。歯周病原性細菌 *P. gingivalis* の A-ATPase が増殖に重要であることを研究代表者らは示唆している (参考文献 1)。

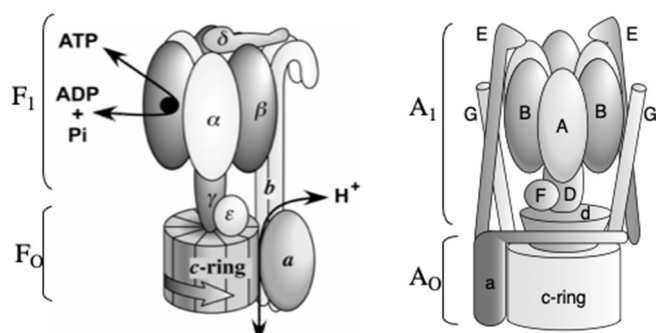


図1 H^+ ATPase のモデル図
左: F型ATPase 右: A型ATPase

研究代表者らは、本研究課題以前より大腸菌 F-ATPase について独自の解析法を駆使し、同酵素の作動機構を明らかにしてきた。さらに、F-ATPase の新たな阻害剤を見出し、その阻害機構を解明した。それらの結果から H^+ ATPase には薬剤標的となり得る構造部位が多数の存在することを示唆した。

感染症に対抗する抗菌薬は、常に耐性菌の出現という問題を抱えている。既存の医薬品にはほぼすべてに耐性菌が報告されており、より多様な作用機序の抗菌薬の開発と新たな創薬アプローチが求められている。研究代表者はこれまでの結果を踏まえ、一つの標的分子に対し、結合部位の異なる多種類の抗菌薬の開発が可能であると考えた。すなわち、多剤耐性菌に対し、抗菌薬の選択肢を効率よく増やしていくことで対抗する。また、結合部位の異なる阻害薬を組み合わせることにより、より強力な抗菌作用を発揮し、耐性菌の発生を抑えることが期待できる。そこで薬剤標的となり得る構造部位を多数有する H^+ ATPase を対象に、本創薬アプローチを実践できると考えた。

2. 研究の目的

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やガンの原因になっている。*S. mutans* は虫歯菌として知られており、酸を産生してエナメル質などを脱灰させ、歯を欠損させる。*S. anginosus* は、口腔内や消化器などの組織で増殖し、膿瘍を形成することで歯周病や食道ガンなどの形成に関与することが示唆されている。*S. mutans* は F 型の、*S. anginosus* は F 型と A 型の 2 種類の H^+ ATPase を有する。これらの細菌は、いずれも高い耐酸性を有しており、 H^+ ATPase が細胞質からのプロトンを排出することで耐酸性に関与している可能性が考えられた。したがって、*S. mutans*、*S. anginosus* の H^+ ATPase を阻害する化合物は虫歯 (う蝕) 歯周病及びガンの予防効果が期待できると考えた。

そこで、これらの細菌の H^+ ATPase を精製し、阻害化合物の探索を行った。得られた阻害化合物による酸性環境での増殖や生存率を評価することで、新規抗菌薬のリード化合物としての有用性や、耐酸性における H^+ ATPase の関与を検討した。さらに、 H^+ ATPase の遺伝子欠損株を作製し、同酵素の耐酸性における役割をより詳細に解析した。

3. 研究の方法

(1) *S. mutans* の H^+ ATPase 阻害化合物の探索と耐酸性への影響

S. mutans の F-ATPase を大腸菌に発現させ、膜画分、または触媒活性を有する F_1 部分を精製した。酵素の ATPase 活性の pH 依存性を評価するとともに、ATPase 活性を指標に阻害する化合物を探索した。阻害作用が見られた化合物については、*S. mutans* を中性 (pH7.3)、酸性 (pH5.3)

の2種類の培地で培養し、増殖への影響を検討した。また、より酸性度の高い(pH4.3)の培地で培養後、CFUを測定し、生存率を評価した。

(2) *S. anginosus* に対する F-ATPase 阻害化合物の作用と遺伝子欠損株の作製

(1)で阻害作用が見られた化合物について、*S. anginosus* の pH7.3、pH5.3 の培地での増殖への影響を検討した。併せて pH4.3 の培地で培養後、CFUを測定し、生存率を評価した。また、ノックアウトベクター-pResEmBBN(参考文献2)を用いて、F-ATPase サブユニット欠損株を作製し、酸性条件での増殖と生存率について、野生株と比較した。

4. 研究成果

(1) *S. mutans* の H⁺ATPase 阻害化合物の探索と耐酸性への影響

S. mutans の F₁ 部分の ATPase 活性は *E. coli* の酵素に比べ低 pH でも活性を維持しており、pH4.3 でも触媒活性が確認できた。また、ピセタノールや、クルクミン、デメトキシクルクミンなどのポリフェノール類(図2a)が F₁ や膜画分の ATPase 活性を pH に依らず強力に阻害することを明らかにした。*S. mutans* の増殖に対し、これらの化合物は、pH7.3 の培地では抑制しなかったが、pH5.3 では有意に抑制した(図2b)。さらにピセタノール、クルクミン、デメトキシクルクミンは pH4.3 での *S. mutans* の生存率を大きく低下させた(図2c)。これらの結果は、F-ATPase が *S. mutans* の酸性環境における生存・増殖に重要な役割を果たしていることを示唆している。研究成果は Archives of Biochemistry and Biophysics 誌に発表した。

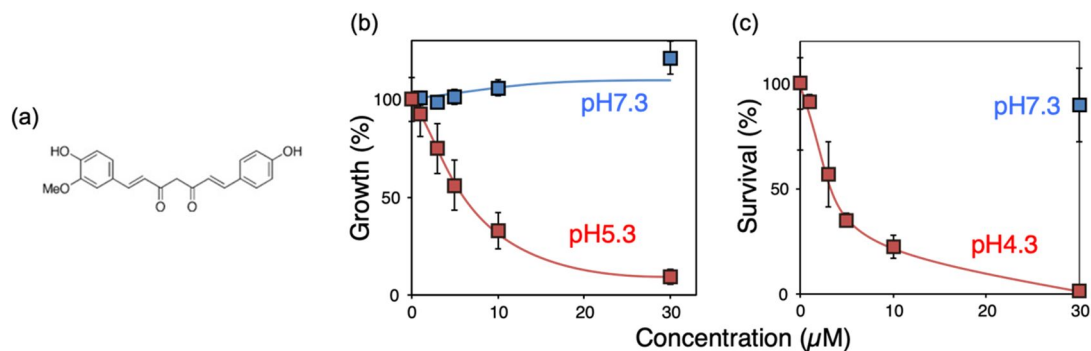


図2. F-ATPase 阻害化合物による *S. mutans* への作用

(a) デメトキシクルクミンの化学構造

(b) デメトキシクルクミンによる *S. mutans* の増殖への影響。pH7.3 (青)または pH5.3 (赤)の培養液で18hまたは24h培養後の OD₆₀₀を測定した。

(c) デメトキシクルクミンによる *S. mutans* の生存率への影響。pH7.3(青)または pH4.3 の培養液で2h培養後、寒天培地で一晚培養し、コロニー数を測定した。

Sekiya et al (2019) Arch. Biol. Biophys. の発表データより一部改変して抜粋

(2) *S. anginosus* に対する F-ATPase 阻害化合物の作用と遺伝子欠損株の作製

RT-PCR、及びウェスタンブロットティングの結果から、*S. anginosus* において F 型と A 型の H⁺ATPase の発現が確認された。また、F-ATPase は酸性環境において発現量が増加した。F-ATPase 阻害作用を有するデメトキシクルクミンは、野生型の *S. anginosus* に対しては培地の pH に依らず、弱い増殖抑制作用を示した。一方、アルギニンからアンモニアを生成することで酸性環境での増殖に関与するアルギニンデアミナーゼ arcA の欠損株(参考文献3)に対しては、pH5.3 の培地でのみ、より低濃度で強力な増殖抑制作用を示した(図3a)。さらに、pHを4.3に低下させた培地でデメトキシクルクミンは、*S. anginosus* の生存率を低下させた(図3b)。以上の結果から、*S. anginosus* において F-ATPase は、arcA とともに酸性環境での増殖、及び耐酸性に関与していることが考えられた。

しかし、F-ATPase と A-ATPase の構造は類似するため、F 型に対する阻害剤が A 型にも作用した可能性も考えられた。そこで F-ATPase サブユニットの遺伝子欠損株を作製し、その表現型を検討した。F-ATPase の サブユニットを欠損した *S. anginosus* は、野生株と比較して pH7.3 では増殖に弱い影響しか見られないが、pH5.3 で増殖が抑制された。さらに、pHを4.3に低下させた培地で、欠損株は著しく生存率が低下した。これらの結果は、デメトキシクルクミンの作用と概ね一致する。したがって、*S. anginosus* において F-ATPase は、プロトンの排出により酸性環境での増殖、及び耐酸性に関与していることが示唆された。現在、A-ATPase 欠損株の作製にも取り組んでおり、その表現型を評価することで新規抗菌薬の標的分子を同定できると考えられている。

成果は第92回日本生化学会大会、日本薬学会第140年会で発表した。

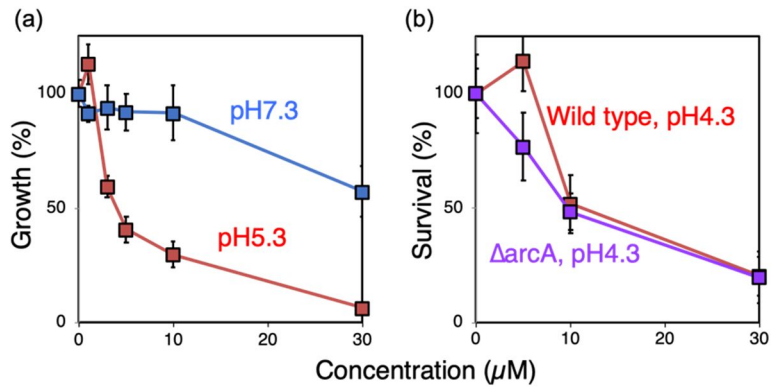


図 3. F-ATPase 阻害化合物による *S. anginosus* への作用

(a) デメトキシクルクミンによる *S. anginosus* *arcA* 欠損株の増殖への影響。pH7.3 (青) または pH5.3 (赤) の培地において 18h または 24h 培養後の OD_{600} を測定した。

(b) デメトキシクルクミンによる *S. anginosus* の生存率への影響。野生株 (赤) または *arcA* 欠損株 (紫) を pH4.3 の培養液で 2h 培養後、寒天培地で一晚培養し、コロニー数を測定した。第 92 回日本生化学会大会の発表データより一部改変して抜粋

参考文献

- (1) Sekiya M, Shimoyama Y, Ishikawa T, Sasaki M, Futai M, Nakanishi-Matsui M: *Porphyromonas gingivalis* is highly sensitive to inhibitors of a proton-pumping ATPase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 498: 837-841 2018
- (2) Shiroza T, and Kuramitsu HK: 1Construction of a model secretion system for oral streptococci. *Infection and Immunity* 61:3745-3755 1993
- (3) Sasaki M, Kodama Y, Shimoyama Y, Ishikawa T, Kimura S: Aciduricity and acid tolerance mechanisms of *Streptococcus anginosus*. *The Journal of General and Applied Microbiology* 64:174-179 2018

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Sakamoto Yasumitsu, Suzuki Yoshiyuki, Nakamura Akihiro, Watanabe Yurie, Sekiya Mizuki, Roppongi Saori, Kushibiki Chisato, Iizuka Ippei, Tani Osamu, Sakashita Hitoshi, Inaka Koji, Tanaka Hiroaki, Yamada Mitsugu, Ohta Kazunori, Honma Nobuyuki, Shida Yosuke, Ogasawara Wataru, Nakanishi-Matsui Mayumi, Tanaka Nobutada et al	4. 巻 9
2. 論文標題 Fragment-based discovery of the first nonpeptidyl inhibitor of an S46 family peptidase	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-49984-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Sekiya Mizuki, Izumisawa Shintaro, Iwamoto-Kihara Atsuko, Fan Yang, Shimoyama Yu, Sasaki Minoru, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 666
2. 論文標題 Proton-pumping F-ATPase plays an important role in Streptococcus mutans under acidic conditions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Archives of Biochemistry and Biophysics	6. 最初と最後の頁 46 ~ 51
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.abb.2019.03.014	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Naomi, Sekiya Mizuki, Tohyama Koujiro, Ishiyama-Matsuura Eri, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Futai Masamitsu, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 8
2. 論文標題 Essential Role of the $\alpha 3$ Isoform of V-ATPase in Secretory Lysosome Trafficking via Rab7 Recruitment	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-018-24918-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Naomi, Sekiya Mizuki, Fujimoto Yasuyuki, Haga Satoshi, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 169
2. 論文標題 Functional complementation of V-ATPase α subunit isoforms in osteoclasts	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Journal of Biochemistry	6. 最初と最後の頁 459 ~ 466
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jb/mvaa118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計14件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Nakanishi-Matsui Mayumi、Matsumoto Naomi、Sekiya Mizuki、Sun-Wada Ge-Hong、Wada Yoh、Tohyama Koujiro、Ishiyama-Matsuura Eri、Futai Masamitsu
2. 発表標題 V-ATPase a3 isiform is involved in trafficking of osteoclast secretory lysosomes
3. 学会等名 27th FAOBMB Conference in Kuala Lumpur (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 關谷瑞樹、高坂未星、矢野志緒、河野喜久子、佐々木実、中西（松井）真弓
2. 発表標題 Streptococcus anginosus の酸性環境におけるプロトン輸送ATPaseの役割
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松元奈緒美、關谷瑞樹、遠山稿二郎、石山（松浦）絵里、和田（孫）戈虹、和田洋、二井將光、中西（松井）真弓
2. 発表標題 V-ATPase a3 アイソフォームが関与する分泌リソソームの細胞内輸送機構
3. 学会等名 第92回日本生化学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 日高興士、橋本大聖、関拓海、櫻井有紀、中村彰宏、鈴木義之、小笠原涉、六本木沙織、阪本泰光、關谷瑞樹、田中信忠、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 細菌DPP7を標的とするジペプチド型阻害剤のSBDDとエステル誘導体の開発
3. 学会等名 第37回メディシナルケミストリーシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 関谷瑞樹、村上幸汰、高坂未星、松元奈緒美、下山佑、石河太知、河野喜久子、矢野志緒、佐々木実、中西（松井）真弓
2. 発表標題 アンギノースレンサ球菌の酸性環境におけるプロトン輸送ATPaseの役割
3. 学会等名 日本薬学会第140年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 関谷瑞樹、下山佑、石河太知、高橋歩実、小田原大樹、佐々木実、二井將光、中西(松井)真弓
2. 発表標題 プロトン輸送 ATPase 阻害剤は歯周病菌 <i>P. gingivalis</i> の増殖を阻害する
3. 学会等名 第84回日本生化学会東北支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 松元奈緒美、関谷瑞樹、遠山稿二郎、石山（松浦）絵里、和田（孫）戈虹、和田洋、二井將光、中西（松井）真弓
2. 発表標題 V-ATPase a3アイソフォームのリソソーム輸送における機能
3. 学会等名 第84回日本生化学会東北支部例会・シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Sekiya Mizuki, Izumisawa Shintaro, Kushigeta Aki, Haga Masato, Shimoyama Yu, Sasaki Minoru, Kimura Shigenobu, Sasaki Yuka, Iwamoto-Kihara Atsuko, Nakanishi-Matsui Mayumi
2. 発表標題 Essential role of proton pumping F-ATPase in acid tolerance of <i>Streptococcus mutans</i>
3. 学会等名 IUBMB SEOUL (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	關谷瑞樹、泉澤信太郎、櫛桁安生、芳賀雅人、下山佑、石河太知、佐々木実、佐々木由香、岩本(木原)昌子、中西(松井)真弓
2. 発表標題	プロトン輸送 F-ATPase 阻害剤によるStreptococcus mutans の耐酸性の低下
3. 学会等名	第91回日本生化学会大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	松元奈緒美、關谷瑞樹、遠山稿二郎、石山(松浦)絵里、和田(孫)戈虹、和田洋、二井將光、中西(松井)真弓
2. 発表標題	V-ATPase a3アイソフォームは破骨細胞の分泌リソソームの細胞内輸送に必須である
3. 学会等名	第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名	關谷瑞樹、高坂未星、伊藤槻、櫻直也、泉澤信太郎、楊帆、岩本(木原)昌子、石河太知、下山佑、佐々木実、中西(松井)真弓
2. 発表標題	口腔レンサ球菌の酸性環境におけるプロトン輸送 ATPase の役割
3. 学会等名	日本薬学会第139年会
4. 発表年	2019年

1. 発表者名	關谷瑞樹、松元奈緒美、矢野志緒、河野喜久子、中西(松井)真弓
2. 発表標題	インスリン分泌小胞の輸送における V-ATPase a2 イソフォームの機能
3. 学会等名	第93回日本生化学会大会
4. 発表年	2020年

1. 発表者名 Hidaka Koushi, Hashimoto Taisei, Seki Takumi, Sakurai Yuki, Sakamoto, Yasumitsu, Roppongi Saori, Sekiya Mizuki, Nakamura Akihiro, Ogasawara Wataru, Suzuki Yoshiyuki, Tanaka Nobutada, Miyazaki Anna, Hojo Keiko and Tsuda Yuku
2. 発表標題 Development of Antimicrobial Dipeptides Targeting Dipeptidyl Peptidase 7 of <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3. 学会等名 第57回ペプチド討論会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 日高興士、橋本大聖、関拓海、櫻井有紀、阪本泰光、六本木沙織、関谷瑞樹、中村彰宏、鈴木義之、小笠原涉、田中信忠、宮崎杏奈、北條恵子、津田裕子
2. 発表標題 多剤耐性菌 <i>Stenotrophomonas maltophilia</i> に抗菌活性を示すジペプチド誘導体の開発
3. 学会等名 日本薬学会第141年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計0件

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 ペプチド型細菌ジペプチジルペプチダーゼ7阻害剤	発明者 日高興士、津田裕子、阪本泰光、関谷瑞樹、小笠原涉	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2018-151899号	取得年 2018年	国内・外国の別 国内

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	中西(松井) 真弓 (Nakanishi-Matsui Mayumi)	岩手医科大学・薬学部・教授 (31201)	
研究協力者	松元 奈緒美 (Matsumoto Naomi)	岩手医科大学・薬学部・助教 (31201)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	佐々木 実 (Sasaki Minoru)	岩手医科大学・歯学部・教授 (31201)	
研究協力者	岩本(木原) 昌子 (Iwamoto-Kihara Atsuko)	長浜バイオ大学・バイオサイエンス学科・准教授 (34204)	
研究協力者	阪本 泰光 (Sakamoto Yasumitsu)	岩手医科大学・薬学部・准教授 (31201)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関