

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：32663

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06549

研究課題名(和文) Mrp型Na⁺/H⁺アンチポーターを標的とする新規黄色ブドウ球菌生育阻害剤の開発研究課題名(英文) Development of a novel Staphylococcus aureus growth inhibitor targeting Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter

研究代表者

伊藤 政博 (Ito, Masahiro)

東洋大学・生命科学部・教授

研究者番号：80297738

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)：MrpタイプのNa⁺/H⁺対向輸送体は、多くの細菌や古細菌に遍在している。黄色ブドウ球菌由来のMrpのNa⁺輸送経路に特異的な阻害剤を探すために、約11,000の小分子化合物ライブラリーを利用した。目的は阻害剤を探し、その作用機序を解明することでした。阻害剤候補化合物の再現性実験を行い、阻害化合物の候補を幾つか確認しました。次に、Mrpを発現する大腸菌から反転膜を作製し、候補化合物の存在又は非存在下でのNa⁺/H⁺対向輸送活性を蛍光消光法で測定した。問題点は、候補化合物の自家蛍光が色素の蛍光測定に干渉することがあった。今後の課題は、二次スクリーニングの測定系を改善することです。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の研究対象であるMrp型Na⁺/H⁺アンチポーターは、多くの細菌や古細菌に普遍的に存在する。また、細菌感染症を引き起こす黄色ブドウ球菌や緑膿菌では、mrp欠損株がマウスへの感染率と病原性の低下を引き起こすことが報告されている。このようにMrpは、感染症や多剤耐性菌予防の有望なターゲットタンパク質として注目される。本研究課題は、創薬研究にも直結する黄色ブドウ球菌由来のMrpを用いて、このNa⁺輸送経路に特異的な阻害剤を探索することであり、社会的意義があるテーマであると考えられる。今回の研究では、ハイスループットなスクリーニング系の開発である。今後、目的の阻害物質の発見を進めたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：The Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter is ubiquitous in many bacteria and archaea. To search for inhibitors specific to this Na⁺ transport pathway of Mrp from *S. aureus*, I utilize a library of about 11,000 small molecule compounds. The purpose was to search for inhibitors and elucidate their mechanism of action. A reproducibility experiment of a candidate compound of an inhibitor was performed, and several candidate reproducibility was confirmed for the compound. Next, an inverted membrane was prepared from the *E. coli* expressing Mrp. The fluorescence quenching method for measuring the Na⁺/H⁺ antiport activity on the presence or absence of the candidate compound. As a problem, it was confirmed that the autofluorescence of the candidate compound interferes with the measurement of the fluorescence of dye. The challenge is to improve the measurement system for secondary screening.

研究分野：極限環境微生物学

キーワード：Mrpアンチポーター 黄色ブドウ球菌 Na⁺/H⁺アンチポーター 阻害剤

1. 研究開始当初の背景

(1) Na^+/H^+ アンチポーターは、細胞内への H^+ の再取り込み経路の一つとして、また、細胞内へ流入する Na^+ の排出経路としても Na^+ 耐性やアルカリ性環境適応に不可欠な膜タンパク質として知られている(図1)。また、 Na^+/H^+ アンチポーターはどの生物種においても普遍的に存在する輸送酵素であり、多数のファミリーが存在する。一般的な Na^+/H^+ アンチポーターの多くは一遺伝子から発現し、単量体もしくはホモ二量体として機能しているものが多い。しかし、Mrp (Multiple resistance and pH) 型 Na^+/H^+ アンチポーターはオペロン構造をとる 7 つの遺伝子 (*mrpABCDEFG*) から発現し、その Na^+/H^+ アンチポート活性には、すべての遺伝子産物を必要とする(図2)。*mrp* 遺伝子にコードされたタンパク質はすべて疎水性タンパク質であり、それら遺伝子産物は膜タンパク質複合体を形成している^①。黄色ブドウ球菌の Mrp は、アンチセンス RNA 鎖を利用した *mrp* 遺伝子の翻訳抑制により黄色ブドウ球菌の生育が抑制されること^②や黄色ブドウ球菌と緑膿菌の *mrp* 欠損株は、マウスへの感染率と病原性の低下を引き起こすことが報告されている^{③, ④}。これらのことから、Mrp は、感染症を引き起こす細菌に対する新規抗生物質のターゲットタンパク質として期待されている。

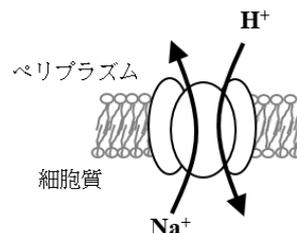


図1. Na^+/H^+ アンチポーターは H^+ の細胞内への取り込みに共役して、 Na^+ を能動的に排出する。

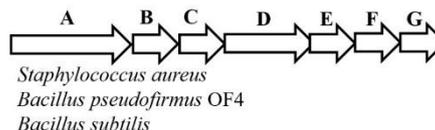


図2. Mrp アンチポーター遺伝子オペロンの概略図

(2) Mrp は、 Na^+/H^+ アンチポーターとして細胞内の pH ホメオスタシスや細胞内で Na^+ 濃度を低く維持する主要な調節能を担っている^①。Mrp の機能を失った黄色ブドウ球菌や緑膿菌は、外環境の変化に対して脆弱性を示す。このように、Mrp は、感染症や多剤耐性菌の予防・治療のターゲットタンパク質として期待される。しかし、これまで Mrp をターゲットとした阻害剤の報告例はない。これまで Mrp 研究で培った様々な技術として、(1) 主要な Na^+/H^+ アンチポーターを欠損させた大腸菌変異株で Mrp を発現させた株を用いた Na^+ 耐性試験、(2) Mrp 複合体の発現システムや Mrp を発現させた大腸菌からの反転膜の調製、(3) 反転膜と蛍光 pH 指示薬を用いた蛍光消光法による Na^+/H^+ アンチポート活性の測定、(4) Blue-Native PAGE による Mrp 複合体構造の検出、(5) 精製した Mrp の人工膜脂質への再構成技術などが挙げられる。これらの技術的な優位性を活用して、阻害剤探索のスクリーニング系を構築して目的の阻害剤を探索することが期待された。

2. 研究の目的

(1) これまで研究代表者は、Mrp アンチポーターに関して、(i) 微生物細胞における生理学的な役割^{⑤, ⑥, ⑦, ⑧}、(ii) Mrp 複合体の各サブユニットの構造や機能に重要なアミノ酸残基の同定^{⑨, ⑩, ⑪}、(iii) 新規 Mrp 型アンチポーターの発見^⑫、(iv) 将来の結晶化を見据えた大量精製系の確立、(v) プロテオリポソームへの再構成^⑬と、これまでの Mrp 研究をまとめた総説^⑭を明らかにしてきた。これらを踏まえて本研究では、黄色ブドウ球菌由来の Mrp を研究材料とし、 Na^+ 輸送経路の特異的な阻害剤の探索及びその作用機序の解明を目的とした。

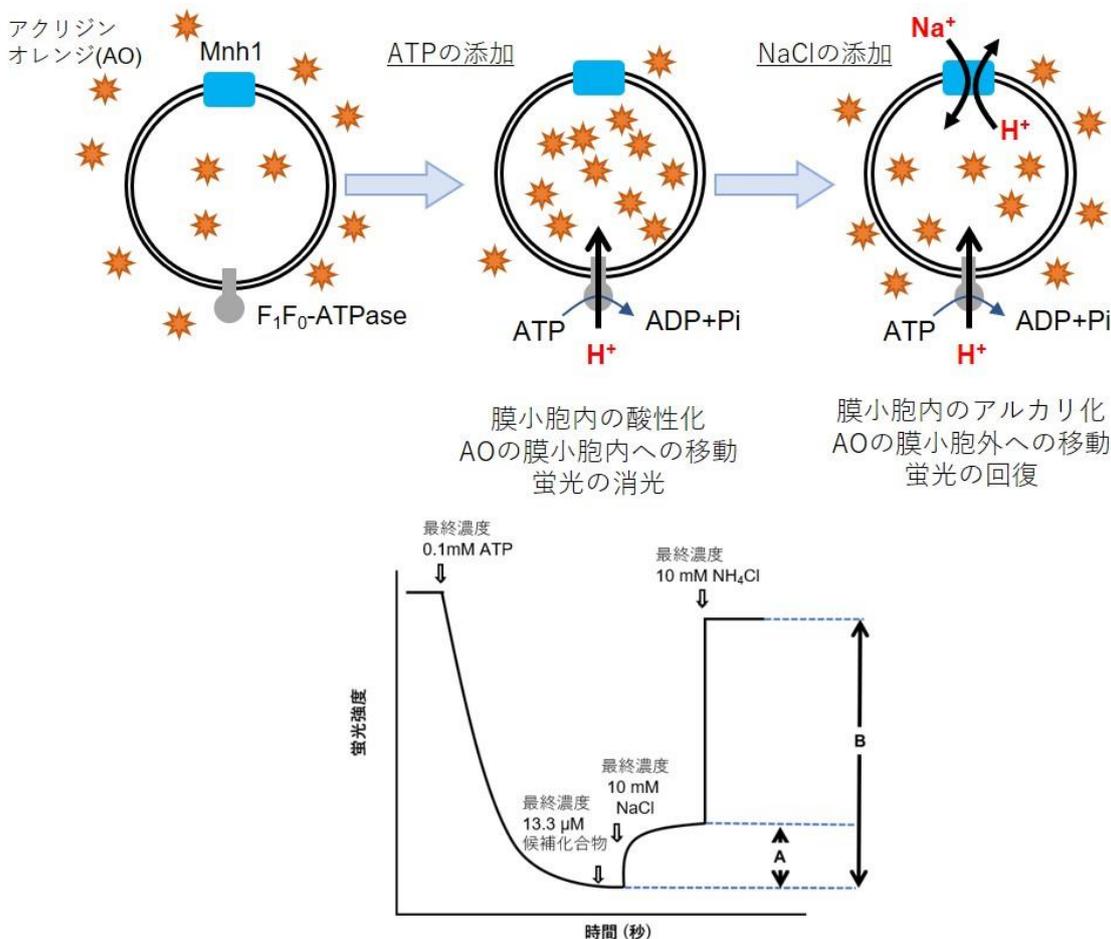
(2) 上記に記した技術的な優位性を活用して、阻害剤探索のスクリーニング系を構築して目的の阻害剤を探索する。なお、スクリーニングに用いる低分子化合物ライブラリーは、東京大学・創薬機構より提供を受けた。

3. 研究の方法

(1) Mrp に特異的な阻害剤探索のためのスクリーニング系構築と一次スクリーニング
黄色ブドウ球菌由来の *mrp* 遺伝子は大腸菌の多コピーベクターにクローニングし、そのプラスミドを主要な Na^+/H^+ アンチポーターを欠損させた大腸菌 KNabc 株に形質転換する。KNabc 株は、pH 7.5、0.1 M NaCl 存在下で生育できない。それに対して、黄色ブドウ球菌由来の Mrp (=Mnh1) が発現した KNabc 株と大腸菌野生株は、0.6 M NaCl 存在下で生育が可能である^⑧。尚、大腸菌 K-12 株は、Mrp 型 Na^+/H^+ アンチポーターを持たないので、Mrp に特異的な阻害剤に対して高 NaCl 存在下で生育阻害を受けない。そこで、 Na^+ 耐性の差を利用する阻害剤探索のスクリーニング系で実験を行った。KNabc 株に黄色ブドウ球菌由来の *mnh1* 遺伝子を発現させた株 (KNabc/*mnh1* 株) を用いてスクリーニングに最適な培地の pH と NaCl 濃度を検討した。東京大学・創薬機構から分譲された構築アッセイ系の確認に用いられる約 1500 サンプルの化合物ライブラリーと更に創薬機構の化合物ライブラリーの構造多様性等を考慮して選抜した 9600 サンプルのコア・ライブラリーに対して、NaCl 添加の有無にかかわらず生育阻害を受ける場合は、Mnh1 に非特異的な大腸菌の生育阻害であると判断し、NaCl を添加しない培地で KNabc/*mnh1* 株が生育阻害を受けず、NaCl を添加した培地でのみ KNabc/*mnh1* 株が生育阻害を受ける (つまり Mnh1 が機能しないので NaCl 存在下で生育できなくなる) ことを指標にスクリーニング系の評価を行った。この系を用いて 96 穴マイクロプレートを用いたハイスループットスクリーニングを行った。

(2) ヒット化合物を用いた酵素活性測定による阻害効果の検証

Mnh1 を発現させた KNabc 株から高圧細胞破碎機により反転膜を調製し、反転膜と蛍光 pH 指示薬を用いた蛍光消光法による Na⁺/H⁺ アンチポート活性を指標に (1) のヒット化合物の添加の有無で Mnh1 のアンチポート活性が特異的に阻害を受けているかを検証した。阻害率の計算は、以下のように行った。アンチポート活性 (%Dequenching) は、以下の式により算出した。DMSO でのアンチポート活性を 100% とした各サンプルで 2 回の測定を行い、平均値をとった。



$$\text{アンチポート活性 (\% Dequenching)} = \frac{\text{基質添加による蛍光の回復量(A)}}{\text{NH}_4\text{Cl添加による蛍光の回復量(B)}} \times 100$$

図3. 蛍光 pH 指示薬のアクリジンオレンジと反転膜小胞を用いた蛍光消光法による Na⁺/H⁺ アンチポート活性測定法の概略図

(3) ヒット化合物を用いた黄色ブドウ球菌や緑膿菌への阻害効果の検証

実際に黄色ブドウ球菌や緑膿菌に対する阻害剤の効果を検証した。

4. 研究成果

(1) スクリーニング系の評価を行うために 96 穴マイクロプレートを用いたハイスループットスクリーニング系を用いて構築アッセイ系の確認に用いられる約 1500 サンプルの低分子化合物ライブラリーから 4 種類 (A, B, C, D) の阻害剤候補を選抜した。次に、再現性を確認するために、再度、同様の実験を行い、NaCl 無添加時には大腸菌 KNabc/mnh1 株の生育を阻害せず、0.3 M NaCl 存在下で阻害することを確認した。

(2) Mnh1 の阻害剤選抜を目的とした今回の研究では、黄色ブドウ球菌の Mrp である Mnh1 を大腸菌 (E. coli KNabc 株) に形質転換し実験を行った。これを用いて化合物 A、B、C、D、E を様々な濃度になるように添加した時の Na⁺/H⁺ アンチポート活性測定と Na⁺耐性生育試験を行った結果を以下にまとめる。

・化合物 A

Na⁺/H⁺ アンチポート活性において、コハク酸添加した場合、化合物 A を 250 μM になるように添加することで Na⁺/H⁺ アンチポート活性が見られなくなった。ATP を添加した場合 150 μM になるように添加することで Na⁺/H⁺ アンチポート活性が見られなくなった。E. coli KNabc pGEM Mnh1 における生育試験では 200 μM になるように添加することで LBK+0.3 M NaCl 培地での生育を完全に阻害することが確認された。黄色ブドウ球菌における生育試験では化合物 A を

50 μM になるように添加した LBK 培地で生育しないことが確認された。緑膿菌における生育試験では 300 μM になるように添加しても生育阻害をしないことが確認された。

Na^+/H^+ アンチポート活性測定及び大腸菌 KNabc/mnh1 株の生育試験の結果より、化合物 A は Mnh1 を阻害することが推定された。また、黄色ブドウ球菌を用いた生育試験で黄色ブドウ球菌の生育が確認できなかった。黄色ブドウ球菌はグラム陽性菌であるため細胞内に化合物が浸透しやすく、50 μM では濃度が高すぎることを考えられた。また、化合物 A が Mnh1 以外の場所も阻害している可能性も考えられた。

・化合物 B

Na^+/H^+ アンチポート活性測定において、化合物 B を添加した時点で蛍光強度が上昇した。化合物 B の溶液は黄色であり、本研究の実験経路では Mnh1 に対し化合物 B が影響を与えるのかに関して推定することは困難であった。

・化合物 C

Na^+/H^+ アンチポート活性測定において、化合物 C を添加した時点で反転膜小胞膜内外の pH 差がなくなった。これより化合物 C はイオノフォアとして働いていることが推測された。本研究の実験経路では化合物 C が Mnh1 に影響を与えているか推定することは困難であった。

・化合物 D

Na^+/H^+ アンチポート活性において、コハク酸添加した場合、ATP を添加した場合ともに化合物 D を 500 μM になるように添加することで Na^+/H^+ アンチポート活性が見られなくなった。E. coli 大腸菌 KNabc/mnh1 株及び黄色ブドウ球菌における生育試験では 500 μM になるように添加しても LBK 培地及び LBK+0.3 M NaCl 培地での生育阻害は確認されなかった。

Na^+/H^+ アンチポート活性測定結果より化合物 D が Mnh1 を阻害することが推測できた。一方で生育試験では大腸菌 KNabc/mnh1 株、黄色ブドウ球菌ともに生育阻害が確認できなかった。原因として、化合物 D の細胞内への透過性が低いことが考えられる。細胞膜の表面は疎水性である。そのため化合物 D に透過性を高める、疎水性の低分子化合物を結合させることにより化合物 D は阻害剤候補になりえると考えられる。

・化合物 E

Na^+/H^+ アンチポート活性において、コハク酸添加した場合、化合物 E を 150 μM に添加することで Na^+/H^+ アンチポート活性が見られなくなった。ATP を添加した場合、化合物 E を 500 μM になるように添加しても Na^+/H^+ アンチポート活性が見られた。大腸菌 KNabc/mnh1 株における生育試験では Mnh1 が無くても生育できる LBK 培地で生育阻害することが確認された。黄色ブドウ球菌における生育試験では 50 μM になるように添加した LBK 培地で生育しないことが確認された。

大腸菌 KNabc/mnh1 株 及び黄色ブドウ球菌で生育阻害が見られた原因として、化合物 E が呼吸鎖などを阻害している可能性があり、大腸菌 KNabc/mnh1 株及び黄色ブドウ球菌の阻害剤として機能していると考えられる。

以上より、今回のハイスループットスクリーニング系が Mrp アンチポーターの阻害剤をスクリーニングすることができると判断した。今回の 4 つの阻害剤候補の中では阻害剤候補 A が Mnh1 の阻害剤候補であると考えられる。今後、詳細な阻害部位の検討などが期待される。

(3) 次に、創薬機構の化合物ライブラリーの構造多様性等を考慮して選抜した 96 穴マイクロプレートを用いたハイスループットスクリーニング系を用いて構築アッセイ系の確認に用いられる約 9600 サンプルの低分子化合物ライブラリーから 7 種類 (E, F, G, H, I, J, K) の阻害剤候補を選抜した。次に、再現性を確認するために、再度、同様の実験を行い、NaCl 無添加時には大腸菌 KNabc/mnh1 株の生育を阻害せず、0.3 M NaCl 存在下で阻害する化合物として化合物 F を確認した。また、同様のスクリーニング系で大腸菌や黄色ブドウ球菌に対して 7 種類の阻害剤候補を使って生育実験を行ったところ、化合物 F は、黄色ブドウ球菌を用いた生育試験で黄色ブドウ球菌の生育が確認できなかった。今後、 Na^+/H^+ アンチポート活性測定を行い、Mnh1 の活性を阻害するかを検証する予定である。

<引用文献>

- ① Ito M, Morino M, Krulwich TA, (2017) Mrp Antiporters Have Important Roles in Diverse Bacteria and Archaea. *Frontiers in Microbiology*, 8:2325
- ② Ji, Y., Zhang, B., Van Horn, S. F., Warren, P., Woodnutt, G., Burnham, M. K., et al. (2001) Identification of critical staphylococcal genes using conditional phenotypes generated by antisense RNA. *Science* 293, 2266–2269.
- ③ Vaish M, Price-Whelan A, Reyes-Robles T, Liu J, Jereen A, Christie S, Alonzo F 3rd, Benson MA, Torres VJ, Krulwich TA.(2018) Roles of *Staphylococcus aureus* Mnh1 and Mnh2 Antiporters in Salt Tolerance, Alkali Tolerance, and Pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 7;200(5):e00611-17.
- ④ Kosono, S., Haga, K., Tomizawa, R., Kajiyama, Y., Hatano, K., Takeda, S., et al. (2005). Characterization of a multigene-encoded sodium/hydrogen antiporter (*sha*) from *Pseudomonas aeruginosa*: its involvement in pathogenesis. *Journal of Bacteriology*, 187, 5242–5248
- ⑤ Ito M., A.A. Guffanti, B. Oudega, and Krulwich TA, (1999) *mrp*: a multigene, multifunctional locus in

Bacillus subtilis with roles in resistance to cholate and to Na⁺, and in pH homeostasis. *Journal of Bacteriology*, 180, 2394-2402

⑥ Ito M., A.A. Guffanti, W. Wang, and Krulwich TA, (2000) Effect of nonpolar mutations in each of the seven *Bacillus subtilis* *mrp* genes suggest complex interactions among the gene products in support of Na⁺ and alkali but not cholate resistance. *Journal of Bacteriology*, 182, 5663-5670

⑦ Ito M., A.A. Guffanti and Krulwich TA, (2001) Mrp-dependent Na⁺/H⁺ antiporters of *Bacillus* exhibit characteristics that are unanticipated for completely secondary active transporters. *FEBS Letters*, 496, 117-120

⑧ Swartz TH, Ito M, Ohira T, Natsui S, Hicks DB, and Krulwich TA, (2007) Catalytic Properties of *Staphylococcus aureus* and *Bacillus* Members of the Secondary Cation- Proton Antiporter-3 (Mrp) Family are Revealed by an Optimized Assay in an Escherichia coli Host. *Journal of Bacteriology*, 189(8), 3081-3090

⑨ Morino M, Natsui S, Swartz TH, Krulwich TA, and Ito M, (2008) Single gene deletions of *mrpA-G* and *mrpE* point mutations affect activity of the Mrp Na⁺/H⁺ antiporter of alkaliphilic *Bacillus* and formation of hetero-oligomeric Mrp complexes. *Journal of Bacteriology*, 190(12), 4162-4172

⑩ Morino M., Natsui S., Ono T., Swartz T.H. , Krulwich T.A. and Ito M., (2010) Single site mutations in the hetero-oligomeric Mrp antiporter from alkaliphilic *Bacillus pseudofirmus* OF4 that affect Na⁺/H⁺ antiport activity, sodium exclusion, individual Mrp protein levels or Mrp complex formation. *Journal of Biological Chemistry*, 285(40), 30942-30950

⑪ Morino M, Ogoda S, Krulwich TA, Ito M, (2017) Differences in the phenotypic effects of mutations in homologous MrpA and MrpD subunits of the multi-subunit Mrp-type Na⁺/H⁺ antiporter, *Extremophiles*, 21(1), 51-64

⑫ Morino M. and Ito M., (2012) Functional expression of the multi-subunit type calcium/proton antiporter from *Thermomicrobium roseum*, *FEMS Microbiology Letters*, 335(1), 26-30,

⑬ Morino M., Suzuki T., Ito M., Krulwich T.A. (2014) Purification and Functional Reconstitution of a Seven-Subunit Mrp-Type Na⁺/H⁺ Antiporter. *Journal of Bacteriology*, 196(1) 28-35

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 特許願	発明者 伊藤政博	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、公開番号 2021-129511	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

東洋大学生命科学部生命科学科極限環境生命科学研究室 http://www2.toyo.ac.jp/~ito1107/
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------