

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06546

研究課題名(和文) 口腔内細菌におけるイオン輸送ネットワークの解明～う蝕・歯周病に対する新戦略～

研究課題名(英文) Ion transport network in oral pathogenic bacteria

研究代表者

關谷 瑞樹 (Sekiya, Mizuki)

岩手医科大学・薬学部・准教授

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)：S. mutans、S. anginosusなどの口腔内病原細菌は、う蝕や歯周病のような局所性疾患に加え、種々の全身性疾患の原因になる。本研究課題では、口腔内病原細菌におけるプロトン輸送ATPaseやそれに関連する分子に注目し、その役割を検討した。S. mutansとS. anginosusのF型ATPaseの遺伝子変異・欠損株を作製したところ、顕著な耐酸性の低下がみられた。また、S. anginosusのA型ATPase欠損株では、塩基性や高塩濃度での増殖が低下した。プロトン輸送ATPaseは、他の細菌とは異なり、口腔内病原細菌では細胞外環境のストレス応答に重要な役割を果たしてい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、耐塩基性、耐塩性のようなストレス応答にプロトン輸送ATPaseが重要であることが示唆された。同酵素は、他の多くの細菌ではATP合成酵素としてはたらいており、増殖に重要であるが必須ではない。したがって、プロトン輸送ATPaseを阻害する化合物は、口腔内の常在細菌叢を破壊させることなく、病原細菌の増殖を選択的に抑制できる可能性がある。また、A型ATPaseは哺乳類には存在しない酵素であり、特異的な阻害剤は口腔内病原細菌に対して選択毒性を示すことが期待できる。

研究成果の概要(英文)：Oral pathogens, including S. mutans and S. anginosus, are responsible for dental caries and periodontal disease. Chronic oral infection with these microorganisms is also associated with systemic diseases. In this study, we focused on oral bacterial F- and A-type proton pumping ATPases. We generated mutant S. anginosus and S. mutans expressing no or lower levels of F-type ATPase. The mutant cells exhibited a significantly lower growth rate and survival under acidic conditions. In addition, A-type ATPase deficient S. anginosus showed lower growth rate under alkaline or high salt conditions. These results suggest that proton pumping ATPases in oral pathogenic bacteria play roles in responses to acid, alkaline and high salt stresses.

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 P. gingivitis 虫歯 歯周病

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

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。これらの予防法はブラッシングやスクレーピングなどによる歯垢・歯石の除去、治療法は抜歯や抜髄といった物理的・外科的な方法が主流である。近年では、特に高齢者のう蝕や歯周病の患者数・罹患率が上昇し、継続的な口腔ケアが困難な場合も多いため、より簡便で侵襲性の低い予防・治療法の確立が期待されている。医薬品による口腔内病原細菌の殺菌・除菌はその主要な選択肢になり得る。

プロトン輸送 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 型に分類されるが、構造や作動機構は類似している。これまでに研究代表者は、*S. mutans* の F 型 ATPase (F-ATPase) を阻害する化合物を見出し、それらの化合物が、酸性環境での増殖・生存を低下させることを明らかにした。このことから、同菌の F-ATPase は、酸性環境で細胞質のプロトンの排出に関与していることが予想された。さらに、*P. gingivalis* の A 型 ATPase (A-ATPase) が増殖に重要であることを示唆した。同菌は糖を利用せず、増殖をアミノ酸やオリゴペプチドに依存しており、A-ATPase はこれらの栄養物を細胞内へ取り込むためにイオン濃度勾配を形成している可能性がある。ほ乳類を含む多くの生物で F-、A-ATPase は、呼吸鎖により形成されたプロトン濃度勾配を利用して ATP を合成している。一方、*S. mutans* は、呼吸鎖を持たないため、プロトン濃度勾配を利用した ATP 合成は行わない。また、*P. gingivalis* は偏性嫌気性細菌であるため、呼吸鎖によるプロトン濃度勾配を利用した ATP 合成は行わない。以上のことから研究代表者は、口腔内病原細菌の F-、A-ATPase は、ATP を合成する場合とは異なる輸送体と共役しており、それぞれに独自のイオン輸送ネットワークが存在すると予想した。このネットワークは耐酸性の獲得やアミノ酸などの取り込みに関与すると考えられる。これらを明らかにすることは、う蝕や歯周病の効果的な予防・治療薬の開発につながると考えられる。

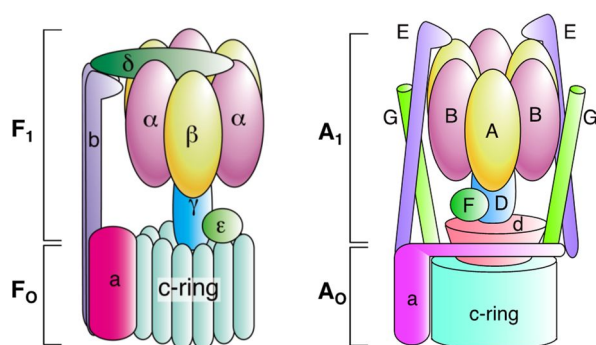


図 プロトン輸送 ATPase のモデル図
左:F-ATPase 右:A-ATPase

2. 研究の目的

本研究課題では、上記の研究当初の背景に基づき以下の2点を目的とした。

- (I) プロトン輸送 ATPase および共役してはたらく分子の口腔内病原細菌における役割を詳細に明らかにする。
- (II) プロトン輸送 ATPase および共役してはたらく分子の特異的に阻害する化合物を見出す。

口腔内病原細菌としては、*S. mutans* と *P. gingivalis* に加え、食道がんの高リスク因子として近年注目されている *S. anginosus* に着目した。*S. mutans* は F-ATPase を、*P. gingivalis* は A-ATPase を、*S. anginosus* は F-ATPase と A-ATPase の両方を有している。*S. mutans* と *S. anginosus* は高い耐酸性を有しており、耐酸機構へのプロトン輸送 ATPase の関与を中心に検討した。*P. gingivalis* は、タンパク質やペプチドを分解してアミノ酸を栄養源とするが、その取り込みには A-ATPase によるプロトンまたはナトリウムの濃度勾配が関係していると考えられる。そこで、アミノ酸の取り込みに着目し、タンパク質やペプチドを分解するジペプチジルペプチダーゼにも着目した。

3 . 研究の方法

(1) *S. mutans* におけるプロトン輸送 ATPase の役割

S. mutans は、プロトン輸送 ATPase として、F-ATPase を有している。ノックアウトベクターにより、触媒中心の β サブユニットの発現量が低下した変異株を作製した。得られた変異株の耐酸性を評価するために、酢酸により pH を低下させた培地における増殖度を野生型と比較した。また、増殖度の実験よりさらに pH を低下させた培地での生存率を評価した。

(2) *S. anginosus* におけるプロトン輸送 ATPase の役割

S. anginosus は、F 型と A 型の 2 種類のプロトン輸送 ATPase 遺伝子を有している。そこで、ノックアウトベクターにより F-ATPase の β サブユニット遺伝子、A-ATPase の B サブユニット遺伝子の欠損株を作製した。得られた欠損株の酸性環境での増殖・生存を(1)と同様の方法で評価した。また、プロトン輸送 ATPase 遺伝子のプロモーター領域を探索し、その領域に欠損させたプロトン輸送 ATPase 遺伝子を連結した発現ベクターを導入し、欠損株において機能が回復するかどうかを検討した。

(3) *P. gingivalis* のジペプチジルペプチダーゼを阻害する抗菌物質の探索

P. gingivalis は、ジペプチジルペプチダーゼの一つである DPP7 を有する。DPP7 は、*P. gingivalis* の増殖に重要な役割を果たしていることが知られている。そこで、DPP7 の活性中心に結合するバリルチロシンやフェニルアラニルチロシンの共結晶構造を基にジペプチド阻害剤を設計した。各化合物の DPP7 の酵素活性阻害作用と増殖抑制作用を評価した。

4 . 研究成果

(1) *S. mutans* におけるプロトン輸送 ATPase の役割

F-ATPase の β サブユニットの発現量が低下した *S. mutans* 変異株について、野生株と増殖速度を比較した。中性 (pH7.4) の培地では両者に大きな差は見られなかったが、酢酸により pH を 5.3 に低下させた培地では変異株の増殖速度が顕著に低下した。さらに、低い pH 条件下における *S. mutans* の生存率を検討したところ、野生株は pH4.2 ~ 4.3 付近まで生存するのに対し、変異株は生存率が大きく低下した。一方、中性の培地での生存率には差が見られなかった。したがって、*S. mutans* の F-ATPase はプロトンを細胞外へ排出することにより、耐酸性の発現に重要な役割を果たしていることが示唆された。研究成果は、Journal of Applied Microbiology に報告した (Sekiya et al, 2023, 134(4), Ixad073)。

(2) *S. anginosus* におけるプロトン輸送 ATPase の役割

F-ATPase の β サブユニットの欠損株について、野生株と増殖速度を比較したところ、*S. mutans*

と同様に中性 (pH7.3) の培地では大きな差は見られなかったが、pH を 5.3 に低下させた培地では欠損株の増殖速度が低下した。より強い酸性条件下における生存率を検討したところ、野生株は pH4.3 でも生存するのに対し、欠損株は pH4.7 でほとんど生存できなかった。また、F-ATPase オペロンの約 200 bp 上流領域に β サブユニット遺伝子を連結した発現プラスミドを欠損株に導入すると、 β サブユニットの発現が野生株と同程度に回復したことから、導入した領域にプロモーターが存在することが示唆された。さらに、 β サブユニットの発現が回復した *S. anginosus* では、酸性環境における増殖、生存ともに野生株と同程度に回復した。したがって、*S. anginosus* の F-ATPase は、耐酸性に重要な役割を果たしていることが強く示唆された。

A-ATPase の B サブユニット欠損株は、酸性環境での増殖・生存に影響が見られなかった。一方、水酸化ナトリウムによって pH を 8.5 に上昇させた培地や塩化ナトリウムを 1.8% 添加して塩濃度を増加させた培地での増殖速度が、野生株に比べて低下した。したがって、A-ATPase は耐塩基性、耐塩性に重要な役割をしていると考えられる。

以上のことから、*S. anginosus* において F-ATPase、A-ATPase は、プロトンやナトリウムの排出を介して各種ストレス応答に関与している可能性がある。研究成果は、薬学会第 144 年会などで発表した。

(3) *P. gingivalis* のジペプチジルペプチダーゼを阻害する抗菌物質の探索

ジペプチド誘導体について、*P. gingivalis* の DPP7 の阻害活性を検討したところ、強力に阻害する化合物を数種見出した。これらの化合物の *P. gingivalis* の増殖に対する作用を検討したところ、MIC 約 1 μ M の強い抗菌活性を示す誘導体を同定した。また、*P. gingivalis* に対し強い抗菌活性を示した化合物は、他の口腔内細菌の増殖を抑制しなかった。したがって、DPP7 を特異的に阻害する化合物は、口腔内の細菌叢には影響を与えずに口腔内病原細菌を選択的に除菌できる可能性がある。研究成果により、特許を出願した (特願 2022-110510)。

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 Matsumoto Naomi, Sekiya Mizuki, Sun-Wada Ge-Hong, Wada Yoh, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 12
2. 論文標題 The lysosomal V-ATPase a3 subunit is involved in localization of Mon1-Ccz1, the GEF for Rab7, to secretory lysosomes in osteoclasts	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8455
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-12397-w	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	4. 巻 45
2. 論文標題 Proton Pumping ATPases: Rotational Catalysis, Physiological Roles in Oral Pathogenic Bacteria, and Inhibitors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1404 ~ 1411
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b22-00396	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, Ikeda Kazuya, Yonai Ayaka, Ishikawa Taichi, Shimoyama Yu, Kodama Yoshitoyo, Sasaki Minoru, Nakanishi-Matsui Mayumi	4. 巻 134
2. 論文標題 F-type proton-pumping ATPase mediates acid tolerance in <i>Streptococcus mutans</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Applied Microbiology	6. 最初と最後の頁 lxad073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jambio/lxad073	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 阪本泰光, 日高興士, 石原 司, 中村彰宏, 鈴木義之, 關谷瑞樹, 六本木沙織, 小笠原 渉, 田中信忠	4. 巻 35(2)
2. 論文標題 多剤耐性菌及び歯周病菌感染症の治療を目指した新たな作用機序による抗菌薬の開発	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本放射光学会誌	6. 最初と最後の頁 88-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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13件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 後藤（松元）奈緒美、關谷瑞樹、和田（孫）戈虹、和田洋、河上裕、中西（松井）真弓
2. 発表標題 プロトンポンプV-ATPaseのa3サブユニットによる小胞輸送関連因子Mon1-Ccz1の分泌リソソームへのリクルート
3. 学会等名 第12回国際医療福祉大学学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 關谷瑞樹
2. 発表標題 口腔内病原性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 第20回生物化学若手研究セミナー
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 松元奈緒美、關谷瑞樹、和田（孫）戈虹、和田洋、中西（松井）真弓
2. 発表標題 破骨細胞において、分泌リソソームに局在するV-ATPaseのa3サブユニットは、Rab7のGEFであるMon1-Ccz1をリクルートする
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 關谷瑞樹、松元奈緒美、高橋巖、荒木信、那谷耕司、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 aサブユニットの役割
3. 学会等名 第95回日本生化学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関谷瑞樹、池田一弥、米内文香、下山佑、石河太知、古玉芳豊、佐々木実、中西（松井）真弓
2. 発表標題 虫歯菌Streptococcus mutansのプロトン輸送ATPaseによる耐酸性メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M. Sekiya
2. 発表標題 Role of the $\alpha 2$ isoform of V-ATPase in insulin granule trafficking in pancreatic cells
3. 学会等名 V-ATPase summit: from structure and mechanism to cell biology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 3)関谷瑞樹、山口友聖、村松美音、高坂未星、村上幸汰、下山佑、石河太知、古玉芳豊、河野貴久子、矢野志緒、佐々木実、中西（松井）真弓
2. 発表標題 Streptococcus anginosus F型プロトン輸送 ATPase の酸性環境における役割
3. 学会等名 第94回日本生化学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 M. Nakanishi-Matsui, N. Matsumoto, M. Sekiya
2. 発表標題 Molecular mechanism underlying osteoclast secretory lysosomes mediated by vacuolar-type ATPase
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 関谷瑞樹、村松美音、山口友聖、下山佑、石河太知、古玉芳豊、佐々木実、中西(松井)真弓
2. 発表標題 口腔レンサ球菌 <i>Streptococcus anginosus</i> のプロトン輸送 ATPase による耐酸性発現メカニズム
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 関谷瑞樹、小原優良、村松美音、山口 友聖、石河太知、下山佑、古玉芳豊、佐々木実、中西(松井) 真弓
2. 発表標題 食道がん高リスク因子となる <i>Streptococcus anginosus</i> のプロトン輸送 F 型 ATPase による耐酸性機構
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 小宅真由、関谷瑞樹、村松美音、山口友聖、下山佑、石河太知、古玉芳豊、佐々木実、中西(松井)真弓
2. 発表標題 食道がん高リスク因子となる口腔内レンサ球菌 <i>Streptococcus anginosus</i> における プロトン輸送 A型 ATPaseの役割
3. 学会等名 日本薬学会第144年会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 関谷瑞樹、松元奈緒美、高橋巖、花坂 智人、荒木信、那谷耕司、中西(松井)真弓
2. 発表標題 V-ATPase a サブユニットを介したインスリン分泌小胞の輸送
3. 学会等名 第96回日本生化学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 K. Hidaka, Y. Tsuda, M. Sekiya, Y. Sakamoto, S. Roppongi, A. Nakamura, Y. Suzuki, W. Ogasawara, N. Tanaka
2. 発表標題 Combination study of partial structures in Phe-Tyr derivatives for antibacterial activity against <i>Stenotrophomonas maltophilia</i>
3. 学会等名 第58回ペプチド討論会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗菌性ジペプチド化合物	発明者 日高興士、野中由香莉、多部田康一、阪本泰光、關谷瑞樹	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-110510	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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

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