

令和 6 年 5 月 24 日現在

機関番号：32651

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21291

研究課題名（和文）アミロイドーシスの発症を誘導する腸内細菌由来機能性アミロイドの探索

研究課題名（英文）Exploration of Functional Amyloids Derived from Gut Bacteria that Induce the Onset of Amyloidosis

研究代表者

杉本 真也（Sugimoto, Shinya）

東京慈恵会医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60464393

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：我々は、神経変性疾患患者で優位に増加する細菌の機能未知タンパク質が、大腸菌の機能性アミロイド構成タンパク質と相同性を示すことを見出した。Alpha-Fold 2によってアミロイド線維を形成することが示唆された本タンパク質のC末端ペプチドが、チオフラビンT陽性のアミロイド様凝集体を形成することを分光学的解析と電子顕微鏡観察によって確認した。このC末端ペプチドのアミロイド様凝集体は自身のアミロイド線維形成を促進する活性を有するが、アミロイド ペプチドに対しては示さなかったことから、この効果は分子種特異的であ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

現在、腸内細菌は数万種類存在すると推定されており、ヒトの健康や様々な疾病に影響を及ぼすことが分かってきた。しかし、腸内細菌の大部分は難培養性であり、かつ膨大な種類の腸内細菌が生成する機能性アミロイドについてアミロイド線維の形成を検証したり、ヒトや実験動物でアミロイドーシス発症との関連を検証したりすることは困難である。本研究では、機能性アミロイド候補の探索・評価法を確立した。本研究で得られた成果は、マウスやヒトを対象とした研究の基盤となり、機能性アミロイドの産生を特異的に阻害する、あるいは特異的な腸内細菌を選択的に除菌するといった新たな疾病予防法の確立にも繋がる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：We discovered that a previously uncharacterized protein from gut bacteria, which is significantly increased in patients with neurodegenerative diseases, shows homology to the functional amyloid-forming proteins of Escherichia coli. Spectroscopic analysis and electron microscopy demonstrated that the C-terminal peptide of this protein, which AlphaFold 2 predicted to form amyloid fibrils, forms Thioflavin T-positive amyloid-like aggregates. These amyloid-like aggregates of the C-terminal peptide promoted the formation of its own amyloid fibrils but did not show this effect on A₄₂ peptides, suggesting that this effect is molecule-specific.

研究分野：応用微生物学 細菌学 分子生物学 生化学

キーワード：アミロイドーシス パーキンソン病 アルツハイマー病 機能性アミロイド 腸内細菌 チオフラビンT 透過型電子顕微鏡 大腸菌

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患は、進行性の認知症や運動機能の低下を引き起こす難病である。これらの疾患は、共通してアミロイドと呼ばれる規則的な線維状凝集タンパク質が関わっていることから、アミロイドーシスと呼ばれる。アミロイドーシスは、社会の高齢化にともない増加の一途をたどっており、その発症機序の解明と予防法・治療法の開発は喫緊の課題である。

アミロイドは、タンパク質（もしくはペプチド）が規則正しく重合した線維状凝集体であり、変性剤やタンパク質分解酵素の作用に対して耐性である。そのため、アミロイドは物理化学的に極めて安定であり、生体内で生成されると、その除去は困難である。アミロイドは、アミロイド前駆体の単量体がβシートに富んだ構造に変化しながら重合することで形成される。しかし、生体内におけるアミロイドの核形成のメカニズムは十分に理解されていない。

多くの微生物は、アミロイドと構造的に類似した線維状タンパク質（またはペプチド）凝集体を菌体外に生成する。それらは、バイオフィーム（医療器具表面などに形成される菌膜）の形成や、宿主への定着・感染の際に重要な役割を果たすことから、『機能性アミロイド』と呼ばれている。このような機能性アミロイドは、ヒトの腸管内においても検出されており、宿主に対して何らかの影響を与えると予想される。興味深いことに、アルツハイマー病患者やパーキンソン病患者の腸内では、それぞれ特定の腸内細菌の割合が顕著に増加していることが知られている。これらを統合すると、特定の細菌が菌体外に生成する機能性アミロイドがアミロイドーシスの発症に関与する可能性が想起される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「特定の腸内細菌が産生する機能性アミロイドが、腸管などの末梢組織から中枢神経や全身に移行し、宿主のアミロイド前駆体タンパク質の構造変換を触媒することで、アミロイドーシスを発症させる」という新たな仮説を検証することである。

3. 研究の方法

(1) バイオインフォマティクスを活用した腸内細菌が産生する機能性アミロイドの探索

膨大な種類の腸内細菌を網羅的に分離・培養することは、現在の技術では不可能である。そこで、アルツハイマー病やパーキンソン病のようなアミロイドーシスを発症した患者に特有の腸内細菌のゲノム情報と、様々な菌が産生する既知の機能性アミロイドのアミノ酸配列を照らし合わせ、機能性アミロイドを形成する可能性の高い候補タンパク質を探索した。また、アミロイド形成の予測プログラム（PASTA2.0, <http://protein.bio.unipd.it/pasta2/>）を用いて、候補タンパク質を絞り込んだ。

(2) 大腸菌のカーリー分泌系を用いた腸内細菌由来機能性アミロイドの評価系の確立

機能性アミロイド候補タンパク質が、実際にアミロイド線維を形成するかを検証した。多くの候補タンパク質について評価するためには、ハイスループットな評価法が必要であったため、本研究では大腸菌の機能性アミロイドであるカーリーの分泌システムを応用した（図1）。カーリーの構成タンパク質であるCsgAの菌体外への分泌に必要なシグナル配列及び外膜トランスポーターCsgGの認識配列と、候補タンパク質を融合したキメラタンパク質を発現するプラスミドを構築した。このプラスミドを *csgA* 欠損株に導入し、アミロイド線維の形成をコンゴレード含有寒天培地上で評価した。また、機能性アミロイドの発現量を増加させるため、*csgA* 欠損株からカーリーの産生を負に制御する複数の遺伝子を欠損させた株を構築した。

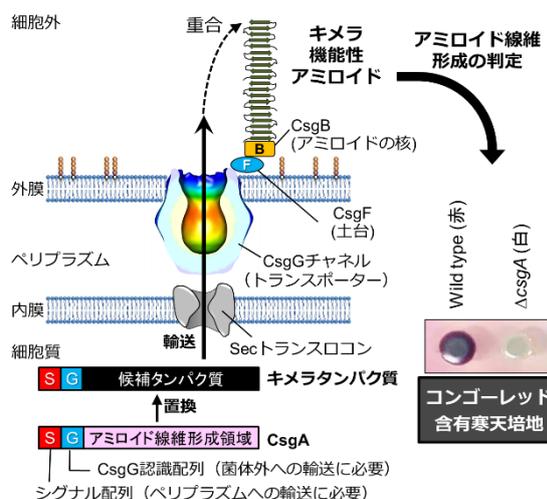


図1. 大腸菌カーリー分泌システムを応用した機能性アミロイドのハイスループット評価法

(3) 機能性アミロイド候補タンパク質のアミロイド線維形成の検証

機能性アミロイドを精製し、実際にアミロイド線維を形成するかを試験管内で評価した。本研究では、アミロイドに結合して強い蛍光を示すチオフラビン T を用いた分光学的な解析と、生体高分子の構造解析に有用な透過型電子顕微鏡を用いて検証した。

(4) 腸内細菌由来機能性アミロイドとアミロイドーシス関連タンパク質の相互作用の解析

腸内細菌由来機能性アミロイドと、ヒトのアミロイドーシスに関連するアミロイド前駆体タンパク質の相互作用を調べた。機能性アミロイドを超音波処理で断片化し、それが核となって、アミロイド前駆体タンパク質のアミロイド線維形成を促進するか（シーディング活性）を、チオフラビン T 蛍光測定を用いて検証した。

4. 研究成果

(1) バイオインフォマティクスを活用した腸内細菌が産生する機能性アミロイドの探索

腸内細菌のメタゲノムデータを用い、大腸菌の機能性アミロイドであるカーリーの主要な構成タンパク質である CsgA と同源性を示すタンパク質を検索した。その結果、パーキンソン病患者において優位に増加することが報告されている偏性嫌気性グラム陽性細菌 *Catabacter* 属の機能未知タンパク質（74 アミノ酸、分子量 7.9 kDa）が CsgA と低いながらも同源性を示すことを見出し、本タンパク質を *Catabacter amyloid-like protein A* (CalA) と命名した。また、Web 上で公開されているアミロイド予測プログラム (RFAmyloid) により、CalA がアミロイド線維を形成することが示唆された (Probability = 0.821)。一方、別の腸内細菌由来機能性アミロイド候補タンパク質として、*Akkermansia* 属細菌の機能未知タンパク質が、パーキンソン病に関わる α シヌクレインと同源性を示すことを見出した。しかし、本タンパク質は α シヌクレインの非アミロイド形成領域と同源性を示したため、アミロイド線維を形成する可能性は低いと判断し、以後の研究では CalA に注目して実験を行った。

(2) 大腸菌のカーリー分泌系を用いた腸内細菌由来機能性アミロイドの評価系の確立

大腸菌カーリー分泌機構を応用した機能性アミロイドの評価系を確立し、実験に必要な菌株とプラスミドの準備を完了した。大腸菌に合わせてコドン最適化した CalA 遺伝子を CsgA のシグナルペプチド (1-20) および CsgG 認識部位 (21-43) と連結したキメラ遺伝子を人工合成し、大腸菌で複製可能なプラスミドの IPTG 誘導型プロモーターの下流に連結した。このプラスミドを大腸菌 *csgA* 欠損株に導入したが、アミロイドの産生を示すコロニーの赤い呈色は観察されなかった。そこで、カーリーの産生をネガティブに制御する因子を欠損させることで、機能性アミロイドの産生量が増加すると予想し、ペリプラズムにおいて CsgA の分解に関わるペリプラズム局在プロテアーゼを 3 種類欠損させた株を作製した。さらに、この株からカーリーの産生を転写レベルで抑制する転写因子を欠損させた多重遺伝子欠損株を作製した。この株に CalA 発現プラスミドを導入し、コンゴールレッド含有培地上でアミロイド線維の産生を評価した結果、CalA 発現プラスミド導入株のコロニーが微弱ながら赤色を呈した (図 2)。

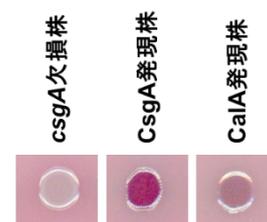


図 2. コンゴールレッド含有寒天培地上での大腸菌のコロニーの呈色

(3) 機能性アミロイド候補タンパク質のアミロイド線維形成の検証

Alpha-Fold 2 を用いて CalA の立体構造を予測したところ、CalA の N 末端は天然変性領域であり、C 末端側に 4 本の β ストランドからなる β シート構造を形成することが示唆された。そこで、CalA の C 末端ペプチド (CalA-C) を化学合成し、CalA-C がアミロイド線維を形成しやすい条件 (ペプチド濃度、温度、時間、バッファー組成など) を精査した。その結果、リン酸バッファー中で 20 μ M 程度に調製したあと、振とうしながら 37°C で保温することで、48 時間以内に効率的にアミロイド線維を形成することがチオフラビン T 蛍光の増大から確認できた。透過型電子顕微鏡を用いて CalA-C 凝集体を観察したところ、一般的なアミロイド線維と同様に枝分かれのない線維構造を形成することがわかった (図 3)。また、CalA-C アミロイド様凝集体を超音波処理することで得られた断片が CalA-C 自身のアミロイド線維形成を飛躍的に促進することを確認した (シーディング活性)。これらの結果より、CalA がその C 末端領域をコアとしたアミロイド様凝集体を形成することが示唆された。

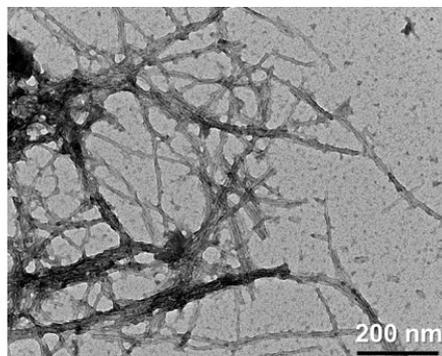


図 3. CalA-Cのアミロイド様凝集体の透過型電子顕微鏡像 (ネガティブ染色)

(4) 腸内細菌由来機能性アミロイドとアミロイドーシス関連タンパク質の相互作用の解析
CalA-C アミロイド様凝集体がアミロイドーシスに関連するアミロイドベータペプチド ($A\beta_{42}$) のアミロイド線維形成に対してもシーディング活性を示すかを検討した。その結果、CalA-C は $A\beta_{42}$ に対してシーディング活性を示さなかった。そのため、CalA-C のシーディング活性は分子種特異的である可能性が示唆された。

以上のように、本研究ではパーキンソン病患者で優位に増加する *Catabacter* 属細菌の機能未知タンパク質 CalA がアミロイド様凝集体を形成することを見出した。今後、 α シヌクレインや Tau など、他のアミロイドーシス関連タンパク質と CalA の相互作用を調べ、CalA がこれらの疾患関連タンパク質に対してシーディング活性を示すかを検証する必要がある。また、線虫やマウスなどのアミロイドーシスモデルにおける疾患発症への影響や、パーキンソン病患者の腸管内に CalA のアミロイド様凝集体が検出されるについても調べる必要があり、今後の研究の進展に期待したい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 杉本真也
2. 発表標題 分子生物学と透視技術でバイオフィルムの形成原理と機能に迫る
3. 学会等名 第55回 ビブリオシンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 杉本真也
2. 発表標題 アミロイドの制御分子から開拓する感染症・神経変性疾患の融合領域研究
3. 学会等名 東京慈恵会医科大学 第4回総合医科学研究センターセミナー（招待講演）
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京慈恵会医科大学細菌学講座 http://square.umin.ac.jp/saikin/ 細菌学講座 東京慈恵会医科大学 基礎・臨床講座 http://www.jikei.ac.jp/academic/course/11_saikin.html バイオフィルム研究センター 東京慈恵会医科大学 基礎・臨床講座 http://www.jikei.ac.jp/academic/course/77_biofilm.html プロジェクト研究部 アミロイド制御研究室 https://www.jikei.ac.jp/academic/course/project_research_amyloid.html
--

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