



## 大腸菌が“毒性のあるアミロイド”の材料タンパク質を安全に分解する仕組みを発見 － 神経変性疾患研究にもつながる基礎的成果 －

東京慈恵会医科大学 細菌学講座 准教授／アミロイド制御研究室 室長の杉本 真也、医学科ユニット医学研究専攻の寺澤 友梨香（2022年卒）、同細菌学講座 講座担当教授の金城 雄樹らは、熊本大学 発生医学研究所 准教授の山中 邦俊らとの共同研究により、大腸菌が細胞の外で作る特殊なアミロイドの材料タンパク質を、細胞の中で安全に処理するための仕組みを発見しました。本研究成果は、2025年9月17日、国際学術誌 *Journal of Molecular Biology* にオンライン先行掲載されました。

アミロイド<sup>(注1)</sup>と呼ばれる線維状のタンパク質の塊は、アルツハイマー病やパーキンソン病などの原因物質として知られています。一方で、大腸菌などの細菌は「Curli（カーリー）<sup>(注2)</sup>」と呼ばれる「機能性アミロイド」を細胞の外に作り、仲間同士で集まる“バイオフィーム”<sup>(注3)</sup>を形成するのに利用しています。しかし、この材料が細胞内に溜まると細菌自身にとっても毒となります。

今回の研究で、大腸菌は「Prc（ピー・アール・シー）」というタンパク質分解酵素（プロテアーゼ）を使って、Curli の材料タンパク質 CsgA（シー・エス・ジー・エー）を細胞の中で分解し、毒性化を防いでいることがわかりました。さらに、分解や細胞の外への分泌がうまくいかないときには、遺伝子の働きを抑える仕組みも備えており、多重の安全装置で身を守っていることが明らかになりました。

### 背景

タンパク質は正しく折り畳まれて立体構造をつくることで、本来の機能を発揮します。ところが、ストレスや遺伝子変異などの影響で折り畳みに失敗すると、構造が壊れたり（変性）、異常な形のまま集合して「凝集体」と呼ばれる塊をつくってしまいます。なかでも「アミロイド」と呼ばれる線維状の凝集体は、アルツハイマー病やパーキンソン病といった神経変性疾患の発症と深く関わっていることが知られています。

一方で、細菌はあえて「機能性アミロイド」を細胞の外に作り出し、バイオフィームと呼ばれる集団構造を築く戦略をとります。代表的な例が、大腸菌の Curli です。Curli は細菌にとって有用ですが、材料となる CsgA タンパク質が細胞内にたまると毒性を示すため、細菌にとってもリスクを伴います。ところが、これまで CsgA が細胞内でどのように分解され、毒性を回避しているのかは分かっていませんでした。

### 主な研究成果

本研究では、大腸菌を用いた遺伝子改変解析とタンパク質分解実験、および遺伝子発現量解析により、以下の知見を得ました。

- Prc は CsgA を特異的に内部切断し、分解する。
- Prc はペリプラズム<sup>(注4)</sup>に存在する分子シャペロン CsgC と協調し、アミロイド様凝集体の蓄積を防ぐ。
- 分解や細胞外への分泌が滞ると、大腸菌は Rcs および Cpx とよばれる二成分制御系<sup>(注5)</sup>を介して CsgA の発現を転写レベルで抑制し、さらなるアミロイドの蓄積を防ぐ。



これらの結果から、大腸菌は「タンパク質分解」と「タンパク質凝集抑制」、および「転写制御」という複数の安全機構で、機能的アミロイドの毒性を回避していることが明らかになりました。

### 意義と展望

今回の成果は、細菌における機能性アミロイドの品質管理と毒性回避機構の全貌に迫る重要な知見であり、以下の展開が期待されます。

- バイオフィルム形成制御に向けた新規分子標的の提供
- 難治性細菌感染症の治療法開発への応用
- ヒトのアミロイド関連神経変性疾患研究への基盤知識の提供
- 生物学・バイオマテリアル分野における「効率的な機能性アミロイド利用技術」開発への応用

### 論文情報

タイトル : Periplasmic serine protease Prc is responsible for amyloid subunit CsgA degradation and proteostasis in *Escherichia coli*

著者 : Shinya Sugimoto, Yurika Terasawa, Naoki Tani, Kunitoshi Yamanaka, Yuki Kinjo

掲載誌 : Journal of Molecular Biology

Doi : <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2025.169418>

### 研究支援

本研究は、国立研究開発法人科学技術振興機構 (JST) が推進する創発的研究 (JPMJFR2209) および ERATO 野村集団微生物制御プロジェクト (JPMJER1502)、文部科学省科学研究費補助金 国際共同研究強化 (A) (JP18KK0429)、上原生命科学財団研究奨励費、東京慈恵会医科大学戦略的重点配分研究費、熊本大学発生病学研究所共同研究費、熊本大学発生病学研究所高深度オミクス医学研究拠点ネットワーク形成事業などの助成を受けて行われました。

### 研究メンバー

- ・東京慈恵会医科大学 医学部 医学科 細菌学講座  
准教授 杉本 真也 (アミロイド制御研究室 室長兼任)  
医学科ユニット医学研究専攻 寺澤 友梨香 (2022 年卒)  
講座担当教授 金城 雄樹 (バイオフィルム研究センター長兼任)
- ・熊本大学 発生病学研究所  
准教授 山中 邦俊  
専門技術職員 谷 直紀

### 【本研究内容についてのお問い合わせ窓口】

東京慈恵会医科大学 細菌学講座 准教授／総合医科学研究センター プロジェクト研究部 アミロイド制御研究室 室長 杉本 真也 (すぎもと しんや)  
電話 03-3433-1111 (代) メール [ssugimoto@jikei.ac.jp](mailto:ssugimoto@jikei.ac.jp)

### 【報道機関からのお問い合わせ窓口】

学校法人慈恵大学 経営企画部 広報課  
電話 03-5400-1280 メール [koho@jikei.ac.jp](mailto:koho@jikei.ac.jp)



## 研究の詳細

### 1. 背景

タンパク質の品質管理機構は、折り畳み異常や凝集によって生じる毒性から細胞を守るために不可欠です。その破綻は、ヒトにおける神経変性疾患や老化の進行とも直結します。アミロイドはその代表例で、病的アミロイドは神経毒性を示しますが、一方で細菌や真菌では「機能性アミロイド」として利用されることも知られています。

大腸菌が産生する Curli はバイオフィルムの主要構成要素であり、その主成分である CsgA は強力なアミロイド形成能を持ちます (図1)。通常、Curli は細胞外で形成されますが、遺伝子変異などにより CsgA が細胞内に蓄積すると毒性を示すため、細菌にとっても「リスクのある分子」といえます。そのため、蓄積を防ぐ制御機構が不可欠です。

これまでに DnaK システム<sup>(注6)</sup> (文献 1-3) や CsgC (文献 4) などの分子シャペロンの役割は報告されていましたが (図1)、CsgA の分解を担うプロテアーゼは不明でした。特に、CsgA が大腸菌のペリプラズム (細胞質膜と外膜の間の空間) で速やかに分解されることは示唆されていたものの、その担い手は 30 年以上にわたり謎とされてきました。本研究では、CsgA の分解機構を明らかにし、そのプロテアーゼを特定することを目的としました。さらに、CsgA がペリプラズムに蓄積した際の大腸菌の応答についても解析しました。

### 2. 研究手法と成果

#### ① ペリプラズムにおける CsgA 分解の可視化

CsgA は通常、ペリプラズムから速やかに分泌または分解されるため、その動態を直接観察することは困難でした。そこで私たちは、CsgA の C 末端に蛍光タンパク質 sfGFP を融合した CsgA-sfGFP を合成するように大腸菌を改変し、ペリプラズム内に停滞する CsgA を追跡しました。その結果、CsgA がペリプラズムで強く切断されることを確認しました (図2)。

#### ② DegP/DegQ の関与と限界

ヒトではアルツハイマー病関連アミロイド  $\beta$  が HtrA1 により分解されることが知られています (文献 5)。大腸菌にも同系統の HtrA ファミリー<sup>(注7)</sup> に属する DegP/DegQ が存在するため、その関与を解析しました。結果として、これらは CsgA 分解に寄与するものの、活性化因子 YjN を必要とし、完全な分解には至りませんでした (図3)。したがって、主要な分解酵素は他に存在すると考えられました。

#### ③ Prc による CsgA の非典型的分解機構の発見

私たちは、マルチコピーサプレッサースクリーニング法<sup>(注8)</sup> による遺伝学的解析、遺伝子欠損株を用いた機能解析、CsgA 結合タンパク質の網羅的探索、さらに精製タンパク質を用いた生化学的実験を組み合わせることで、ペリプラズムに存在するプロテアーゼ Prc が CsgA の主要な分解酵素であることを明らかにしました。加えて、LC-MS/MS<sup>(注9)</sup> による切断部位の解析から、Prc は従来知られていた C 末端特異的切断 (tail-specific protease 活性)<sup>(注10)</sup> に依存せず、CsgA 内部を複数箇所段階的に切断する独自の分解様式を示すことが判明しました (図4)。さらに、Prc は可溶性モノマー型の CsgA には作用する一方で、アミロイド化した CsgA (成熟 Curli) には作用しないことも確認されました。

#### ④ Prc と CsgC の協働機構

大腸菌のペリプラズムにおいて、分子シャペロン CsgC が CsgA のアミロイド形成を抑制することは、米国ミシガン大学 Matthew Chapman 博士らの研究グループにより報告されています (文献 4)。この知見を踏まえ、私たちは、新たに同定した Prc と CsgC が協働することで効率的に CsgA を分解できるのではないかと考えました。そこで、CsgA のアミロイド形成過程にあらかじめ CsgC を添加し、その後に Prc による分解を検証したところ、CsgC を加えた場合にのみ Prc による CsgA 分解が確認されました (図5)。この結果から、CsgC は



アミロイド形成を抑制するだけでなく、Prc が基質を認識・分解できる状態を保持する役割も担うことが明らかになりました。すなわち、CsgC と Prc の連携は、ペリプラズムにおけるアミロイド前駆体管理の中核をなすと考えられます。

### ⑤ ストレス応答経路による転写制御

ヒトの細胞では、異常なタンパク質が蓄積すると、それを感知して原因となるタンパク質の合成を抑制する仕組みが存在します。そこで私たちは、大腸菌のペリプラズムにも同様の制御機構があると予想し、CsgA を細胞外へ分泌する輸送タンパク質 CsgG と、CsgA を分解するプロテアーゼ Prc の遺伝子を欠損させた株を作製しました。そして、リアルタイム PCR<sup>(注11)</sup>により CsgA 遺伝子の転写産物 (mRNA) 量を測定したところ、両遺伝子を欠損した変異株では CsgA の mRNA 量が減少していることが明らかになりました (図6)。

さらに、ペリプラズムでの異常タンパク質蓄積をモニターする CpxR および RcsB 遺伝子を追加で欠損させたところ、CsgA の mRNA 量は野生株レベルまで回復しました (図6)。これらの結果から、ペリプラズムに CsgA が過剰に蓄積すると Rcs 経路および Cpx 経路が活性化し、CsgA の転写を抑制することが分かりました。すなわち、分泌経路が飽和した際には、新規基質の供給を抑えるネガティブフィードバック機構が働くと考えられます。

## 3. 意義と展望

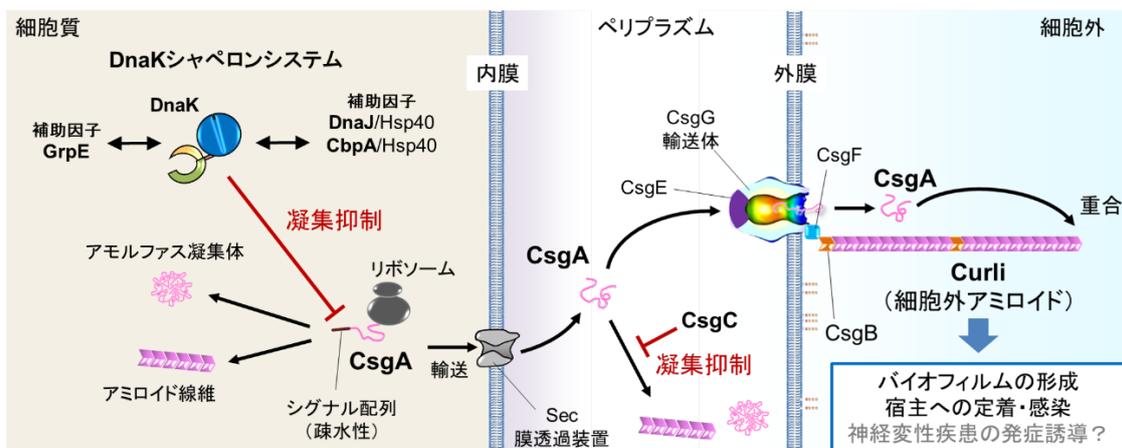
本研究により、大腸菌は少なくとも以下の三重の制御機構を並行して持つことが示されました (図7)。

- 分泌による Curli 形成 (従来の見解)
- CsgC と Prc による凝集抑制と分解 (今回の発見)
- ストレス応答経路による転写抑制 (今回の発見)

これらを動的に使い分けることで、大腸菌は機能性アミロイドの毒性を回避していると考えられます。特に、Prc による CsgA 選択的分解は、ヒトのアミロイド疾患に関連する前駆体分解機構の理解にもつながる可能性があります。

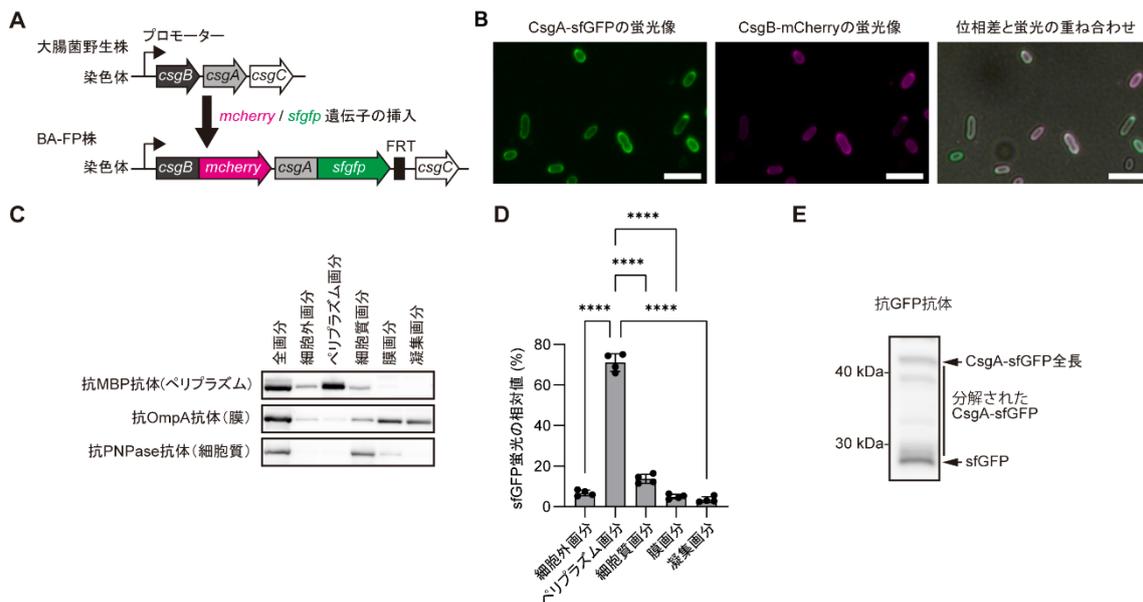
今後は、Prc 以外のプロテアーゼの関与や、Prc に類似したヒトタンパク質の探索と機能解析が重要課題となります。現在、私たちはヒトに存在する Prc 類似タンパク質の機能解析を進めており、将来的に神経変性疾患研究への応用が期待されます。

#### 4. 参考図



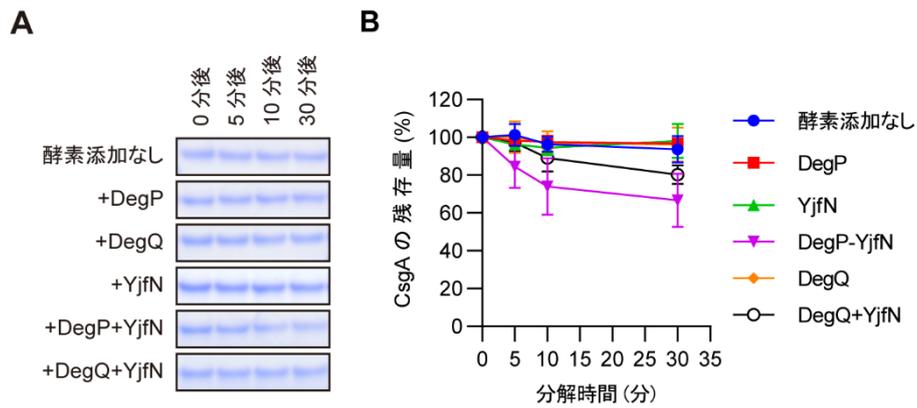
**図 1. Curli の生合成と制御に関わるタンパク質の働き**

Curli の主要な構成タンパク質である CsgA は、まずリボソームで合成され、Sec 膜透過装置を介してペリプラズムに運ばれる。次に、外膜に存在する CsgG 輸送体を通して細胞外へ分泌され、そこでアミロイド線維を形成して Curli が組み立てられる。CsgB は CsgA のアミロイド化を促進し、CsgE や CsgF は補助タンパク質として Curli 形成を助ける。さらに、CsgA が細胞質内で凝集しないように DnaK シャペロンシステムが監視し、同様にペリプラズムでは CsgC が凝集を防ぐ役割を担っている。



## 図2. 遺伝子改変大腸菌を用いたペリプラズムにおける CsgA の分解解析

- (A) 大腸菌の染色体上で、CsgA 遺伝子と CsgB 遺伝子の直後にそれぞれ sfGFP (緑色蛍光タンパク質) と mCherry (赤色蛍光タンパク質) の遺伝子をつなぎ合わせ、CsgA-sfGFP と CsgB-mCherry を作ることができる改変株 (BA-FP 株) を作製した。FRT は遺伝子改変の際に残る印を示す。
- (B) BA-FP 株を蛍光顕微鏡で観察すると、CsgA-sfGFP と CsgB-mCherry が細胞の縁 (辺縁部) に集まっていることが確認できた。
- (C) BA-FP 株の細胞を「細胞外」「ペリプラズム」「細胞質」「膜」「凝集」の画分に分け、マーカータンパク質を用いて分画が正しくできていることを確認した。  
マルトース結合タンパク質 (MBP) : ペリプラズムの目印  
外膜タンパク質 A (OmpA) : 細胞膜の目印  
ポリヌクレオチドホスホリラーゼ (PNPase) : 細胞質の目印
- (D) 各画分で sfGFP の蛍光の強さを測定した結果、CsgA-sfGFP の多くがペリプラズムに存在していることが分かった。統計解析は One-way ANOVA で実施し (N=4)、有意差は \*\*\*\* $P < 0.0001$  と判定した。
- (E) GFP に対する抗体を使ったウェスタンブロット解析<sup>(注1,2)</sup>により、CsgA-sfGFP が分解されていることが確認された。



### 図3. DegP および DegQ による CsgA の分解

- (A) 精製した CsgA モノマーに、精製した DegP または DegQ を加え、CsgA が分解されるかどうかをドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) 法<sup>(注13)</sup> で調べた。ゲル上の青いバンドが CsgA を示している。
- (B) 青いバンドの濃さを測定してグラフ化した。その結果、活性化因子 YjfN を加えた場合に、DegP および DegQ による CsgA の分解がわずかに起こることが確認された。4 回の実験の平均値 (シンボル) と標準偏差 (エラーバー) を示す。



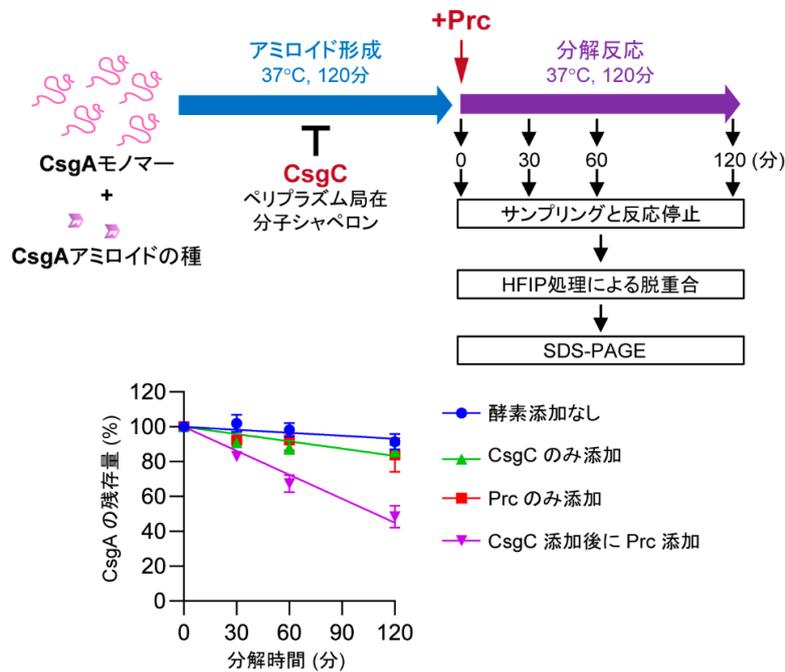
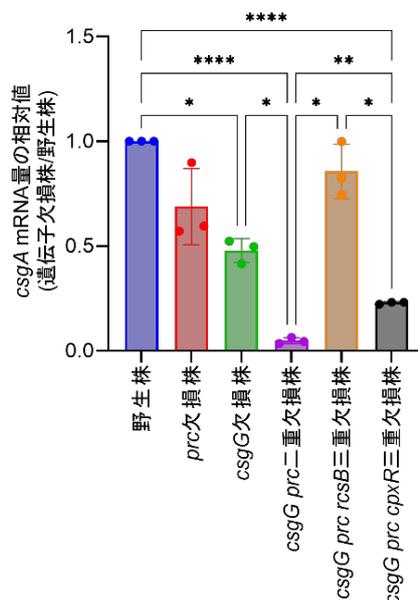


図 5. Prc と CsgC の協働による CsgA の効率的な分解

CsgA モノマーにアミロイドの種を添加して 37°C で 120 分間インキュベートすると、アミロイド線維が形成される。ところが、この過程で CsgC を加えるとアミロイド形成が抑えられる。その後に Prc を添加して 120 分間分解反応を行い、一定時間ごとにサンプリングして氷上で反応を停止させた。サンプルはヘキサフルオロイソプロパノール (HFIP) 処理でアミロイドをモノマーに戻し、SDS-PAGE 法で CsgA の分解の程度を解析した。その結果、アミロイド形成時に CsgC を添加した場合にのみ、Prc による CsgA の分解が確認された。3 回の実験の平均値 (シンボル) と標準偏差 (エラーバー) を示す。



### 図6. CsgA 蓄積時における CsgA の発現変化

各大腸菌株から RNA を抽出し、リアルタイム PCR で CsgA の mRNA 量を測定した。統計解析は One-way ANOVA で実施し (N=3)、有意差は  $*P<0.05$ 、 $**P<0.01$ 、 $****P<0.0001$  と判定した。CsgG 遺伝子と Prc 遺伝子の二重欠損株では CsgA の mRNA 量が大きく減少した。しかし、さらに RcsB 遺伝子または CpxR 遺伝子を欠損させると、CsgA の mRNA 量は部分的に回復した。このことから、分泌や分解が滞って CsgA がペリプラズムに蓄積すると、Rcs 経路と Cpx 経路という二成分制御系によるネガティブフィードバックが働き、転写レベルで CsgA の発現が抑えられると考えられる。特に、RcsB 遺伝子欠損では発現量が野生株レベルまで回復しており、Rcs 経路の寄与が大きいことが示された。(グラフ中の遺伝子名は斜体で、先頭文字を小文字で表記)

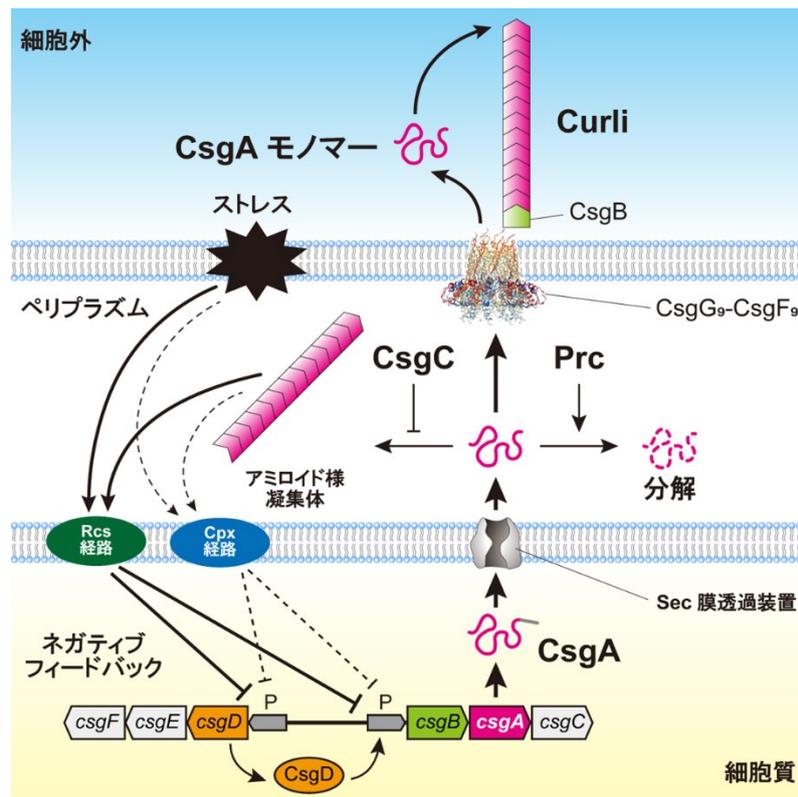


図7. 本研究のまとめ(概略図)

大腸菌は以下の3つの仕組みを並行して働かせ、状況に応じて使い分けることで、Curli という機能性アミロイドが細胞に毒性を及ぼさないように調節している。

- ① 分泌経路: CsgA を分泌し、Curli を構築する (従来知見)。
- ② 分解・凝集抑制経路: CsgC や Prc によって CsgA の凝集を防ぎ、分解して蓄積を抑える (今回の発見)。
- ③ 転写制御経路: Rcs 経路や Cpx 経路によって CsgA 遺伝子の発現自体を抑制する (今回の発見)。



## 5. 用語説明

### (注1) アミロイド

アミロイドとは、 $\beta$  シート構造を基本とする線維状タンパク質凝集体で、強固な不溶性構造を持つ。病的アミロイド(アルツハイマー病のアミロイド  $\beta$  など)は細胞毒性を示すが、一方で細菌や真菌が利用する「機能性アミロイド」も存在する。

### (注2) Curli

大腸菌やサルモネラなどの腸内細菌科細菌が産生する機能性アミロイド。主要な成分は CsgA で、バイオフィルムの形成や宿主細胞への付着に関与する。Curli の生合成には CsgB (アミロイドの核形成因子)、CsgD (転写制御因子)、CsgE (補助タンパク質)、CsgF (補助タンパク質)、CsgG (外膜輸送タンパク質) という別のタンパク質が必要である。CsgC は Curli の生合成に必須ではないが、CsgA のアミロイド形成を抑制する機能を持つ。

### (注3) バイオフィルム

微生物が産生する多糖・タンパク質・DNA などから構成される菌体外マトリクスに微生物細胞の集合体が覆われながら作られる三次元構造体。抗菌薬や免疫から細菌を保護し、慢性感染の原因となる。

### (注4) ペリプラズム

大腸菌などのグラム陰性菌における細胞質膜(内膜)と外膜の間の空間。折り畳み途上のタンパク質や分子シャペロン、プロテアーゼが存在し、タンパク質の品質管理やストレス応答に重要。

### (注5) 二成分制御系

細菌が環境変化を感知し応答するためのシグナル伝達系。センサーキナーゼとレスポンスレギュレーターとの二つのタンパク質で構成される。

### (注6) DnaK システム

大腸菌の主要な分子シャペロン系 (Hsp70 ファミリー)。DnaK、DnaJ/CbpA/DjlA、GrpE から成り、折り畳み異常タンパク質の再折り畳みや分解を補助する。

### (注7) HtrA ファミリー

高温ショックに応答するセリンプロテアーゼファミリー。細菌では DegP/DegQ/DegS が、ヒトでは HtrA1 などが知られる。折り畳み異常タンパク質の分解に関与。

### (注8) マルチコピーサプレッサースクリーニング法

目的遺伝子の機能を補う遺伝子を、多コピーの形で導入することにより同定する遺伝学的手法。未知の相互作用分子の探索に用いられる。

### (注9) LC-MS/MS

液体クロマトグラフィーと質量分析(タンデム質量分析)を組み合わせた解析法。タンパク質やペプチドの切断部位や修飾を高感度に特定できる。

### (注10) Tail-specific protease

Prc (別名 Tsp) はもともと「C 末端特異的プロテアーゼ」として同定され、基質タンパク質



の C 末端を切断する活性が知られていた。

(注11)リアルタイム PCR 法

蛍光を利用して DNA の増幅を定量的に追跡する方法。遺伝子発現量の解析に広く利用される。近年では、新型コロナウイルス感染の検査にも使用されている。

(注12)ウェスタンブロット解析

特定のタンパク質を検出・定量するための手法。まず SDS-PAGE によってタンパク質を大きさごとに分離し、その後、ゲルから膜へ転写して抗体を用いて目的のタンパク質を特異的に可視化する。

(注13)SDS-PAGE 法

タンパク質を分子量に基づいて分離する基本的な電気泳動法。SDS (ドデシル硫酸ナトリウム) を結合させてタンパク質を変性・荷電化し、ポリアクリルアミドゲル中を電場で移動させることで、分子の大きさに応じて分離することができる。

## 6. 引用文献

1. Arita-Morioka K, Yamanaka K, Mizunoe Y, Ogura T, Sugimoto S. Novel strategy for biofilm inhibition by using small molecules targeting molecular chaperone DnaK. **Antimicrob Agents Chemother**. 2015, 59(1):633-41. doi: 10.1128/AAC.04465-14.
2. Sugimoto S, Arita-Morioka KI, Terao A, Yamanaka K, Ogura T, Mizunoe Y. Multitasking of Hsp70 chaperone in the biogenesis of bacterial functional amyloids. **Commun Biol**. 2018, 1:52. doi: 10.1038/s42003-018-0056-0. eCollection 2018.
3. Sugimoto S, Yamanaka K, Niwa T, Terasawa Y, Kinjo Y, Mizunoe Y, Ogura T. Hierarchical Model for the Role of J-Domain Proteins in Distinct Cellular Functions. **J Mol Biol**. 2021, 433(3):166750. doi: 10.1016/j.jmb.2020.166750.
4. Evans ML, Chorell E, Taylor JD, Åden J, Göthesson A, Li F, Koch M, Sefer L, Matthews SJ, Wittung-Stafshede P, Almqvist F, Chapman MR. The bacterial curli system possesses a potent and selective inhibitor of amyloid formation. **Mol Cell**. 2015, 57(3):445-55. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.025.
5. Grau S, Baldi A, Bussani R, Tian X, Stefanescu R, Przybylski M, Richards P, Jones SA, Shridhar V, Clausen T, Ehrmann M. Implications of the serine protease HtrA1 in amyloid precursor protein processing. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2005, 102(17):6021-6. doi: 10.1073/pnas.0501823102.

以上