

認知症予防に効果を有する低利用海藻のメタボローム解析

鳥取大学 工学部 化学バイオ系学科
八木 寿梓

1. 研究の背景と目的

急激な高齢化社会を迎えた日本において加齢に伴い発症する疾患に対する対策・研究開発は重要な課題である。優れた医療技術の発展から人の平均寿命はのびつつあり、「人生100年時代」と謳われるようになった。一方、「健康寿命」と「平均寿命」には大きな壁があり、健康的に老いるためには加齢に伴い発症する疾患群を予防し、健康寿命を延ばすことが必要である。代表的な予防・治療疾患対象として認知症が挙げられる。2025年には700万人と試算されており、潜在的なものを合わせればその数倍は予測でき、今後はさらに加速的増加していく。認知症は「アルツハイマー型認知症」、「血管性認知症」、「レビー小体型認知症」「前頭側頭型認知症」の4種類が代表的である。この中で多くの割合を占めるアルツハイマー型認知症は、脳にアミロイドβペプチドが異常蓄積（アミロイド線維形成）する、タンパク質異常凝集疾患の1つとしても知られている（Reiss *et al.* 2018）。このタンパク質のアミロイド線維形成は、神経変性疾患を含むさまざまな疾患に関与しており、その多くは加齢が伴う（Picken 2020）。アルツハイマー病においても、この蓄積したアミロイドβペプチドのアミロイド線維を除去する治療薬「レカネマブ」が2023年日本でも薬事承認された（van Dyck *et al.* 2023）。しかしながら、初期のアルツハイマー病患者が対象であること、進行を遅らせる効果が認められることから、完全な治療薬という要素は持たない。また、アミロイドβペプチドのアミロイド線維形成は若年期、中年期から生じているが細胞の品質管理システムによって守られている。つまり、高齢期以降のアミロイドβペプチド蓄積は細胞機能の低下の影響も大きいと考えられるため、早い段階からアミロイド線維形成を誘導させないということが発症予防につながると考えられる。

近年、脳腸相関が認知症等にも注目されている。以前までは脳で生じるタンパク質のアミロイド線維形成は、脳内で起こる現象だと考えられていたが、腸の迷走神経や血液にも原因タンパク質が存在することから、第一に腸で異常が生じ、それらが何らかの要因によって脳内に移行する仮説が提唱されている。そのため、腸を標的としたアプローチが注目されている（Tan *et al.* 2022）。

認知症の発症予防には広範囲の視点が必要である。肥満等から派生する生活習慣病等は認知症の発症リスクが高ま

るとされており、若年期の生活習慣を考慮することは、認知症の発症予防につながるとともに、総合的な視点での発症予防研究は重要である。しかし、投薬で発症予防することは現実的ではなく、「医食同源」の考え方が必要である。

海藻は、日本に豊富に存在し、馴染みのある食材である。緑藻、紅藻、褐藻に大きく分類され、一部は食用として流通しているが、多くは未利用・低利用海藻の雑海藻である。海藻は古くから健康に良い食材として知られている（Abdelhamid *et al.* 2018）。本研究は、海藻成分に再注目し、食料と競合しない未利用、低利用海藻成分に疾患発症予防に寄与する成分の探索・機能解析を目的としている。食品予防医学研究であるが、対象物は海藻であり、SDGsの14「海洋資源」にも該当する。

2. 研究材料

2-1. 海藻抽出物の調製

(1) 熱水抽出

凍結保存している海藻を緩やかに解凍させ、水で洗浄した後、海藻を約5g量り取り、フードプロセッサーもしくははさみで細かく破碎した。破碎した海藻約5gと蒸留水35mLをメディウム瓶に入れ、70-100°Cで3hr、乾燥機内に静置して抽出した。インキュベート後、ガラスフィルター（17G-1）で海藻残渣を除去し、3.0μmメンブレンフィルター（ADVANTEC）で粒子除去、0.45μmメンブレンフィルター（ADVANTEC）で微粒子除去と滅菌を行った。得られた熱水抽出液を凍結乾燥機（FD-1000 東京理科器械株式会社）によって粉末化した海藻抽出物はデシケータ保存した。

(2) 有機溶媒抽出

冷凍保存された各海藻を緩やかに解凍後、水でよく洗浄し粘性成分等を除去した。洗浄後の海藻を再冷凍し、凍結乾燥機で乾燥させて水分を除去した。海藻の乾燥重量を量り、フードプロセッサーで粉碎した。粉碎した海藻と抽出する有機溶媒（EtOH、ヘキサフロロイソプロパノール（HFIP））を別々のガラス容器に加え、乾燥器内で抽出温度（EtOH: 60°C、HFIP: 45°C）になるまで加温した。その後素早く海藻に混合し、ドラフトチャンバー内のオイルバスでそれぞれの温度で熱し、さらにジムロート冷却器で有機溶媒の蒸発をトラップさせて還流させながら抽出液を

調製した。ガラスフィルターによる海藻残渣の除去後、ロータリーエバポレーターによる有機溶媒除去を行い、除去後の溶液を凍結乾燥機で粉末化した。

2-2. アミロイド線維形成実験

アミロイド線維の形成有無はアミロイド線維に特異的に結合して蛍光を発する蛍光色素チオフラビン T (ThT) (励起波長 440 nm、蛍光波長 480 nm) を用いた蛍光経時変化測定で調べた。アミロイド線維形成の分子機構はタンパク質の種類に問わず同じであるために、本研究ではアミロイドーシスの 1 つでインスリンノーマ原因ペプチドであるインスリンを用いた。インスリンはペプチドホルモンの 1 つであり、また薬剤として利用されているが、疾患の原因ペプチドにもなり得る。

終濃度 0.5 mg/mL インスリン、20 mM リン酸ナトリウム緩衝液、2.0 M 塩酸グアニジン (線維形成促進効果) とし、その反応溶液に 0.01-0.5% で調製した海藻抽出物を添加し、アミロイド線維形成の変化について調べた。蛍光測定はマイクロウェルプレートリーダー (SH-9000、CORONA ELECTRIC) を用いた。

添加する海藻抽出物は、必要量に応じて熱水抽出物は蒸留水、有機溶媒抽出物は、100% ジメチルスルホキシド (DMSO) で溶解し、8% 海藻抽出液を調製して用いた。

2-3. 透過型電子顕微鏡観察 (TEM)

海藻抽出物添加によるインスリンのアミロイド線維形成反応後の生成物の形態を観察するために TEM を用いた。

反応後のインスリン溶液を軽くピペティングした後、コロジオン膜を貼付した銅製の 400 メッシュグリッド (日新 EM 株式会社) に反応液 5 μ L 添加、1 min 静置後ろ紙で余分な反応液を除去した。次に 2% (w/v) ウラニル酢酸溶液を 5 μ L 加えて、20 sec 静置後ろ紙で余分なウラニル酢酸溶液を除去して風乾させた。TEM 試料調製後 1 週間以内に TEM (JEM-1400 plus、JEOL) を用いて観察した。

2-4. 高速液体クロマトグラフィー分析 (HPLC)

各種海藻抽出物の成分パターン、成分のグルーピング、LC-MS に用いるための条件検討として、HPLC (SHIMADZU) での分析を行なった。カラムは主に逆相カラムである COSMOSIL Cholester (4.6 ID x 250 mm、NACALAI Tesque) を用いた。このカラムの特徴としては天然物、構造類似化合物、ポリフェノール・カテキン・脂溶性ビタミン・フラボンなどを解析するカラムである。分析条件は、流速 1 mL/min、カラム温度 40°C、溶離条件として、0.1% ギ酸-蒸留水と 0.1% ギ酸-アセトニトリルのグラジエントで行なった。詳細なグラジエント条件はサンプル毎に調整した。

2-5. 化合物の推定

HPLC にて分析条件等の最適化を行い、本学の共同利用機器として設置されてある電場型フーリエ変換質量分析計 (ESI/DART FTMS) と HPLC を組み合わせて LC-MS 分析を行った。分析条件は HPLC の時の溶離条件と同じであるが、カラムサイズに合わせて 2.0 ID x 150 mm カラムを使用時は 0.2 mL/min で行なった。また、4.6 ID x 250 mm を使用する場合は、ADJUST SPRIT を組み合わせて、質量分析器に流入する流速を調整した。

得られた質量値は、ノンターゲットメタボローム解析を行うために、国立遺伝学研究所 櫻井望准教授が開発された解析ソフトを用いて解析し、また既報の論文等と比較した (Sakurai *et al.* 2014; Akimoto *et al.* 2017)。

3. 研究結果

3-1. アミロイド線維形成実験

海藻は 2 種類 (A、B) を選択し、有機溶媒抽出と熱水抽出を行なった海藻抽出物そのものにアミロイド線維形成阻害活性を有するかを調べた。

Fig. 1 は海藻 A を EtOH および HFIP の有機溶媒を用いて得られた抽出物をインスリンのアミロイド線維形成反応溶液に 0.01-0.1% (w/v) になるように添加し、インスリンのアミロイド線維形成に及ぼす影響を調べた結果である。海藻抽出物未添加 (黒) は反応開始から 6 時間以内で ThT の蛍光強度の増加が見られアミロイド線維を形成した。それに対して、EtOH、HFIP 抽出物をそれぞれ添加すると、抽出物添加濃度に依存して ThT の蛍光強度の増加が抑えられ、線維形成時間が遅延した。特に EtOH、HFIP とともに 0.05% (w/v) 以上であれば蛍光強度の増加が全く測定時間内に認められなかったことから、海藻 A は強くアミロイド線維形成を阻害する成分を含んでいることがわかった。

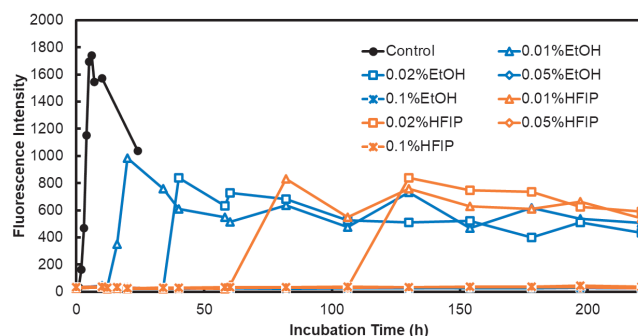


Fig. 1 海藻 A の有機溶媒抽出物によるインスリンのアミロイド線維形成阻害実験。黒色：海藻抽出物未添加、青色：EtOH 海藻抽出物、オレンジ色：HFIP 抽出物。

Fig. 2 は同じく海藻 A を 70、100℃の熱水抽出で得られた抽出物をインスリンのアミロイド線維形成反応溶液に 0.1-1.0% (w/v) になるように添加し、インスリンのアミロイド線維形成に及ぼす影響を調べた結果である。有機溶媒抽出物の結果と同様に熱水抽出物でも 0.5% (w/v) 以上であればアミロイド線維形成阻害効果が認められたが、抽出物添加濃度は有機溶媒抽出物の 10 倍からとなり、成分分析を進めるさいには有機溶媒抽出物から展開することが望ましいと考えた。

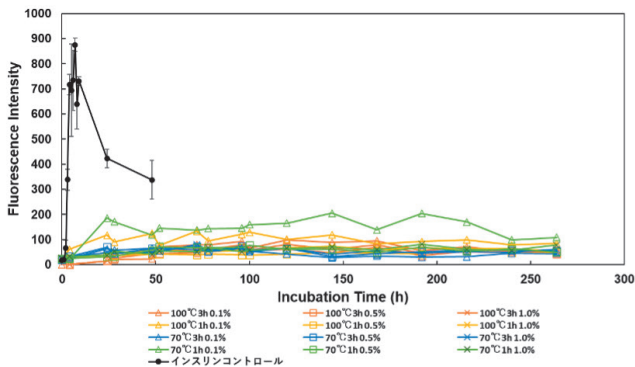


Fig. 2 海藻 A の水抽出物によるインスリンのアミロイド線維形成阻害実験。黒色：海藻抽出物未添加、緑色：70℃、1 h 抽出物、青色：70℃、3 h 抽出物、オレンジ色：100℃、1 h 抽出物、赤色：100℃、3 h 抽出物

3-2. TEM 観察

Fig. 3 は海藻 A の HFIP 抽出物を添加し、反応後の反応溶液を TEM 観察した結果を示した。黒枠の海藻未添加の反応溶液では、反応開始後 6 時間後には線維状の形態を示した典型的なアミロイド線維を形成したことがわかる。その反応溶液に 0.01% (w/v) の添加物を加えると、海藻未添加と同様のアミロイド線維を形成しており、Fig. 1 でも ThT 蛍光強度が増加していることから妥当な結果が得られた。他方、0.05% (w/v) のサンプルではアミロイド線維様の形態は観察されず、不定形な凝集体を形成した。この TEM 観察の結果からも海藻 A 抽出物はアミロイド線維形成阻害成分を含んでいることが示唆された。データに示していないが、Fig. 1, 2 で蛍光強度の増加が認められなかったサンプルにおいては Fig. 3 と同様にアミロイド線維は観察されなかった。

3-3. HPLC 分析

海藻 A 抽出物のアミロイド線維形成阻害効果が ThT 測定、TEM 観察から明らかになったので、HPLC を用いて有用成分の分析を試みた。Fig. 4 はさまざまな生理活性が報告されているフコキサンチンが存在するか確認した。

フコキサンチンは波長 450 nm の光を吸収するため検

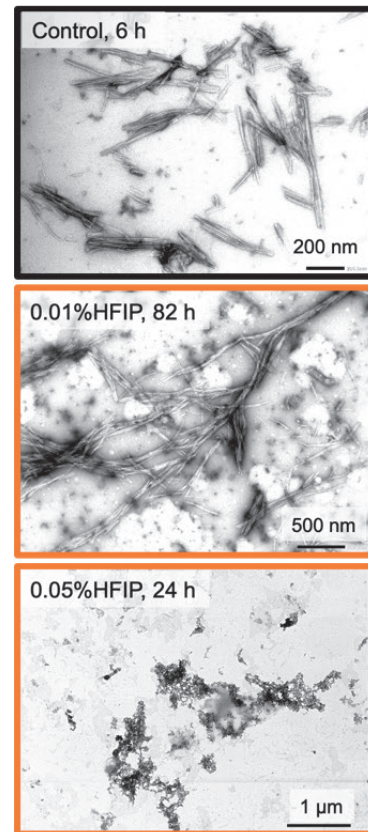


Fig. 3 TEM 観察による海藻 A の HFIP 抽出物添加によるインスリンのアミロイド線維形成阻害効果。

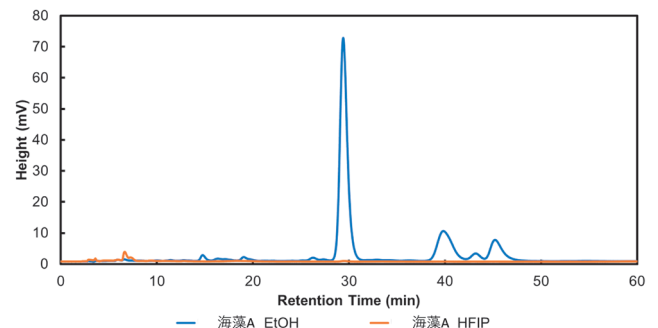


Fig. 4 HPLC 分析による各種有機溶媒で抽出した海藻 A 抽出物のフコキサンチンの検出。青色：EtOH 抽出物、オレンジ色：HFIP 抽出物。

出が可能である。EtOH 抽出物は約 30 min でピークが検出されたため、フコキサンチンの存在が示唆された。他方、HFIP 抽出物では、EtOH 抽出物のピークと比較すると大きなピークは検出されてないように見えるが、HFIP 抽出物単独で確認すると EtOH 抽出物と類似のピークは得られた。HFIP 抽出物にもフコキサンチンのピークは検出されていた。それぞれの有機溶媒抽出物はアミロイド線維形成阻害活性を有しているため、この結果から、フコキサンチンの量がアミロイド線維形成阻害に寄与していないことが考えられた。

Fig. 5 は、Fig. 4 の結果を踏まえてより広範囲の成分を分析するためにベンゼン環の吸収波長である 254 nm における EtOH、HFIP 抽出物の溶出パターンを調べた。フコキサンチンの結果と同様に、それぞれの有機溶媒の溶出パターンを比較すると 40 min までには比較的 HFIP 特有のピークが見られ、60 min 以降は EtOH 特有のピークが見られた。これらの結果を踏まえると、複数の成分が相乗的にアミロイド線維形成阻害活性を有するか、あるいはそれぞれの抽出物に特有の成分が影響を及ぼすかが示唆された。

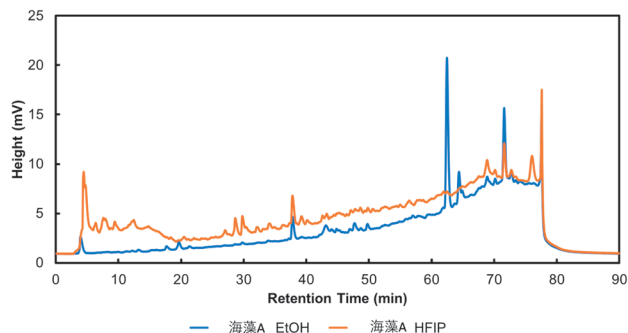


Fig. 5 HPLC 分析による各種有機溶媒で抽出した海藻 A 抽出物の波長 254 nm での検出。青色：EtOH 抽出物、オレンジ色：HFIP 抽出物。

3-4. 化合物の推定

HPLC の分析結果から、各有機溶媒抽出物において共通する、あるいは異なるピークが確認できたので、それぞれのサンプルについて、LC-MS 解析を行い、比較的ピーク強度が高く得られた質量値に関して化合物の推定を行った。EtOH、HFIP で得られた推定化合物に関して Table に示した。

Table LC-MS 解析等から推定された候補化合物

	質量値	化合物名	溶媒
1	164.0729	S-Methylmethionine	HFIP
2	338.3377	Iminoctadine	共通
3	538.3757	Cucurbitacin P	HFIP
4	560.3807	Vitamin D	HFIP
5	641.4130	Fucoxanthin	共通
6	672.4970	Pepstanone A	HFIP
7	736.6067	DGTS	共通
8	760.6080	Manzamine A	共通

この結果から、HFIP 抽出特有の化合物が推定化合物として得られたこと、比較的中小分子の化合物が推定された。この得られた化合物についてアミロイド線維形成阻害活性

として既に知られているものが存在するか、既報の論文を検索したところ、Vitamin D と Cucurbitacin P の類自体である Cucurbitacin B, E, I について報告例があった (Fig. 6) (Grimm *et al.* 2017; Park *et al.* 2015)。

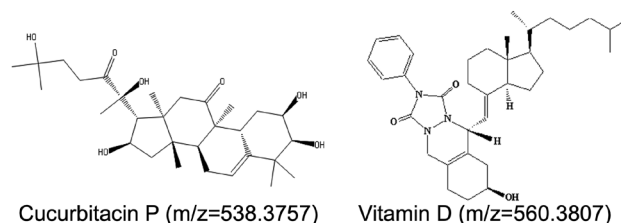


Fig. 6 Cucurbitacin P と Vitamin D の化学構造式

4. 結論・考察

今回、未利用海藻である海藻 A を選択し、抽出方法の違いによるアミロイド線維形成阻害効果、化合物の推定等を行なった。結果として、海藻 A の熱水抽出と EtOH、HFIP を用いた有機溶媒抽出の両方から得られた抽出物において認知症発症に強く関与するアミロイド線維形成阻害活性が認められ、その成分の推定を試みた。熱水抽出物と有機溶媒抽出物のアミロイド線維形成阻害効果を比較すると熱水抽出物の方が添加濃度を 10 倍要することから、可能性として主に有機溶媒で抽出される成分が熱水抽出でも得られたと考え、有機溶媒抽出物を中心に化合物の推定を行なった。結果として、LC-MS 解析から比較的強度が高かったピークを選択して化合物の推定を行ない、既報のアミロイド線維形成阻害化合物とヒットした。しかしながら、EtOH、HFIP それぞれにアミロイド線維形成阻害活性が認められているにもかかわらず、EtOH 特有の化合物の推定はできなかった。解析方法も含め、更なる解析を進める必要がある。また、今回推定された化合物においても新たなアミロイド線維形成阻害化合物の可能性があるため、これらの化合物単独での評価が必要であり、単一成分あるいは複数成分によって達成するのかを明らかにしなければならない。一方、HFIP 抽出物の場合、HFIP 特有の化合物が候補として挙げられた。また、Fig. 1 の結果からも 0.01% (w/v) で EtOH 抽出物と比較すると、最終的に両方ともアミロイド線維を形成しているが、ThT 蛍光強度が増加する時間は EtOH 抽出物よりも遅いことから、HFIP 抽出物に存在する特有の化合物でこのような違いが生じたと示唆された。HFIP は吸引麻酔薬「セボフルラン」の合成過程で生じる化合物であり、一般的な成分抽出溶媒としては知られていないが、成分分析でよく用いられているその他の有機溶媒に代わる新たな抽出溶媒として可能性を示した (Motiwala *et al.* 2022; Palanca *et al.* 2017)。

5. 今後の課題

本助成期間内では、海藻 A に関する成分分析を進めてきたが、「医食同源」の考えを進める上では、日々の日常に近い環境・条件の中で強くアミロイド線維形成阻害活性を有する成分の存在が望ましい。本助成期間内には間に合わなかったため、研究成果の項目に記載しなかったが、現況を示す。

本助成期間内に海藻 B についても検討を進めてきた。海藻 B においても初期段階として、熱水抽出物、有機溶媒抽出物の効果を比較し、両方の抽出物においてアミロイド線維形成阻害効果を有したため、海藻 B においては熱水抽出物に着目した。理由として、海藻 B は一部の地域では食されている低利用海藻であるため、安全性等の面はクリアできており、成果が得られれば、その後の応用展開へのステップが容易であるからである。

HPLC 分析の前に、成分数を減らす目的として熱水抽出物に MeOH を添加して、可溶性画分と不溶性画分に分離する前処理を行なった。

Fig. 7 は MeOH 前処理後の可溶性画分と不溶性画分のアミロイド線維形成阻害活性を調べた結果である。結果として MeOH 可溶性画分の方が 0.1% (w/v) で高い阻害活性を有したため、さらに MeOH 可溶性画分を HPLC にて分析した。

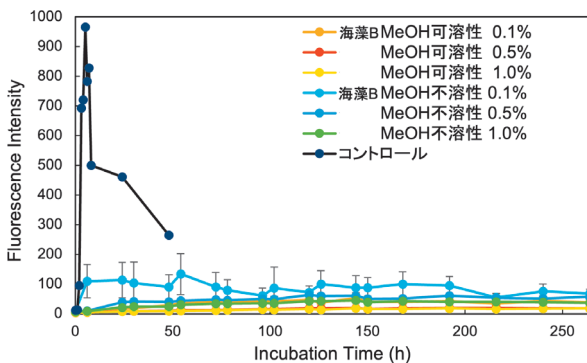


Fig. 7 海藻 B の熱水抽出物 (MeOH 前処理) によるインスリンのアミロイド線維形成阻害実験。黒色：海藻抽出物未添加、オレンジ色、赤色、黄色：MeOH 可溶性成分、水色、青色、緑色：HFIP 抽出物。

Fig. 8 は海藻 B MeOH 可溶性画分の HPLC 分析による成分の溶出パターンを示した。条件は海藻 A の時と同様で、アセトニトリルのグラジエントでさまざまなピークが検出された。この溶出パターンを I-IV の大まかな画分でグルーピングを行い、分取-凍結乾燥粉末を作製し、それぞれの画分に対するアミロイド線維形成阻害活性を調べた。

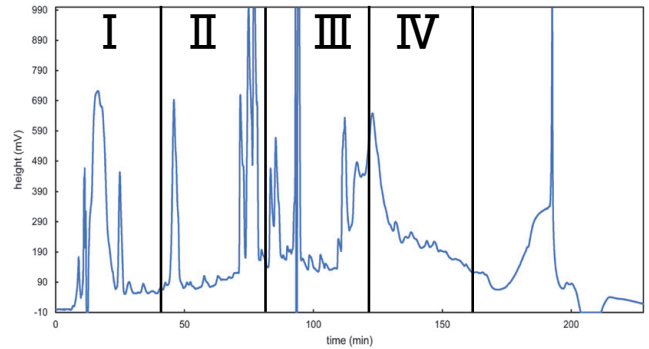


Fig. 8 HPLC 分析による海藻 B MeOH 可溶性画分

Fig. 9 は HPLC で I-IV にグルーピング後の各粉末のアミロイド線維形成に及ぼす効果を示したものである。この結果から分画 I と IV には阻害活性が弱いこと、分画 II と III は ThT の蛍光強度の増加が認められなかったが、分画 II は反応溶液に添加するとインスリンが凝集したので別の効果を示したと考えられた。これらから分画 III に含まれる成分には強いアミロイド線維形成阻害活性を含んでいることが示唆されたため、今後の課題としてこの助成期間で試行錯誤した経験を活かしてこの成分の分析を進める。また、本研究はアルツハイマー病原因ペプチドであるアミロイド β ペプチドのアミロイド線維形成反応にも同様の結果が得られており、本研究のさらなる発展が発症予防に貢献できると期待される。

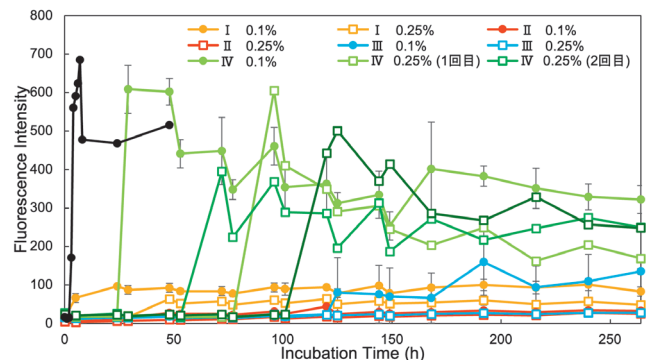


Fig. 9 海藻 B の I-IV 画分成分によるインスリンのアミロイド線維形成阻害実験。黒色：海藻抽出物未添加、オレンジ色：I 画分、赤色：II 画分、水色：III 画分、緑色：IV 画分。

6. Acknowledgments

本研究は、(公財) 東洋食品研究所の 2021 年度研究助成を受けて実施しました。本研究を遂行するにあたり、定期的な面談も含め、多くのご助言・ご支援を賜りました(公財) 東洋食品研究所ならびに関係の皆様には厚く御礼申し上げます。

7. 参考文献

- Abdelhamid, Amal; Jouini, Meriem; Amor, Haifa Bel Haj; Mzoughi, Zeineb; Dridi, Mehdi; Said, Rafik Ben; Bouraoui, Abderrahman, 2018, Phytochemical Analysis and Evaluation of the Antioxidant, Anti-Inflammatory, and Antinociceptive Potential of Phlorotannin-Rich Fractions from Three Mediterranean Brown Seaweeds. *Mar. Biotechnol.*, **20**(1), p. 60-74. DOI: 10.1007/s10126-017-9787-z.
- Akimoto, Nayumi; Ara, Takeshi; Nakajima, Daisuke; Suda, Kunihiro; Ikeda, Chiaki; Takahashi, Shingo; Muneto, Reiko; Yamada, Manabu; Suzuki, Hideyuki; Shibata, Daisuke; Sakurai, Nozomu, 2017, FlavonoidSearch: A system for comprehensive flavonoid annotation by mass spectrometry. *Sci. Rep.*, **7**(1), 1243. DOI: 10.1038/s41598-017-01390-3.
- van Dyck, Christopher H.; Swanson, Chad J.; Aisen, Paul.; Bateman, Randall J.; Chen, Christopher.; Gee, Michelle.; Kanekiyo, Michio.; Li, David.; Reyderman, Larisa.; Cohen, Sharon.; Froelich, Lutz.; Katayama, Sadao.; Sabbagh, Marwan.; Vellas, Bruno.; Watson, David.; Dhadda, Shobha.; Irizarry, Michael.; Kramer, Lynn D.; Iwatsubo, Takeshi, 2023, Lecanemab in Early Alzheimer's Disease. *N. Engl. J. Med.*, **388**(1), p. 9-21. DOI: 10.1056/NEJMoa2212948.
- Grimm, Marcus O. W.; Thiel, Andrea; Lauer, Anna A.; Winkler, Jakob; Lehmann, Johannes; Regner, Liesa; Nelke, Christopher; Janitschke, Daniel; Benoist, Céline; Streidenberger, Olga; Stötzel, Hannah; Endres, Kristina; Herr, Christian; Beisswenger, Christoph; Grimm, Heike S.; Bals, Robert; Lammert, Frank; Hartmann, Tobias, 2017, Vitamin D and Its Analogues Decrease Amyloid- β ($A\beta$) Formation and Increase $A\beta$ -Degradation. *Int. J. Mol. Sci.*, **18**(12), p. 2764, DOI: 10.3390/ijms18122764.
- Motiwala, Hashim F.; Armaly, Ahlam M.; Cacioppo, Jackson G.; Coombs, Thomas C.; Koehn, Kimberly R. K.; Norwood, Verrill M. IV; Aubé, Jeffrey, 2022, HFIP in Organic Synthesis. *Chem. Rev.*, **122**(15), p. 12544-12747. DOI: 10.1021/acs.chemrev.1c00749.
- Palanca, B. J. A.; Avidan, M. S.; Mashour, G. A., 2017, Human neural correlates of sevoflurane-induced unconsciousness. *Br. J. Anaesth.*, **119**(4), p. 573-582. DOI: 10.1093/bja/aex244.
- Park, Sun Young; Kim, Young Hun; Park, Geuntae, 2015, Cucurbitacins attenuate microglial activation and protect from neuroinflammatory injury through Nrf2/ARE activation and STAT/NF- κ B inhibition. *Neurosci. Lett.*, **609**, p. 129-36. DOI: 10.1016/j.neulet.2015.10.022.
- Picken, Maria M., 2020, The Pathology of Amyloidosis in Classification: A Review. *Acta Haematol.*, **143**(4), p. 322-334. DOI: 10.1159/000506696.
- Reiss, Allison B.; Arain, Hirra A.; Stecker, Mark M.; Siegart, Nicole M.; Kasselmann, Lora J., 2018, Amyloid toxicity in Alzheimer's disease. *Rev. Neurosci.*, **29**(6), p. 613-627. DOI: 10.1515/revneuro-2017-0063.
- Sakurai, Nozomu; Ara, Takeshi; Enomoto, Mitsuo; Motegi, Takeshi; Morishita, Yoshihiko; Kurabayashi, Atsushi; Iijima, Yoko; Ogata, Yoshiyuki; Nakajima, Daisuke; Suzuki, Hideyuki; Shibata, Daisuke, 2014, Tools and databases of the KOMICS web portal for preprocessing, mining, and dissemination of metabolomics data. *Biomed. Res. Int.*, 2014: 194812, DOI: 10.1155/2014/194812.
- Tan, Ai Huey.; Lim, Shen Yang.; Lang, Anthony E., 2022, The microbiome-gut-brain axis in Parkinson disease - from basic research to the clinic. *Nat. Rev. Neurol.*, **18**(8), p. 476-495. DOI: 10.1038/s41582-022-00681-2.