

1. 最後は、なぜ線虫でやっているのか？細胞での研究と線虫での研究と、どこまで質が変わるのか？線虫の応答まではやっていないのか？

論文中の記述に “We have shown that α -synuclein forms liquid-like condensates *in vivo* in a *C. elegans* model of PD” とあることから線虫は *in vivo* モデルとみなしてここでの実験で使われています。

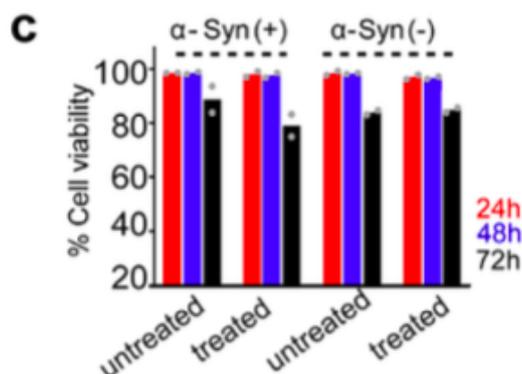
パーキンソン病モデル生物として線虫が選ばれたのは、老化の特性が十分に明らかにされていること、ゲノムワイドな RNAi スクリーニングが可能であること、生涯を通じて透明であることから、老化の過程で生きている動物の内包物を可視化することができるからだそうです。(パーキンソン病線虫モデル開発: E. A. A. Nollen et al. *PLoS Genet.*, 4, e1000027.)

細胞と線虫での研究の差としては、生体内での液滴形成、凝集の様子が見えることと、線虫では添加剤なしに液滴形成、凝集が起きることがあげられます。

線虫の系では神経細胞ではなく表面の筋細胞内にシヌクレインを発現させていることもあり、応答までは調べられていません。

2. 上村さんがやっているクロマチンの LLPS に比較してシヌクレイン LLPS は、いまだ観測研究にとどまっていて、操作や生物機能（毒性）までに至っていない印象だが、正しいか？

その通りです。今回セミナーで紹介した細胞でやっているもの (S. K. Maji et al. *Nat. Chem.* 2020, 12, 705.) と線虫でやっているもの (M. Vendruscolo et al. *J. Mol. Cell. Biol.* 2021, mjaa075) の 2 つしかシヌクレイン LLPS の報告がないです。ちなみに細胞内 LLPS の実験で 72 時間後までの毒性は調べられていますが、シヌクレインの液滴形成及び凝集に由来する細胞死 (syn+/treated 左から 2 番目) はほぼ起きていません。



* α -Synuclein はどのような様式の相互作用で LLPS を引き起こしていると考えられるか？

N 末端では静電的な相互作用、NAC 領域では疎水的な相互作用が働いていると考えられます。

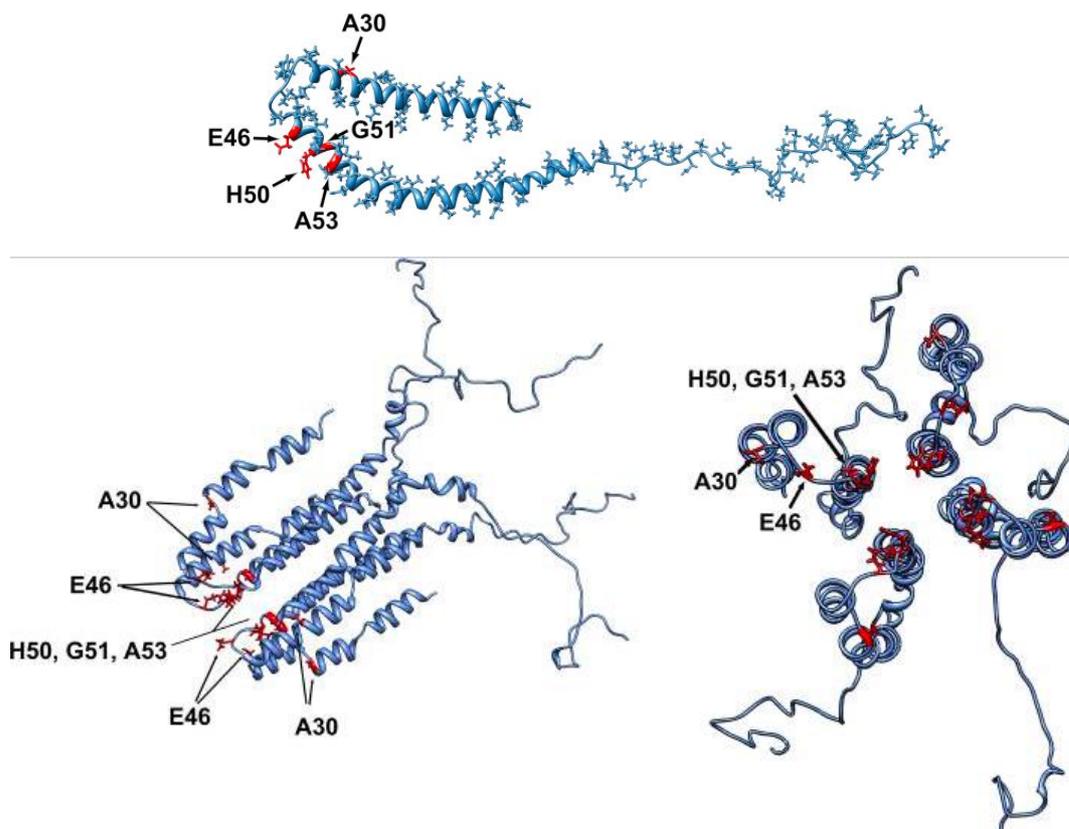
* 関連するが、pH はどのようなメカニズムで LLPS に影響を及ぼすか？

特に述べられていませんが、おそらく単量体のコンフォメーション変化により、ヘリックス等の二次構造が崩れることと、C 末端の酸性側鎖が電氣的に中性になり C 末端における分子間の陰イオン同士の反発がなくなることが液滴形成を加速させると考えられます。

* NMR の研究で E46K では著しく相互作用の様式が変わることがわかる。A53T の液滴形成速度に対しての影響もそうだが、なぜ単一の変異がどうしてここまで影響を及ぼせるのか？

変異の凝集への影響は明らかにされていません。

シヌクレインの変異場所は図のようにターン構造付近に集中しています。そのため、monomer のヘリックス構造の不安定化を起こすと考えられています。またこの部分は生体内でのシヌクレインの四量体化に関与していると言われており、この安定な四量体の安定性を下げることが凝集促進に関わっていると考えられます。(J. Hardy et al. *Neurosci Lett.* 2013, 546, 67.)



E46K 変異体は WT と異なる形のフィブリルを形成し(WT のフィブリルで見られる E46-K80 のシヌクレイン分子間塩橋が組めないため)、このフィブリルは WT に比べて脆くて断片化しやすくなっています。シヌクレインフィブリル断片はシードとしてシヌクレイン凝集を促進するため、E46K 変異体は WT に比べて細胞間の凝集伝播が起きやすくなっています。(C. Liu et al. *Nat Commun* 2020, 11, 2643.)

A53T 変異体の凝集体は WT に比べて毒性が強い構造のオリゴマーを形成しやすい (=毒性が高い) そうです。

* p12. 200,500uM という単一のタンパク質の溶液としては極めて濃度が高い。生細胞内においても液性の変化が LLPS の誘導を引き起こすということか?

今回の細胞については鉄イオンを添加しないと液滴形成が起きないので、細胞系では添加剤が必要です (シヌクレイン発現細胞ではシードなどを添加しないと凝集が起きません)。一方、今回の線虫系ではシヌクレインが 200-300 $\mu\text{M}/\text{cell}$ と高濃度であるため、添加剤なしでも液滴形成や凝集が起きていると考えられます。

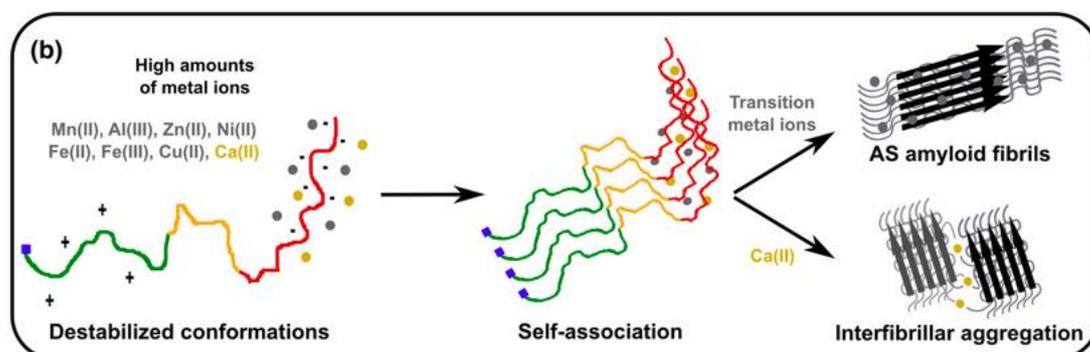
* 鉄や銅のイオンはパーキンソン病の病理にどうかかわっているのか? そのようなイオンの濃度異常が原因であると知られているのか? また、どのようなメカニズムで LLPS を促進すると考えられるか?

→ 金属イオン濃度の変化が起こるといことは他の神経変性疾患でも言われている

→ これは、副次的なものではないのか? 発病の中心的なメカニズムなのか?

レビー小体内の Fe(III) 沈着 (Smith, M. A. *Acta Neuropathol.* 2000, 100, 111.) やパーキンソン病患者の脳脊髄液内で Cu(II) 濃度上昇 (Taylor, A. *Lancet* 1987, 330, 238.) が観測されています。そこから、「これらの金属イオンがシヌクレイン凝集に関与しているのではないか?」ということで研究が行

われ、その結果として金属イオンの凝集促進効果が発見されました。金属イオン濃度異常がパーキンソン病の原因なのか結果なのかは定かではありません。シヌクレインはこれらの金属イオンに配位することが知られており、図のように大量の金属イオンが凝集を促進するようです。(C. O. Fernandez et al. *J. Neurochem.* 2019, 150, 507.)



* p22 だんだん上がっていくのはどうなっているのか?スケールが d だが、液滴形成に参与しているのか?hardening に参与しているのか?

N 末端と NAC 領域では、凝集体が観測されない 2 日目の時点で上昇が起きていることから液滴形成に参与していると言われています。さらにこれらの部分は凝集開始後にも上昇しているので凝集にも関与します。C 末端の上昇開始が遅いのは、相互作用をほとんどしないためであり、最終的に全体が同程度の FRET efficiency となっているのはシヌクレインの凝集によるものであると考えられます。(セミナー中で 15 日の時点でノーマライズされているかもしれないと言いましたが、実際には FRET efficiency が全ての場所の Trp-Cys について同程度になるようです。これは繊維状の凝集体になるとシヌクレインが平行に並び各 Trp-Cys 間の距離が同程度になるためだと考えられます。)

* p23 の C4 が影響を及ぼさないことは確認しているか?

確認されています。他にも p22 の W 変異体などについても既に凝集に対する影響がないことが知られています。

* ThioflavinS は液滴の物性や凝集の進行に影響を及ぼさないのか?

蛍光プローブ自体には凝集阻害効果はありません。液滴への物性への影響については不明ですが、p19 の fibril, oligomer, monomer の比率をみる実験など他の実験でも 5 日目で凝集が見られているので、大きな影響はないと考えられます。

* Levy 小体が複雑な構造だというのが、どのような構造をとっているのか？

図(Spring-8 ホームページ :

http://www.spring8.or.jp/ja/news_publications/research_highlights/no_87/ ,
H. Mochizuki et al. *Sci. Rep.* 2015, 5, 17625.) のようになっています。

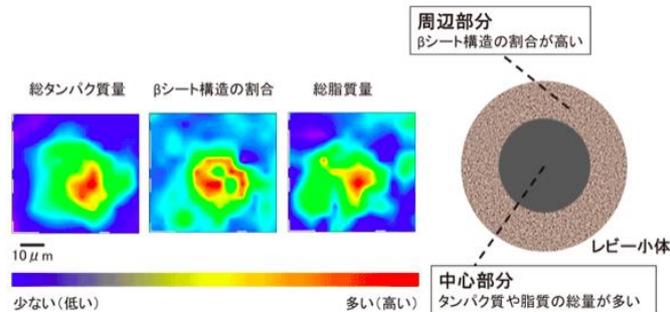


図3 赤外分光による典型的なレビー小体の解析結果

* p18. liposome と液滴が融合するというのはどういう現象か?特に、liposome はどのような状況になるのか?

液滴の内部に liposome が取り込まれていることを示しています。このまま液滴が成熟していくと、シヌクレイン繊維に脂質膜が絡まった状態 (レビー小体のような状態) になるので、液滴からレビー小体ができるという主張をしています。

* p25. 微小管で能動輸送されている?

液滴の移動に微小管が関与していることは述べられていましたが、農道種そうについては触れられていませんでした。

P10 について、IDR や LCD が多くのタンパクにおいて液滴形成に関与しているという話があったと思うのですが、それは単に経験則的な事実として知られているのでしょうか?もしくは、そのようなドメイン同士の相互作用か何かで説明が可能なのでしょうか?特に IDR の方は、決まった2次構造を持っていないのにも関わらずそれが液滴の形成に関わるというのが不思議に感じました。

色々調べていると、経験則なのかなという感じがします。決まった二次構造を持つ部分は分子内で相互作用をしているため分子間相互作用への関与は薄いですが、IDR など決まった構造を取らないところは、逆に分子内で相互作用をしていない部分なので、LLPS に関わる分子間相互作用を引き起こすのだと思います。