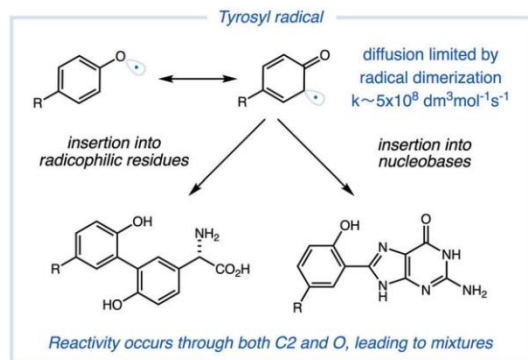


10/7 literature seminar 質問シート回答

○フェノキシラジカルが核酸と反応した生成物は？

フェノール 2 位の部分に立ったラジカルが核酸やアミノ酸と結合する形になります。



○TurboID が BioID より早い理由

今までの BioID と変えた点は、活性中心の R118 をセリンに変異させた R118S 型にし、さらにランダム変異を導入した。

もともと BirA がダイマー化してしまい BioAMP の形成が遅い問題があったが、TurboID に変えたところ、結果的に BioAMP の形成が速くなり、TurboID で 10min でラベリングを行えることが分かった。

○P17 の Westernblotting にて色々ラベル化されたものだが、何か言及されていたか？

この Western 解析に関しては詳しい言及はされていませんでした。ここでは時間依存でラベリングが上昇していることを述べていたので、近傍のタンパクをラベリングしているか否かは TMT による解析でしか分からないのだと思われます。

○抗体のサイズが 10~15nm だが、どうして < 4nm の方法でラベル化できているの？

質問の意図があまりくみ取れなかったのですが、抗体のサイズによらず、光触媒から 0.1nm でラベリングを行うことができるラベリング法です。

○P20,P21 の cis trans の話が分からなかった。

まず 2 つの細胞を接着させることが重要で細胞がくっついている部分に存在するタンパク

質(PD-L1)を狙った場合、細胞接着部位で両方の細胞のタンパク質をラベリングすることを **trans labelling** といいます。

細胞接着部位から離れたタンパク質(CD-45)をターゲットとした場合、1つの細胞上だけでしかラベリングが起きずにもう片方の細胞上ではラベリングされないことを **cis labelling** といいます。

そして P21 で結果を見てみると、**trans labeling** を狙った場合では T 細胞、B 細胞上のタンパク両方でラベリングが観測された。Cis labelling を狙った場合では、T 細胞上でのみラベリングが確認できました。ペルオキシターゼを用いた最新のラベリング法を行うと、このような選択性は全く確認できませんでした。

○光触媒の細胞内での安定性

PDT では Ru 光触媒など遷移金属を用いている例はかなり多く存在するように見受けられました。(Acc. Chem. Res. 2017, 50, 2727.)。Ir 光触媒でもいくつかあったはずなので、光触媒を細胞内に入れること自体での毒性はそこまで懸念する必要がないと思います。勇逸の懸念点は、光増感剤として働き、1重項酸素を生成しそれが毒性を持つことが問題として挙げられます。

○ジアジリジンそのままつけて 365 nm の UV でクロスリンクさせる従来法と比べて良いのはなぜか？(本質的な部分)

幅崎さんの指摘でもあったように、従来法ではジアジリンアルキンを $5\mu\text{M}$ 加えているのに対して、この新規法では光触媒を $5\mu\text{M}$ 、ビオチンジアジリンを $250\mu\text{M}$ 加えています。つまり、従来法では、そもそも低い濃度で行っているためラベリングできる量が少なく、高い濃度で行うと、近傍のラベリングが不可能となってしまいます。それに対して、新規法では、ジアジリンを高い濃度で加えても、光触媒に近づいた時のみカルベン種が発生するため、近傍ラベリングが高い感度で行うことが可能になります。

○P26 でなぜラベリングされてない？恣意的にリンカーの長さを制御していないか？

説明不足でしたが、ラベリングされてないのではなくて、あくまで濃縮されていないというデータです。(+)JQ1-Dz を用いて、コントロールとしてそのエナンチオマーを用いており、そこで **fold change** が 0 に近いことが分かっているので、単純にどちらの立体でもラベリングが行われています。

○Op25 の JQ1 の話で、真ん中の図ではなんで **enrich** される BRD isomer に差がある？

ここの BRD2/3/4 の差の説明は全くなされていませんでした。このデータから推測すると、JQ1 と BRD タンパク質それぞれの affinity が異なり、それが影響しているのかと考えました。