

質問回答

23/10/18 梅田大輝

【前半の内容】

- **p.11 : cytoplasm? 毒性?**
TurboID-NES を細胞質に導入することによる毒性については本文内で言及は見当たりませんでした。なお、transfection で一過性に入れているのは、内在性ビオチンによるバックグラウンド標識を減らすためと思われます。
- **p.13 : LOV は光を当てるまでは不活性化**
そうです。LOV は light-oxygen-voltage の略で、これらの感知に働くタンパク質によく保存されたアミノ酸配列に名付けられたタンパク質ドメインです。LOV-turbo では、燕麥由来の LOV ドメインを、turboID の活性部位にアロステリックに作用するループ構造に挿入することで、470nm の青色光での可逆的な活性化に成功しています。
詳細 : Ting, A. Y. *et al. Nature Method* **2023**, *20*, 908
<https://www.nature.com/articles/s41592-023-01880-5#MOESM1>.
- **p.14 b の図 : 説明? PABP がストレス顆粒にある(?)**
説明が不十分ですみません。PABP(ポリ(A)結合タンパク質)は、ストレス顆粒(SG)のマーカーとして知られている分子です。ここでは、細胞をストレス環境下において形成される SG を mCherry-PABP で可視化し、SG 中の paGFP-JUN だけを光活性化するための目印として利用しています。図は、SG 中の光活性化された paGFP-JUN が、その後、次第に核内に移行することを示しています。
- **p.14 c の図 : 不活性化? 核から移動。凝集しないとどういうことか?**
図 c が示しているのは、ストレス顆粒(SG)の集合に働く G3BP1/G3BP2 のダブルノックアウト(DKO)によって、ストレス環境下での JUN の SG への移行を阻害すると、SDS 不溶性の凝集体が増加したというものです。JUN の凝集に関わるメカニズムは不明ですが、筆者らが相同性を指摘した TDP-43 では、SG で RNA と結合したコンフォメーションをとれることが凝集抑制に効いているとされているようです。
詳細 : Donnelly, C. J. *et al. Neuron* **2019**, *102*, 321.
<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0896627319300753?via%3Dihub#sec3>
- **from と to の場所を指定してあげる必要はある気がするが。網羅性?**
→偽陽性は少ない。偽陰性はほどほど
TransitID に利用される各酵素のカバー率は、膜のある区画で約 85-90%、膜のない区画で約 60-70%ということであり、TransitID 全体では、その積算として 35-80%ほどになるようです(中程度の感度)。従って、全ての移行タンパク質を完全に検出することはできず、移行の程度がわずかなものは、現状検出できないことが予想されます。なお、特異度については高いという主張がなされており、偽陽性は少ないらしいです。

- **ばーっと元の場所にいるタンパク質を全部 biotin 化する→影響大きそうだが？**

本文中には言及が見当たりませんでした。たしかに、ビオチン化によるタンパク機能への影響はあり得ることで、実際には局在移行するタンパク質が検出されない場合もあるとは思いますが。また、タンパク機能への影響の結果、細胞機能に影響を及ぼす可能性も否定できないと思います。

- **今回の系だと、過程は見れない**

1回目と2回目の標識時間を振ることで、タイムコースをとることは可能です。一方で、A→B→Cのように移動するタンパク質については、確かにA→CのTransitIDではBを経由することを直接知ることは困難だと思います。ただし、そのようなタンパク質は、A→Bのタイムコースをとった時に、検出が一過性になると考えられることから、その後さらに移動するかどうかはわかる可能性があります。また、もしA→B→Cの移動をするタンパク質の網羅的解析を行いたいのであれば、A→BとB→CのTransitIDを組み合わせれば検出可能かもしれません。

- **細胞間と細胞内のシグナルを区別できるのか？**

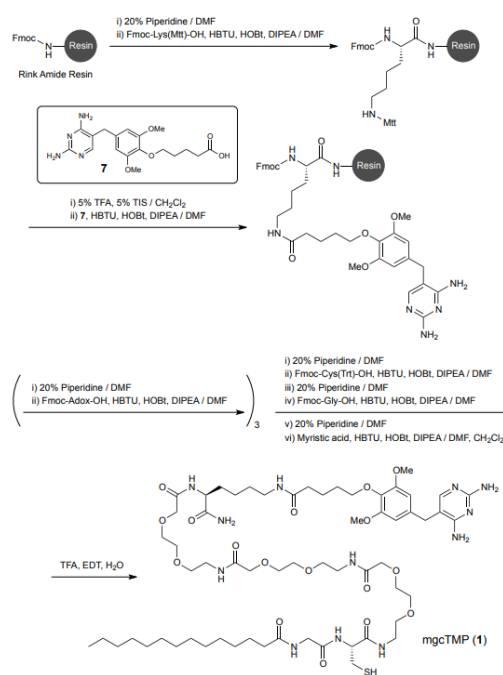
本文中での言及は見当たりませんでした。細胞内に二種の酵素を導入した場合と、それぞれの酵素を1つだけ導入した場合を比較することで区別できる可能性があります(後者でも二重標識が検出されるならば、細胞間と判断できる)。

- **APEXとTurboIDのラベル化の届く範囲？/核と核小体を区別できているのか？**

APEX2では半径20nm, TurboIDでは半径10nmを標識するようです。核小体のサイズは1-3um, ストレス顆粒のサイズは1-2umとこれよりも大きいため、ある程度、その外部との識別はできるものと思われます。

- **亜ヒ素がストレスを与える原理？**

ヒ素はNADPHオキシダーゼのp22phoxサブユニットの発現を促進し、ROSの産生量を増加させることで、酸化ストレスを与えるようです。



Scheme S1. Synthetic route of mgcTMP (1).

【後半の内容】

- **p.19 SLIPT system とは、localize する motif (taxol, mDc)に、ligand をくっつけたもの？**

その通りです。

- **p.20 ジスルフィドになることはあるか？**

本リガンドの合成スキームは右図の通りになっています。最終段階までシステインはトリチル保護されており、最終段階の脱保護で

もエタンジチオールが添加されていることから、ジスルフィド形成はあり得ても、それは最小限に抑えられていると考えられます。

詳細：Tsukiji, S. *et al. J. Am. Chem. Soc.* **2013**, *135*, 12684.

https://pubs.acs.org/doi/suppl/10.1021/ja4046907/suppl_file/ja4046907_si_001.pdf (SI)

- **mDcは何に認識される？ゴルジ膜上のパルミトイル化酵素で認識される**

mDcはパルミトイルアシルトランスフェラーゼ(PAT)によってパルミトイル化されます。PATの1種である、DHHCをGFPに融合させて過剰発現させた系では、ほとんどが小胞体またはゴルジ体に局在することが知られています。

- **p.24 K6 DNA っていない？/核への局在も起きている？**

K6 タグの挿入によって DNA に結合しうるかどうかについての言及は見当たりませんが、確かに、p.24の図を見ると、K6-DP-iSH2は核に局在してしまっているように見えます。なお、Akt-KTR-Turqの核局在についてはKTRの効果と思われます。

- **目的としては、あるタンパク質を局在化した時の応答とかを知りたい？**

今回紹介した話の目的はそれに近いと思います。例えば、特定のタンパク質を局在化によって活性化することで、その機能を明らかにすることなどが目的に含まれます。より一般的には、「従来の酵素活性や相互作用の制御化合物とは全く異なる原理に基づいた新しい細胞制御方法の創出」、延いては「生細胞内の情報伝達シグナルを細胞内の部位特異的に誘導・活性化する強力なケミカルバイオロジーツールや薬剤」の開発が目的とされています。

- **p.25 どう振動する？実際の振動について /wash できる？細胞内だが。wash すると TMP が薄まって外れるらしい**

自己局在化リガンドの添加による活性化ののち、これと競合する free TMP の添加による不活性化と、free TMP の除去(=wash)による活性化を繰り返すことで振動させています。TMPは細胞内外を透過できるように、flow系によって培地をかけ流すことで細胞内のTMPは少しずつ抜けていきます。また、実際の振動の例としては、DNA損傷後のp53の振動などが知られているようです。

- **つきじ先生の系で解明できたことはあるか？転写レベルまで変えているのか？機能の変化までみれている？**

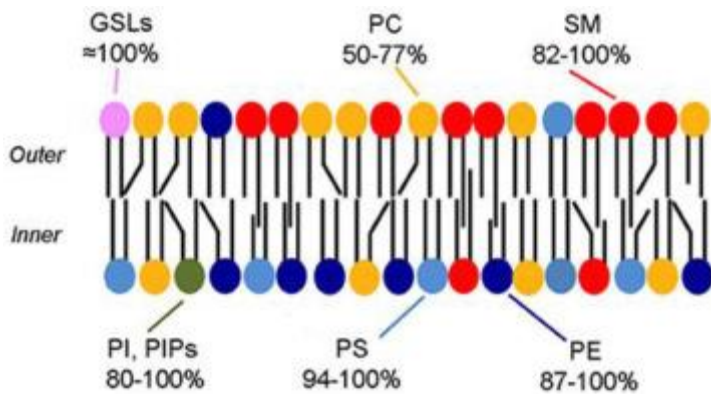
細胞の機能まで、という点では、細胞の形態変化(ラメリポディアの突出)を実際にもたらしことを確認した例があります。また、この系は、細胞の形態変化がHGFへの感受性を高めるかどうかを調べることにも利用されており、新しい知見にもつながっていると考えられます。

詳細：Matsuda, M. *et al. Dev. Cell* **2022**, *57*, 2290.

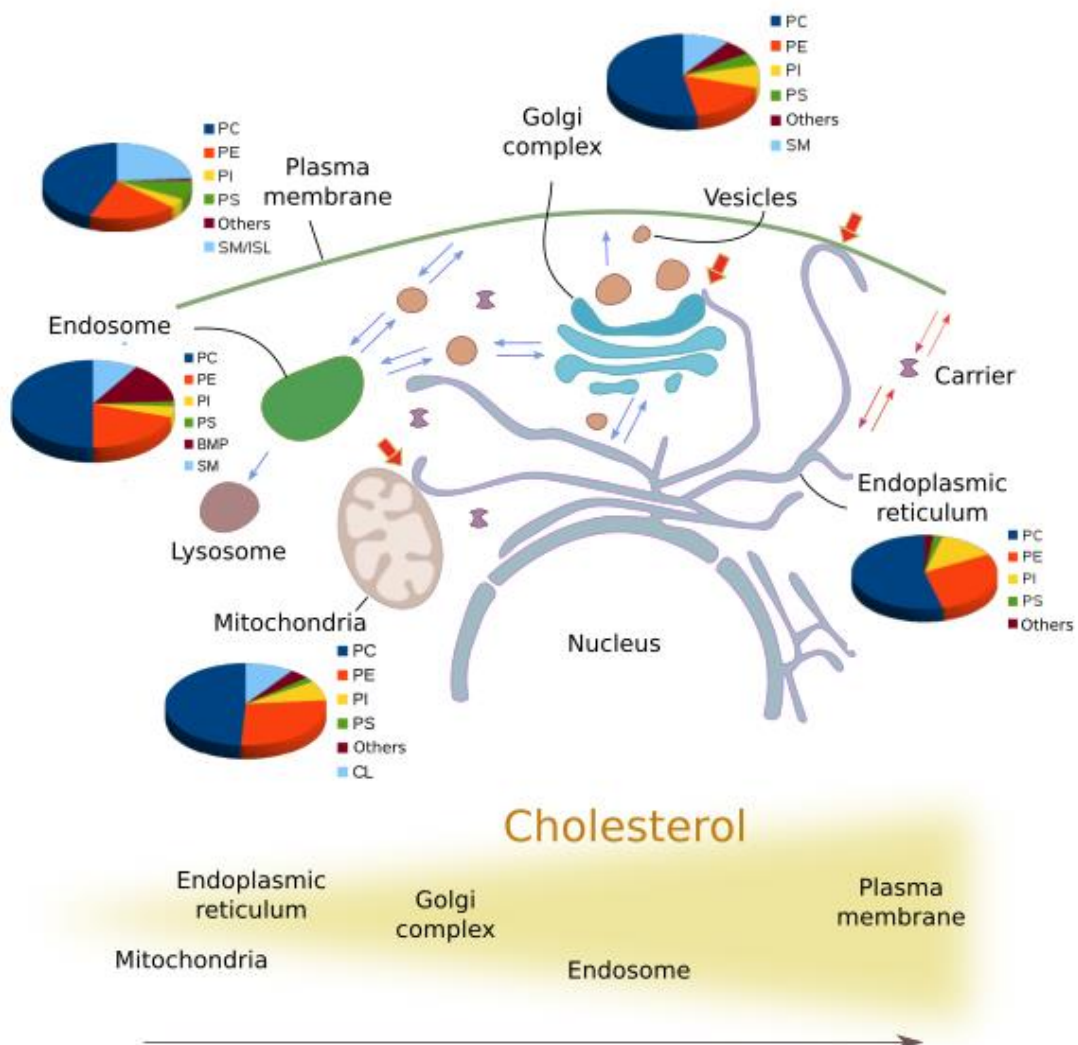
[https://www.cell.com/developmental-cell/fulltext/S1534-5807\(22\)00633-5#gr5](https://www.cell.com/developmental-cell/fulltext/S1534-5807(22)00633-5#gr5)

- **細胞膜やゴルジ膜の組成について知りたい**

良い図があったので、次頁にはっておきます。なお、今回紹介したK6付加体は、アニオン性のリン脂質の中でもPSとの相互作用が大きく効いているらしいです。



<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005273619302937?via%3Dihub> より引用



<https://mmegias.webs.uvigo.es/02-english/5-celulas/3-lipidos-a.php> より引用

* PS は内膜系の細胞質側層には存在しないとの主張もある

<https://www.igm.hokudai.ac.jp/molint/research.html>