

文献質問回答 M1 黄

Q1. p11 の結果をみると、bivalent でない場合 (3,5 を投与) でも、ある程度差が出ていそうにも見える。相加的な結果とみなせるのか、それとも P 值的に bivalent だから意味があると言えるのか？

3,5 を投与した場合でも SR が減少している理由についての言及は論文には書いてありませんでした。シャトルタンパクとターゲットが繋がられているわけではないので、局在制御に関係なく、リガンドが標的に結合することが何らかの原因となって SR が形成されにくくなっているのだと思います。10 のみ加えた場合、3 のみ加えた場合のデータがあれば標的に対するリガンドの結合が SR 形成抑制に作用しているかがより分かりそうではある。

Q2. p15 の e の図について、化合物 1 を加えた群で 72 時間後から急に値が上昇している。これは何が起きているのか？

e の結果について論文の日本語訳をそのまま載せると、「1 を投与したニューロンでは、軸索切断後少なくとも 72 時間は軸索の健全性と軸索末端の健全性の両方が維持され、軸索死の減弱は 96 時間後にのみ観察された」とあります。推察ですが、軸索切断後 NMNAT1 の保護作用でしばらく生き残るものの、切断されてしまっているので 72 時間以降は結局死んでしまうでしょう。

Q3. p23 の c-e の図について、control と比較して cRTC の発現量が全体的に多い (蛍光強度が高い) のは、解釈結果に影響を与えないか？

d,e を比べたときに e(cRTC)の縦軸の目盛りが非常に大きいので、トランスフェクションによるタンパクの発現量をそろえるのが難しいと解釈しています。しかし control,cRTC それぞれの EGFP-CAAX と mSca-hTPX2 の発現量自体に大差はなさそうなので、cRTC による局在制御の評価に関してはあまり影響はないと思います。

Q4. p.6 hoechst との共局在は見えない？局在制御を定量的に評価した結果はあるか？

Supplemental Figure 含めて hoechst との共局在は見えてませんでした。Hoechst との PCC を測ってもよさそうな気もしますが。

定量については、核内の蛍光強度/細胞質内の蛍光強度の比によって核内移行の度合いを評価した結果があります。(Figure1g, シャトルタンパクをトランスフェクションによって発現させた場合とさせなかった場合を比較している)

Q5. p.10 の incubation time は？

画像は TRAM5 を添加してから 3 時間後の結果になります。

Q6. p.11 G3BP1 が少ないところを見ているだけとも見れる？

Figure3i の画像に関して言えばそうとも見れるかもしれません。一応 j で SG の数を定量してる（少なくとも 40 細胞の平均を Triplicate で取ってる模様）ので、SG の減少を恣意的に見てるのではなさそうです。

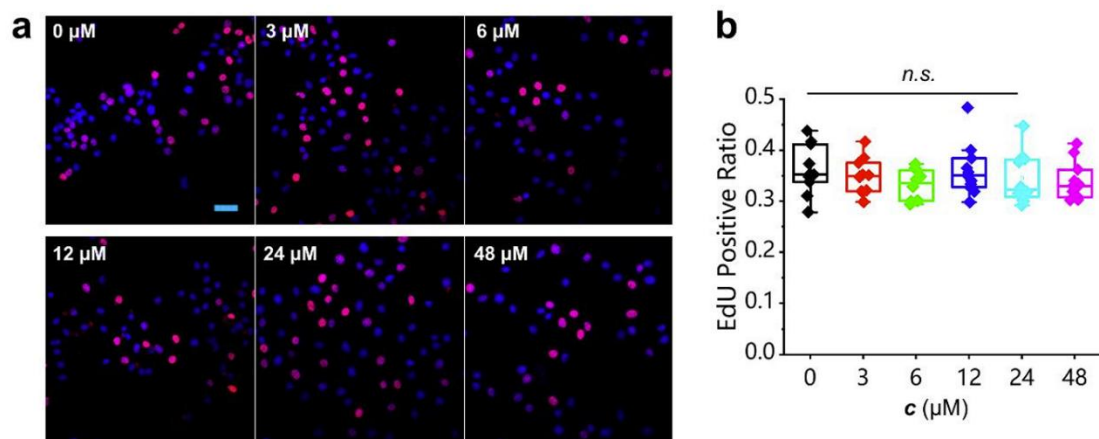
Q7. G3BP1 も減るのはなぜ？ FUS がなくなると、足場の G3BP1 があっても SG が壊れる？
今回 G3BP1 は SG のマーカーとして見ています。FUS 含有 SG がどういうメカニズムで形成されるかはわかっていませんが、G3BP1 があっても SG が形成されないということは G3BP1 単独で SG 形成するのは困難なのかもしれません。FUS が関わる何かしらの PPI が必要？

Q8. TRAM が治療応用しにくいのはなぜ？

標的タンパクに直接結合する低分子リガンドがないため、TRAM と標的を結合させるには標的に eDHFR や FKBP12^{F36V} などのリガンド結合タグをつける必要があります。そのため、ビトロで局在制御による影響を見ることができて、TRAM を直接臨床応用するのは難しいという意味でした。その問題を克服しうるのが後半で紹介した SNACIP になります。

Q9. cRGT は細胞にどのくらい入れている？ 毒性は出ないか？

cRGT 24uM 添加後 1.5h, TMP 10uM 添加後 10 分後の結果をそれぞれ見ています。また、EdU cell proliferation assay より、この条件では cRGT が細胞に有害でないことも確かめています。（cRGT の濃度が 0 uM と 24 uM の時で EdU positive な細胞の割合に有意差がない）



Q10. p.23 この PCC は細胞全体で計算している？

一つの細胞を切り取ったときにその細胞の一部ではなく、全体を見ているかという意味

でしょうか？Method 見た感じだと各細胞全体で計算しているようです。

Q11. Nanobody だとサイズが大きいので CPP が必要なのが課題か？

論文では従来の CPP の弱点として、リソソーム分解を受けやすいことをあげていました。本論文で使用している CPP は cR10*という環状 CPP であり、細胞内で切断されるという性質があるため、この課題を克服しています。

Q12. そもそも、どうしてタンパク質の局在異常が起こるのでしょうか？

局在シグナル(NLS,NES など)の変異、インポートン/エクスポートンの発現異常、タンパク質のミスフォールディングやそれによるストレス小胞の誘発、シグナル伝達や PTM の調節異常、エンドサイトーシス異常などの要因が考えられます。

参考: Ka-Yiu Edwin Kong, João P.L. Coelho, Matthias J. Feige, Anton Khmelinskii, Quality control of mislocalized and orphan proteins, Experimental Cell Research, Volume 403, Issue 2(2021)

Q13. nmnat の軸索保護作用のメカニズムは？

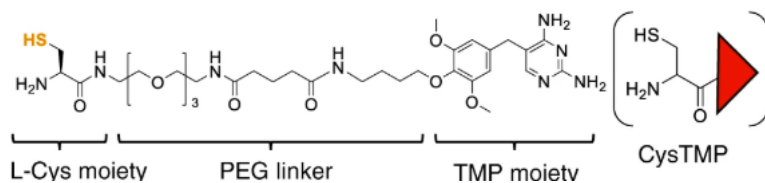
まず軸索生存維持に必要な因子として NMNAT2 というタンパクが同定されており、さらに軸索傷害後 NAD⁺を添加すると軸索変性がレスキューされることが過去の文献からわかっています。以上のことから WldS(NMNAT1 の配列を含む変異タンパク)は NMNAT2 の代替タンパクとして働き、NAD⁺が WldS 活性の下流で軸索保護の特異的な分子メディエーターである可能性が示唆され、NMNAT1 も WldSto 同様の機構で軸索保護の働きをすると考えられます。

参考:Wang, Jack T et al. “Local axonal protection by WldS as revealed by conditional regulation of protein stability.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 112,33 (2015)

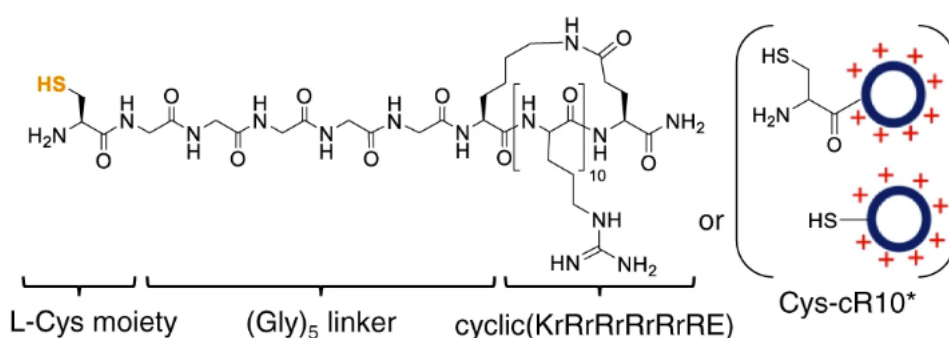
Q14. snacip の各モジュールはどういう反応でつなげているのか？

cRGT の組み立てについて説明します。

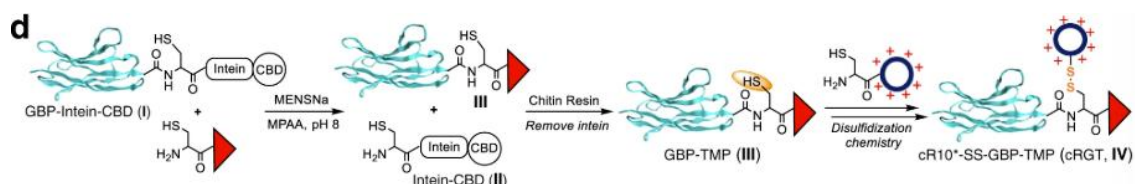
まず TMP リガンドを GBP に結合させるための CysTMP を化学合成しました。 CysTMP は、N 末端システイン、水溶性 PEG リンカー、および eDHFR タグと結合するための TMP 構造から構成されます↓



これと並行して、L-Cys 残基、(Gly)₅ リンカー、環状(KrRrRrRE)細胞膜透過ペプチド部分を持つ Cys-cR10* を 99% の純度で固相ペプチド合成により調製しました ↓



次に、expressed protein ligation (EPL) を経た後ジスルフィド結合形成によって、2 ステップで cRGT を組み立てました ↓



d の模式図の内容をより具体的に説明すると、CysTMP を GBP-intein-CBD とライゲーションし、intein-CBD タグの切断を伴って TMP を GBP の C 末端に結合させ、精製を経て GBP-TMP を生成しました。最後に、内部にシステイン残基を持つ GBP-TMP を、Cys-cR10* とジスルフィド結合させ、cR10*-SS-GBP-TMP、すなわち cRGT を作製しました。

Q15. SNACIP の vivo 実験で、どれくらいマウスに投与してる？それによる毒性は出ないか？

PBS 中の 25 mg/ml CTTC (M.W. 62.2 kD, 0.4mM) 100 μl をマウスに尾静脈から静脈内注射し、所定の時点で 1 日置きに注射を繰り返しています。

CTTC 投与そのもののマウスに対する毒性を評価したデータはありませんでした。

Q16. Nanobody はこの用途以外にどんなものがあるのか、臨床の方にどれくらい使われて

いるのか気になりました。

もともと重鎖抗体の可変部由来のペプチド断片なので、抗体医薬としての応用が期待されています。従来の抗体医薬と異なり、組織透過性が高い、血中半減期が長いなどの利点があります、

調べたら抗体医薬として承認済みの VHH 薬があったので紹介します。

・Caplacizumab (Cabliivi)：血液凝固因子である von Willebrand factor (vWF) を標的とし、後天性血栓性血小板減少性紫斑病 (aTTP) を適用疾患とする NANOBODY®薬で、2018 年に欧州、2019 年に米国、2022 年に日本で承認済みである。

・ Ozoralizumab (Nanozora)：自己免疫疾患に関与するサイトカインの一つ、TNF α を標的とし、関節リウマチ (RA) を適用疾患として 2022 年に日本で承認された NANOBODY®薬。本抗体は 2 つの抗 TNF α ヒト化 NANOBODY®分子と 1 つの抗 HSA ヒト化 NANOBODY®分子をペプチドリinkerで連結させた 3 価抗体である。

・ Envafolelimab (Enveda)： Programmed death receptor-1 (PD-1) のリガンドである免疫チェックポイントタンパク、PD-L1 を標的とし、進行性固形がんを適用疾患として 2021 年に中国で承認された VHH 薬。

参考: 生物工学会誌 第 101 巻 第 7 号 356-359, 2023

DOI: 10.34565/seibutsukogaku.101.7_356:

Q17. 可変領域全体ではなく、もっとけずって小さくできたり CPP の役割を兼ねたりできるのか気になりました。

ウシ由来の抗体を用いて、抗原と主に相互作用する部分 (CDR、相補性決定領域) のみを抽出して、もっと短いペプチド (~5kDa) として再設計する研究もあります。ナノボディの 3 倍小さく、knob と呼ばれているようです。

参考: Huang, Ruiqi et al. "The smallest functional antibody fragment: Ultralong CDR H3 antibody knob regions potently neutralize SARS-CoV-2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* vol. 120,39 (2023)

また、CPP なしで細胞膜透過するナノボディについて報告した論文があります。具体的にはフレームワーク領域を塩基性残基 (アルギニン・リジン) へ大量変異し、理論上の正味電荷 +14 ~ +15 ナノボディを作成したところ、WT のナノボディと比べて細胞膜通過が可能になったそうです。

参考: Bruce, Virginia J et al. "Resurfaced cell-penetrating nanobodies: A potentially general scaffold for intracellularly targeted protein discovery." *Protein science : a publication of the Protein Society* vol. 25,6 (2016)