

学位論文

多重差別化戦略に基づいた  
光アフィニティーラベル法に関する研究

富山大学大学院 医学薬学教育部

生体認識化学研究室 森本 正大

# 目次

略語 .....	1
<b>第 1 章 序論 .....</b>	<b>2</b>
1-1. 生体小分子のケミカルバイオロジーと創薬研究 .....	2
1-2. 光アフィニティーラベル法による標的同定の特徴と問題点 .....	5
1-3. 光アフィニティーラベル法の多機能化 .....	8
1-4. 光アフィニティーラベル法による標的同定戦略の見直し .....	12
1-5. 蛍光基形成型クロスリンカーの開発 .....	14
1-6. 本研究の概要 .....	17
<b>第 2 章 クマリン形成反応を利用したラベル部位解析法基盤の確立 .....</b>	<b>18</b>
2-1. マメ科植物における種子貯蔵タンパク質の輸送・貯蔵メカニズム .....	19
2-2. ペプチドプローブ 1 の設計 .....	21
2-3. ペプチドプローブ 1 の合成 .....	23
2-4. ペプチドプローブ 1 の光特性評価 .....	24
2-5. ペプチドプローブ 1 を用いた GmVSR の光ラベル条件の検討 .....	26
2-6. GmVSR の脱ビオチン化と蛍光化 .....	30
2-7. 光切断を利用したビオチンラベル標的の単離・精製手法への展開 .....	32
2-8. 精製クマリン化 GmVSR の消化フラグメント解析 .....	34
2-9. 小括と考察 .....	39
<b>第 3 章 タンパク質混合系を用いた同位体導入型蛍光ラベル法の検証 .....</b>	<b>40</b>
3-1. プローブの設計 .....	41
3-2. ビオチンプローブ 8 の合成 .....	43
3-3. タンパク質混合系におけるアビジンの光ラベル解析 .....	44
3-4. 小括と考察 .....	50
<b>第 4 章 多機能光アフィニティーラベルによる標的同定法の確立 .....</b>	<b>51</b>
4-1. HeLa 細胞ライセートを用いた評価系とその標的タンパク質 .....	52
4-2. HeLa 細胞ライセートを用いたビオチン結合タンパク質の解析 .....	53
4-3. 小括と考察 .....	61
<b>第 5 章 総括 .....</b>	<b>62</b>
<b>第 6 章 実験項 .....</b>	<b>63</b>
6-1. 使用機器、試薬・材料 .....	63
6-2. 合成の部 .....	65
6-3. ラベル化実験の部 .....	70
参考文献 .....	77
謝辞 .....	85

## 略語表

ACC, acetyl-CoA carboxylase

BCCP, biotin carboxyl carrier protein

CBB, coomassie brilliant blue

CHCA,  $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid

DTT, dithiothreitol

ESI-MS, electrospray ionization mass spectrometry

Fmoc, 9-fluorenylmethyloxycarbonyl

GmVSR, glycine max homologues of VSR

GST, glutathione S-transferase

HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HPLC, high performance liquid chromatography

HRP, horseradish peroxidase

HRMS, high resolution mass spectrometry

ICAT, isotope-coded affinity tag

LC-MS, liquid chromatography-mass spectrometry

MALDI-MS, matrix assisted laser desorption / ionization mass spectrometry

Mp, melting point

Mw, molecular weight

NHS, *N*-hydroxysuccinimide

NMR, nuclear magnetic resonance

PAL, photoaffinity labeling

PBS, phosphate buffered saline

PC, pyruvate carboxylase

PMF, peptide mass fingerprinting

PVDF, polyvinylidene fluoride

SDS, sodium dodecyl sulfate

SDS-PAGE, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis

SPR, surface plasmon resonance

TFA, trifluoroacetic acid

TLC, thin-layer chromatography

TIPS, triisopropyl silane

T-PBS, polyoxyethylene (20) sorbitan monolaurate-PBS

UCSF, University of California, San Francisco

VSR, vacuolar sorting receptor

WSC, (=EDC), 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride

## 第1章 序論

### 1-1: 生体小分子のケミカルバイオロジーと創薬研究

薬物を含め生物活性小分子（リガンド）の多くは生体内に存在する標的受容体や酵素に結合しその活性を発現することから、創薬研究の主対象はタンパク質であり、その細胞または生体機能発現ネットワークを解析するプロテオミクスは、生物学的研究や医学的研究において重要課題である。従って、これら生物活性小分子の合成やその標的タンパク質の同定は疾患診断・治療のための創薬に必要不可欠であり、ケミカルバイオロジー研究の主要課題になっている<sup>1,2,3</sup>。標的の同定に関する方法論として、レポーター遺伝子試験や分子可視化などによる機能解析からのトップダウン的アプローチでは直接的な標的の同定は難しい<sup>4,5</sup>。逆にこれら小分子の標的の同定に基づいたボトムアップ的相互作用分子解析は有効であり、分子親和性（アフィニティー）に基づく多くの手法が開発されてきた<sup>4,6</sup>。生体分子のネットワーク解析では、特定の分子や機能に着目して、膨大で複雑な細胞内生体分子混合物から1つまたはいくつかの標的を同定するため、その効果的な方法が求められる。しかし、多様な系に対応する汎用法はほとんどない。

多くの相互作用系に対応する方法論としてアフィニティーラベル法がある（Figure 1）。これは細胞系など *in situ* で用いることができ、リガンドの親和性を利用して共有結合で直接的にタグを付け、それを指標として解析する手法である。従って、最も汎用されている方法論であるアフィニティー精製法で対応困難な膜タンパク質や複合体、弱い相互作用系、微量発現タンパク質などにも有効である。

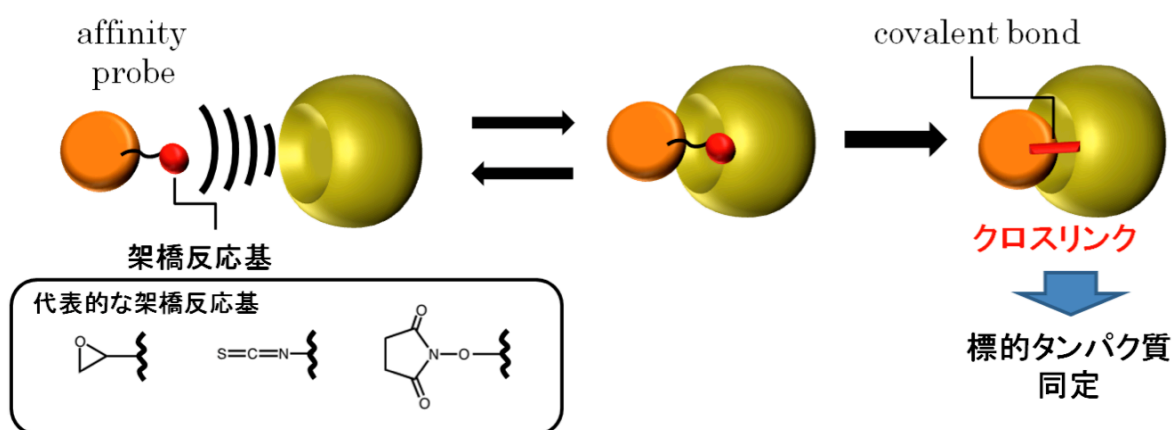


Figure 1. アフィニティーラベル法のアウトライン

しかし、活性エステルなど化学反応基を用いたアフィニティーラベル法では非特異的なラベルが多いことから、改良法として光アフィニティーラベル法（PAL）が開発された（Figure 2）<sup>7</sup>。この方法論では光反応基を架橋基（クロスリンカー）として採用し、光

照射によって生じる高反応性中間体を介して架橋するため、リガンドが十分に標的タンパク質と相互作用した後にタグを付けることができる。中間体の寿命は極めて短いため、リガンド結合部位に接近していない反応種は、速やかに水により失活するか非活性（基底）状態に戻るため、標的以外への非特異的なラベルを減ずる。また操作性にも優れているため、汎用性の高い手法である<sup>8</sup>。

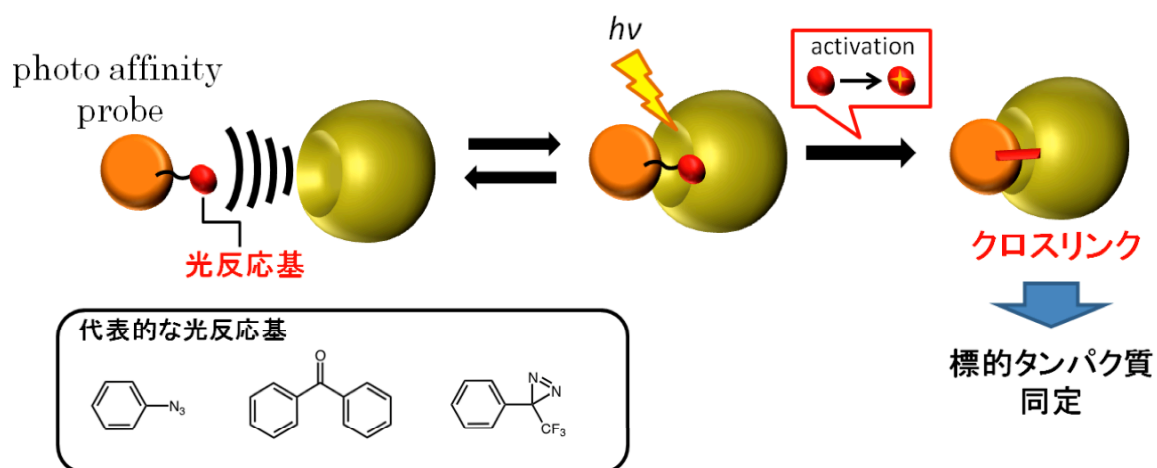


Figure 2. 光アフィニティーラベル法のアウトライン

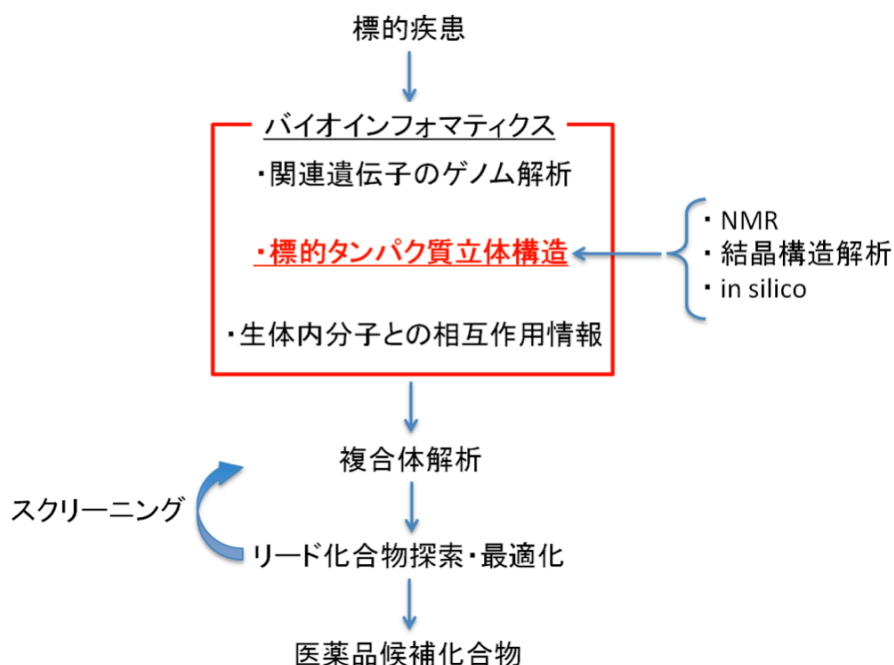
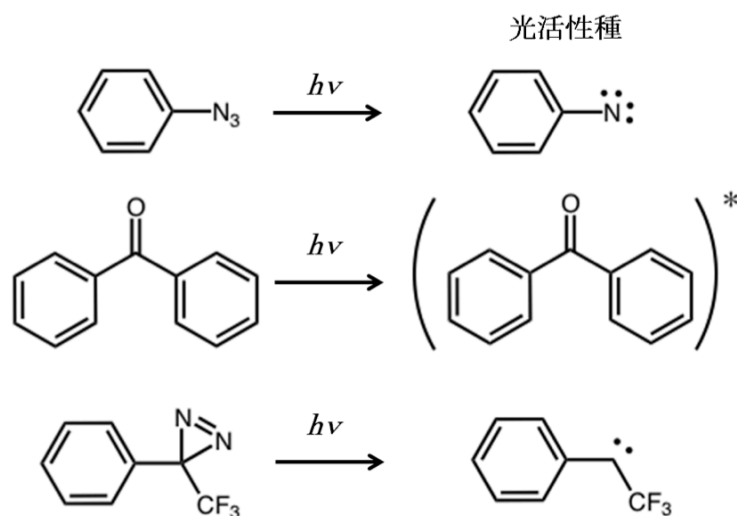


Figure 3. タンパク質立体構造情報に基づく薬剤設計

また、アフィニティーラベル法の特長としてリガンド結合部位近傍にタグがつくことから、ラベル部位特定により相互作用状態やドメイン構造情報が得られることが挙げられる<sup>9</sup>。小分子とその標的受容体の相互作用は環境や条件だけでなくその標的の構造変化や修飾などにも影響をうけるため、標的受容体の構造を解析することは非常に重要である。特に、タンパク質の発現技術やその結晶化技術の進歩に伴い、最近ではオピオイド受容体<sup>10</sup>やアドレナリン受容体<sup>11</sup>、GABA受容体<sup>12</sup>など、主要な創薬対象である膜受容体の結晶構造が報告されたが、依然として多くの膜受容体の高次構造は未解明のままである。これらのタンパク質に対し、PALによるラベル部位情報は、最近の *in cell* NMR<sup>13</sup> や *saturation-transfer difference (STD) NMR*<sup>14</sup> 等による *in situ* での解析情報や、蓄積されたタンパク質構造データベースと照合することで、細胞内環境下における生体分子相互作用の構造解析に革新的な展開をもたらすものと考えられる。最終的に、より実際の系に近い環境下での標的タンパク質との結合構造情報は *in silico* による創薬研究を加速させる基盤情報を与え、合理的で迅速なドラッグデザインが可能になるものと考えられる (*structure based drug design; SBDD, Figure 3*)<sup>15</sup>。

## 1-2: 光アフィニティーラベル法による標的特定の特徴と問題点



現在、光アフィニティーラベル法は主に Figure 4 に示したアリアルアジド基、ベンゾフェノン、ジアジリン基の 3 つの光反応基が汎用されている。最も汎用されている反応基はアリアルアジドであり、これはリガンド分子のプローブ合成が容易なことと、構造が小さいことによる。しかし、チオールなどの還元条件下で不安定であり、その活性種である一重項ニトレンは副反応として環拡大反応を起こして失活する<sup>16</sup>。また、N原子によるクロスリンクでは、形成した結合が化学的に不安定であることがあり、解析が困難になる場合が多い<sup>17,18</sup>。

ベンゾフェノンは光照射により、励起三重項カルボニル基が反応活性種として近傍の水素原子を引き抜くことでラジカルを生成しクロスリンクする<sup>19</sup>。この時、反応相手がない励起状態では基底状態に戻るという特徴がある。そのため、ラベル収率が比較的高い。しかし、反応相手を選ぶことから、リガンド結合部位ではない非特異的なラベルの増加が懸念される。また、アリアルアジドやジアジリンに比べて光照射時間が比較的に長いこと、そして、他 2 つに比べてその構造が大きいこと、プローブのアフィニティーの低下が懸念される。

一方、1980 年に Brunner らにより開発されたトリフルオロメチルフェニルジアジリン基<sup>20</sup>は通常の合成条件で安定であり、光照射により生じた一重項カルベンは極めて短寿命で、反応相手を選ばず極近傍の分子と反応する。カルベンは水や緩衝液成分とも反応するため、結合ドメインにないプローブはそのまま失活することから、ラベルの特異性は非常に高い<sup>21</sup>。さらに、一重項フェニルカルベンはニトレンに比べて環拡大反応の活性エネルギーが非常に高く、通常条件下では起こりにくい上に、主な副生成物であるジアゾ誘導体の反応性はトリフルオロ基により低下している。炭素原子によるクロスリ

ンクも安定であることから、リガンド結合状態の解析には有効である。また、フェニル基の誘導体化法も開発されプローブ化が容易になった<sup>22</sup>。しかし、その一方でラベル収率が低く、通常数%程度である。これらの観点からラベル収率が低いという欠点はあるものの、このトリフルオロフェニルジアジリン基を用いたラベル法は、操作の容易性、光反応性、ラベルの特異性の高さなどの観点から、複雑な *in situ* の系やタンパク質相互作用系における生体分子標的の解析において使用され、実績を挙げている。実際に、トリフルオロメチルフェニルジアジリンが開発されて直ちに <sup>125</sup>I を導入したプローブを用いた  $\beta$ -アドレナリン受容体の解析 (1983, Figure 5)<sup>23</sup>、ナトリウムチャンネルの解析 (1992, Figure 6)<sup>24</sup> が行われた。

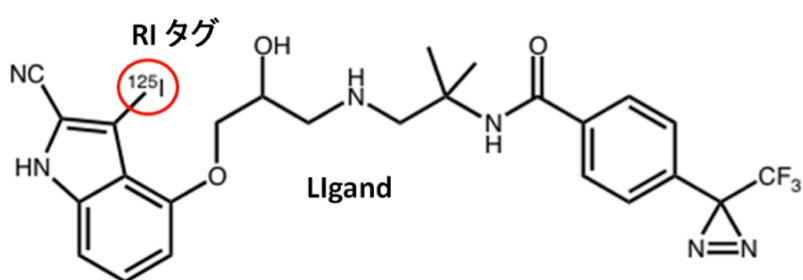


Figure 5.  $\beta_2$ 受容体解析用光アフィニティープローブ

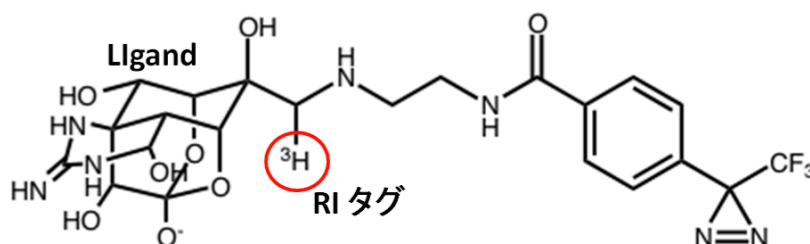


Figure 6. ナトリウムチャンネル解析用光アフィニティープローブ

ラベル部位特定には通常、相互作用タンパク質を特異的に捕捉した後、ラベルを指標にしたラベルタンパク質の精製、さらにそれを消化した後、ラベルペプチドの精製、その配列解析等を経て結合部位の特定が進められる (Figure 7)。

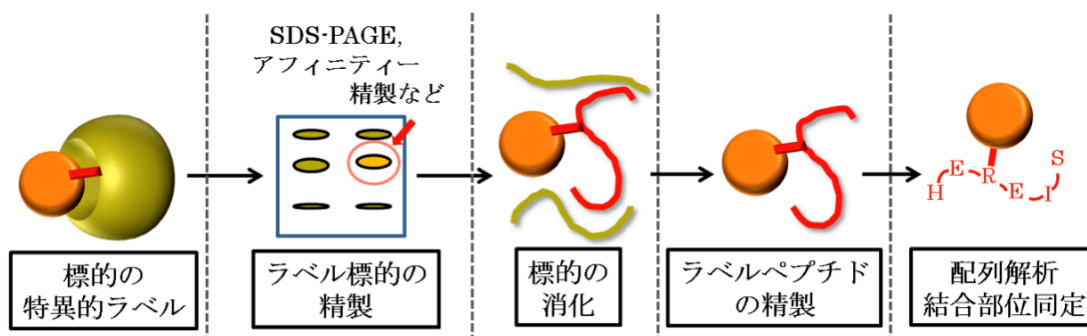


Figure 7. 光アフィニティーラベル法による同定操作の流れ



後者のナトリウムチャンネル研究では、デンキウナギから 10 mg のナトリウムチャンネルを分離し、フグ毒テトロドトキシンを光プローブ化して解析が進められた。このジアジリン基を用いた初期 PAL 研究では、光照射産物をゲルクロマトグラフィー処理後、トリプシン消化し、その産物を HPLC 解析した。しかし、放射能検出ピークの再精製を行うと、そのほとんどをハンドリング時の非特異的な吸着により消失し、その作業は難航を極めた。そこで一次配列情報から複数の抗ペプチド抗体を作製し、免疫沈降させてラベルフラグメントを探索するという手法論が用いられた。これにより電気泳動による分子量情報と併せて 2 つのラベルペプチドが特定されたが、この結果は最近報告された X 線構造解析データ<sup>25</sup> とよく一致しており、ジアジリン光ラベルの特異性が証明された。しかし、ラベルアミノ酸残基の特定には至っていない。

RI 標識による汎用解析では極めて高感度の検出が可能であり、その消化産物の HPLC 分析では極微量ラベルペプチドピークを明瞭に特定できる。しかし、通常そのピークには多くの夾雑ペプチドを含むため、濃縮および再精製する繰り返し操作が必要となる。極微量ペプチドでは、多くの場合この過程でほとんどを消失し、高純度精製操作は煩雑化し、長期化する。そこで、単純な検出用タグ導入のみではなく、解析を効率化するための機能化をプローブに施し、それによる解析効率化が推進された。

### 1-3: 光アフィニティーラベル法の高機能化

ATP 等のようなリガンドでは、リン酸部分と  $\text{Fe}^{3+}$  との金属錯体形成を利用してラベルタンパク質を濃縮して解析が進められてきた (Figure 8)<sup>26</sup>。

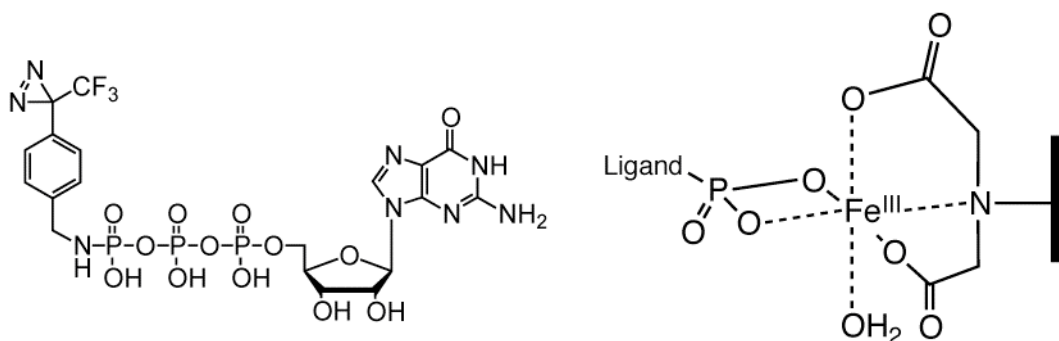


Figure 8. 核酸プローブと金属錯体形成を利用した精製<sup>27</sup>

そこで極微量ラベル体の濃縮を可能とするための、汎用的なプローブの機能化が推進された。その結果、RI と同程度の高感度検出を可能とし、さらに機器等の放射能汚染を回避できるビオチン付加型光反応基が開発された (Figure 9)<sup>28</sup>。この反応基により標的タンパク質に照射のみでビオチン基を導入することが可能となり、ビオチン-アビジン相互作用系 ( $K_d = 10^{-15}$ )<sup>29</sup> を利用した化学発光検出だけでなく、アビジン固相担体を用いたラベルタンパク質の高純度濃縮が可能となった (Figure 10)。

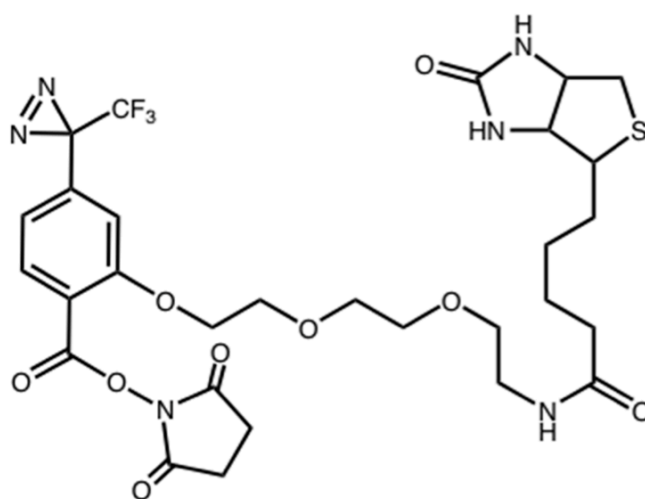


Figure 9. ビオチン付加型光反応基

実際に、この光反応基を糖リガンドに組み込んだプローブを用いてガラクトース転移酵素 (GalT) の活性中心構造の解析が行われた (Figure 11)<sup>30</sup>。まず照射産物をアビ

ジンカラムに通してラベル GalT が濃縮された。しかし、その消化産物の HPLC 解析ではラベルペプチドの特定は困難であった。そこで、各ピークをフラクションして PVDF 膜上に固定化した後、アビジン-HRP を用いた化学発光検出法でラベル（ビオチン化）ペプチドピークが特定された。続くエドマン分解法により 2 つのラベルペプチドが同定された<sup>31,32</sup>。その後の結晶構造解析からもそれらのラベルペプチドは妥当であり、そのドッキングモデル解析からは X 線解析では見出されなかった機能サイトが明らかになった<sup>33</sup>。これによりラベルペプチド特定が簡便化されたが、この場合もラベルアミノ酸の特定には至っていない。

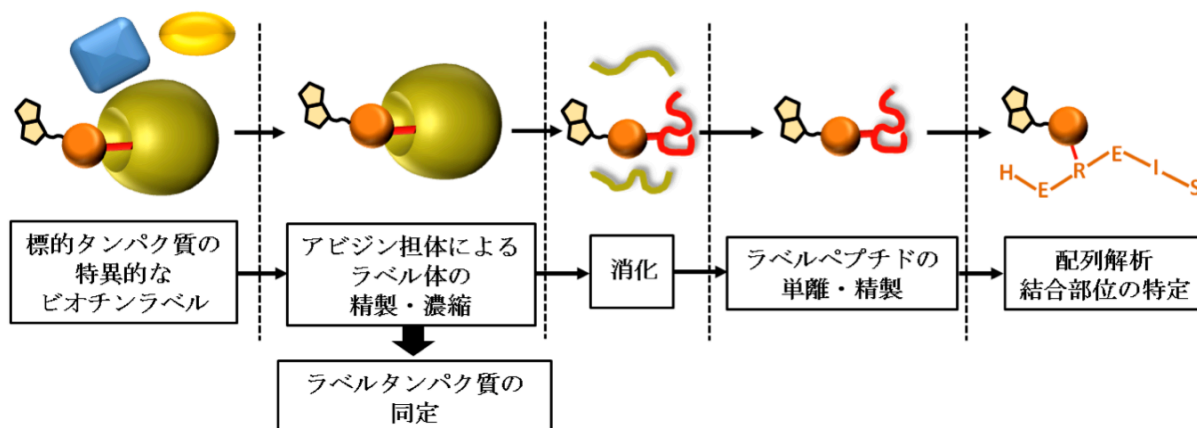


Figure 10. 光ビオチン化法によるタンパク質解析のフローチャート

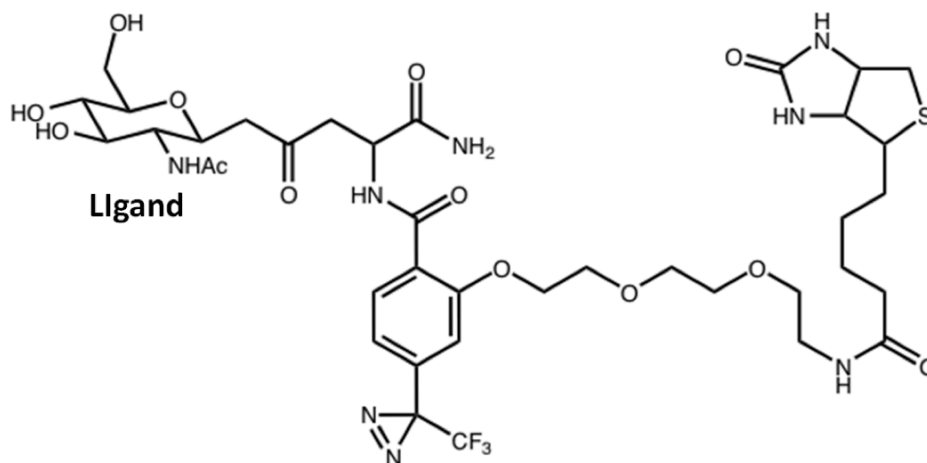


Figure 11. ビオチン付加型光反応基を組み込んだ糖プローブ

上記解析は精製タンパク質を使ったことから、濃縮・精製は捕捉タンパク質の溶出が容易なモノメリックアビジン ( $K_d = 10^{-9}$ )<sup>34</sup> が利用された。実際のプロテオームでは高度濃縮が必須であることから、通常のアビジン 4 量体が用いられる。近年では質量解析法が発展しており、この光アフィニティービオチン化法

を利用したラベルタンパク質の高度濃縮を経て、その消化産物パターン（ペプチドマスフィンガープリンティング：PMF）をデータベースと照合解析し、タンパク質が同定される。これにより標的タンパク質同定が高速化され、現在多くの系で実績を挙げている<sup>35,36,37</sup>。例えばビオチン化パルミチン酸プローブを用いたペルオキシソーム画分からの標的同定では、1～2ヶ月でβ酸化関連酵素MFE2 (multifunctional enzyme 2) が同定された<sup>38</sup>。しかし、アビジン精製担体からの溶出はSDS存在下、高温で煮出すなど過激な条件が必要であり、極微量のラベルでは、わずかな非特的吸着物質の共出でも深刻な問題を引き起こす。さらに細胞にはカルボキシラーゼなどのビオチン化タンパク質が存在していることも、微量解析を困難にした。この対処として多様な切断性官能基を加えた反応基が開発された (Figure 12)<sup>39,40,41</sup>。

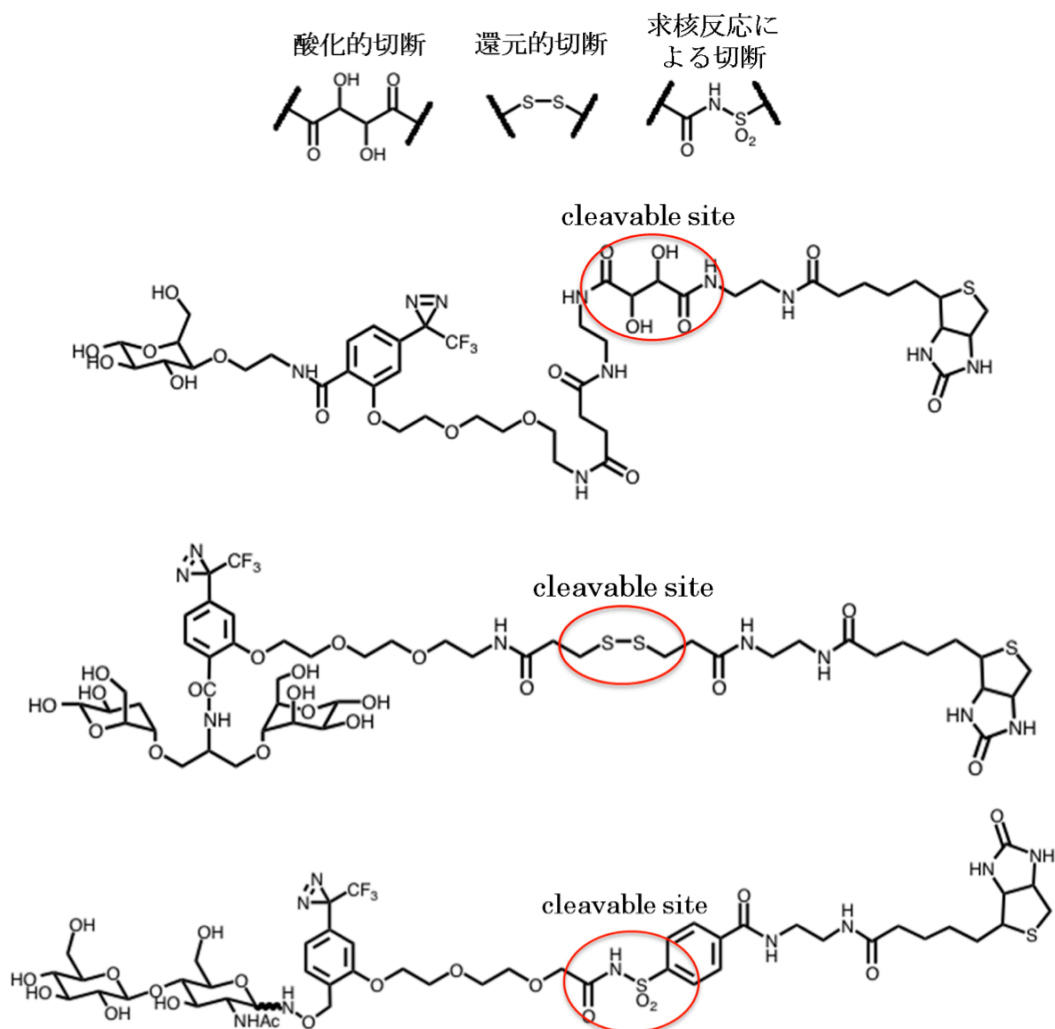


Figure 12. 代表的な切断性リンカーと  
 ビオチン付加型光アフィニティープローブ

また他の精製タグとして、最近、ビオチン基に替わりパーフルオロ基<sup>42</sup>(Figure 13) やオリゴヌクレオチド<sup>43</sup>を精製用タグとして用いた PAL が開発され、また小さなアジドやエチニル基などクリックタグによるポストラベル法<sup>44</sup>による精製手法も報告されている。

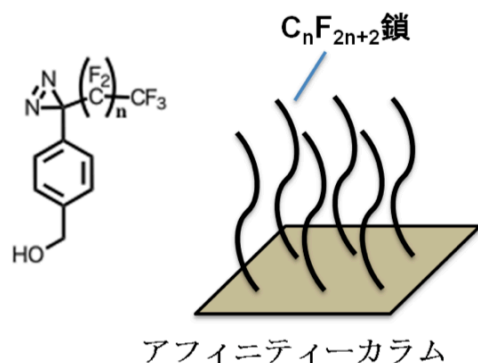


Figure 13. パーフルオロ基をもつジアジリン試薬とその親和性カラム

何れの場合も更なる SDS-PAGE やアフィニティー精製等による分離を必要とするが、それでも微量夾雑物の混入は避けられず、PMF 解析では多くの標的候補がリストアップされるのが現状である。従って、標的タンパク質同定にはラベルペプチドの配列解析に基づく同定・検証が極めて重要であり、それにより解析結果の信頼性も高くなる。しかし、前述のように、各ペプチドフラグメントの物性は構成するアミノ酸残基の性質に大きく依存し、往々にして基質結合部位は疎水性アミノ酸や特殊配列を有することが多いことから、微量ペプチド精製は困難でありその再現性も低い。従って対照実験との僅かな差から微量ラベルペプチドを特定することは難しく、ピークを特定できた後も、多くの夾雑物を含むため再精製が必須となり、微量ペプチドを濃縮する過程で非特異的な吸着などによりほとんどを損失することが多かった。このように微量ペプチド精製は煩雑化しやすく、多大な努力にもかかわらず多くの場合でラベル部位の特定に至っていない。

#### 1-4: 光アフィニティーラベル法による標的特定戦略の見直し

以上の研究から、ナノ/ピコモルレベルでの微量ラベルペプチドフラグメント解析において、非特異的吸着による損失や微量吸着物質の混入は避けられず、そのため特定の精製タグや検出タグのみでは、多様な対照実験とのピーク量の僅かな差異からラベルペプチドを特定することや、さらに高純度精製のために繰り返し精製を進めることは極めて困難であることが分かった。そこで、なるべく操作を繰り返さずに解析する戦略が必要であると考えた (Figure 14)。つまり、高純度精製を基本概念とする解析ではなく、繰り返し操作をすることなく、連続的な多重の差別化により標的を絞り込み、最終的にはその流れの中でラベルペプチドを明瞭に特定できることが必要と考えた。その目的に特化した光反応基の多機能化を重視することにした。

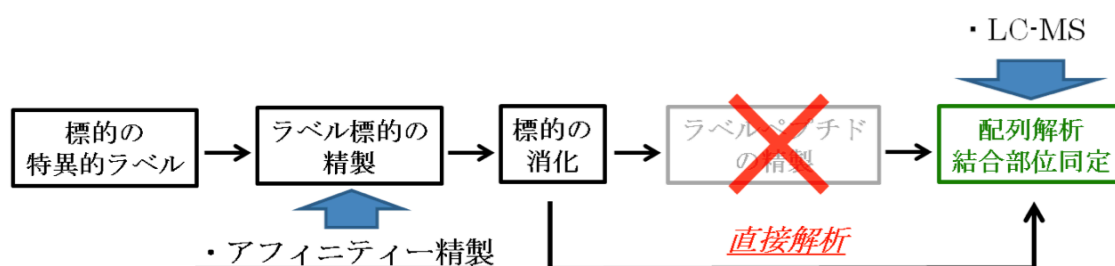


Figure 14. 連続した標的の絞り込みによる解析の流れ

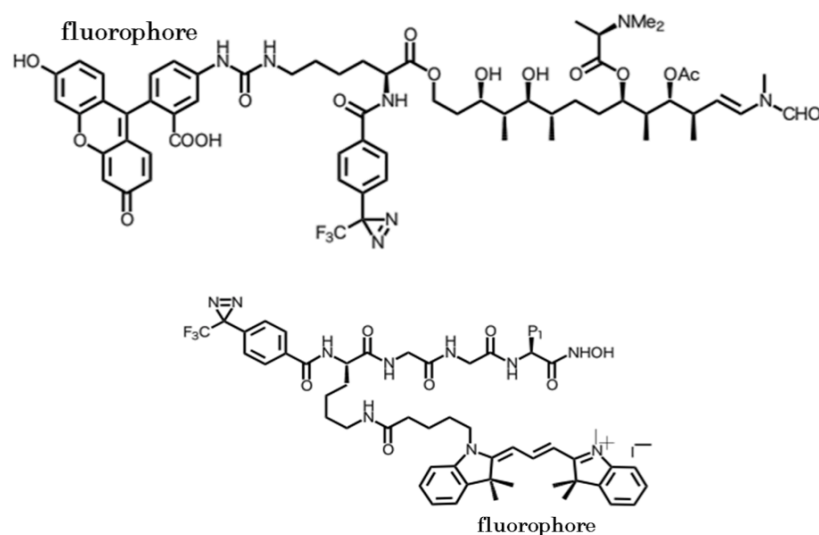


Figure 15. 蛍光基導入型ジアジリンプローブの構造

選択的な非 RI 高感度検出タグとして蛍光基が挙げられる。これまで Figure 15 に示す蛍光基を導入したプローブが開発されているが、蛍光基は比較的大きな分子であり不安定なため合成は容易ではなく報告例は少ない。このようなプローブへの

蛍光基導入は、構造の肥大化によるアフィニティーの低下や質量解析時の分解能の低下、さらに不安定化による操作中での分解や質量シグナルの複雑化などが懸念される。このため、クリック反応などを利用したポストラベルにおける蛍光基導入法が開発された。この手法を用いることで比較的小さなアジド基やエチニル基などのライゲーショントグを導入することでプローブ構造を小さく抑えることが可能になった (Figure 16)<sup>45,46</sup>。しかし、反応後に蛍光基を付ける化学的処理を必要とし、反応の選択性は高いものの、標的が微量であることから導入効率の面で問題となる。

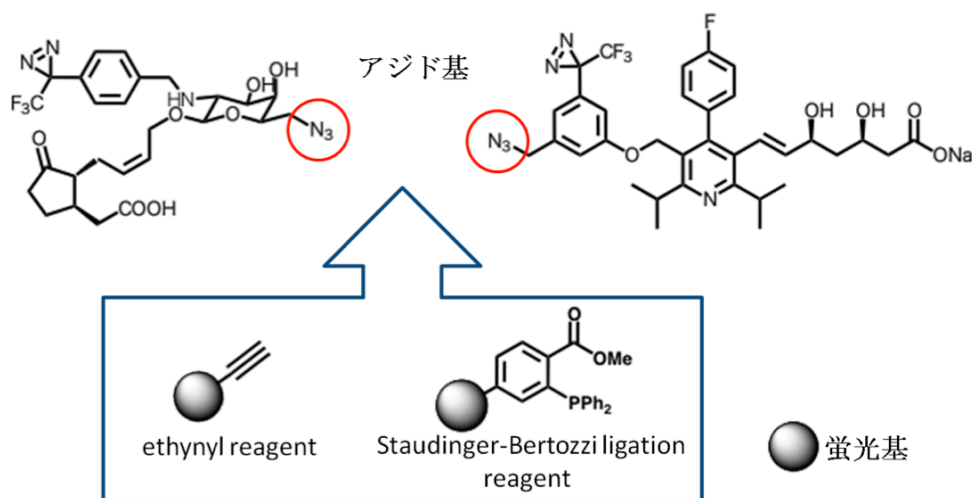


Figure 16. アジド基指向型のポストラベルにおける蛍光基導入

実際のプロテオームの解析においては、先例のように高感度検出タグだけでは同定は困難であり、さらに細胞内に含まれるフラビンを始めとする蛍光物質も多数含まれるため、微量ラベルタンパク質の濃縮を兼ねた精製操作は必須である。以上の観点から、ジアジリン基を用いた PAL 標的的同定において、以下の点が重要であると考えた。

1. ラベル標的タンパク質の高選択的濃縮 (高度濃縮)
2. ラベルペプチドの選択的高感度検出 (蛍光化)
3. ポストラベルなど化学処理は避ける

これら 2 段階の高感度差別化による絞り込みにより繰り返し精製を抑えることと、さらに以下の解析操作を複雑化しない技術などが挙げられる。

4. プローブ構造の大きさや安定性
5. 付与される物質の大きさや安定性

## 1-5：蛍光基形成型クロスリンカーの開発

最近、当研究室で *o*-ジヒドロキシ桂皮酸型ジアジリン誘導体が開発された (Figure 17)<sup>47</sup>。これを搭載したリガンド分子は、光照射により標的タンパク質にクマリン蛍光を付与する。これを用いて細胞の蛍光可視化に応用された。

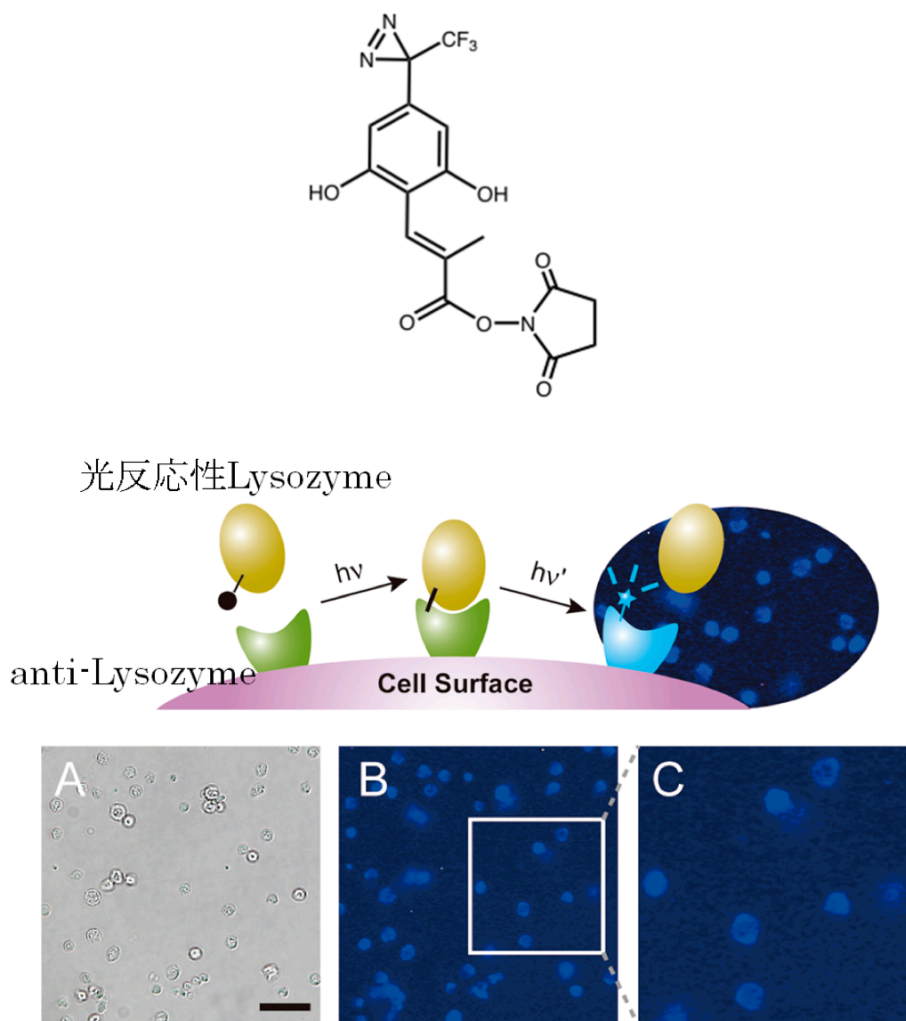


Figure 17. 蛍光基形成型クロスリンカーの構造と B 細胞可視化への応用

この試薬は基本骨格であるトリフルオロメチルフェニルジアジリンにヒドロキシ基と二重結合が1つ加えられたものであり桂皮酸骨格を有する。この光反応ユニットは非常にコンパクトな構造にもかかわらず、2種類の光反応特性を示す。重メタノール溶液中での蛍光基形成反応を以下に示す (Figure 18)。この反応はまずジアジリン光分解で生成したカルベンがメタノールと反応する (近傍分子とクロスリンクする)。その後、2段階目の光照射によりオレフィンが



*E-Z*異性化する。これにより、フェノール性ヒドロキシ基が空間的にカルボニル基に接近し求核置換反応が誘引される。この分子内環化反応により蛍光基クマリンが形成される。つまり、この一連の反応により相互作用タンパク質にはクマリン誘導体が移植されることになる。即ち、前述の条件であるコンパクトな反応基構造であり、不安定な蛍光基を事前に導入することなく、あるいはポストラベル的に化学的処理で導入することなく蛍光タグを付けることが可能である。また分子内求核反応ではリガンド分子を切断遊離するため、ラベル部位には形成したクマリンのみが導入される。この蛍光基クマリンは分子量が小さく比較的安定なため、ラベルペプチドの質量解析時の分解能低下やシグナルの複雑化を抑えることが可能と思われる。

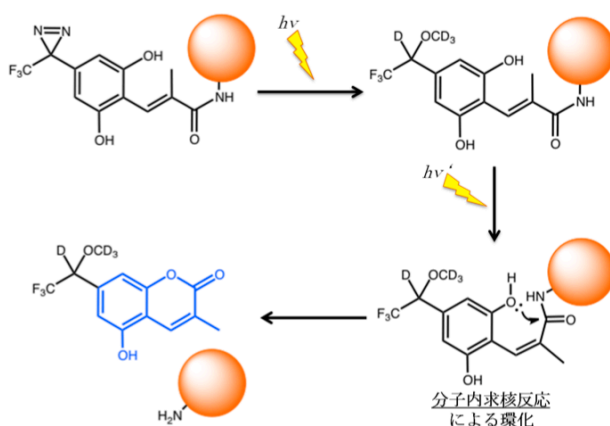


Figure 18. 重メタノール溶液中における桂皮酸型ジアジリンの光反応

今回、さらにこの桂皮酸ユニットを光切断性リンカーと捉えることで、先のビオチン化法を利用した微量ラベル標的タンパク質の高度濃縮と選択的溶出が可能と考えられた (Figure 19)。これにより、微量ラベル標的の高度濃縮と高感度検出を同時に達成することで、ラベルペプチドの特定が容易になるものと考えた。

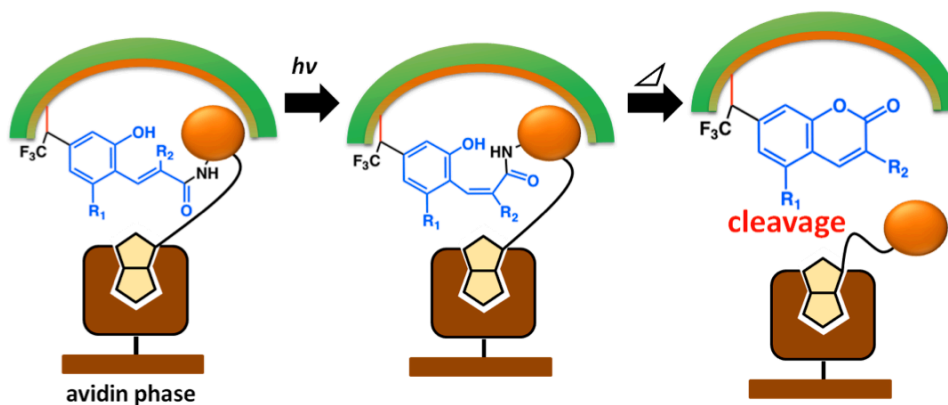


Figure 19. 光切断によるラベル標的の選択的溶出と蛍光化

このクロスリンカーユニットはコンパクトな構造ながら光クロスリンク、光切断、発蛍光、リガンド導入の4つの機能を有する多機能ユニットであり、これらの機能は前述の検討からいずれも極微量ラベルタンパク質の構造解析を進める上で有効な機能特性であると言える。そこで、本反応基の最適化を検討し、プロテオームに対応した標的特定法の開発に取り組むことにした。

## 1-6：本研究の概要

本研究では、微量ラベルペプチドの高純度精製を基本とする従来解析概念を刷新し、多段階での明瞭な標的絞り込みによる大幅な解析時間短縮と微量化を目的とした。この達成のため、以下に示す検討を行うことで、標的同定に特化した光反応基ユニットの多機能化を図り、汎用的な標的同定技術として、効率性と簡便性、操作性に優れた高性能光アフィニティー同定法を開発する。

### 1. クマリン形成反応を利用したラベル部位解析法基盤の確立（第2章）

同定解析に特化した桂皮酸型光クロスリンカーの最適化を行う。それを組み込んだプローブを設計合成し、単一精製タンパク質を用いて、蛍光化機能と光切断濃縮機能を利用した濃縮の評価を行う。これら一連の検討により本方法論の基盤技術の確立と、2つの差別化によるラベル標的ペプチド解析の効率化を評価する。

### 2. タンパク質混合系を用いた同位体導入型蛍光ラベル法の検証（第3章）

質量解析による定量プロテオミクスで利用される同位体評価法を取り入れた新規クロスリンカーを開発する。LC-MSを利用した微量ラベルペプチドの同定において、蛍光特性と同位体特性付与による多重差別化効果を、人工的に調整したタンパク質混合系を用いて評価する。

### 3. 多機能性光アフィニティーラベルによる標的同定法の確立（第4章）

HeLa cell lysate を用いて、ラベル標的タンパク質の選択的濃縮効率、HPLCでのラベルペプチドの特定効率、MS解析での標的ピークの特定効率を評価する。3段階の異なる操作における多重差別化戦略によるプロテオーム解析を行ない、本解析概念を実証すると共に汎用的な標的同定法として確立する。

## 第2章 クマリン形成反応を利用したラベル部位解析法基盤の確立

RI 標識を用いた光ラベル法では、HPLC 解析において膨大な消化産物から微量ラベルペプチドを極めて高感度に検出できる。しかし、そのピークには多くの夾雑物を含むため再精製や濃縮操作が必須であり、その過程で大部分を損失することが多く、ラベル部位解析に成功した例は少ない。問題はナノ／ピコモルレベルのラベルペプチド操作であり、加えて機器等の放射能汚染を回避できないことにある。そこで、極微量ラベルタンパク質の濃縮が推進され、ビオチン化プローブの有効性が示された。しかし、微量操作では、アビジン精製担体上の僅かな非特異的吸着物質でも影響は大きく、切断機能を加えても高純度精製の達成は容易ではない。それ故、対照実験等による HPLC データの比較からラベルペプチドを特定することは困難であった。

細胞イメージングに利用された桂皮酸型ジアジリンによる光蛍光ラベル法では、相互作用タンパク質に蛍光基であるクマリン誘導体が構築され、同時にリガンド分子は切除される。この光切断機能は、ビオチン-アビジン精製においてアビジン担体から温和で選択的な溶出を可能にする。従って本蛍光化法は、非特異的吸着物質の溶出を抑えたラベルタンパク質の選択的濃縮と、続く HPLC 解析におけるラベルペプチドの高感度選択的検出が可能である。つまり、ジアジリン分解（クロスリンク）と *E-Z* 異性化（切断／クマリン化）の2つの光反応を制御できれば、標的タンパク質を光ビオチン化反応で捕捉した後で、極微量のビオチン化標的タンパク質をある程度濃縮・精製できるため、ラベルペプチドの精製を繰り返すことなく蛍光特性で同定が可能と考えられた。また、クロスリンク後に蛍光基が形成されるため、前述のような従来型の蛍光プローブに比べ取り扱いが容易であることも利点に挙げられる。

本章では、本蛍光化反応の詳細な検討により技術基盤を確立し、構造解析法として、2段階の標的差別化による絞り込み機能の効率を検証した。相互作用系として大豆タンパク質 **vacuolar sorting receptor (VSR)** とそのシグナルペプチドを用いて、標的タンパク質の光クロスリンク、タンパク質上での蛍光基形成、アビジン担体を利用した精製、及び蛍光特性による標的差別化を検証し、操作効率を評価した。

## 2-1: マメ科植物における種子貯蔵タンパク質の輸送・貯蔵メカニズム

被子植物は種子の液胞に発芽時に必要となる栄養素であるタンパク質を貯蔵するメカニズムを有している<sup>48</sup>。マメ科植物においては、主に粗面小胞体上で生合成された二種類のタンパク質（7S globulin と 11S globulin）が液胞へと貯蔵される（Figure 20）。これらのタンパク質はゴルジ体を介してプロセッシングなどを受け、輸送するタンパク質を認識し液胞へと誘導するレセプター（VSR）により trans 側から出芽する輸送小胞を経て液胞へと輸送される<sup>49</sup>。種子タンパク質は自身のもつ選別輸送シグナルによってレセプターに認識されることが分かっている<sup>50</sup>。このシグナルはいくつかのパターンに分類されており、タンパク質中のどこにも位置していても機能する配列特異型シグナル（sequence-specific vacuolar sorting determinant : ssVSD）、C 末端に位置し比較的疎水性残基に富む C 末端型シグナル（C-terminal vacuolar sorting determinant : ctVSD）、高次構造により形成されるシグナル（physical structure vacuolar sorting determinant : psVSD）の 3 種類がある。

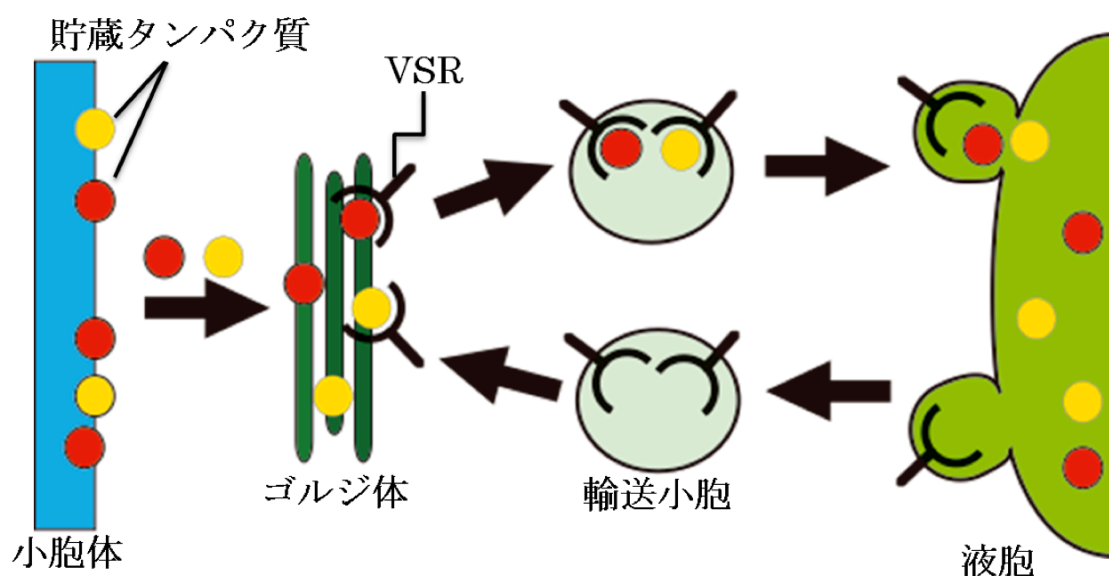


Figure 20. VSR による貯蔵タンパク質の液胞輸送メカニズム

今回用いた VSR は 7S globulin の C 末端にあるシグナル（ctVSD）を認識し、7S globulin を構成する 3 つのサブユニットのうち、 $\alpha$  サブユニット C 末端数残基を特異的に認識する<sup>51</sup>。このシグナル配列の認識部位は VSR 膜外ドメインに存在することから、その内腔領域の発現タンパク質（GmVSR）を用いて、このシグナルを含むペプチド配列をリガンドとするプローブを作製し、結合部位解析を行った。この GmVSR とシグナルペプチドとの相互作用は、C 末端にこの認識配列およびそのアナログ配列を発

現させた GST を用いて、表面プラズモン共鳴 SPR による解析の結果、この RAFY 配列のみが特異的に認識されるということが確認されている<sup>51</sup>。この研究は京都大学大学院農学研究科農学専攻品質設計開発学分野・丸山伸之准教授との共同研究で進められた。GmVSR は丸山博士により、昆虫細胞発現系を用いて C 末端にヒスチジンタグを付加した組み換えタンパク質として発現され、アフィニティーカラムとゲル濾過クロマトグラフィーにより精製されたものを使用した<sup>52</sup>。

## 2-2: ペプチドプローブ 1 の設計

### ・桂皮酸誘導体の光反応特性の比較

桂皮酸誘導体は光照射により *E-Z* 異性化を起こすことから、タンパク質の機能制御に利用された<sup>53</sup>。さらに *o*-ヒドロキシ桂皮酸誘導体は *Z* 異性体においてヒドロキシ基による分子内環化反応が起こるため光切断性保護基として汎用されていることから、1988年に Porter らによりセリンプロテアーゼ活性の光制御に利用された<sup>54</sup>。先の細胞イメージング研究<sup>47</sup>ではこの保護基を蛍光ラベル剤として利用された。つまり保護基であった桂皮酸を蛍光基クマリン前駆体として考え、新たに桂皮酸骨格のベンゼン環にジアジリン基を導入したクロスリンカーが作製された。従来のクロスリンカーであるフェニルジアジリン骨格と桂皮酸骨格が融合したコンパクトな構造になっており、クロスリンカー自体が蛍光基化し切断されるため、リガンド分子から相互作用タンパク質への蛍光ラベル移殖剤として利用された。

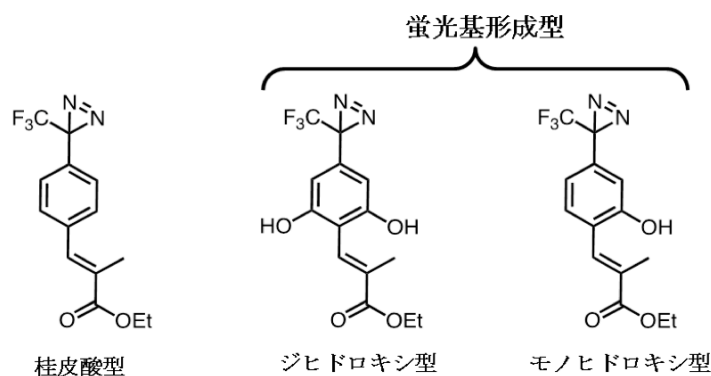


Figure 21. 桂皮酸型ジアジリン誘導体の種類

この研究で用いられた光クロスリンカーは Figure 21 に示すジヒドロキシ型桂皮酸誘導体である。このジアジリン光分解反応を調べたところ、汎用のフェニルジアジリン誘導体に比べ極めて遅いことが明らかになった。そこで別途、桂皮酸型 (OH free)、モノヒドロキシ型桂皮酸誘導体が作製され、ジアジリン基の光分解速度と *E-Z* 異性化の反応速度が比較された<sup>55</sup>。この系では、重メタノール中、ブラックライトランプ (15 W x 2、最大波長 360 nm) を光源として用い、<sup>1</sup>H および <sup>19</sup>F-NMR により光反応の経時変化を追跡した。<sup>1</sup>H-NMR では *E-Z* 異性化を、<sup>19</sup>F-NMR ではジアジリン、ジアゾ中間体およびメタノール付加物生成をモニターしている。その結果、ジアジリンの光分解速度は、モノヒドロキシ体がジヒドロキシ体に比べて約 3 倍速いことが判明した。また同時に *E-Z* 異性化速度も検討され、これもモノヒドロキシ体はジヒドロキシ体に比較して 4

倍程度速かった。さらに、*Z*体の環化反応の検討では、エステル誘導体では 0 °C で容易に起こること、アミド誘導体では起こりにくいことが明らかになった。一方、蛍光波長に関しては、ジヒドロキシ型由来のクマリン誘導体の蛍光は 440 nm 付近の長波長領域に観測され、モノヒドロキシ型由来のクマリン誘導体は 410 nm 付近に観測される。HPLC でラベルペプチドの差別化に蛍光特性を利用する場合、蛍光強度が重要なファクターであり、前者の蛍光強度は小さく不利であった。以上の観点から、光クロスリンカーとしてモノヒドロキシ体を選択し、アミド結合によりリガンドに付与することにした。

#### ・シグナルペプチド (ctVSD) プローブ設計

現在、GmVSR は貯蔵タンパク質 7S globulin の  $\alpha$  サブユニットの C 末端に存在する配列 SSILRAFY を特異的に認識することが報告されており<sup>56,57</sup>、その中でも特に C 末端配列 RAFY が重要であることが示唆されている。本研究では、SSILRAFY の N 末端に桂皮酸型クロスリンカーを導入することにした。また、精製用タグであるビオチン基はペプチドとクロスリンカーの間に組み込むことで、ジアジリン光分解反応により共有結合で捕捉されたタンパク質をアビジン固定担体で濃縮し、続いて、このクロスリンカー桂皮酸ユニットのクマリン化反応により、アビジン精製担体にビオチン基やリガンドペプチドを残したまま、クマリン標識された標的タンパク質のみが切除/溶出されるように設計した。実際には、側鎖にビオチン基を導入したリシン (ビオシチン) を組み込み、さらにこの K(biotin)SSILRAFY 配列の N 末端に桂皮酸型クロスリンカーを導入したプローブ 1 を作製した (Figure 22)。

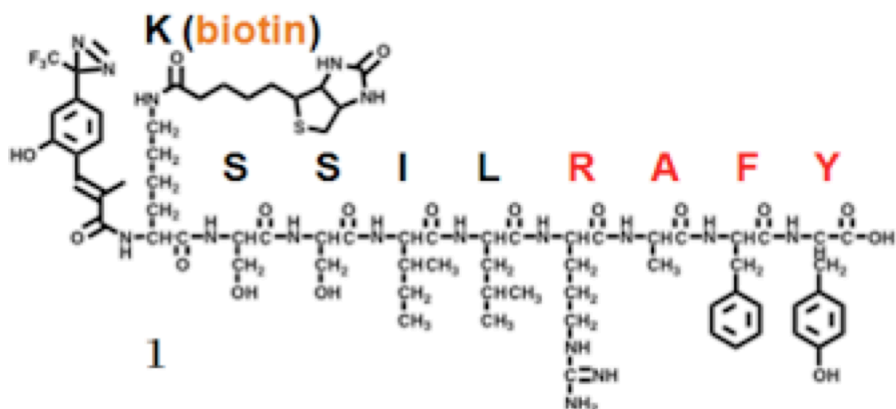


Figure 22. ペプチドプローブ 1 の構造



## 2-3: ペプチドプローブ 1 の合成

プローブ **1** は以下のスキームに従って合成した (Figure 23)。先行研究であるジヒドロキシ型桂皮酸誘導体の合成を参考にした<sup>47</sup>。フェニルジアジリンアルデヒド誘導体 **2**<sup>58</sup> を出発物質として、Wittig 反応を利用して1段階で基本骨格となる桂皮酸誘導体 **3** を得た。それを水酸化ナトリウムで加水分解し、縮合剤として 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide (EDCI) を用いて *N*-ヒドロキシスクシミドエステル **5** を作製した。一方、リガンドペプチドは Fmoc 固相合成法により自動合成機で作製し、脱保護した後、その固相に先の活性エステル **5** を溶液のまま精製せずに加え、振盪機により終夜反応させた。TFA で固相から切り出し、逆相 HPLC を用いて精製した。プローブ **1** は HRMS (ESI) により確認した。

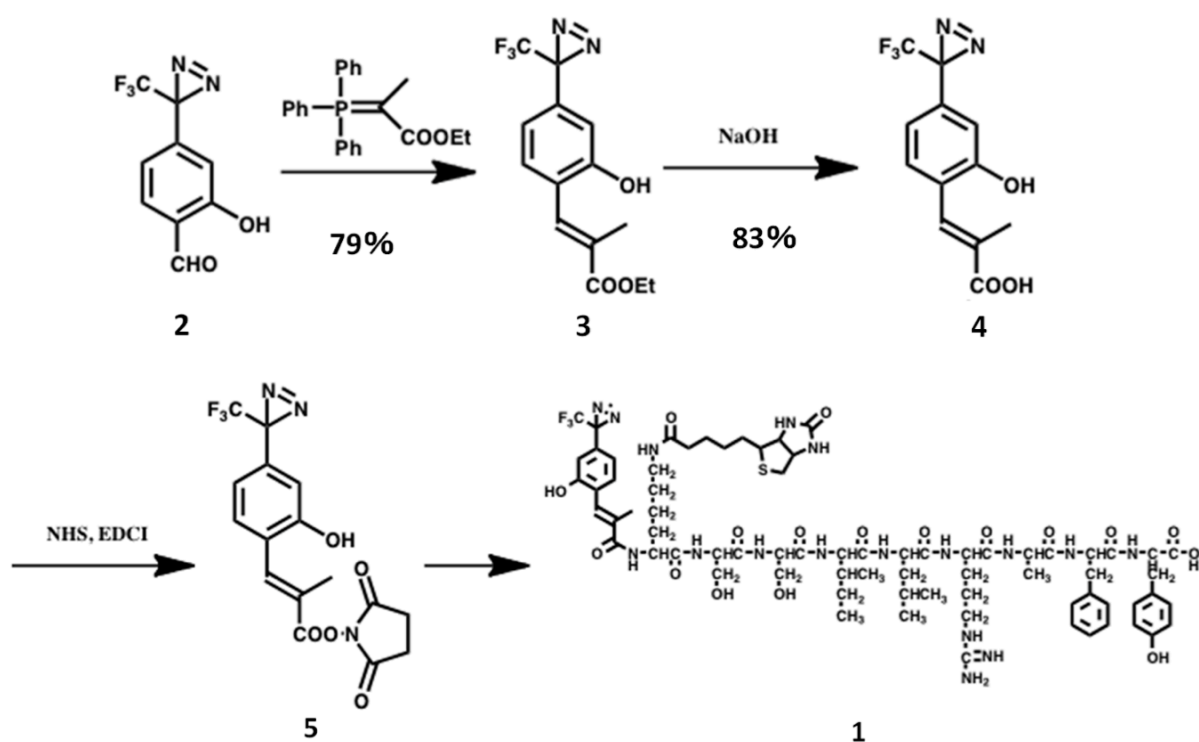


Figure 23. 光反応性ペプチドプローブ **1** の合成スキーム

## 2-4: ペプチドプローブ 1 の光特性評価

ペプチドプローブ 1 のジアジリン基の光分解について、紫外可視吸光度計を用いて追跡した。ジアジリン基はフェニル基と直交しており、波長 360 nm 付近に  $n-\pi^*$  遷移に基づく吸収をもつ。その光照射により脱窒素してカルベンを生じる。プローブ 1 を 33% 含エタノール水溶液 ( $H_2O:EtOH = 2:1$ ) に溶かし、タンパク質ラベルにおけるプローブ濃度に近い  $50 \mu M$  に調整した。これを石英セルに入れ、 $0^\circ C$ 、ブラックライトランプ ( $15 W \times 2$ 、最大波長 360 nm) で 5 cm 上から光照射を行ない、360 nm における吸光度を確認した (Figure 24)。照射時間に伴って吸光度の減少が確認され、10 分間の光照射で吸光度の変化がほぼ定常状態になり、ジアジリン基の分解を確認した。

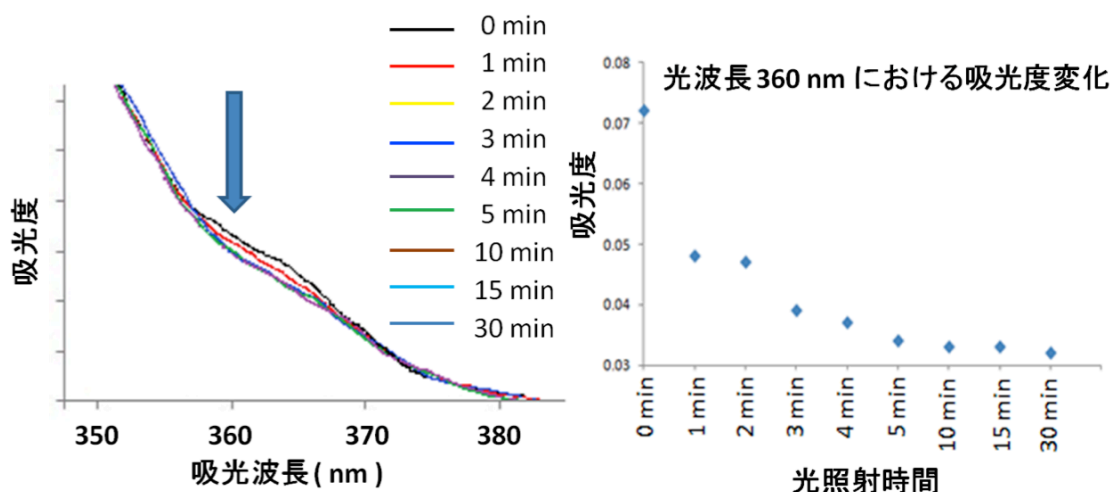


Figure 24. 光照射による吸光波長 360 nm における吸光度の時間変化

また、ジヒドロキシ型桂皮酸誘導体を用いた先行研究では、この反応基ユニットはジアジリン光分解波長である 360 nm の照射でも、効率は低いながらもクマリン形成を起こすことがわかっている<sup>47,55</sup>。ただし、この環化反応は実際のプローブや実際のタンパク質ラベル化ではほとんど進行しなかった。蛍光基形成時の分子内環化反応は求核的にフェノール性ヒドロキシ基が *E-Z* 異性化により構造的に接近したカルボニル基に攻撃することで起こるため、熱依存的に進行することが考えられた。そこで、桂皮酸骨格の  $\pi-\pi^*$  遷移吸収波長に近い 315 nm (30 W ブラックライトランプ、最大波長 315 nm) の光照射を室温条件下で行い、その蛍光基形成反応を追跡した (Figure 25)。

この結果、室温条件下での光照射で効率よくクマリン形成が起こることが分かった。しかし、クロスリンク条件下ではこの蛍光基形成反応が進行しないことが必要である。そこで、クロスリンク反応とクマリン形成/切断反応を制御すべく検討を行った。まずクロスリンク波長の光照射後に反応温度条件を変え、引き続き *E-Z* 異性化波長での光照射

射を行い、2つの光反応を調べた。プローブ1溶液 (50  $\mu\text{M}$  in  $\text{H}_2\text{O}/\text{EtOH} = 2/1$ , 石英セル) を調整し、最初に  $0^\circ\text{C}$  で 10 分間、360 nm 光照射を行った。反応温度を  $25^\circ\text{C}$  にして、さらに 315 nm 光を照射し、形成したクマリン由来の蛍光 ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$ ) の強度変化を、蛍光光度計を用いて追跡した (Figure 26)。

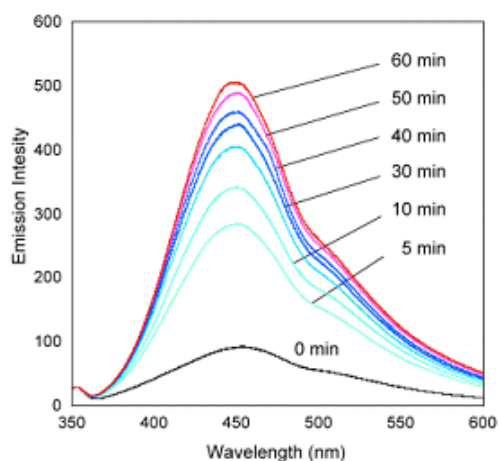


Figure 25. 室温条件下での 315 nm 光照射によるクマリン形成反応の追跡

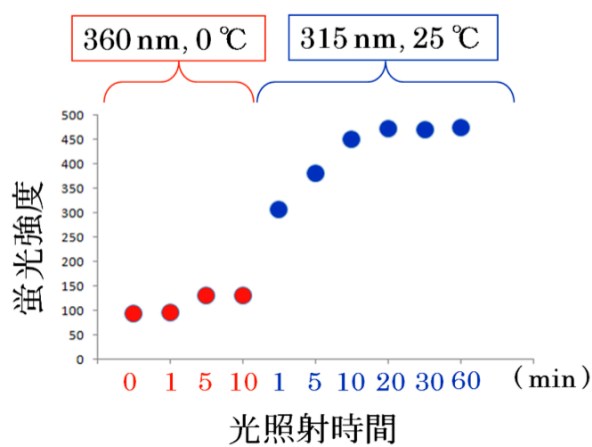


Figure 26. クマリン形成反応の光照射条件の検討

Figure 26 では  $15 \text{ W} \times 2$ 、360 nm,  $0^\circ\text{C}$  の条件下 10 min の光照射で蛍光強度変化はほとんど見られず、315 nm,  $25^\circ\text{C}$  の条件下での光照射で蛍光強度の著しい増加が確認された。この結果より、ジアジリン基によるクロスリンク反応進行条件ではクマリンはほぼ形成しない、あるいは進行が極めて遅いことから、2つの反応は温度により制御できることが分かった。これは同時期に行った別系でも確認されている<sup>55</sup>。次にこの条件でタンパク質の光ラベルを検討した。

## 2-5: ペプチドプローブ 1 を用いた GmVSR の光ラベル条件の検討

プローブ 1 において、クロスリンクと切断の 2 反応の制御が確認された。次に、ペプチドプローブ 1 による GmVSR の光アフィニティーラベルの検討を行った。プローブはビオチンを有することから、GmVSR とのクロスリンク反応をアビジン-HRP (horseradish peroxidase) を用いた化学発光検出法により追跡した。

### ・ ペプチドプローブ 1 による GmVSR の光クロスリンク

このペプチドプローブ 1 (2.0 pmol) を GmVSR (50 kDa, 2.0 pmol) に加え、20 mM HEPES-NaOH pH 7.0 緩衝液中、1 mM CaCl<sub>2</sub> 存在下、1 時間室温でインキュベートした。この GmVSR 溶液に 0 °C で、ブラックランプ (15 W×2、最大波長 360 nm) を用いて照射した。サンプル毎に照射時間を変えて、その経時変化を確認した (Figure 27)。光照射産物を室温変性後、SDS-PAGE で分離し、PVDF メンブレンに転写した。ビオチン化 GmVSR はアビジン-HRP を用いた化学発光法により検出した (Figure 27)。この結果、GmVSR に相当する分子量バンドにおいて発光が確認され、光照射により GmVSR がビオチン化すること、さらにその発光強度より、光照射時間に応じてラベル量が増加することを確認した。約 10 min の光照射でラベル量はプラトーに達し、30 min の照射サンプルとのラベル量の変化はほとんどなかった。従って、本評価系における光クロスリンク反応は 10 min の光照射で行うことにした。これ以降、この VSR とプローブ 1 による相互作用系におけるクロスリンク反応の光照射条件は、15 W×2、波長 360 nm, 0 °C, 10 min である。

また、プラトーに達した後、更なる光照射で発光量が減少しなかったことから、脱ビオチン化、つまりこの光照射条件で切断反応の進行は極めて遅いことが分かった。

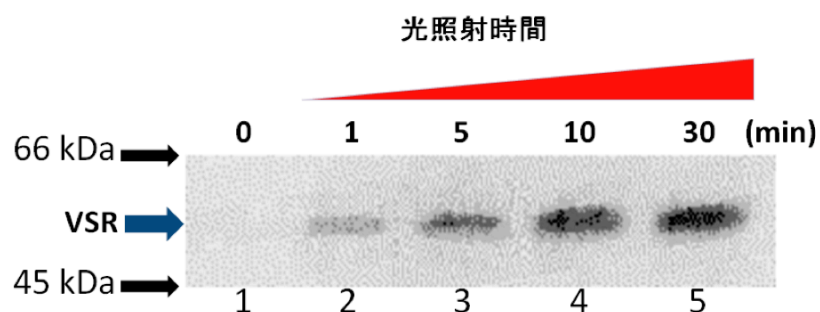


Figure 27. 光照射によるビオチン化 GmVSR の生成  
照射時間 : lane 1~5 順に、0 min, 1 min, 5 min, 10 min, 30 min

・光クロスリンク収率

ラベル収率は、市販されているビオチン化 BSA (アミノ基の 10%) の化学発光強度を基に算出した。同一ゲルに各種濃度のビオチン化 BSA とラベル化した GmVSR を SDS-PAGE 分離し、PVDF メンブレンに転写後に化学発光検出した。画像解析ソフトである Quantity One (BIO-RAD) を用いてその発光量を数値化した。Figure 28 の検量線から、ペプチドプローブ 1 による GmVSR ラベル収率は 4.6% であった。

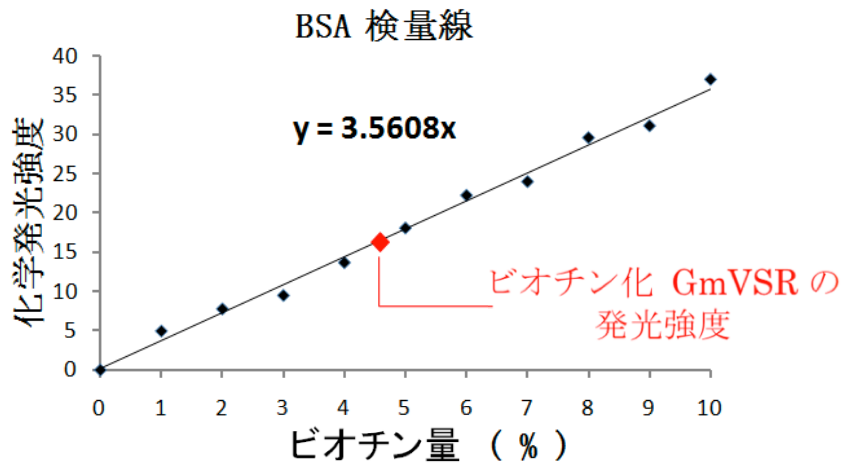


Figure 28. ビオチン化 BSA の検量線とラベル GmVSR の発光強度

・ GmVSR に対するペプチドプローブのシグナルペプチド結合部位への特異性の確認

次に、競合阻害実験によりペプチドプローブ 1 の GmVSR に対する特異性を検討した。阻害剤として同じシグナル配列の SSILRAFY を用いた。GmVSR と当量のペプチドプローブ 1、および SSILRAFY を 1~20 当量加えて室温でインキュベートした後、光照射した。これらのサンプルを前項と同様にアビジン-HRP を用いて化学発光検出した (Figure 29)。

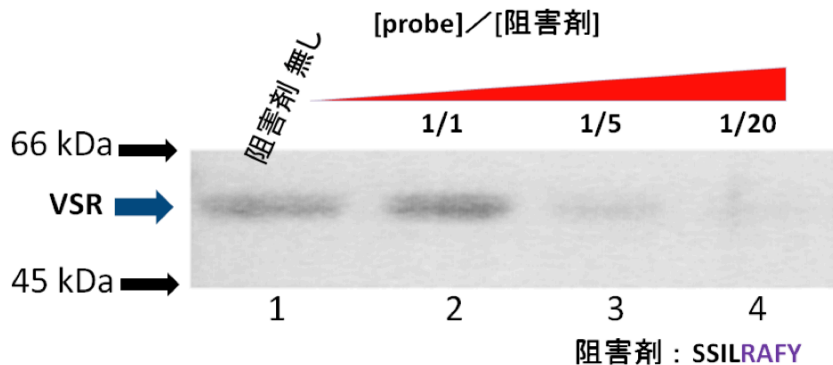


Figure 29. 阻害剤濃度に依存したラベル量の減少  
照射時間 : lane 1~4 順に、阻害剤なし、阻害剤濃度 1 倍、5 倍、20 倍

阻害剤を加えなかった lane 1 に比べて、lane 2, 3, 4 では阻害剤濃度に依存して発光強度が減少した。このことからプローブと SSILRAFY は競合的に相互作用し、ペプチドプローブ 1 は GmVSR の配列認識部位に特異的に結合することが示唆された。そこで次に、主要な認識配列とされる RAFY の各残基を1つずつグリシン (G) に置換したペプチド、さらに C 末端をアミドにしたペプチドを作製し、これらを用いた阻害実験を行い、プローブ 1 の特異性を確認した。競合阻害剤として各種ペプチドを 1~25 倍当量加えて、先と同様に光照射した後、その化学発光量を比較した。Figure 30 はその阻害効果の結果を示した。

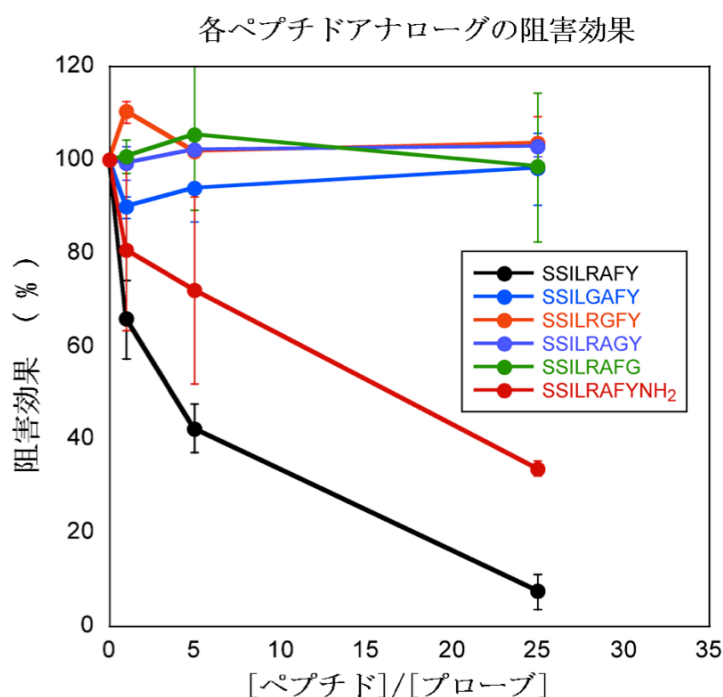


Figure 30. シグナルペプチドアナログを用いたプローブ阻害効果

この結果より、RAFY の 1 残基を G に置換したペプチドは、このペプチドプローブ 1 に対してほとんど阻害効果を示さないことが分かった。ただし、C 末端をアミド化した SSILRAFY-NH<sub>2</sub> は C 末端がフリーのものと比較してやや弱いものの十分に阻害効果を示すことが分かった。C 末端にこれらのペプチドを融合させた GST (glutathione S-transferase) を用いた先の SPR 解析研究において、RAFY 配列のうち、R 残基を改変したものは一切結合を示さず、その他の 3 残基を改変したペプチドも弱い結合しか示さない。本来の RAFY 配列を発現させた GST のみが GmVSR と強く結合することが確認されている<sup>47</sup>。本研究での阻害実験の結果はこれらの SPR 結果にほぼ一致してした。また C 末端をアミドにしたものでも結合することがわかった。これは、先の SPR による結果と同様に、

**GmVSR** は **RAFY** 配列に強く結合することを示している。この結果より、タンパク質 C末端ペプチドでなくても、**GmVSR** はこの配列のペプチドを特異的に認識することが示された。シグナルペプチド認識部位の解析に本プローブは有効であることが証明された。

## 2-6 : GmVSR の脱ビオチン化と蛍光化

プローブ **1** の切断反応は温度により制御出来ることがわかった。次に、2段階目の蛍光基形成反応について、VSR の脱ビオチン化による化学発光量の減少と蛍光基形成による蛍光強度の増加を、照射時間で追跡し評価した。ビオチン化 GmVSR はメンブレンブロッキング後にアビジン-HRP による化学発光で検出し、クマリン化 GmVSR は SDS-PAGE 後にゲル上で蛍光発光強度を検出した。

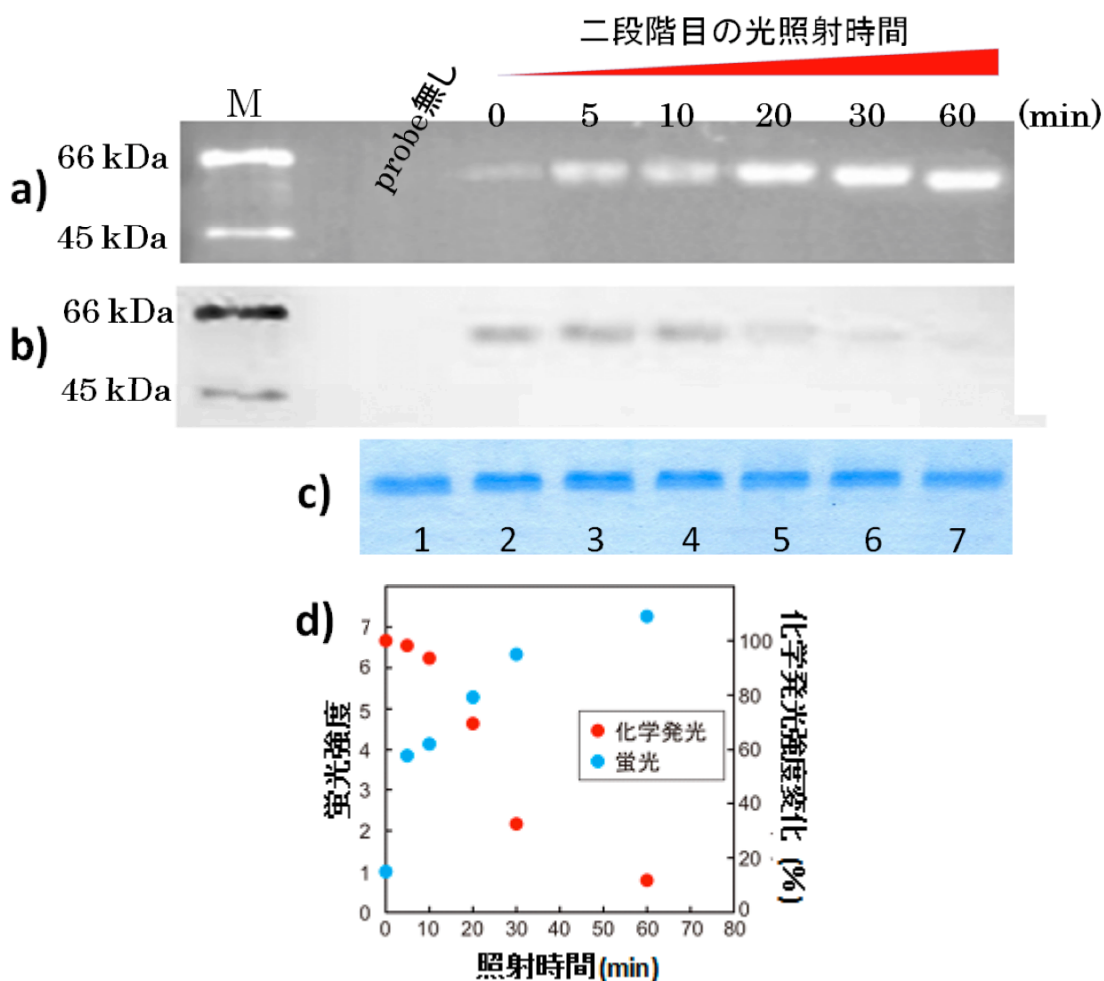


Figure 31 : ラベル GmVSR の検出と 315 nm 光反応の経時変化

a) PVDF 膜の蛍光検出 (上)、b) 化学発光検出 (中)、c) CBB 染色 (下)

2段階目の照射時間 : lane 1~7 順に、probe なし、照射時間 0, 5, 10, 20, 30, 60 min

d) 光照射時間と GmVSR 由来の蛍光と化学発光の変化

GmVSR と等量のペプチドプローブ **1** を加えて室温でインキュベートし、1段階目の光照射 (ブラックランプ 15 W×2, 360 nm, 10 min) を行った後、2段階目の光照射 (315 nm, 25 °C, 0~60 min) を行ない、この経時変化を化学発光および蛍光検出 ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) で確認した。Figure 31 に蛍光検出 (上段 panel a)、化



学発光 (中段 panel b)、CBB 染色 (下段 panel c) の結果を示した。また、Figure 31d にこの蛍光強度変化および発光強度変化を数値化してプロットしたものを示した。

Figure 31 より、315 nm の光照射時間に比例して GmVSR の蛍光化反応が進行し、それに伴ってビオチン標識が切除されることを確認した。60 分間照射した後では、ほぼビオチン化 GmVSR は消失したことから、室温では環化反応が効率よく進行し、ほぼ完了することが示された。

ただし、315 nm 光照射を行っていないサンプル (lane 2) でもわずかに蛍光が検出された。これは SDS-PAGE 中にゲル温度が上がり、生成した Z 体が環化したものと考えられる。別途、OH free 型の桂皮酸エステル (第 2 章 2 節) を用いて E-Z 異性化の波長依存性を検討した。キセノン光源 (朝日分光 100W LAX-103) を用い、各種バンドパスフィルター (FWHM 10 nm、300, 320, 340, 360, 380 nm) を通して照射し、 $^1\text{H}$  および  $^{19}\text{F}$ -NMR により確認した。その結果、低分子では E-Z 異性化は上記波長範囲で進行することが分かり、360 nm ではジアジリン分解と同時に起こることが判明した。この結果はリガンド分子がタンパク質に結合した状態でも光異性化は起こす可能性を示しているが、その量は lane 2 から最大 10% と低いレベルと考えられる。このサンプルと lane 3 の 2 段階目の光照射 (315 nm, 25 °C) を行なったサンプルの蛍光基形成速度を比較すると、後者の条件は著しい蛍光強度の増強 = クマリン形成反応が進行しているのに対して 1 段階目の光照射条件では蛍光基形成はわずかであることがわかる。これは Figure 26 で示した、プローブの温度依存性と同じ結果であった。360 nm 光照射でも E-Z 異性化 ( $E/Z = \text{ca. } 2/1$ ) を起こし、*o*-ヒドロキシ基が存在すると環化により平衡がずれクマリン生成が進行することを考慮すると、ドメインに結合しているプローブでは、E-Z 異性化が抑えられており、Z 体でも 0 °C での環化反応の進行は極めて遅いと考えられる。以上のことから実際のタンパク質系においても 1 段階目光照射条件下では蛍光基形成反応の進行は非常に抑えられていると考えられ、タンパク質上でビオチン標識反応と蛍光基形成による標的蛍光化の制御が可能であることが示唆された。

## 2-7: 光切断を利用したビオチンラベル標的の単離・精製手法への展開

次に前述の2つの反応を利用して、ラベル標的タンパク質の単離・精製の検討を行った。光クロスリンクによりビオチン標識した GmVSR をアビジン固定担体に保持し、この担体を洗浄後、2段階目の光照射により GmVSR を担体から切断した。まずペプチドプローブ 1 の光クロスリンクにより GmVSR (2 nmol, 100 µg) をビオチン標識した。このビオチン標識 GmVSR を SDS サンプル溶液で室温変性後、透析により非ラベルプローブ等の小分子を除去し、アビジン-agarose を加えて 25 °C でインキュベートした。この担体を 0.2% SDS/HEPES buffer 2 回、HEPES buffer 2 回、水 3 回で洗浄した後、25 °C で1時間光照射を行ない、その上清を蛍光光度計で測定したところ、クマリン由来の蛍光が確認された (Figure 32)。

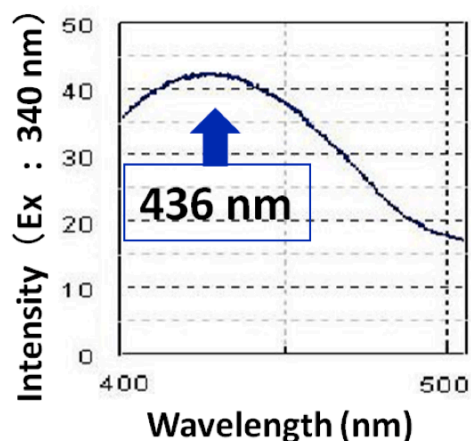


Figure 32: 溶出 GmVSR の蛍光

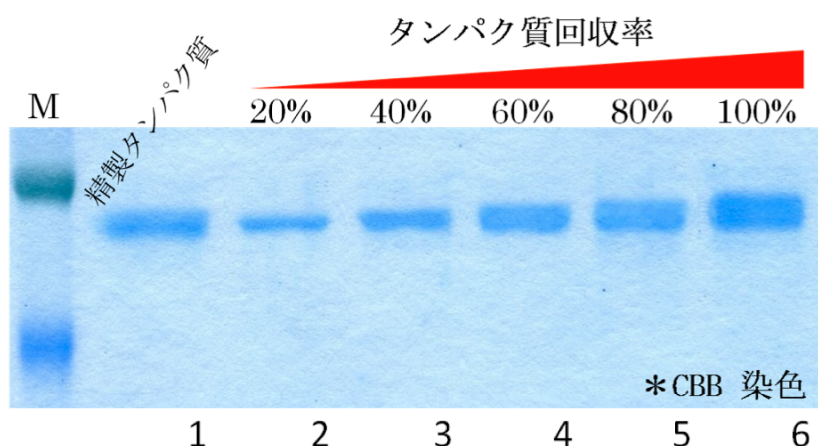


Figure 33: 蛍光化 GmVSR の溶出効率

lane 1: 蛍光化 GmVSR (1/5 量), lane 2 から GmVSR 4.0, 8.0, 12.0, 16.0, 20.0 pmol  
GmVSR クロスリンク収率から概算した量: 20%~100%

担体より遊離した蛍光化 GmVSR を SDS-PAGE で分離し CBB 染色した。非ラベル GmVSR との比較により、単離された蛍光化 GmVSR のおおよその相対量を求めた (Figure 33)。ラベル収率約 5% から計算するとビオチン化 GmVSR の量は 100 pmol, 5.0  $\mu\text{g}$  であることから、クマリン化 GmVSR を効率約 60% で精製担体から切断回収することに成功した。ビオチン-アビジンを利用した汎用精製法では、SDS 存在下煮沸することで溶出する。これに比べ本法では温暖な条件下で溶出でき、担体表面の非特異的吸着物質の溶出を抑えることが可能と思われる。しかも、光切断溶出は極めて選択的であり、細胞に内在するビオチン化タンパク質もアビジン担体に捕捉されることから、それらの溶出を回避できることも、大きな特長の 1 つと考えられる。

## 2-8：精製クマリン化 GmVSR の消化フラグメント解析

次に精製したクマリン化 GmVSR を消化し、HPLC 及び MS によるラベルペプチド解析を実施した。GmVSR (10  $\mu\text{g}$ , 0.2 nmol) を光クロスリンク反応によりビオチン標識した後、DTT (dithiothreitol) 及びヨードアセトアミドを遮光下で反応させてシステイン残基側鎖チオール基の還元アルキル化を行った。透析により失活したプローブ及び反応試薬等を除去した後、アビジン-agarose と室温でインキュベートした。前項の操作に従い処理した後、光照射によりクマリン化 GmVSR を溶出し、リシルエンドペプチダーゼ溶液を加えて 37  $^{\circ}\text{C}$  で 24 h インキュベートした。この消化サンプルの HPLC プロファイルを示した。

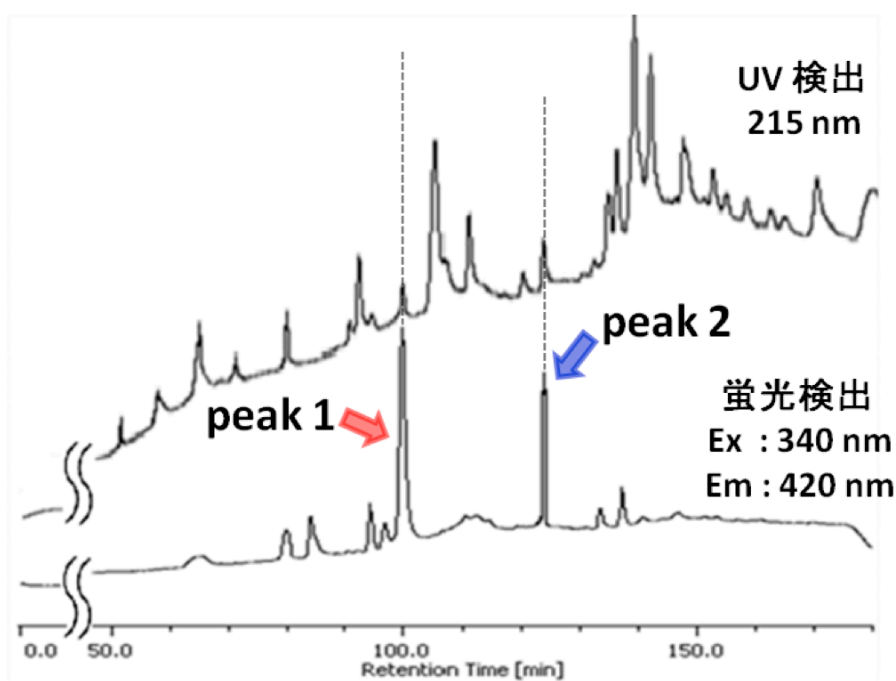


Figure 34 : GmVSR 消化産物の HPLC 分析

波長 215 nm の吸光度検出 (Figure 34, HPLC プロファイル上) では多くのフラグメントペプチドを確認できた。同時にクマリン由来の蛍光 ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 420 \text{ nm}$ ) を検出したところ、主要ピークとして、溶出時間 98.7 min, 123.8 min に2つの蛍光ピークが確認された (HPLC プロファイル下)。これら蛍光ピークと同じ保持時間には吸光度検出でもピークが現れた。ただし、蛍光 peak 2 は 1 よりも小さいにもかかわらず、該当する吸光度検出によるピークは 1 に該当するものよりも大きい。つまり、少なくとも peak 2 は夾雑物の混入が疑われた。これら peak 1, 2 を分取し、ESI-MS および MS/MS 解析を行った。

以下に peak 1 (MS: Figure 35, MS/MS: Figure 36) と peak 2 の質量解析結果 (MS: Figure 37, MS/MS: Figure 38) を示す。

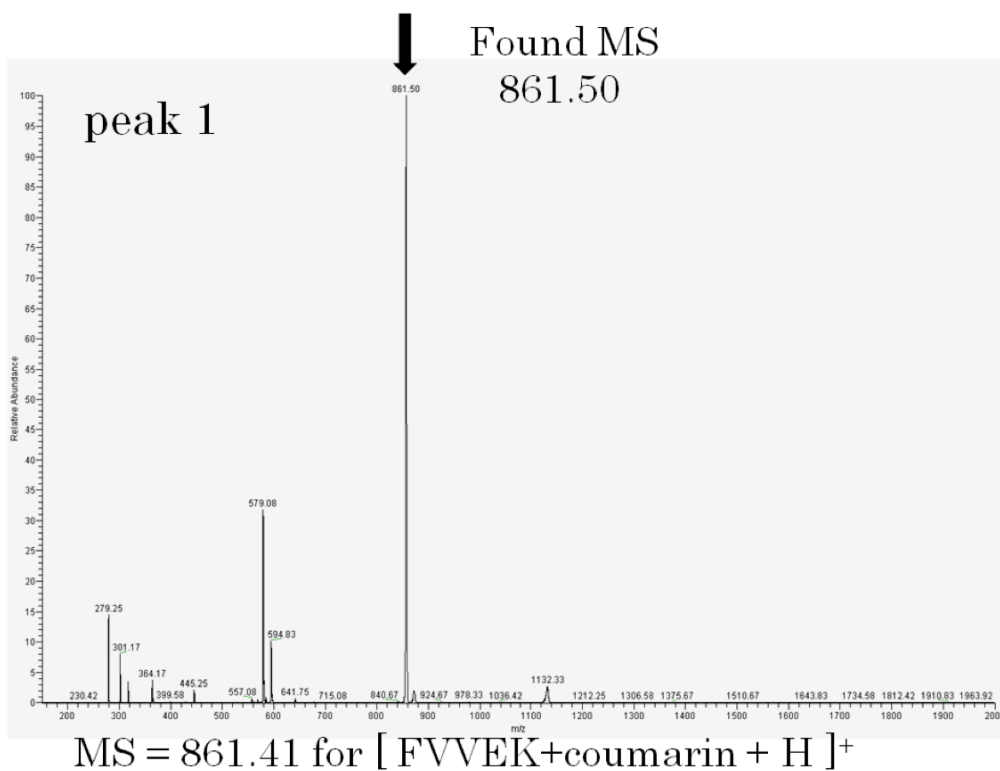


Figure 35. peak 1 の ESI-MS (positive)

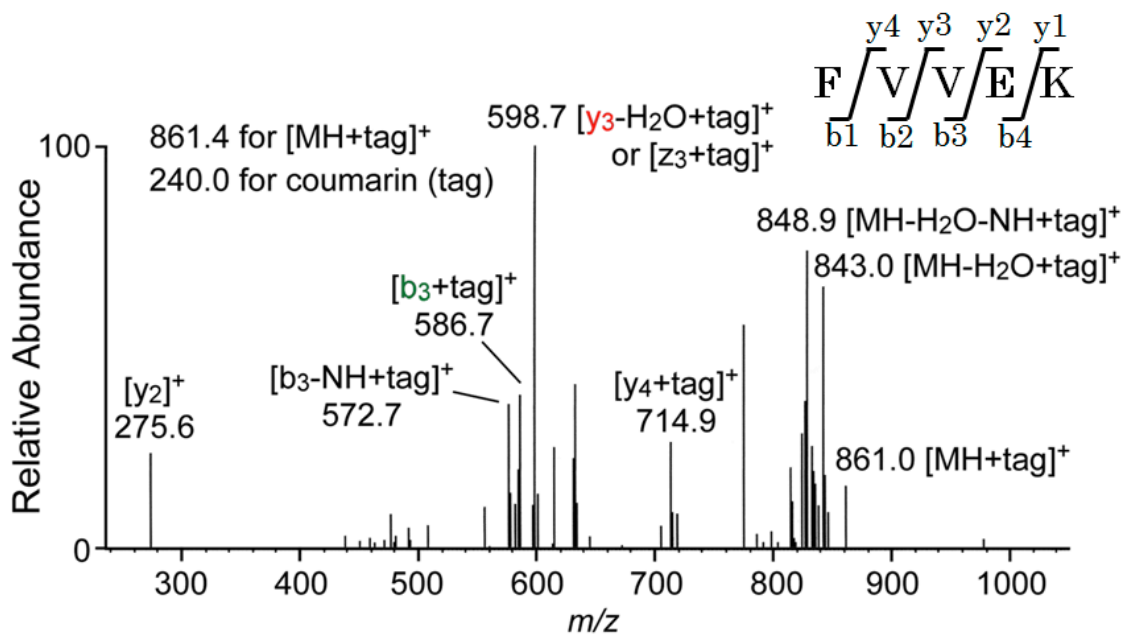


Figure 36.  $m/z = 861.50$  MS ピークの MS/MS

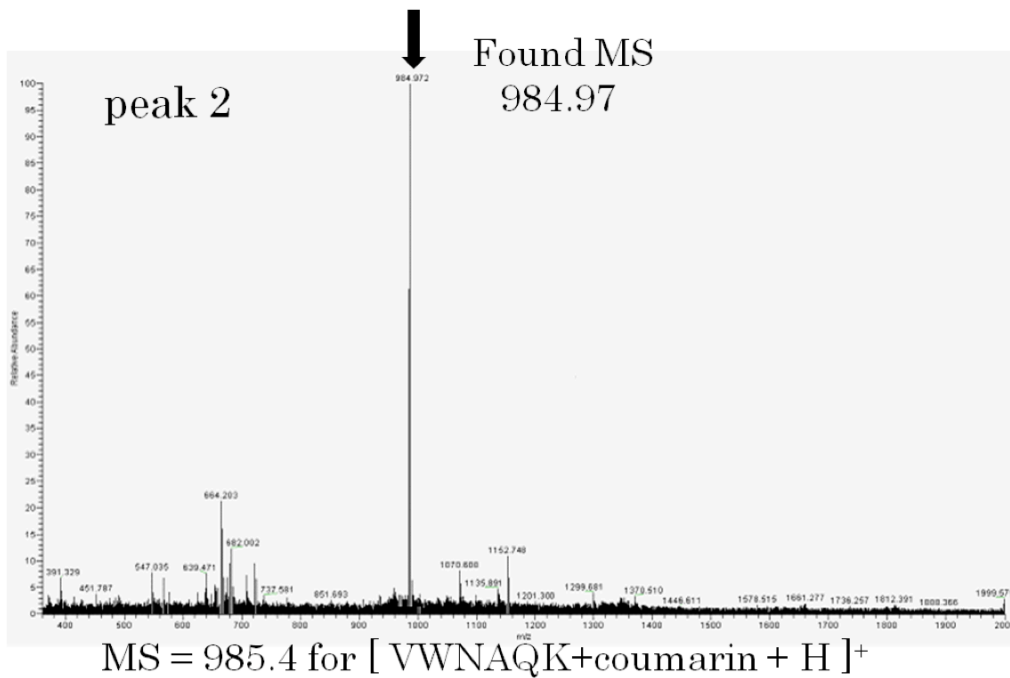


Figure 37. peak 1 の ESI-MS (positive)

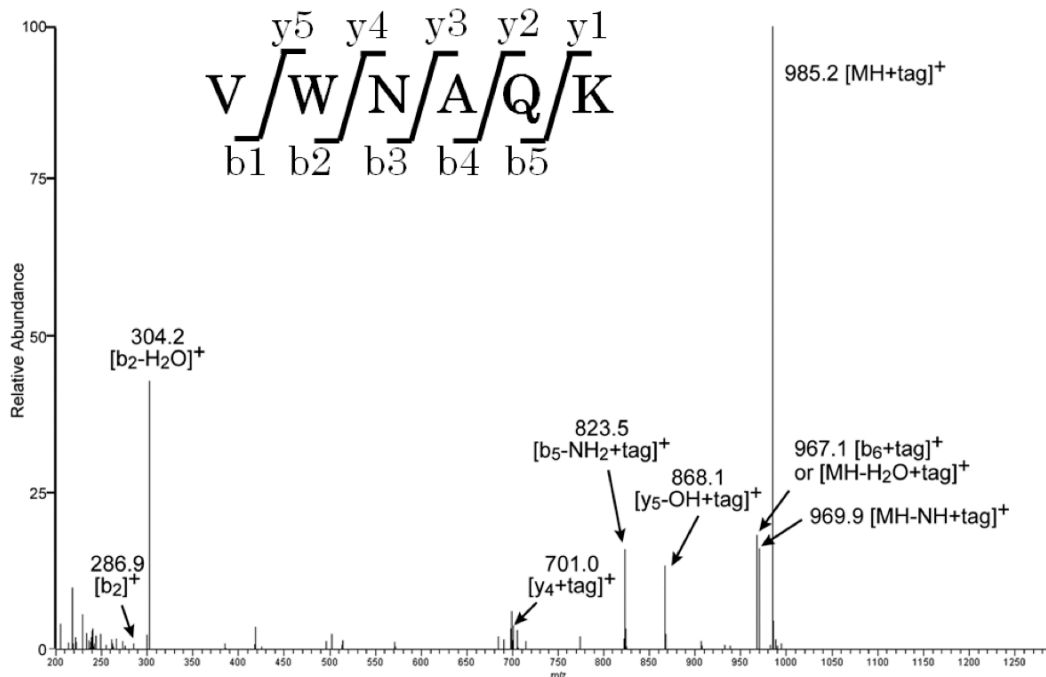


Figure 38.  $m/z = 984.97$  MS ピークの MS/MS

まず、peak 1 の ESI-MS 解析 (Figure 35) には主要ピークとして 861.50 ( $m/z=1$ ) が検出された。つまり、GmVSR のクロスリンク収率は 5%と低いものであったが、その GmVSR をアビジン精製で効率よく捕捉し濃縮できたことが示された。つまり、精

製タンパク質であれば容易に蛍光検出でラベルペプチドを特定できることを示している。これまで、いくつかの対照実験を行い、その僅かな差からラベルペプチドピークを推定し、MS やエドマン分析で特定するという操作を繰り返す。本法ではクマリンがラベルされているため独特の蛍光を検出することで標的ペプチドを容易に特定することが出来た。その結果、GmVSR に存在する Phe2~Lys6 部分 (FVVEK) がラベル化されたと推定された。次に、このピークを MSMS 解析したところ Figure 36 に示す MSMS プロファイルが得られ、フラグメント MS の解析から同配列であることが示された。また、y3 イオンピークにおいてはクマリンが導入されており、b3 イオンピークにおいてもクマリンが導入されている MS が得られたことから、Val4 残基がそのラベル部位と同定された。

同様に peak 2 についても MS 解析した結果 (Figure 37)、GmVSR 中に存在すると Val85~Lys90 配列にクマリンが導入されたと予測される MS ピークが検出された。このピークには夾雑物を含んだが、その LC 溶出時間を区切り詳細に解析したところ、Figure 38 に示す MSMS が得られ、それを分析したところ VWNAQK 配列にラベル化されたことが特定された。さらに y4 イオンピークにおいてはクマリンが導入されており、y2 イオンピークにおいてはクマリンが導入されていないことから、Asn87 あるいは Gln88 配列がそのラベル部位だと分かった。

次にこれらのラベル部位について考察する。GmVSR の一次配列情報から Figure 39 に示す二次構造予測を行い、この2つのラベルサイトをマッピングすると (赤枠)、シート構造とヘリックス構造と予測される部分であると予測された。



Figure 39. GmVSR の二次構造予測と 2つのラベルペプチド

また、この2つのラベルサイトは共に N 末端側にあり、これらのことからこの N 末端部位周辺が何らかのドメインを構成してこの二つのラベルペプチドが接近している立体構造になっているのではないかと考えられる。現在、京大・丸山博士等により、このラベル近傍部位のポイントミュートーションなど生物的解析が進められている。この桂皮酸型クロスリンカーを組み込んだラベルペプチド同定解析法は同時に2つのラベルペプチドを解析することができた。ラベルペプチドを対照実験により比較する従来手法とは異なり、ラベルタンパク質の濃縮と高感度検出蛍光基を同時に達成する本手法は、瞬時に視覚的に微量ラベルペプチドの判別が可能となった。従来手法では主要な1つのラベルピーク以外は判別できなかったが、このようにマイナーラベルピークの解析も可能となり、複数ラベルペプチドを同時に解析することができる本手法の確立は、より多くの結合部位情報が得られるものと考えられる。



## 2-9：小括と考察

本章では、蛍光イメージング試薬として開発された桂皮酸クロスリンカーを、ラベルペプチドの同定解析に応用した。この桂皮酸クロスリンカーを導入したプローブは、リガンド部位を解離しながら蛍光基を形成する。この切断機能をラベル標的タンパク質の精製・濃縮に有用であったビオチン-アビジンシステムに取り入れ、問題点の1つであったラベルタンパク質の溶出において、光照射と室温程度の温和な条件でラベル標的のみを選択的に溶出することを可能にした。しかもこの溶出時に、蛍光基クマリンがリガンド結合部位近傍に導入される。この蛍光基導入によりラベルペプチドを高感度に検出する差別化は、対照実験によるラベルペプチドの比較を必要としないため操作が著しく簡便になった。このようにラベルタンパク質の選択的溶出とラベルペプチドの蛍光差別化による直接的しかも連続的な解析を可能とした本手法により、標的の同定解析の大幅な時間短縮が達成された。また、従来では数 mg のタンパク質が解析に必要であったのに対し、本解析手法においては 10  $\mu\text{g}$  で解析可能であった。必要サンプルの微量化は膜タンパク質を始めとする微量発現タンパク質等の解析にも有意であると思われる。

### 第3章 タンパク質混合系を用いた同位体導入型蛍光ラベル法の検証

前章では、単一タンパク質において、この桂皮酸クロスリンカーの切断性を利用したラベルタンパク質精製と標的ペプチドへの蛍光基導入により、従来法では困難であったラベルペプチド配列解析を、短時間でしかも少量で完了できた。その結果、本戦略がリガンド結合部位解析に非常に有効であることが証明された。しかし、本評価系でのタンパク質一次配列は既知であり、その情報から標的 MS ピークの判別は容易であった。ただし、MS/MS によるラベル残基の同定は未だ複雑であり、多くの微小ピーク解析を含めた試行が必要であり、5 mer ペプチドにもかかわらず長時間の解析となった。しかし本来、未知標的や、蛍光ピークに多くの夾雑フラグメントが重なる場合などでは、解析の更なる煩雑化は不可避であり、極めて複雑なプロテオームにおいて、未特定の微量標的タンパク質をビオチン精製と蛍光特性だけで区別することは難しいと予想された。

そこで、MS タグを導入して MS 解析を有利にすすめることを考えた。近年、質量解析技術はハードウェア、ソフトウェア共に著しい進展をみせており、タンパク質 MS データの蓄積と共に、PMF 解析の精度向上だけでなくプロテオーム解析法なども確立されつつある。特に、1999年に ICAT (isotope-coded affinity tag) 法が報告されてから<sup>59</sup>、同位体を用いた定量プロテオミクス (*in vivo* 同位体標識法<sup>60</sup>、ICAT)や MS/MS 分解タグ (tandem mass tag<sup>61</sup>、isobaric<sup>62</sup>、IsoStamp<sup>63</sup>)を利用した MS 同定法が著しい展開を見せた。そのため電気泳動による精製したペプチドの分子量解析あるいは Edman 分解法による配列解析に代わり、ラベルペプチドの直接的な MS 解析・同定法が現在の主流になっている。本系では、ラベル MS ピークの多重化戦略を本桂皮酸型光クロスリンカーに組み込むことにした。HPLC でのラベルピークの蛍光検出に加え、この MS 二重化を組み合わせることで、HPLC である程度精製できれば、蛍光ピーク中に含まれる夾雑物由来の多くの MS ピークからラベルピークを視覚的に判別しやすくなり、特定操作を繰り返すことなく、通常の LC-MS 操作を行うだけでそのまま標的ペプチドの絞り込みが可能と考えた。

本章では、前章で用いたクロスリンカーを基本骨格として、同位体を組み込んだ桂皮酸クロスリンカーを開発した。さらにそれを導入した2種類のプローブを作成し、人為的に調整したタンパク質混合物に用いてラベルペプチド解析効率を評価した。

### 3-1: プローブの設計

本光反応基は、汎用クロスリンカーであるフェニルジアジリン骨格に二重結合を1つ加えた、非常にコンパクトな構造である。さらにこれ自体が蛍光団に変化するため、予め蛍光団を持たないユニークな蛍光ラベル化剤である。これはラベル法の欠点である、反応基や標識によるリガンドの特異性低下を最小限に止めている。もとより多くの蛍光団は構造が大きく不安定であることから、光ラベル法における蛍光性クロスリンカーは例が少ない。従って、新たな機能を加える場合、上記利点を考慮し、反応基の肥大化や合成の煩雑化を抑えるよう設計した。

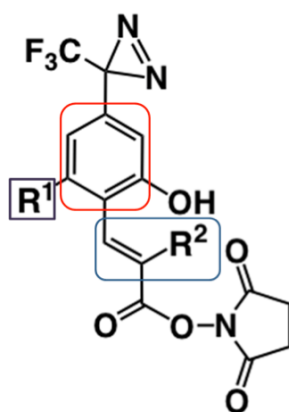


Figure 40. 桂皮酸クロスリンカーユニットの同位体導入

新しい同位体機能は、標識としてタンパク質に付与される桂皮酸骨格内に導入する必要がある。これは反応基構造を肥大化することなく新機能を付与できることからアフィニティーラベルには都合がよい。Figure 40 に同位体導入カ所の候補を示した。まず、既にジヒドロキシ桂皮酸誘導体を保有していることから、R<sup>1</sup> 部位に重水素化したアルキル鎖の導入が考えられる。しかし、第2章2節に記載したようにジヒドロキシ桂皮酸誘導体のジアジリン分解速度は遅く、光クロスリンク効率の低下が予測されるため、この部位への導入は回避すべきと考えた。次に、フェニルジアジリン骨格内の芳香環の重水素化が考えられる。しかし、この方法では最初の原料から変えることになり、多段階の反応を経ることから時間とコスト的に、また質量差 3 u は小さく差別化として不利であると考えた。そこで桂皮酸オレフィン部位の R<sup>2</sup> への導入を考慮した。以前の研究より、このカルボニル基  $\alpha$  位へのアルキル基導入は環化反応効率を向上することが明らかになっており、しかもジアジリンの反応性にほとんど影響を与えない。さらに、合成中間体から1ステップで重水素化桂皮酸骨格が合成可能なことも有意であることから (Figure 41)、重水素化したアルキル基をこの部位に導入することにした。

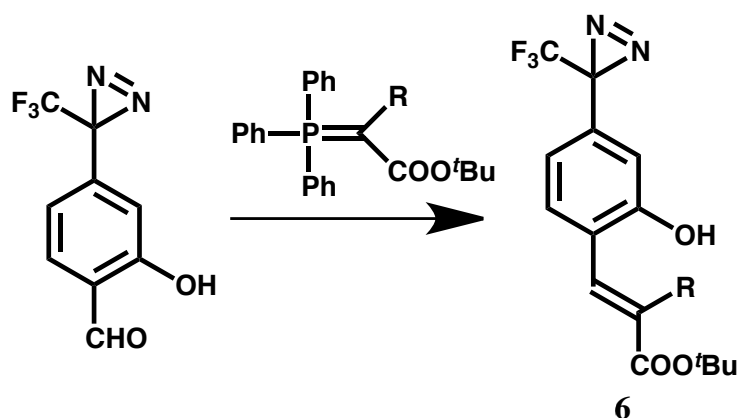


Figure 41. 桂皮酸骨格への同位体導入

次に、同位体タグの設計では、大きさ、質量差、光反応における安定性やコストを考慮し、同位体元素として重水素を選択した。重水素の導入数によって二重化するピークの質量差が決まるが、メチル基と重メチル基では質量差 3 u であり、ペプチド本来の同位体ピークパターンに埋没すると予想される (Figure 42)。一方、長鎖アルキル基ではクロスリンカー構造の肥大化を招きリガンドの親和性に影響する。今回、解析しやすい最小限のアルキル基である、エチル基および重水素化エチル基を選択した。この質量差 5 u は、後述の MS/MS による *de novo* シーケンス解析にも有意と考えた。

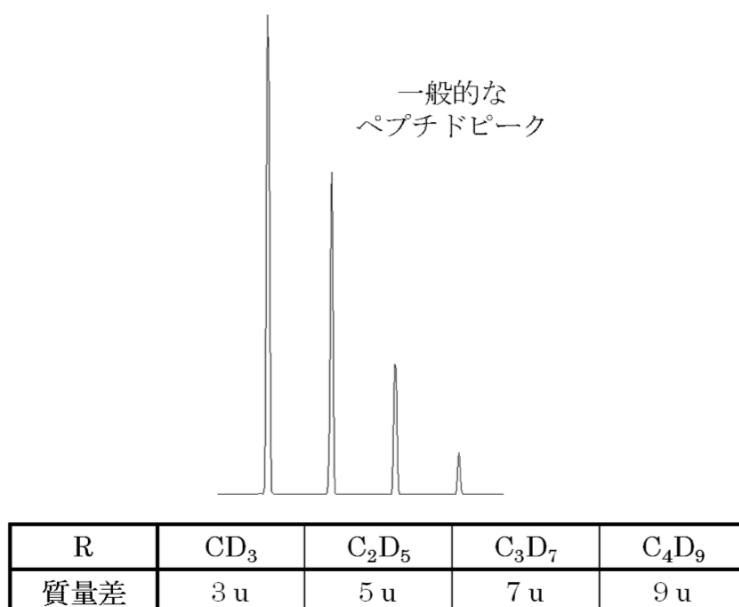


Figure 42. 一般的なペプチド MS ピークと重水素化アルキル鎖の同位体質量差

### 3-2: ビオチンプローブ 8 の合成

今回、この同位体導入型桂皮酸クロスリンカーの効率、つまり蛍光特性に同位体機能を加えた二重差別化による解析効率について、タンパク質混合系を用いて評価した。解析評価には相互作用の特異性が高く、結合構造が明らかであるビオチン-アビジン系を採用し、ビオチンに上記光反応基を導入したプローブ **8a, b** を設計した (Figure 43)。基本的な合成戦略は Figure 23 に示したペプチドプローブと同じである。前述したとおり、基本的な桂皮酸骨格は Wittig 反応により 1 段階で合成した。TFA による脱保護を経てカルボン酸体を作製し、ビオチンにはエチレンジアミンリンカーを介して導入した。重水素化エチル体も同様のルートにて合成した。

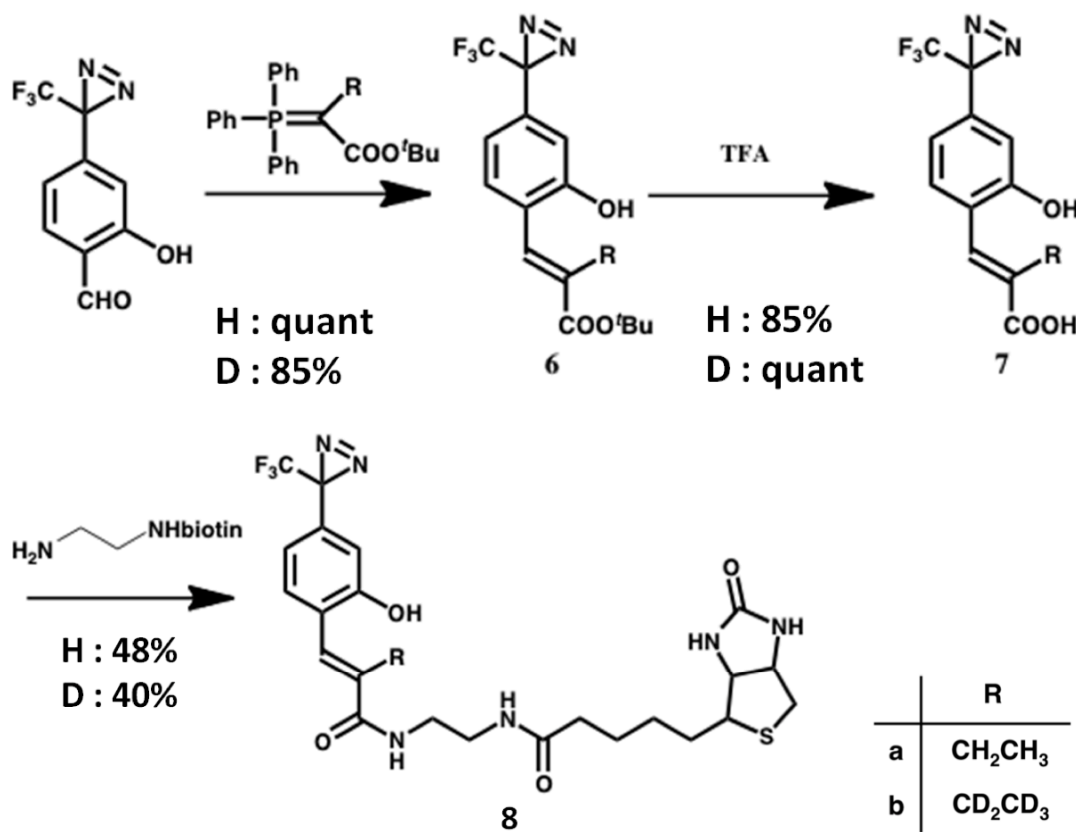


Figure 43. ビオチンプローブ 8 の合成スキーム

### 3-3：タンパク質混合系におけるアビジンの光ラベル解析

標的タンパク質であるアビジンに加え、トランスフェリン (90 kDa), BSA (66 kDa), 炭酸脱水酵素 (30 kDa) を同量ずつ混合したタンパク質溶液を調整し、評価系とした。5%DMSO-水溶液にビオチンプローブ **8a**, **8b** をモル比 1 : 1 で混合したプローブ溶液 (総濃度として 10  $\mu$ M) を調整し、これを stock 溶液とした。このプローブ **8a** と **8b** (各 5 pmol) を混合タンパク質溶液 (各タンパク質 10 pmol) に加え (10  $\mu$ L)、37 °C で 2 h インキュベートし、光照射 (250 W 高圧水銀ランプ、波長 360 nm : バンドパスフィルター (FWHM 10 nm)、0 °C, 15 sec) を行った。このサンプルを DTT により 57 °C で還元後、ヨードアセトアミドを加えてアルキル化した。限外ろ過を行ってプローブおよび変性剤、アルキル化剤を除去し、クロスリンク産物を精製することなく、37 °C で 2 段階目の光照射 (光源 250 W 高圧水銀灯ランプ、波長 360 nm : バンドパスフィルター (FWHM 10 nm)、15 min) を行い蛍光化した。この溶出サンプルを trypsin および Lys-C 消化酵素を用いて消化し、そのフラグメントを HPLC を用いて蛍光分析した (Figure 44a)。

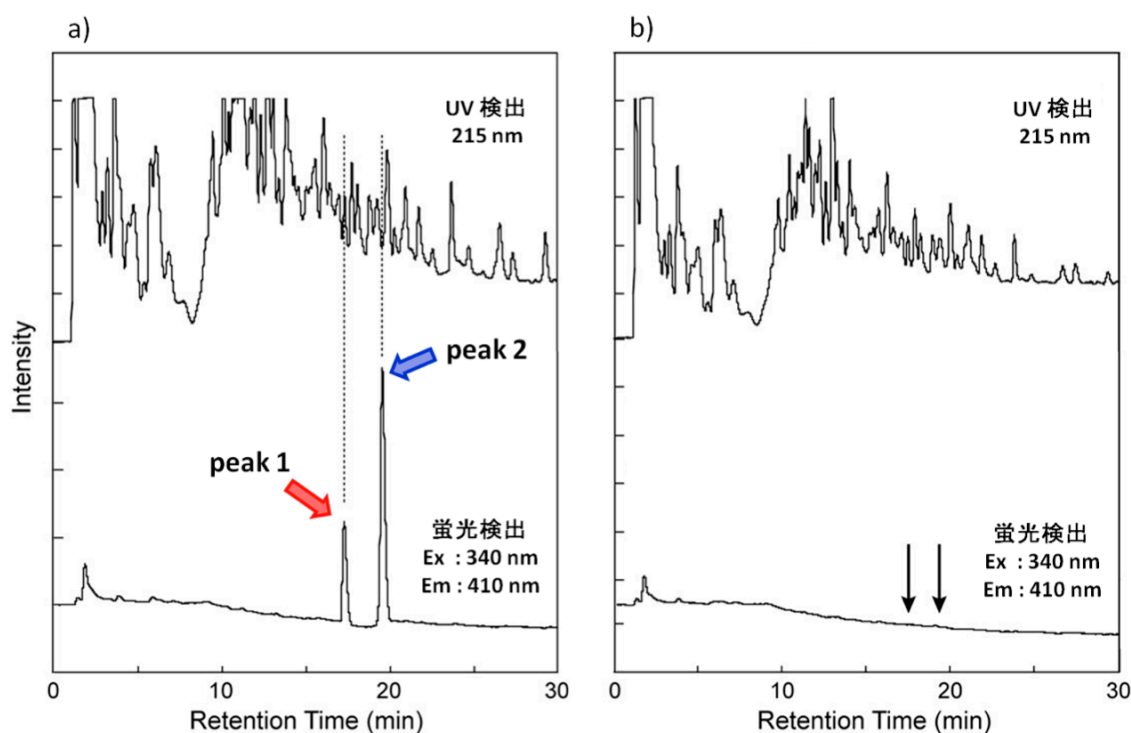


Figure 44. 4 タンパク質光照射/消化産物の HPLC プロファイル

a) プローブ **8a**, **8b**、b) プローブ **8a**, **8b** + ビオチン

同様に対照サンプルとして、このプローブ **8a** と **8b** (各 5 pmol) および阻害剤としてビオチン 5%DMSO-水溶液 (30 pmol, 3eq.) をタンパク質溶液 (各タンパク質

10 pmol) に加え、同様の操作を行い、その消化フラグメントの HPLC プロファイルを示した。Figure 44a では2つの蛍光ピーク peak 1 と peak 2 がそれぞれ 17.3 min、19.5 min に検出された。これらのピークはビオチン添加により消失した (Figure 44b)。プローブ 8a および 8b はビオチンにより阻害されたことから、特異的にビオチン結合部位に結合し、その近傍をラベル化していることが示唆された。

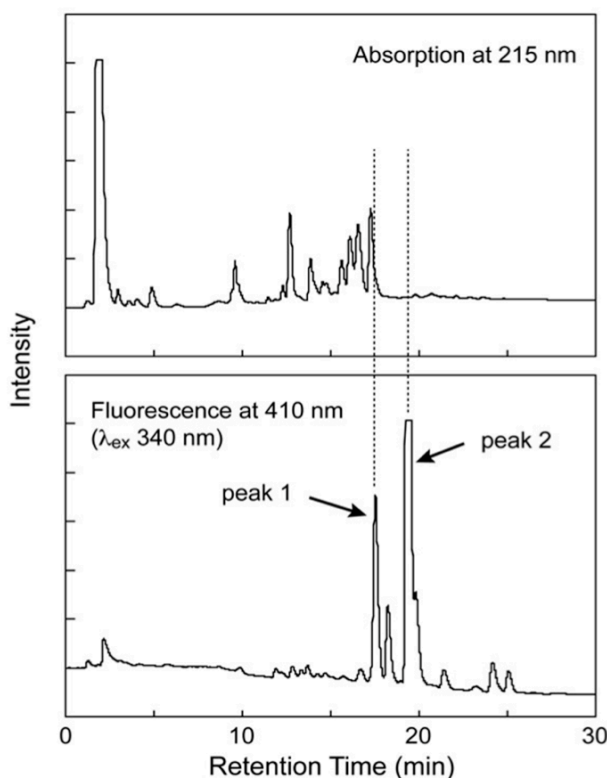


Figure 45. アビジン単体の蛍光ラベル化

しかし、HPLC プロファイル (Figure 44) から peak 1 および peak 2 の両ピークには多くの消化フラグメント夾雑物の混入が予想された。そこで別の比較対照として、アビジン単体 (10 pmol) にプローブ 8a (10 pmol) を加えラベル化し、蛍光基形成反応後そのまま trypsin/Lys-C 消化酵素を用いて消化したサンプルを調整し、確認した。この HPLC プロファイルを Figure 45 に示す。ただし限外ろ過による洗浄を行っていないことから、プローブ由来の蛍光ピークが見られる。結果として、Figure 44 と同じ溶出時間で peak 1 および peak 2 の蛍光ピーク 2 つが検出されたが、215 nm の吸光測定では、主要蛍光ピークである peak 2 に相当する物質が検出されなかった。このプロファイルから peak 1, 2 中のラベルペプチドは極めて微量であり、peak 1 には多くの夾雑物を含むことが示唆された。後述の解析で peak 2 は 19mer であることが判明している。通常このような大きなペプチドフラグメントは吸光度測定で検出されやすい。別途、ビ

オチン化 BSA を用いた化学発光法からこのラベル収率が ca. 8%であったことを考慮すると、この操作では、消化後のサンプルをそのまま HPLC に導入したにもかかわらず、その多くを損失したことを示している。近年では解析ソフトやコンピュータの性能が向上し、標的タンパク質が予想される場合は、全ての HPLC ピークの解析が行われることがある。しかし、それでもこのように見えないピークを標的と判断することは難しいと思われる。

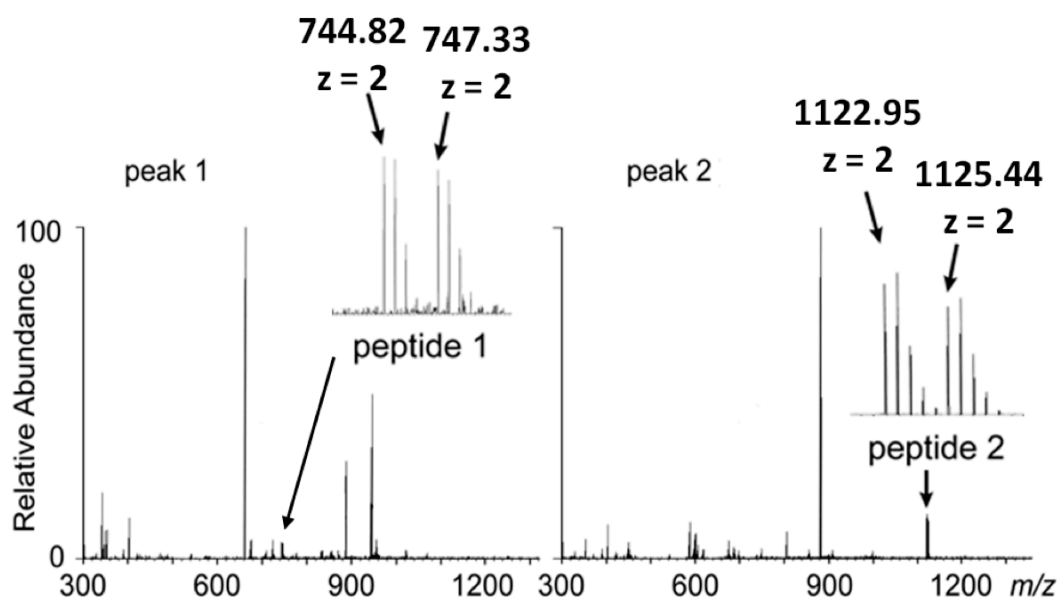


Figure 46. 蛍光化フラグメントの MS 解析

次にこれら 2 つの蛍光ピークを MS 解析した結果を Figure 46 に示す。予想通り、peak 1 および peak 2 には多くの MS ピークが検出され、多種類の夾雑消化フラグメントが混入されていた。MS 解析を基本にしたラベルペプチド解析では、この MS ピークの中から対照実験との結果を比較して MS ピークを絞り込むか、あるいはこれらのピークを 1 つずつ MS/MS 解析して配列およびラベル化を確認する。吸着等により再現性が低い場合は、前者の方法はしばしば煩雑化する。しかし今回、ラベルペプチドには安定同位体が導入されたクマリンがラベルされていることから、ラベルペプチドピークは質量差 5 ( $z=1$ ) の二重線として現れる。その質量差に注目したところ、peak 1 では 744.82 と 747.33 ( $\Delta m=2.51$  u,  $z=2$ )、peak 2 では 1122.95 と 1125.44 ( $\Delta m=2.49$  u,  $z=2$ ) として極めて容易に標的ペプチドが特定された (Figure 46 中の拡大図)。特に peak 1 のプロファイルでは非常に小さなピークであり、この場合も視覚的に識別できたことは、相当数の夾雑物中でもラベルペプチドが特定可能であることが示された。

次に、それらの二重化 MS ピークの MS/MS 解析を進めた。その結果を Figure 47, 48 に示した。



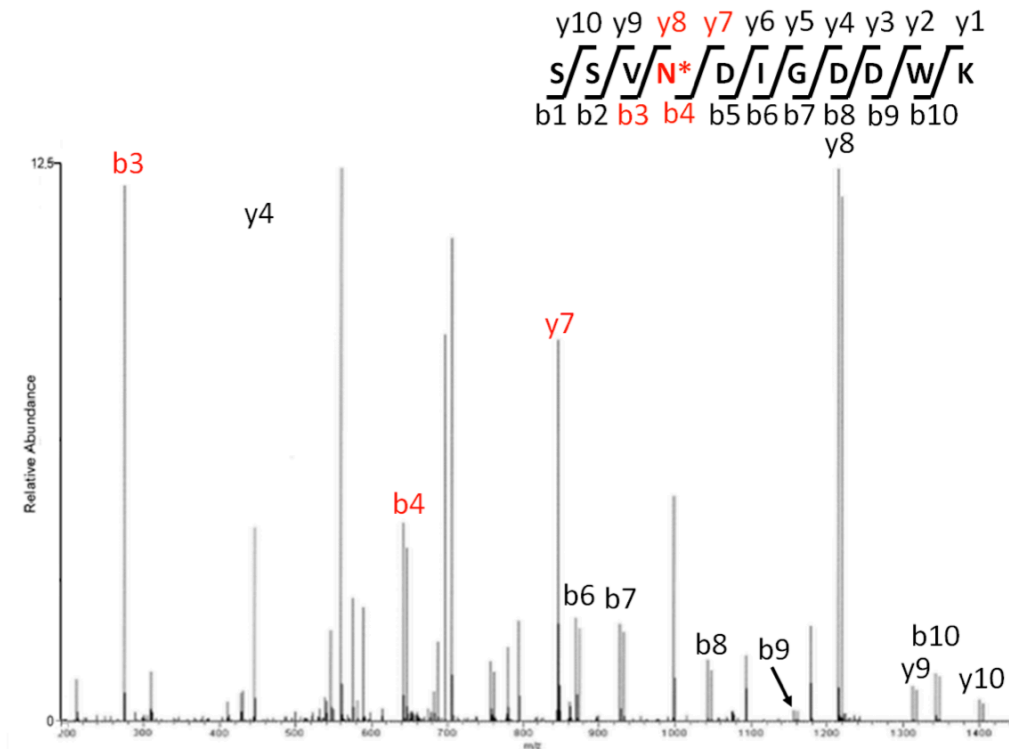


Figure 47. peptide 1 の MS/MS 解析

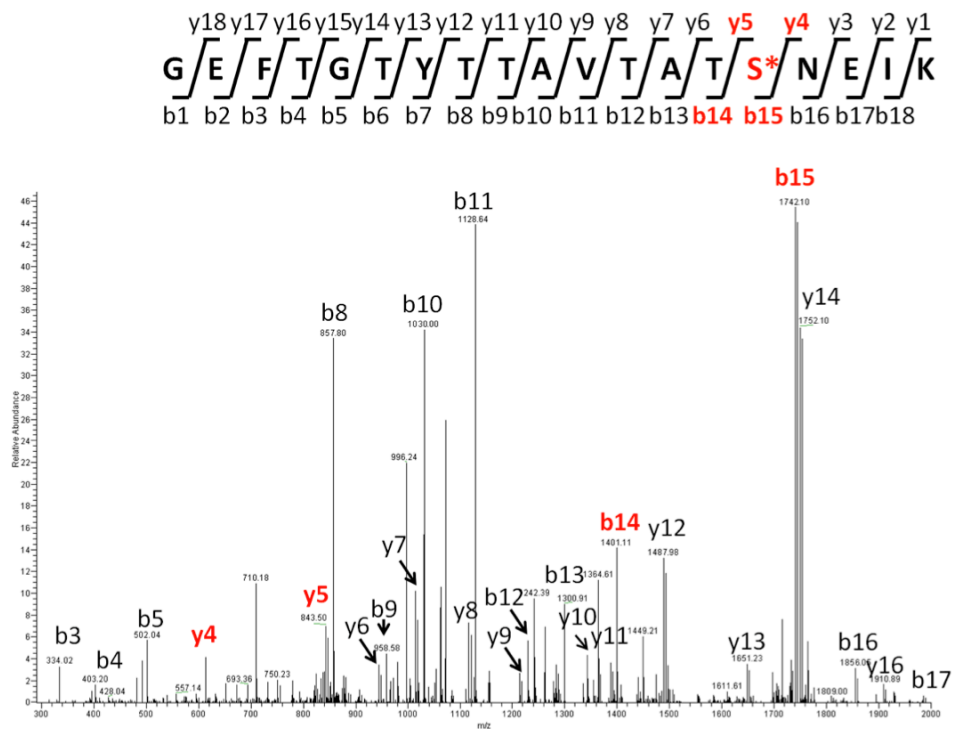


Figure 48. peptide 2 の MS/MS 解析

これらの MS/MS 解析では、同位体ピークの MS 平均値を中心として 9  $m/z$  の範囲でイオントラップして解析を行った。これにより、クマリンラベル残基を含むペプチドフラグメントは二重化して観測されることが分かった (Figure 47, 48)。つまり、MS/MS 解析においても二重化したピークはラベルされたイオン種として特定され、追跡し易くなり、事実、二重ピークの差はアミノ酸 1 残基を示すことから容易に配列同定できた。ESI-MS において目的ピーク周辺に多くの夾雑物を含む場合、本実験系での質量差 5 u はそれらの妨害を最小限止めることが可能であり、標的の MS/MS 解析に極めて有利であると思われる。この類似解析として、消化ペプチド群の N 末端に同位体タグを導入し、MS による定量化および MS/MS 解析による配列特定が報告されている (Figure 49)<sup>64</sup>。

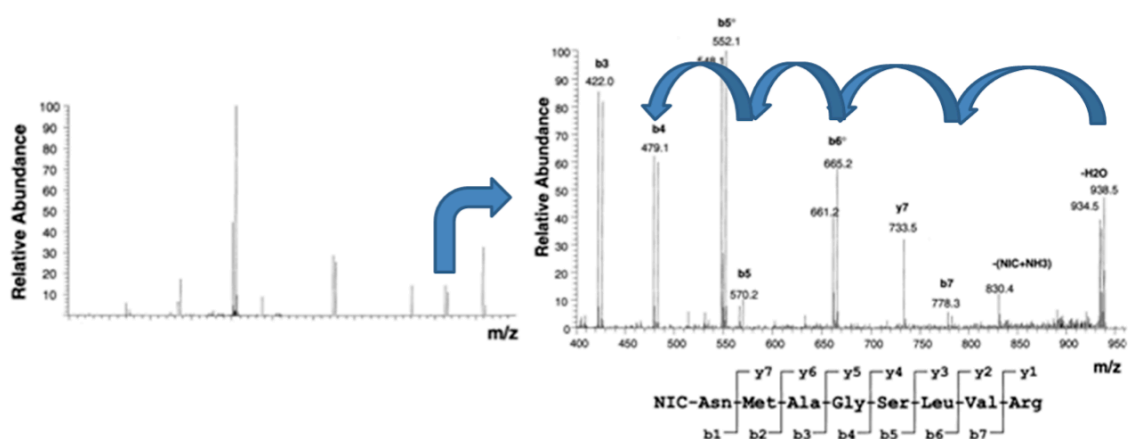


Figure 49. N 末端に同位体タグを導入したペプチドの MS および MS/MS 解析

次に、2つの MS ピークの MS/MS 解析を行った。双方の MS/MS プロファイルではいくつかの二重線のピークが確認された。Peptide 1 では ESI-MS 値 744.82 と 747.33 からアビジンの部分配列である SSVNDIGDDWK (Ser101~Lys111) と予想された。Figure 47 において、b4, b6, b7, b8, b9, b10 および y8, y9, y10 フラグメントイオン種は二重ピークで現れ、b3, y4, y7 フラグメントイオン種は一重ピークで現れたことからその配列と同定し、さらにラベル残基を Asn104 と特定した。同様に、Peptide 2 では ESI-MS 値 1122.95 と 1125.44 からアビジンの部分配列である GEFTGTYTTAVTATSNEIK (Gly27~Lys45) と予想された。Figure 48 において、b15~b17 および y5~y16 フラグメントイオン種は二重ピークで現れ、b3, b5, b8~b14 および y4 フラグメントイオン種は一重ピークで現れたことから、その配列と同定し、さらにラベル残基を Ser41 と特定した。

以上のように二重化された b イオン種と y イオン種を追跡することで比較的長鎖のペプチド解析でも容易に配列を特定することができ、peptide 2 では 19mer

であったが 30 分で終了した。通常の解析ソフトによる配列計算では時間のかかる解析も、安定同位体を用いた MS ピークの特徴付けによる視覚的な判別で迅速に解析できたことになる。また、これらの MS/MS プロファイルから推定されるように、この二重化戦略は一目でラベルイオン種が判断できるため、タグであるクマリンが複雑なフラグメント化を起こさないように MS/MS における CID (collision-induced dissociation) 照射エネルギーを適切に調整可能である点でも優れている。さらにこのタグは変性や消化条件にも安定であり、リガンド分子は切断されること、小さい分子量であることも MS 解析には非常に有利である。特に MS/MS 解析では、リガンド由来の煩雑なフラグメント化を回避でき、さらに小さいため測定範囲を狭くして分解能を維持したまま、全てのフラグメントイオンを一度に見ることが可能となるため有効である。

Figure 50 にアビジン結晶構造およびラベルアミノ酸残基を示した<sup>65</sup>。Asn104 と Ser41 の 2 つのラベル部位は共にビオチン結合ドメイン近傍であり、その位置はビオチン基からジアジリン基までの距離に妥当であったことから、本光ラベル法の高い信頼性を示した結果といえる。

#### Labeled residues (crystal data from PDB ID: 1AVD)

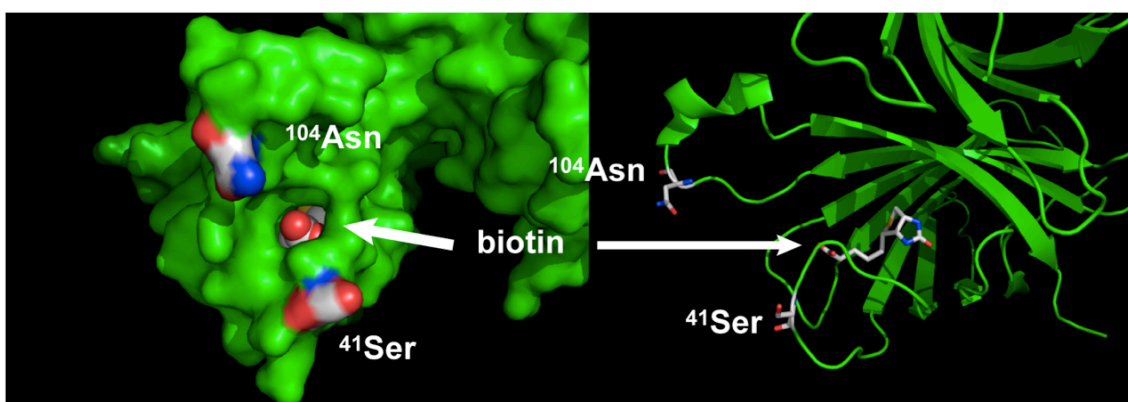


Figure 50. アビジン-ビオチン共結晶構造とラベルアミノ酸残基

以上、4 種混合タンパク質系において 2 つのラベルペプチドおよびラベル部位が迅速に同定できた。つまり、相当量の夾雑物が混入した系においてもラベルペプチドを解析可能であり、配列解析からタンパク質を同定し、ラベル部位から結合構造情報が得られることが示唆された。しかも従来法では不可能であったマイナーなラベルペプチド解析も可能になった。複数ラベルの解析は標的同定の信頼性を向上させ、多くの情報を与える。以上、この解析効率化は複雑なプロテオーム系での標的同定解析においても強力なアプローチ法となり得ると考えられる。

### 3-4：小括と考察

今回、安定同位体タグを組み込んだ桂皮酸クロスリンカーを新規に合成し、ラベル標的を MS 解析時の特徴付けを行った。この新規クロスリンカーは光クロスリンク、切断、発蛍光性、同位体、リガンド導入など、いずれも標的特定操作に有効な 5 つの機能を備えた機能集約型反応基といえる。新機能として追加した MS ピークの二重線化により、LC において検出される蛍光ピークに含まれる夾雑ペプチドがある程度絞り込まれれば、MS 分析において明瞭に判別できることが示された。

この蛍光特性と質量差特性を LC-MS 解析に応用した戦略は、夾雑物が混在する系において、ラベルペプチドが極微量であり長鎖であっても、標的ラベルペプチドを高感度に、しかも明瞭に区別でき、最終的な MS/MS 配列解析を有利に進められることがわかった。そこで、次に実際のプロテオーム系を用いて、前章で確立した光切断によるラベル標的の精製・濃縮と組み合わせ、連続した段階的なラベル物質の絞り込みによるラベルペプチドの特定解析手法を評価し、確立することにした。

## 第4章 多機能光アフィニティーラベルによる標的同一法の確立

第2章では桂皮酸型クロスリンカーによる標的タンパク質捕捉および光切断反応を最適化し、アビジン精製担体を利用したクマリン標識タンパク質の選択的濃縮・精製条件を確立した。この溶出タンパク質は既に蛍光基が導入されていることから、化学的処理をすることなく消化産物の HPLC 解析が可能になった。その結果、対照実験を繰り返すことなく明瞭にラベルペプチドを特定でき、そのまま MS/MS による配列解析とラベル部位特定を達成できることを証明した。第3章ではこの桂皮酸クロスリンカーに同位体法を取り入れることで、数種類のタンパク質が存在する系でも、その消化産物から微量ラベルタンパク質を濃縮することなく、直接 LC-MS を用いて、蛍光と質量差情報のみで標的を明確に特定できた。従って、HPLC である程度分離できれば、蛍光ピークに相当数の夾雑物を含んでも標的 MS ピークを特定でき、容易に配列解析まで進められることが分かった。すなわち、細胞中の膨大な数の生体分子の中から、ビオチン-アビジン相互作用を利用してラベルタンパク質をある程度濃縮をかけることで、続く LC では蛍光、MS では質量差により、段階的に微量標的ペプチドを絞り込み、極微量ラベルペプチドを特定し解析することが可能と考えた (Figure 51)。

次に、本研究の最終目標である HeLa 細胞ライセートからの標的同一法を実施し、汎用的手法としての総合評価を行った。

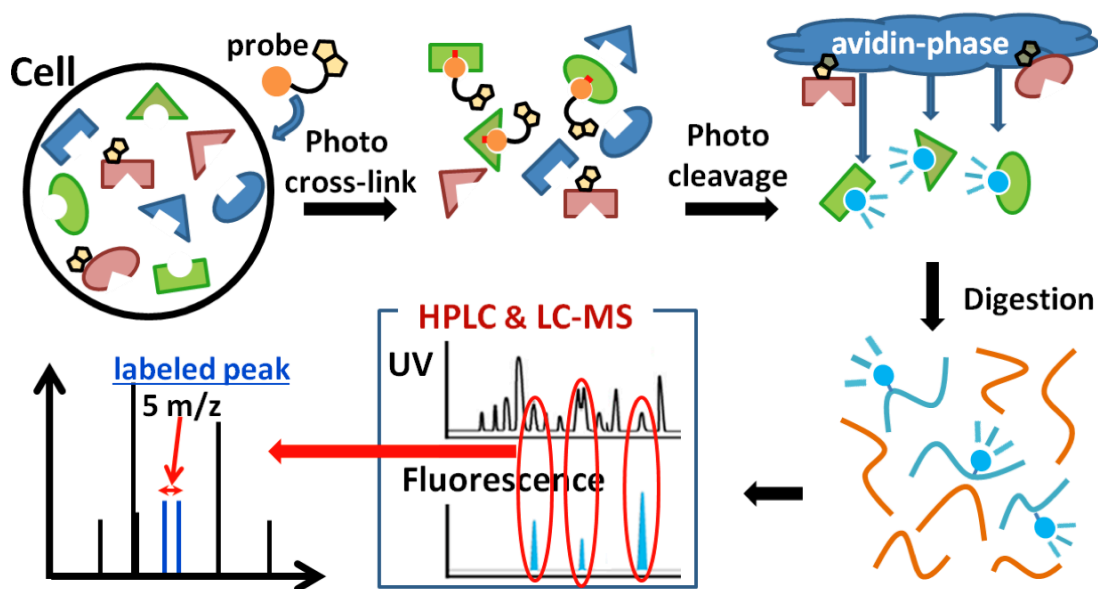


Figure 51. 桂皮酸クロスリンカーを用いたプロテオーム解析

#### 4-1: HeLa 細胞ライセートを用いた評価系とその標的タンパク質

ヒトを含め動物細胞内には、ビオチンを補酵素あるいはリガンドとするタンパク質が存在する<sup>66</sup>。特に、ピルビン酸カルボキシラーゼ (PC)、アセチル CoA カルボキシラーゼ (ACC) など 4 種類のカルボキシラーゼはビオチンを補酵素として取り込み、ATP を用いて基質をカルボキシル化する酵素であり、解糖系などで非常に重要な働きを担っている。この酵素群は以下のように、ビオチン窒素原子へのカルボキシ基導入を介してピルビン酸をカルボキシル化しオキサロ酢酸を生成する (Figure 52)<sup>67</sup>。

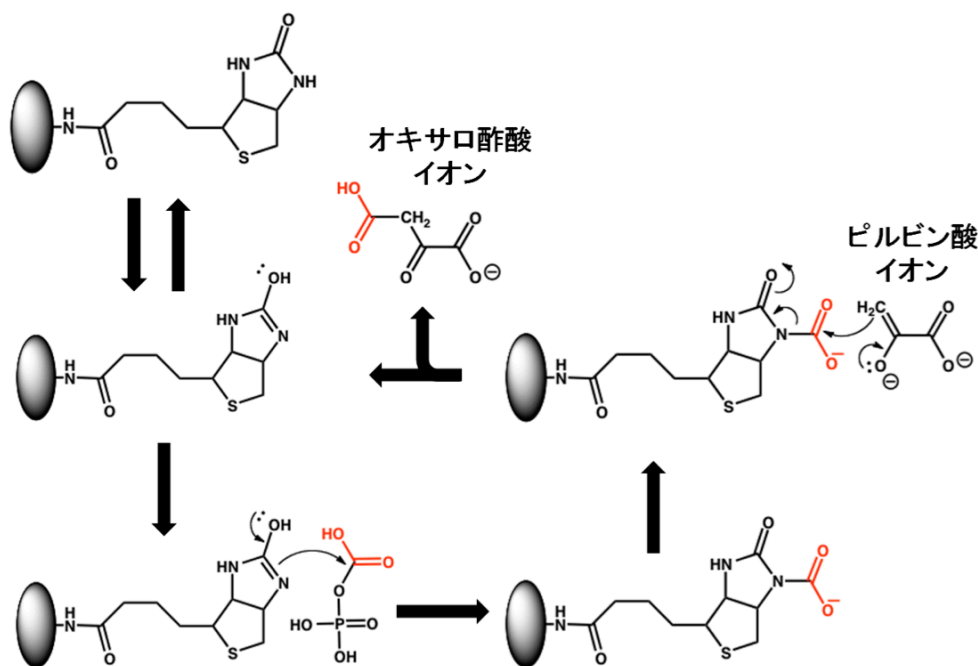


Figure 52. ピルビン酸カルボキシラーゼのカルボキシル化反応

ビオチンは各カルボキシラーゼの BCCP (biotin carboxyl carrier protein) ドメイン内にビオチン固定化酵素 (biotin protein ligase) によりアミド結合で導入される。この BCCP とカルボキシラーゼの機能ドメインの結合解析は大腸菌の系で多く解析されており 0.3  $\mu\text{M}$ ~5 $\mu\text{M}$  前後である。この BCCP ドメインに結合したビオチンが酵素活性部位に結合し、ビオチンを介した基質へのカルボキシル化反応を起こす<sup>68</sup>。この酵素群は 4 量体で存在し巨大複合タンパク質を形成するが、2008 年によく BC (biotin carboxylase) ドメインを除いたヒト PC の結晶構造解析が成された<sup>69</sup>。しかし、他の酵素の構造は未解明のままであり<sup>70</sup>、構造変化と機能発現との関連の詳細も明らかではない。以上、カルボキシラーゼ群を標的とした機能プロテオミクスへの応用に関する評価が可能であることと、巨大酵素の機能構造解析への興味から、これらのカルボキシラーゼのラベル化を実施することにした。またプローブとして用いたビオチンプローブ **8a,b** は、基質であるビオチンが精製タグを兼ねていることから有意であった。

#### 4-2 : HeLa 細胞ライセートを用いたビオチン結合タンパク質の解析

ヒト子宮頸癌由来の HeLa S3 細胞ライセートは、浮遊培養した細胞をダウンス型ホモジナイザーで処理し、核を除いた細胞質画分を用いた。このライセート（総タンパク質量: 2 mg）に、プローブ **8a** およびその同位体プローブである **8b** をそれぞれ 50  $\mu\text{M}$  を加え、37 °C で 12 時間インキュベートした (sample A)。その後、光照射条件 (250 W 高圧水銀ランプ, 360 nm : バンドパスフィルター (FWHM 10 nm), 0 °C, 15 sec) で一段階目の光照射を行った。この後、SDS サンプルバッファーを用いて室温で変性した後、DTT を用いて 57 °C で還元しヨードアセトアミドを加えてアルキル化した。限外ろ過により試薬を含む小分子を除去した後、アビジン-agarose とインキュベートしてクロスリンクした標的タンパク質を精製担体に捕捉した。担体を 0.2% SDS を含む PBS バッファーで 5 回、PBS バッファーで 5 回、および Tris-HCl pH 8.0 で 5 回、十分に洗浄した後、この担体上で光照射 (37 °C, 15 min) し光切断した。溶出したタンパク質溶液に trypsin および LysC を加えて 37 °C で 12 時間インキュベートした。

従来のビオチン精製で進められるラベル解析と比較する上で、この時点で溶出タンパク質消化産物の PMF 解析を行った。その結果、多くのタンパク質候補が列挙された。Table 1 にはある程度選別された候補タンパク質を記載した。リスト上位には Hsp90 を含め癌細胞で大量に発現するタンパク質が候補として多数エントリーされた。この中で、cover 率 12.84% でビオチン結合タンパク質であるピルビン酸カルボキシラーゼ (No. 44) がエントリーされ、さらに cover 率 2.1% でプロピオニル-CoA カルボキシラーゼ (No.102) がエントリーされた。しかし、これらはマイナーエントリーであった。特異的で極めて強いビオチン-アビジン結合を利用した濃縮と徹底的な洗浄、さらに光切断による温和で選択的な溶出を行ったにも拘わらず、アビジン担体には多種類で微量の非特異的吸着が残り、それらが解析を煩雑化させることを再確認した。つまり、精製操作による解析ではプロテオームから標的を絞り込めないことが分かった。また、他のビオチン結合タンパク質がエントリーされていないことは、PMF 解析のみによる標的の同定は困難かつ不完全なものであることが指摘された。

次に、消化産物の HPLC 解析した (Figure 53)。クマリン由来の蛍光波長 ( $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$ ) を検出したところ複数の蛍光ピークが見られた (黒線)。一方、阻害実験として、ビオチン 500  $\mu\text{M}$  を加えた光ラベル結果を赤線で示した (sample B)。Sample A および sample B の HPLC プロファイルを比較したところ、いくつかのピークで阻害剤ビオチンを加えると蛍光強度の減少が見られたが、一方ではほとんど変化しないピークも確認された。保持時間 5 分に溶出され、阻害された最初のピークについては、IK or LK のジペプチドとして MS 解析で同定された。これらピークの内、矢印で示した 2 つの peak A, B においてピーク量が顕著に減少したことから、まずこれらの特異的なラベル産物と推定し MS 解析を行うことにした。

run	mass	coverage (%)	protein candidate
1	7432.562	45.59	90-kDa heat shock protein beta [Homo sapiens]
2	2421.699	43.48	48 kDa histamine receptor subunit peptide 4 (internal fragment) [human]
3	47037.805	39.03	chain A (B, C, D), crystal structure of human enolase 1
4	47108.9	38.94	2-phosphopyruvate-hydratase alpha-enolase [Homo sapiens]
5	11937.65	31.48	aldolase A protein [Homo sapiens]
6	3749.269	30.56	heat shock protein HSP70-1 [Homo sapiens]
7	3009659.2	29.55	tubulin beta 2C [Homo sapiens]
8	16473.604	29.14	heat shock protein 72 [Homo sapiens]
9	1014759.8	28.78	chain A, human profilin I
10	17787.629	27.11	enolase 1 [Homo sapiens]
11	44483.523	26.68	chain A, human phosphoglycerate kinase
12	27803.564	26.67	phosphoglycerate kinase 1, isoform CRA_b [Homo sapiens]
13	4017356.2	26.22	chain A (B), secypa
14	17881.291	26.22	chain A, cyclophilin A (peptidylprolyl isomerase A) [Homo sapiens]
15	28452.322	25.95	phosphoglycerate kinase 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
16	17166.832	25.83	chain A, nm23 human nucleoside diphosphate kinase B
17	14736.938	25.76	beta-actin [Homo sapiens]
18	17298.023	25.66	nucleoside diphosphate kinase B isoform a [Homo sapiens]
19	44614.715	25.42	phosphoglycerate kinase 1 [Homo sapiens]
20	36557.555	25.38	chain A, human muscle L-lactate dehydrogenase
21	24620.336	23.04	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase [Homo sapiens]
22	13858.699	22.4	hCG15971, isoform CRA_b [Homo sapiens]
23	17823.254	21.95	chain A, human cypa mutant K131a
24	11261.993	21.57	hCG2013819 [Homo sapiens]
25	36049.234	20.3	aging-associated gene 9 protein [Homo sapiens]
26	13444.324	20	triosephosphate isomerase 1, isoform CRA_a [Homo sapiens]
27	17148.715	19.08	nucleoside diphosphate kinase A isoform a (b) [Homo sapiens]
28	29411.79	19.01	ACTG1 protein [Homo sapiens]
29	36638.523	18.86	L-lactate dehydrogenase B chain [Homo sapiens]
30	70931.23	17.68	BiP protein [Homo sapiens]
31	72333.055	17.28	78 kDa glucose-regulated protein precursor [Homo sapiens]
32	16759.033	17.22	actin, alpha 2, smooth muscle, aorta [Homo sapiens]
33	19312.041	16.86	chain A (B, C), human nm23-H1
34	23626.086	16.83	XTP3TPA-transactivated protein 1 [Homo sapiens]
35	25878.7	16.81	gamma-actin [Homo sapiens]
36	20411.492	16.11	nm23 protein [Homo sapiens]
37	35492.668	16.01	uracil DNA glycosylase [Homo sapiens]
38	9320.794	15.48	thioredoxin delta 3 [Homo sapiens]
39	9451.985	15.29	thioredoxin isoform 2 [Homo sapiens]
40	9904.084	15.22	chain A, human ribosomal protein S3
41	47766.676	15.02	tubulin, beta [Homo sapiens]
42	30137.072	14.61	NME1-NME2 protein [Homo sapiens]
43	18975.748	14.04	peroxiredoxin 1 [Homo sapiens]
44	265553.8	12.84	pyruvate carboxylase, mitochondrial (EC 6.4.1.1) [Homo sapiens]
45	57984.035	12.62	pyruvate kinase 3 isoform 1 variant [Homo sapiens]
46	22127.412	12.06	enhancer protein [Homo sapiens]
47	8428.488	10.81	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, beta polypeptide [Homo sapiens]
48	32959.426	10.58	annexin A5, isoform CRA_c [Homo sapiens]
49	26538.291	10.08	chain A, human triosephosphate isomerase
50	14327.995	9.76	keratin 8 [Homo sapiens]
50	5035443	9.69	chain A, human annexin V
102	80059.34	2.1	Propionyl-CoA carboxylase alpha chain, mitochondrial (PCCase subunit alpha) (EC 6.4.1.3) (Propanoyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit alpha)

Table 1: 切断溶出タンパク質の PMF 解析結果



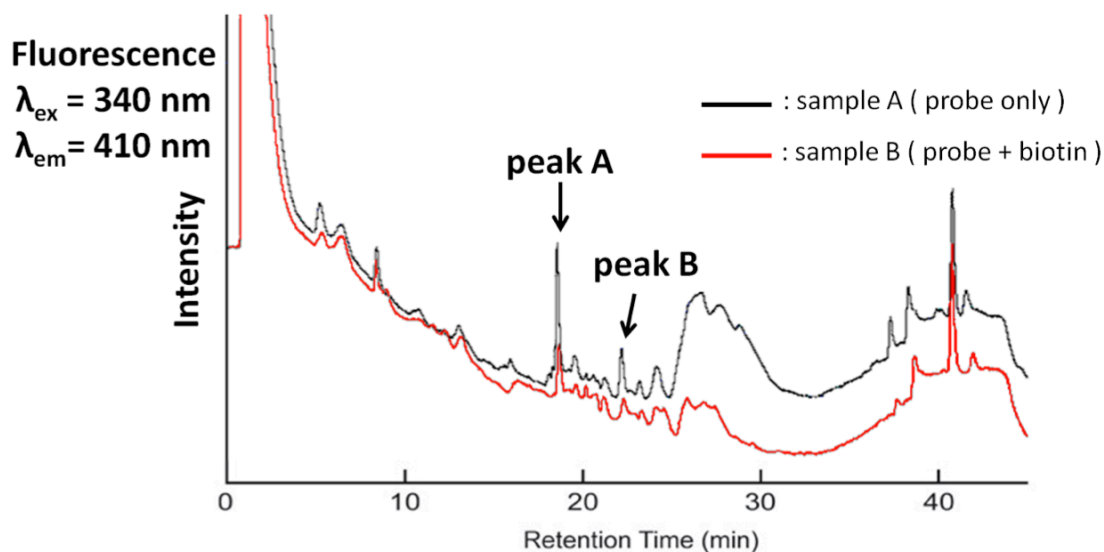


Figure 53. ビオチンプローブによる HeLa ライセートの光ラベル :  
 アジピン担体精製サンプル消化産物の HPLC プロファイル

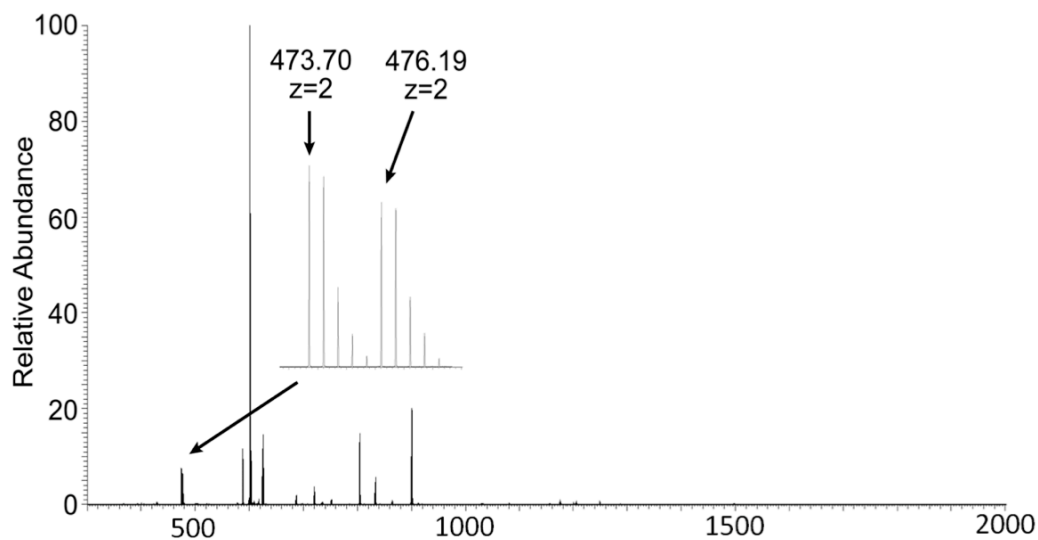


Figure 54. peak A の ESI-MS (positive)

Figure 54 には peak A の ESI-MS を示したが、比較的シンプルなプロファイルが得られた。質量差による二重ピークに注目したところ、2価イオン種として質量差 2.49 u で 473.70, 476.19 に二重ピークが見られ、ラベルペプチドを極めて容易に絞り込むことが出来た。しかし、peak B については非常に複雑なプロファイルが得られた (Figure 55)。このような MS プロファイルでは、対照実験の僅かな差によりラベルペプチドピークを特定する汎用法では、その同定は非常に困難だと思われる。本方法論においても目視による二重ピークの特定はやや時間がかかったが、それでも標的ラベルペプチドの

特定は完了した。質量差による MS ピークの特徴付けは解析操作の単純化をもたらし、飛躍的な効率化が達成できたと思われる。

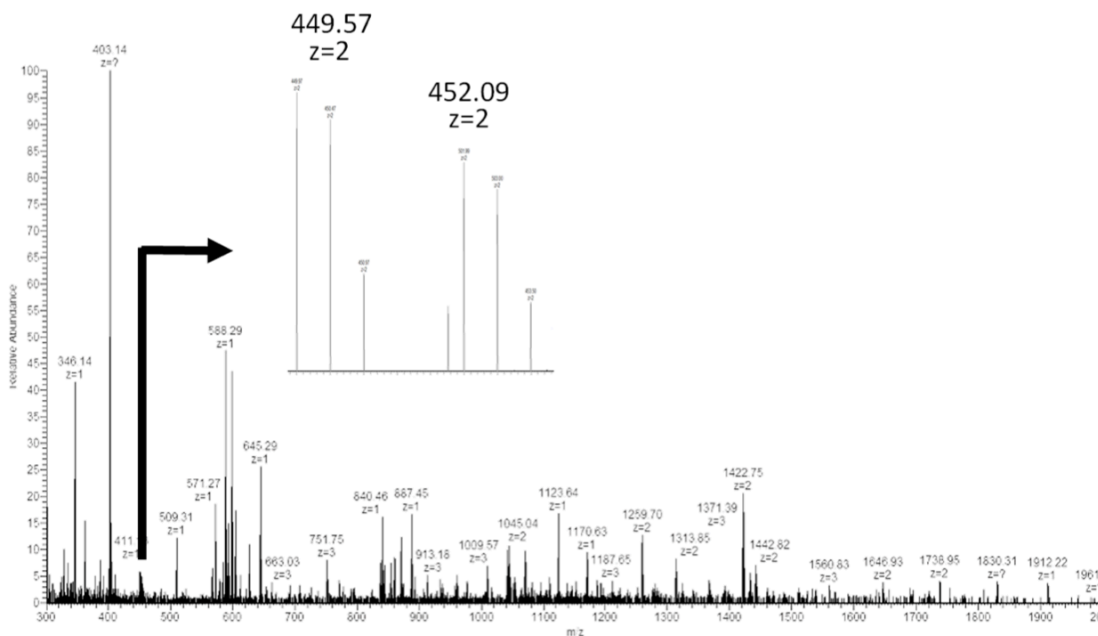


Figure 55. peak B の ESI-MS (positive)

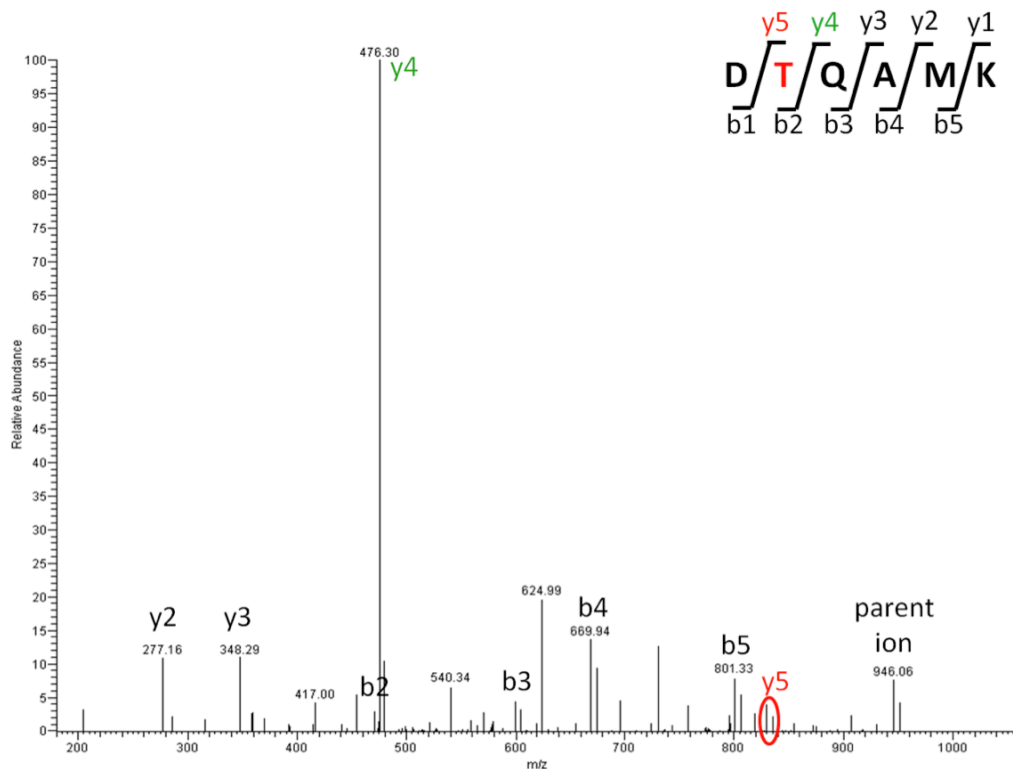


Figure 56. peak A における 473.70, 476.19 の MS/MS 解析

	BOVIN	Pyruvate carboxylase, mitochondrial
DTQAMK	HUMAN	Pyruvate carboxylase, mitochondrial
	MOUSE	Pyruvate carboxylase, mitochondrial
	RAT	Pyruvate carboxylase, mitochondrial

Figure 57. DTQAMK 配列を持つ標的検索結果：UCSF, MS-Pattern の解析結果

Labeled residue <sup>1092</sup>Thr: crystal data from PDB ID: 3BG3

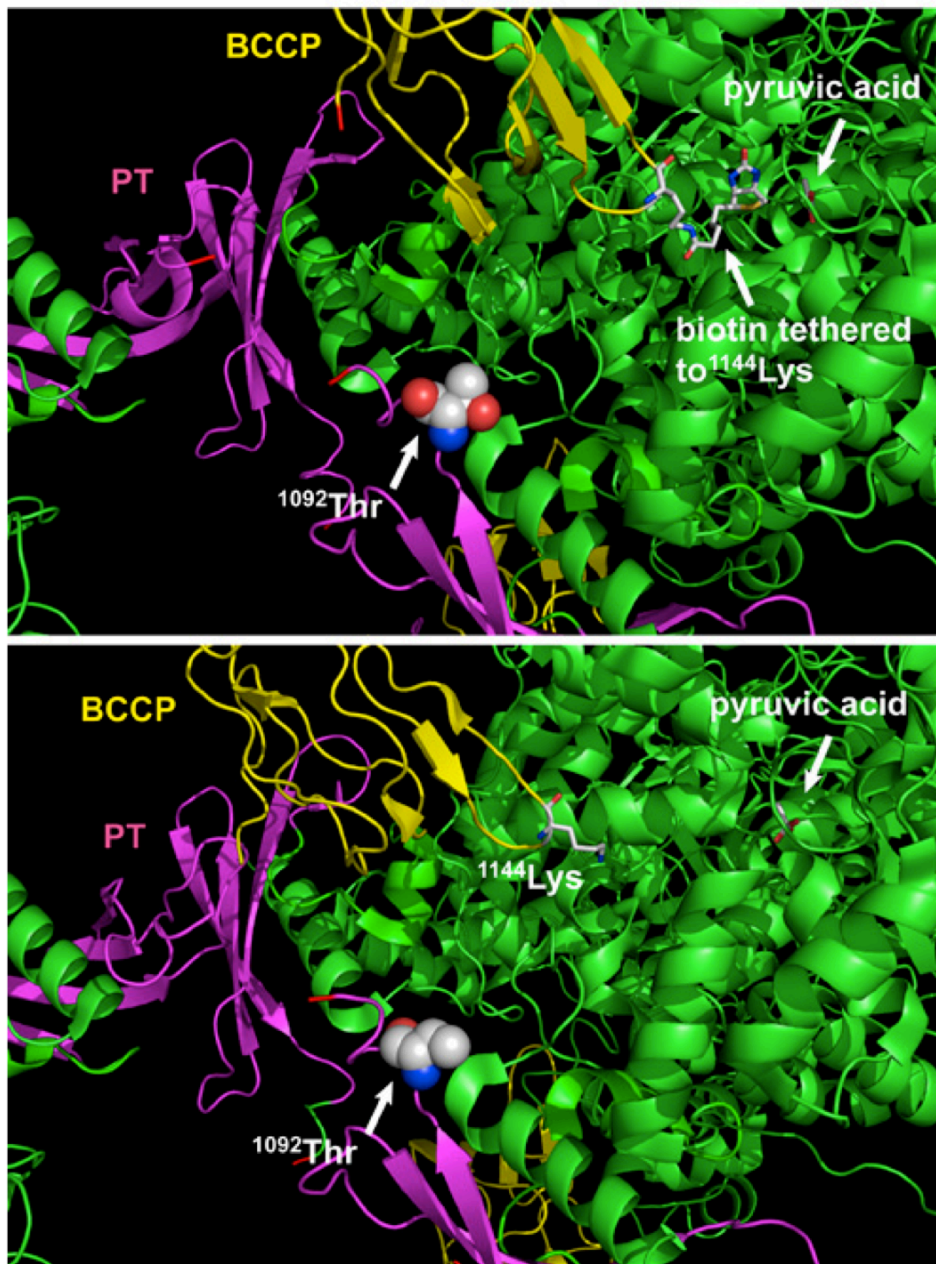


Figure 58. ヒトピルビン酸カルボキシラーゼの結晶構造とラベル部位

次に、peak A における 473.70, 476.19 ( $z=2$ ) の MS ピークを MS/MS 解析した結果を Figure 56 に示した。b2, b3, b4, b5, y5 は二重ピークであり、それを基点に推定されるアミノ酸配列と他の MS ピークから DTQAMK を決定した。この配列情報を基に UCSF のデータベースより検索した結果、ヒト PC の一部 (Asp1091~Lys1096) であることがわかった (Figure 57)。PC は Table 1 で示した PMF 解析でもエントリーされており、その結果と符合する。また y2, y3, y4 で一重ピークであったことから、ラベルアミノ酸残基は Thr1092 と特定された。

PC はミトコンドリアに存在しており、プローブはミトコンドリア膜を通過して光ラベルしたことが分かった。分子量は 130 kDa 程度であり、4 量体を形成している。続いて、今回ラベルしたアミノ残基について、ヒト PC の X 線結晶構造<sup>69</sup>と照らしあわせた結果、BCCP (biotin carboxyl carrier protein) ドメインと 4 量体化に重要な PT (PC tetramerization) ドメインの間に存在する部分をラベルしたことが分かった (Figure 58)。PC では BCCP ドメイン内の Lys1144 がビオチン化される。ラベルされた Thr 残基はビオチン結合部位の対面側に存在しており、ビオチン結合部位近傍ではあるもののやや相互作用部位とは距離がある。PC は Lys1144 がビオチン化されると BCCP ドメインが構造変化し、活性部位に挿入されていくことで基質のカルボキシル化が起こる<sup>71</sup>。この部位へのラベル化が確認できたことから、未だ詳細な構造変化がわかっていない BCCP ドメインの挙動に関する情報が得られたと考えられる。

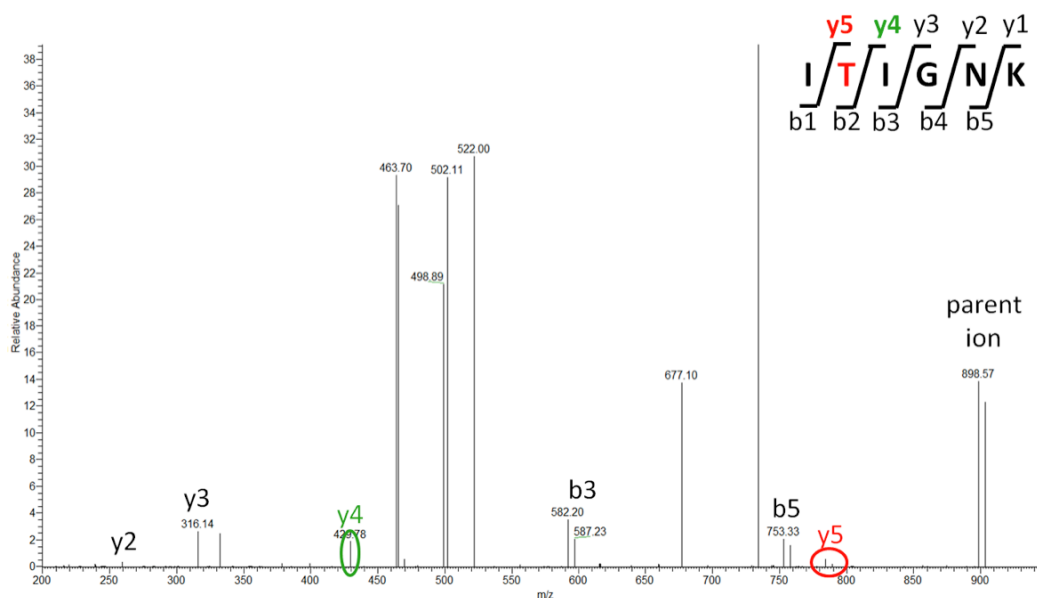


Figure 59. peak B における 449.57, 452.09 の MS/MS 解析

次に、peak B の 449.57, 476.19 (z=2) の MS ピークを MS/MS 解析した結果を Figure 59 に示した。b3, b5, y5 は二重ピークであり、それを基点に推定されるアミノ酸配列と他の MS ピークから ITIGNK を決定した。この配列情報を基に UCSF のデータベースより検索した結果、ヒトアセチル CoA カルボキシラーゼ 1 あるいは 2 (ACC1, 2) の一部であることがわかった (Figure 60)。アイソフォームを考慮すると 5 種類がリストされた。また y2, y3, y4 で一重ピークであったことから、ラベルアミノ酸残基は Thr と特定された。ACC1 isoform 1 (2383 a.a.)、ACC1 isoform 2 (2346 a.a.)、ACC1 isoform 3 (2288 a.a.)、ACC1 isoform 4 (2268 a.a.) および ACC2 (2458 a.a.) に対するラベルアミノ酸はそれぞれ Thr774、Thr737、Thr679、Thr659 および Thr880 であった。

<b>ITIGNK</b>	<b>BOVIN</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase 1</b>
	<b>HUMAN</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase 1</b>
	<b>MOUSE</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase 1</b>
	<b>RAT</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase 1</b>
	<b>SHEEP</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase 1</b>
	<b>HUMAN</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase 2</b>
	<b>CHICK</b>	<b>Acetyl-CoA carboxylase</b>

Figure 60. ITIGNK 配列を持つ標的検索結果 : UCSF, MS-Pattern

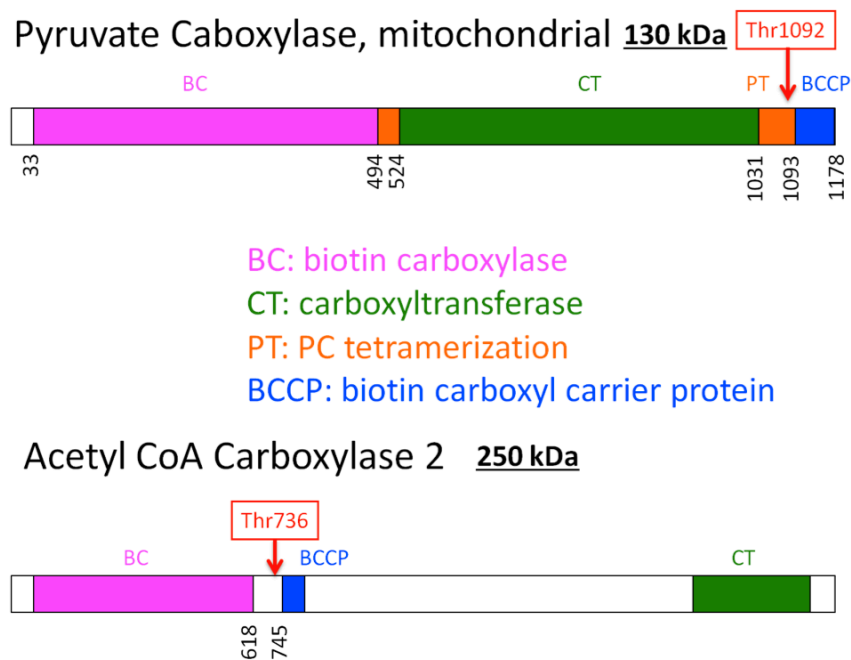


Figure 61. PC と ACC の各ドメイン構造

ACC は先の Table 1 で示した PMF 解析結果にエントリーされていない。つまり、本手法によるラベル標的の同定解析は PMF ではエントリーされない微量ラベルタンパク質の解析を行える優れた手法であるといえる。さらに、特定リガンドの標的タンパク質を 1 つだけでなく同時に複数解析できることを実証した結果であり、これは薬物機能プロテオミクスへの可能性を示したものと考えられる。

次にラベル部位を考察する。ACC は約 250 kDa のモノマーが 4 量体化した巨大複合タンパク質であり、ヒト ACC の結晶構造解析はされていない。この 1 次配列とドメイン情報から、PC のラベル部位と類似した BCCP と PT ドメイン間にラベル化されたことがわかった (Figure 61)。以上のことから、ACC へのラベルも相互作用部位近傍に起こり、本手法の高い信頼性がプロテオーム系でも実証された。

#### 4-3：小括と考察

開発した高性能光クロスリカーを用いて、カルボキシラーゼファミリーを標的タンパク質群として、光アフィニティーラベル法による HeLa 細胞ライセートからの同定解析を実施したところ、ラベルペプチド配列から PC および ACC の 2 種類のカルボキシラーゼが同定された。ラベルアミノ酸残基も特定され、いずれもビオチン結合部位近傍の同様な部位であることが判明し、さらにこのラベル位置からビオチン結合によるアロステリック構造変化を示唆する情報が得られた。

以上、ビオチン-アビジンによる釣り上げ濃縮と光切断による選択的溶出（タンパク質レベル）、光蛍光付加による LC でのラベルペプチドの高選択的／高感度識別（ペプチドレベル）、質量差によるラベルペプチド MS ピークの識別（解析レベル）の 3 段階における連続的なラベル物質の明瞭な絞り込み戦略は、プロテオームからの標的同定に有効であることを示した。従来法における単純な標識により精製操作を繰り返し行う戦略はしばしば煩雑化し、多くの場合でその特定は失敗に終わる。本方法は  $K_d$  数  $\mu\text{M}$  の相互作用系において、総タンパク質量 2 mg のライセートから数週間で、標的タンパク質の同定のみならずラベル部位まで特定できたことは、飛躍的な効率向上を達成したものと評価できる。技術の効率化により複数標的が同定されたことは、プロテオームにおいて特定標的を含めたりガンドベースの汎用的な機能プロテオミクス手法として確立できたと考えられる。

## 第5章 総括

本研究では、繰り返し精製による高純度ラベル標的物質の取得を基本にした従来の光アフィニティーラベル法による同定解析とは異なり、高性能ラベル試薬を使った多角的な特徴付けにより、多数の夾雑物などが混ざっていても、高純度精製をすることなく一連の流れで解析可能な方法論を確立した。本手法の基盤技術である桂皮酸型クロスリンカーの更なる機能化を行い、ラベル同定解析に特化した多彩な機能を有する試薬として完成させた。本標的定法の特長を以下に列挙する。

1. 解析の単純化：一目で分析対象がわかる3つの差別化
  1. 光切断濃縮、2. 蛍光、3. 質量差データの明瞭化 ⇒ 解析時間の大幅な短縮、微量化  
異種操作・分析による連続的な絞り込み ⇒ 高速化、簡便化
2. 簡便な操作：光を照射し、洗浄し、消化するだけ
3. 高い信頼性：ジアジリン光ラベルの特異性は保証されている  
複数ラベルペプチド解析による確実な同定
4. コンパクト：反応基そのものが蛍光タグ化する  
基質親和性を損なわない
5. 安定小型タグ：MS 高分解能の維持、MS/MS 解析が容易

本法では、膨大な数の混合物試料から3つの段階で徐々に、しかし明瞭に標的を絞り込む。その結果、本法の最大のボトルネックであった煩雑な精製操作を回避し、操作を単純化することで、飛躍的な解析時間の短縮と解析に必要な試料量の削減に成功し、著しく効率的な解析手法を確立した。

本手法によるラベルペプチド解析の飛躍的な効率化は、複雑な細胞系におけるリガンドをベースとした機能プロテオミクスへの展開が期待でき、創薬研究をはじめとする様々な研究に貢献できると考えられる。



## 第6章 実験項

### 6-1 : 使用機器

#### NMR スペクトル測定

JEOL ECX-400, Varian UNTY-plus-500

#### MS スペクトル測定

Thermo LTQ Orbitrap XL-ETD, Bruker daltonichs autoflex

#### MS スペクトル解析ソフト

Thermo QUAL browser, Peaks studio

#### 融点測定装置

Yanaco MP-3

#### MilliQ 水精製装置

MILLIPORE MilliQ plus

#### 凍結乾燥装置

EYELA FREEZE DRYER FD-1000

#### 遠心分離器

KN-70 (KUBOTA)

#### 紫外線照射

HP-30M ATTO (315 nm), フナコシ Transilluminator FTI-15L (365 nm)

ASAHI Spectra REX-250 (365 nm)

#### 紫外・可視吸光光度計

JASCO V-530, SHIMADZU UV-1800

#### 蛍光光度計

JASCO FP-6500

#### 化学発光検出

本体・・・Chemi-Print CX-EpiUV (リライオン)

解析用ソフトウェア・・・Intelligent Quantifier (リライオン)

#### HPLC

JASCO DG-980-50, PU-980, FP-920, LC-Net / ADC, UV-2077 plus, PU-2089

#### Plus

#### 温度調整

TaKaRa thermal Cycler Dice, EYELA Dry thermo bath MG-2000

## 試薬・材料

### 和光純薬工業

SDS、NHS、TFA (HPLC grade)、DMF (特級)、benzen (特級)、MeOH (一級)、EtOH (特級)、AcOEt (特級)、Hexane (特級)、Acetone (infinity pure)、Diethylether (一級)、CaCl<sub>2</sub>、CH<sub>3</sub>CN (特級)、CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> (特級)、CHCl<sub>3</sub> (特級)、THF (特級)、HCl (特級)、NaOH (特級)、NaCl (特級)、Acetic Acid (特級)、Formic acid (for HPLC grade)、Iodoethane、MgSO<sub>4</sub>、NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>、HEPES、casein、*m*-cresol、Thioanisole、Triethylamine、dithiothreitol [1-(Ethoxycarbonyl)ethylidene]triphenylphosphorane、モレキュラーシーブ 3Å、イムノスター試薬、water(蛍光分析用)、N-リシルエンドペプチダーゼ

### 渡辺化学

Fmoc-Ala-OH, Fmoc-Arg(Pbf)-OH, Fmoc-Gly-OH, Fmoc-Ile-OH, Fmoc-Leu-OH, Fmoc-Lys(Biot)-OH, Fmoc-Phe-OH, Fmoc-Ser(tBu)-OH, Fmoc-Tyr(tBu)-Alko Resin, Fmoc-Tyr(tBu)-TrtA-PEG Resin, TIPS, WSC

### 京都大学農学部丸山先生よりの贈呈

soybeen VSR delta23: GmVSR

### 産業技術総合研究所岡田知子博士よりの贈呈

HeLa S3 cytoplasm lysate

### promega

rLys-C, Mass Spec Grade、Trypsin/Lys-C Mix, Mass Spec Grade

### BIO-RAD

Precision Streptavidin-HRP Conjugate、SDS-PAGE Molecular Weight Standards、Low Range、Biotinylated SDS-PAGE Standards、DynaMarker® Protein MultiColor III、30% Acrylamide/Bis solution 29:1

### その他

TEMED (nacalai tesque)、iodoethane-*d*<sub>6</sub> (Cambridge isotope laboratories, Inc)、iodoacetoamide (nacalai tesque)、Tween20 (ICN Biomedicals)、streptavidin-horseradish peroxidase conjugate (GE Healthcare)、D-Tube™ Dialyzer Maxi, MWCO 10 kDa (Novagen)、Pierce® Streptavidin UltraLink® Resin (Thermo)、Amicon Ultra-0.5 Centrifugal Filter Devices (Millipore)

## 6-2 : プロローブ合成

### ペプチドプロローブ **1** 合成の部

#### (*E*)-Ethyl 3-[2-hydroxy-4-(3-trifluoromethyl-3*H*-diazirin-3-yl)phenyl-2-methyl acrylate (**2**) の合成

2-Hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzaldehyde (2.0 g, 8.8 mmol) と、[1-(ethoxycarbonyl)ethylidene]triphenylphosphorane (3.5 g, 9.7 mmol) をベンゼン 40 mL に溶解し、室温で 20 時間攪拌後、溶媒を減圧留去し、残渣を CHCl<sub>3</sub> に溶解してそのままシリカゲルカラムクロマトグラフィー (CHCl<sub>3</sub>) により精製後、もう一度シリカゲルカラムクロマトグラフィー (EtOAc : hexane = 10 : 1 ~ 5 : 1) をして黄色固体物質 2.2 g 得た。収率 79 %

$\lambda$  max/nm ( $\epsilon$ ) (MeOH) 352 (sh, 1,270); Mp 69-70 °C (uncorrected);

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  7.82 (s, 1 H), 7.25 (d, 1 H, <sup>3</sup>*J* = 4.8 Hz), 6.73 (s, 1 H), 6.69 (d, 1 H, <sup>3</sup>*J* = 10.2 Hz), 5.99 (m, 1 H), 4.29 (q, 2 H, <sup>3</sup>*J* = 7.2 Hz), 2.05 (s, 3H), 1.33 (t, 3 H, <sup>3</sup>*J* = 10.8 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  168.8, 154.2, 133.1, 131.3, 130.8, 130.4, 124.4, 122.6 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 273), 118.0, 113.8, 61.4, 28.3 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 41), 14.1, 14.2; <sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  -65.6 (3F, s); HRMS (EI+): 314.0872 (M<sup>+</sup>), 314.0878 calcd. for C<sub>14</sub>H<sub>13</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

#### (*E*)-2-Hydroxy-4-(3-Trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]phenyl-2-methylacrylic acid (**3**) の合成

化合物 **2** (2.0 g, 6.40 mmol) を MeOH 1 mL に溶解し、3 M NaOH 50 mL を 0 °C でゆっくり加えた。室温で 10 時間攪拌後、減圧留去した。MeOH を除去後、CHCl<sub>3</sub> で水相を三回洗浄し、0 °C に冷却してから 1 M HCl をゆっくり加えた。中和後、EtOAc を加えて三回抽出した。抽出液を無水 MgSO<sub>4</sub> で乾燥させ、減圧留去した。残渣に CHCl<sub>3</sub> を加えて、再結晶を 0 °C で行なった。白色固体物質 1.52 g 得た。収率 83%

$\lambda$  max/nm ( $\epsilon$ ) (MeOH) 347 (sh, 1,100); Mp 66-67 °C (uncorrected);

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD):  $\delta$  7.66 (s, 1H), 7.26 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 7.6 Hz), 6.62 (s, 1H), 6.56 (d, 1H, <sup>3</sup>*J* = 8.0 Hz), 1.89 (s, 3 H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  171.8, 157.5, 135.0, 131.9, 131.4, 130.5, 126.3, 123.6 (q, <sup>1</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 273), 117.8, 114.1, 29.4 (q, <sup>2</sup>*J*<sub>C-F</sub> = 41), 14.4; <sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>):  $\delta$  -64.9 (3F, s); HRMS (EI+): 286.0565 (M<sup>+</sup>), 286.0565 calcd. for C<sub>12</sub>H<sub>9</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

(*E*)-2-Hydroxy-4-(3-Trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl]phenyl-2-methylacrylic acid  
(4) の合成

化合物 3 (40 mg, 0.14 mmol)、NHS (17 mg, 0.15 mmol) を DMF 1 mL に溶解し、この溶液に EDCI (28 mg, 0.15 mmol) の DMF 500  $\mu$ L 溶液を加えた。室温で 12 時間攪拌した。TLC (EtOAc : hexane = 1 : 1) より原料の消失を確認し、質量分析により化合物 4 を確認した後、精製せずにそのまま次の反応へと進んだ。

peptide probe (1) の合成

Fmoc 固相合成法により、RV チューブ中で側鎖が保護された peptide (NH<sub>2</sub>-K(biotin)SSILRAFY) を 9.5 mg, 7.9  $\mu$ mol 固相上に生やした、Alko-PEG-Resin を得た。化合物 4 の DMF 溶液 760  $\mu$ L を上記の Resin に加え、更に 40  $\mu$ L の triethylamine を加えた後、室温で 24 時間攪拌した。攪拌後、RV チューブより溶媒を除去し、DMF 1 mL で 3 回、EtOAc で 3 回、MeOH で 3 回洗浄した。この Resin に TFA 340  $\mu$ L, *m*-cresol 20  $\mu$ L, thioanisole 20  $\mu$ L, TIPS 20  $\mu$ L を加えて 1 時間、室温で攪拌した。15 mL エッペンチューブに TFA 溶液を集め、固相を 100  $\mu$ L の TFA で 4 回洗浄した後この洗浄液も 15 mL エッペンチューブに集めた。エッペンチューブを氷浴で 0 °C に冷却した後、ether 10 mL を加えて沈殿させた。遠心分離 (3000 rpm, 1 min) 後、デカンテーションで上清を除去。この ether による洗浄を 6 回繰り返した。沈殿物をデシケーターで乾燥後、薄黄色の個体を得た。この個体を MeCN : 0.1% TFA 水 = 1 : 1 溶液に溶解させた後、HPLC にて下記の条件で精製し、化合物であるペプチドプローブ (1) を 3.6 mg 得た。

HPLC 条件

流量 : 1 mL / 1 min

検出波長 : 215 nm, 254 nm, 360 nm

A 液 2% MeCN, 97.9% H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA    B 液 60% MeCN, 39.9% H<sub>2</sub>O, 0.1% TFA

使用したカラム : NOMURA CHEMICAL, Develosil ODS-UG-5,

5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  150 mm

グラジエント条件    B 液の組成比

0~5min : 0%    5~55min : 0% $\rightarrow$ 100%

55~60min : 100%    60~65min : 100% $\rightarrow$ 0%

HRMS (ESI<sup>+</sup>): 1578.7294 (M+H<sup>+</sup>), 1578.7391 calcd. for C<sub>73</sub>H<sub>103</sub>F<sub>3</sub>N<sub>17</sub>O<sub>17</sub>.

ビオチンプローブの合成の部

(*E*)-*tert*-Butyl 2-(2-hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzylidene)-butanoate (**6a**) の合成

2-Hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzaldehyde (231 mg, 1.0 mmol) と *tert*-butyl 2-(diphenylphosphoryl)butanoate (710 mg, 1.8 mmol) をジクロロメタン 10 mL に溶かし、Ar 下、遮光して室温で攪拌した。5 時間後、減圧留去を行った。残渣をシリカゲルカラム(EtOAc : hexane = 1 : 5) で精製し、358 mg の黄色個体として化合物 **6a** を得た。収率 quant

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.51 (s, 1H), 7.19 (d, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.69 (d, <sup>3</sup>J = 8.1 Hz, 1H), 6.22 (s, 1H), 2.36 (q, J = 7.4 Hz, 2H), 1.56 (s, 9H), 1.08 (t, J = 7.5 Hz, 3H); <sup>13</sup>C-NMR (126 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 167.5, 153.9, 140.2, 131.0, 130.7, 129.9, 124.6, 122.1 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 274 Hz), 118.2, 113.9, 81.5, 28.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 41 Hz), 28.2, 21.4, 13.7; <sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -65.5 (3F, s); HRMS (ESI+) 357.1421 (M+H<sup>+</sup>), 357.1426 calcd for C<sub>17</sub>H<sub>20</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

(*E*)-2-(2-Hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzylidene)[3,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>,4,4,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]butanoic acid (**6b**) の合成

2-Hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzaldehyde (230 mg, 1.0 mmol) と *t*-butyl 2-(diphenylphosphoryl)[3,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>,4,4,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]butanoate (486 mg) を加え、上記と同様の操作にて **6b** を合成した。収量 308 mg, 収率 85%

<sup>1</sup>H-NMR (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 7.50 (s, 1H), 7.18(d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.74 (s, 1H), 6.69 (d, J = 8.1 Hz, 1H), 6.20 (s, 1H), 1.56 (s, 9H); <sup>13</sup>C-NMR (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ 167.5, 153.9, 140.1, 131.0, 130.7, 129.9, 124.6, 121.9 (q, <sup>1</sup>J<sub>C-F</sub> = 274 Hz), 118.2, 113.9, 81.5, 28.3 (q, <sup>2</sup>J<sub>C-F</sub> = 40 Hz), 28.2; <sup>19</sup>F-NMR (375 MHz, CDCl<sub>3</sub>): δ -65.5 (3F, s); HRMS (ESI+) 362.1749 (M+H<sup>+</sup>), 362.1740 calcd for C<sub>17</sub>H<sub>15</sub><sup>2</sup>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>O<sub>3</sub>.

(*E*)-2-(2-Hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzylidene)butanoic acid (**7a**) の合成

化合物 **7a** (178 mg, 0.50 mmol) に 50% TFA-CHCl<sub>3</sub> を 2 mL ゆっくり加えた。室温で 1 時間攪拌後、減圧留去した。残渣をシリカゲルカラム (EtOAc : hexane = 1 : 5 ~ 1 : 1) で精製し薄黄色個体 **7a** (129 mg) を得た。収率 85%

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.71 (s, 1H), 7.31 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz), 6.71 (s, 1H), 6.66 (d, 1H, *J* = 7.3 Hz), 2.43 (q, 2H, *J* = 7.3 Hz), 1.11 (t, 3H, *J* = 7.3 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 171.42, 157.34, 136.80, 134.71, 131.19, 126.24, 123.48 (q, *J* = 274.15 Hz), 117.84, 114.06, 29.31 (q, *J* = 40.21 Hz), 21.87, 14.18; <sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ -65.12 (3F, s); HRMS (ESI+): 323.0611 (M+Na<sup>+</sup>), 323.0614 calcd for C<sub>13</sub>H<sub>11</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>.

(*E*)-2-(2-Hydroxy-4-(3-(trifluoromethyl)-3*H*-diazirin-3-yl)benzylidene)[3,3-<sup>2</sup>H<sub>2</sub>,4,4,4-<sup>2</sup>H<sub>3</sub>]butanoic acid (**7b**) の合成

化合物 **7b** (178 mg, 0.50 mmol) に 50% TFA-CHCl<sub>3</sub> を加え、同様の操作で化合物 **7b** を合成した。収量 170 mg, 収率 quant

<sup>1</sup>H-NMR (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.72 (s, 1H), 7.32 (d, 1H, *J* = 7.8 Hz), 6.72 (s, 1H), 6.66 (d, 1H, *J* = 8.2 Hz); <sup>13</sup>C-NMR (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 170.00, 152.65, 136.44, 134.77, 130.79, 128.54, 122.88 (q, *J* = 274.15 Hz), 118.03, 113.79, 28.31 (q, *J* = 35.66 Hz); <sup>19</sup>F-NMR (376 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ -65.11 (3F, s); HRMS (ESI+): 328.0927 (M+Na<sup>+</sup>), 328.0928 calcd for C<sub>13</sub>H<sub>6</sub><sup>2</sup>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>2</sub>NaO<sub>3</sub>.

biotin probe (**8a**) の合成

化合物 **7a** (50 mg, 183  $\mu$ mol) と 4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMT-MM, 60 mg, 218  $\mu$ mol) を5% *N*-methylmorpholine - DMF (2 mL) に溶かし、室温で15分間攪拌した。この溶液に *N*-(2-aminoethyl)-biotinamide (78 mg, 274  $\mu$ mol) を加え、室温で14 時間攪拌した。減圧留去後、残渣を EtOAc で5回、1 M HCl で5回、水で3回洗浄した。洗浄後、真空乾燥して薄黄色固体 **8a** を 48 mg 得た。収率 48%

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  7.95 (s, 1H), 7.93 (s, 1H), 7.81 (s, 1H), 7.38 (d, 1H,  $J = 6.1$  Hz), 6.54 (s,1H), 6.41 (d, 1H,  $J = 6.1$  Hz), 4.29 (m, 1H), 4.24 (m, 1H), 3.31 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.22 (t, 2H,  $J = 6.0$  Hz), 3.16 (m, 1H), 3.06 (dd, 1H,  $J_{A,B} = 6.1$  Hz), 2.75 (d, 1H,  $J = 6.1$  Hz), 2.51 (q, 2H,  $J = 6.6$  Hz), 2.06 (t, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 1.58 (m, 2H), 1.51 (m, 2H), 1.29 (quin, 2H,  $J = 7.2$  Hz), 0.94 ppm (t, 3H,  $J = 6.6$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  173.25, 172.42, 167.49, 162.72, 162.33, 149.76, 143.02, 131.01, 128.42, 126.32 (q,  $J = 220\text{Hz}$ ), 124.40, 120.96, 61.01, 59.20, 55.34, 38.10, 35.79, 35.22, 30.78, 28.18, 28.02, 25.22, 20.85, 13.08;  $^{19}\text{F-NMR}$  (375 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -64.41 (3F, s); HRMS (ESI+): 569.2157 (M+H $^+$ ), 569.2159 calcd for C<sub>25</sub>H<sub>32</sub><sup>2</sup>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S.

biotin probe (**8b**) の合成

化合物 **7b** (50 mg, 183  $\mu$ mol) を用いて、**8a** の合成と同様の操作で合成した。  
収量 40 mg, 収率 40%

$^1\text{H-NMR}$  (400MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  8.01 (s, 1H), 7.95 (s, 1H), 7.84 (s, 1H), 7.41 (d, 1H,  $J = 6.4$  Hz), 6.57 (s,1H), 6.44 (d, 1H,  $J = 6.4$  Hz), 4.37 (m, 1H), 4.32 (m, 1H), 3.43 (t, 2H,  $J = 6.24$  Hz), 3.32 (t, 2H,  $J = 6.25$  Hz), 3.20 (m, 1H), 3.11 (dd, 1H,  $J_{A,B} = 6.0$  Hz), 2.87 (d, 1H,  $J = 6.05$  Hz), 2.15 (t, 2H,  $J = 6.4$  Hz), 1.59 (m, 2H), 1.52 (m, 2H), 1.34 (quin, 2H,  $J = 7.2$  Hz);  $^{13}\text{C-NMR}$  (100 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  173.55, 172.47, 167.55, 162.87, 162.48, 149.90, 143.14, 131.17, 128.58, 126.49 (q,  $J = 240\text{Hz}$ ), 124.55, 121.13, 61.22, 59.24, 55.38, 38.14, 35.84, 35.30, 30.79, 28.20, 28.08, 25.24;  $^{19}\text{F-NMR}$  (375 MHz, DMSO- $d_6$ ):  $\delta$  -64.47 (3F, s); HRMS (ESI+): 574.2469 (M+H $^+$ ), 574.2472 calcd. for C<sub>25</sub>H<sub>27</sub><sup>2</sup>H<sub>5</sub>F<sub>3</sub>N<sub>6</sub>O<sub>4</sub>S.

### 6-3 : ラベル化実験の操作

クマリン形成反応を利用したラベル部位解析法基盤の確立 (第2章)

ペプチドプローブの光反応性評価

プローブ を  $\text{H}_2\text{O} : \text{EtOH} = 2 : 1$  溶液に溶かし、 $50 \mu\text{M}$  に調整した。このプローブ 溶液をガラスセルに移し、吸光光度計 (SHIMADZU UV-1800) にて測定した。また、光照射は  $15 \text{ W} \times 2$  ブラックライト,  $360 \text{ nm}$ ,  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  (フナコシ, Transilluminator FTI-15L) で行った。この時、ガラスセルは光照射機と約  $4 \text{ cm}$  離れた距離より上から光照射した。以下、第二章では一段階目に用いる光照射機は同機、同条件で用いた。

同様に、 $\text{H}_2\text{O} : \text{EtOH} = 2 : 1$  溶液に溶かし、 $50 \mu\text{M}$  に調整したプローブの溶液を別個に用意し、蛍光用石英セルに移し、 $360 \text{ nm}$ ,  $0 \text{ }^\circ\text{C}$  で光照射を  $1 \text{ min}$ 、 $5 \text{ min}$ 、 $10 \text{ min}$  行ってその時間の  $\lambda_{\text{ex}} = 340 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{em}} = 410 \text{ nm}$  での蛍光強度を測定した (光路長  $1 \text{ cm}$ )。また、このサンプルに引き続いて  $315 \text{ nm}$ ,  $25 \text{ }^\circ\text{C}$  の条件下でチューブ直下から光照射 (使用機器 : HP-30M ATTO) した。以下、第二章では二段階目に用いる光照射機は同機、同条件で用いた。 $60 \text{ min}$  までの蛍光強度の経時的変化を蛍光測定器 (JASCO FP-6500) を用いて測定した。

プローブを用いた GmVSR のビオチン標識化反応

・光照射時間によるラベル量の変化

HEPES buffer, pH 7.0 に溶かした GmVSR ( $2.0 \text{ pmol}$ ) 溶液に  $1\%$  DMF 水で溶解させたプローブ ( $2.0 \text{ pmol}$ ) を加え、PCR チューブに全量が  $10 \mu\text{L}$  になるよう水で調整した後、室温で  $1$  時間インキュベートした。インキュベート後、光照射 ( $15 \text{ W} \times 2$  ブラックライト,  $360 \text{ nm}$ ,  $0 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $10 \text{ min}$ ) を各照射時間 ( $0 \text{ min}$ ,  $1 \text{ min}$ ,  $5 \text{ min}$ ,  $10 \text{ min}$   $30 \text{ min}$ ) 行った。

これらの各種サンプルに SDS sample buffer ( $2 \times$ )  $10 \mu\text{L}$  を加え、室温で  $60 \text{ min}$  遮光下で変性を行い、SDS-PAGE ( $10\%$ ゲル),  $24 \text{ mA}$ ,  $60 \text{ min}$  を行った。マーカーは Biotynylated SDS-PAGE Standards を用いた。 $20 \text{ V}$  で  $50 \text{ min}$ 、PVDF 膜に転写し、 $1\%$ カゼインで  $1$  時間ブロッキングした後、アビジン-HRP を加えて  $1$  時間インキュベートした。T-PBS $\times 2$ 、PBS $\times 2$  で各洗浄 (各  $10 \text{ min}$ ) を行い、イムノスター試薬を用いて発光検出機 (リライオン, Chemi-Print CX-EpiUV) で検出した (露光時間  $5 \text{ min}$ )。



・競合阻害剤を用いたプローブの GmVSR に対する特異性の確認

HEPES buffer, pH 7.0 に溶かした GmVSR (2.0 pmol) 溶液にプローブ (2.0 pmol) および阻害剤として SSILRAFY 配列のペプチドを各種濃度 (5.0 pmol, 20 pmol, 50 pmol; 各×2.5 倍, ×10 倍, ×25 倍) 加え、ブランクとして阻害剤を加えないサンプルを全量が 10  $\mu$ L になるように調整した後 1 時間、室温でインキュベートした。インキュベート後、光照射 (15 W×2 ブラックライト, 360 nm, 0 °C, 10 min) を行なった。

これらの各種サンプルに SDS sample buffer (2×) 10  $\mu$ L を加え、室温で 60 min 遮光下で変性を行ない、SDS-PAGE (10%ゲル) 24 mA, 60 min を行なった。マーカーは Biotynylated SDS-PAGE Standards を用いた。20 V で 50 min, PVDF 膜に転写し、1%カゼインで 1 時間ブロッキングした後、avidin-HRP を加えて 1 時間インキュベートした。T-PBS×2、PBS×2 で各洗浄 (各 10 min) を行い、イムノスター試薬を用いて発光検出を行なった (露光時間 5 min)。

ラベル化タンパク質の蛍光化

HEPES buffer, pH 7.0 に溶かした GmVSR (2.0 pmol) 溶液にプローブ (2.0 pmol) を加え、ブランクとして VSR 溶液のみが入ったサンプルを調整し、サンプルを全量が 10  $\mu$ L になるように調整した後 1 時間、室温でインキュベートした。インキュベート後、光照射 (360 nm, 0 °C, 10 min) 行なった。この後、二段階目の光照射 (315 nm, 25 °C, 0 min ~ 60 min) を行なった。

これらのサンプルに SDS sample buffer (2×) 10  $\mu$ L を加え、室温で 60 min 遮光下で変性した後、SDS-PAGE (10%ゲル) 24 mA, 60 min を行なった。マーカーは Biotynylated SDS-PAGE Standards および DynaMarker® Protein MultiColor III を用いた。20 V で 50 min、PVDF 膜に転写し、蛍光を測定した。

1%カゼインで 1 時間ブロッキングした後、アビジン-HRP を加えて 1 時間インキュベートした。T-PBS×2、PBS×2 で各洗浄 (各 10 min) を行い、イムノスター試薬を用いて発光検出を行なった (露光時間 7 min)。

各サンプルの蛍光強度および発光強度を Intelligent Quantifier (リライオン) および画像解析ソフトである Photoshop を用いて算出した。

二段階反応性を利用したラベル化タンパク質単離精製手法への展開

・ラベル化効率の解析

HEPES buffer, pH 7.0 に溶かした GmVSR (2.0 pmol) 溶液にプローブ (2.0 pmol) を加え、サンプルを全量が 10  $\mu$ L になるように調整した後 1 時間、室温でインキュベートした。インキュベート後、光照射 (360 nm, 0 °C, 10 min) を行なった。また、市販の 10% ビオチン化 BSA を各濃度 (BSA 量 1.0 pmol~10.0 pmol, ビオチン量が 0.1 pmol~1.0 pmol) に調整し、全量 10  $\mu$ L とした。

これらの各種サンプルに SDS sample buffer (2×) 10  $\mu$ L を加え、室温で60 min 遮光下で変性を行ない、SDS-PAGE (10%ゲル) 24 mA, 60 min を行った。マーカーは Biotynylated SDS-PAGE Standardsを用いた。20 Vで 50 min、PVDF 膜に転写した。1%カゼインで1時間ブロッキングした後、メンブレン上にアビジン-HRP を加えて1時間インキュベートした。T-PBS×2、PBS×2で各洗浄 (各10 min) を行い、イムノスター試薬を用いて発光検出を行った (露光時間 5 min)。

各サンプルの発光強度を解析ソフトである Intelligent Quantifier (リライオン) を用いて算出した。

#### ・ラベル化タンパク質の単離・精製

HEPES buffer, pH 7.0 に溶かした GmVSR (2 nmol) 溶液にプローブ (2 nmol) を加えた。1.5 mL エッペンチューブにサンプルを全量が 100  $\mu$ L になるように調整した後 1 h、室温でインキュベートした。インキュベート後、光照射 (360 nm, 0 , 10 min) を行った。

ビオチン化 GmVSR 溶液に BPB の入っていない変性用 SDS sample buffer (2×) 100  $\mu$ L を加え、室温で 60 min 遮光下で変性した。変性した GmVSR の溶液を透析用チューブに入れ 3 時間後、8 時間後、13 時間後に溶媒である HEPES buffer を変えながら透析を行った。

透析後、GmVSR 溶液を HEPES buffer で 5 回洗浄してあるアビジン-アガロース溶液 5  $\mu$ L (アビジン含有量 150 ~ 200 pmol) と室温で 2 時間インキュベートした。この固相溶液を遠心 (1300×g, 2 min) して固相を沈殿させ、0.2% SDS/HEPES buffer 1 mL で 2 回、HEPES buffer 1 mL で 2 回、水 1 mL で 3 回洗浄した。

最後に PBS buffer 15  $\mu$ L を加えて二段階目の光照射 (315 nm, 25 °C, 60 min) を行った。この上清を集めた後、SDS sample buffer (4×) 5  $\mu$ L を加えた。この溶液の 1/5 量をゲル上にアプライし、比較対象として SDS sample buffer (2×) で変性した GmVSR 溶液のみのサンプル (GmVSR 200 ng ~ 1  $\mu$ g) を調整し、これも共にアプライして、SDS-PAGE (10%ゲル) 24 mA, 60 min を行った。マーカーは DynaMarker® Protein MultiColor IIIを用いた。

泳動後、CBB 水溶液を加えて 5 min 浸透させた。CBB 水溶液を捨て、Milli Q 水を適量加え、キムワイプを 1 枚ゲルにかぶせるようにのせて 1 晩振盪させて余分な CBB を除去した。

## 蛍光化 GmVSR の消化

### ・蛍光化 GmVSR の in gel 消化

HEPES buffer, pH 7.0 に溶かした GmVSR (0.2 nmol) 溶液にプローブ (0.2 nmol) を加えた。サンプルを全量が 100  $\mu$ L になるように調整した後 1 時間、室温でインキュベートした。インキュベート後、光照射 (360 nm, 0 °C, 10 min) を行った。

ビオチン標識された GmVSR 溶液に BPB の入っていない変性用 SDS sample buffer (2 $\times$ ) 100  $\mu$ L を加え、室温で 60 min 遮光下で変性した。変性した VSR の溶液を透析用チューブに入れ 3 時間後、8 時間後、13 時間後に溶媒である HEPES buffer を変えながら透析を行った。

透析後、HEPES buffer で 5 回洗浄してあるアビジン-アガロース溶液 5  $\mu$ L (アビジン含有量 150~200 pmol) に GmVSR 溶液を加えて室温で 2 時間インキュベートした。この固相溶液を遠心 (1300  $\times g$ , 2 min) して固相を沈殿させ、0.2% SDS/HEPES buffer 1 mL で 2 回、HEPES buffer, pH 7.0, 1 mL で 2 回、水 1 mL で 3 回洗浄した。最後に PBS buffer, pH 7.4 15  $\mu$ L を加えて二段階目の光照射 (315 nm, 25 °C, 60 min) を行った。この上清を集めた後、SDS sample buffer (4 $\times$ ) 5  $\mu$ L を加えた。比較対象として SDS sample buffer (2 $\times$ ) で変性した GmVSR 溶液のみのサンプル (GmVSR 3  $\mu$ g) を調整し、共に SDS-PAGE (10%ゲル) 24 mA, 60 min を行った。マーカーは DynaMarker<sup>®</sup> Protein MultiColor III を用いた。

泳動後、CBB 溶液を加えて 5 min 浸透させた。CBB 溶液を捨て、Milli Q 水を適量加え、キムワイプを 1 枚ゲルにかぶせるようにのせて 1 晩浸透させて余分な CBB を除去した。このゲルより、蛍光化 GmVSR のバンドを切り出した。

切り出したゲルをサイコロ状 0.1 mm 四方程度になるように刻み、このゲルをそれぞれ別の 1.5 mL チューブ内に入れて脱色液 (25 mM 重炭酸アンモニウム 50%MeCN 水溶液) 100  $\mu$ L を加え、10 min ほど攪拌した。溶液を捨て、同じ脱色液を加えて、CBB の色が抜けるまで 3 回繰り返した。

脱色後、MeCN を 100  $\mu$ L 加えて 10 min ほど攪拌した。MeCN を除去後、真空ポンプとデシケーターを用いてゲルを乾燥させた。乾燥後、還元液 (10 mM DTT, 25 mM 重炭酸アンモニウム 水溶液) を 100  $\mu$ L 加え、56 °C で 1 時間振盪させた。液を捨て、洗浄用 Buffer (25 mM 重炭酸アンモニウム 水溶液) で 1 回洗浄後、アルキル化液 (55 mM ヨードアセトアミド 25 mM 重炭酸アンモニウム 水溶液) を 100  $\mu$ L 加え、遮光下で 45 min 攪拌させた。洗浄用 Buffer で 3 回洗浄し、脱水液 (25 mM 重炭酸アンモニウム 70%MeCN : H<sub>2</sub>O 溶液) を 100  $\mu$ L 加えた後、15 min 攪拌した。液を除去後、真空ポンプとデシケーターを用いてゲルを乾燥させた。

リシルエンドペプチダーゼ液 (100  $\mu$ g/mL, 50 mM Tris-HCl, pH 8.5) 20  $\mu$ L を加え、氷上で 30 min 放置しておく。このサンプルを 37 °C で 10 時間ゆっくり攪拌しながら反応させる。反応後、50  $\mu$ L の抽出液 (50%MeCN, 5%TFA 水溶液) を加え、30 min

振盪させた。液を回収し、抽出液をもう一度 25  $\mu$ L 加えて 30 min 振盪させ、液を回収した。

・精製した蛍光化 GmVSR の HPLC 分析

蛍光化 GmVSR の消化サンプルを HPLC にて下記の条件で精製した。

流量 : 0.75 mL / 1 min

検出波長 : 215 nm, Fluorescence =  $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em} = 410$  nm

A 液 10%MeCN, 89.9%H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA

B 液 90%MeCN, 9.9%H<sub>2</sub>O, 0.1%TFA

使用したカラム : SHISEIDO CAPCELL PAK C<sub>18</sub> 5  $\mu$ m, 4.6 mm  $\times$  150 mm

グラジエント条件 B 液の組成比

0~150 min : 0 $\rightarrow$ 100%      150~180 min : 100%

タンパク質混合系を用いた同位体導入型蛍光ラベル法の検証 (第3章)

4 種混合系での蛍光同位体法の検証

・アビジン単体のラベル化

アビジン (10 pmol) PBS buffer, pH 7.4 溶液にビオチンプローブ **8a** (10 pmol) を加えた。サンプルを全量が 10  $\mu$ L になるように調整した後 1 時間、室温でインキュベートした。インキュベート後、光照射機を用いて光照射 (250 W 高圧水銀灯ランプ, 360 nm, 0  $^{\circ}$ C, 15 sec) を行った。この後すぐに光照射 (250 W 高圧水銀灯ランプ, 360 nm, 37  $^{\circ}$ C, 15 min) を行った。この水銀灯を用いた光照射はすべて直当てである。

照射後、消化酵素 trypsin/Lys-C 混合液を加えて 12 時間インキュベートした。HPLC および LC-MS 条件配下のとおりである。

流量 : 0.4 mL / 1 min

検出波長 : 215 nm, Fluorescence =  $\lambda_{ex} = 340$  nm,  $\lambda_{em} = 410$  nm

A 液 10%MeCN, 89.9%H<sub>2</sub>O, 0.1%FA

B 液 90%MeCN, 9.915%H<sub>2</sub>O, 0.085%FA

使用したカラム : ZORBAX 300SB-C18, 5  $\mu$ m, 2.1 x 250 mm

グラジエント条件 B 液の組成比

0~30 min : 0 $\rightarrow$ 100%

イオンソース強度 : 40

測定レンジ : +9 m/z

・混合タンパク質系内でのラベル化

アビジン、BSA、トランスフェリン、炭酸脱水酵素を各 50 ng (アビジン : 10 pmol) を含む PBS buffer, pH 7.4 溶液にビオチンプローブ **8a**, **8b** (各 5 pmol) を加えたサンプルとプローブの他にも阻害剤としてビオチン溶液 (30 pmol) を加えたサンプルの二つを調整した。これらのサンプルを全量が 10  $\mu$ L になるように調整した後 1 時間、室温でインキュベートした。インキュベート後、光照射機を用いて光照射 (250 W 水銀灯ランプ, 360 nm, 0  $^{\circ}$ C, 15 sec) を行った。この水銀灯を用いた光照射はすべて直当てである。

この光照射したサンプルに DTT (100 mM) と重炭酸ナトリウム (100 mM) を 5  $\mu$ L 加え、1 時間還元させた。その後限外ろ過 (15000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 30 min) を一回行った。ヨードアセトアミド溶液 (55 mM) を 20  $\mu$ L 加えて遮光下、30 min 反応させた。限外ろ過 (15000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 30 min) を 3 回行った。さらに洗浄液として Tris-HCl, pH 8.0 を用いて buffer 交換するため、同条件で 3 回限外ろ過を繰り返した。このサンプルに消化酵素 trypsin/Lys-C 混合液を加え、12 時間インキュベートした。その後、このサンプルに光照射 (250 W 高圧水銀灯ランプ, 360 nm, 37  $^{\circ}$ C, 15 min) を行った。HPLC 及び LC-MS 条件は以下のとおりである。

流量 : 0.4 mL / 1 min

検出波長 : 215 nm, Fluorescence =  $\lambda_{ex}$  = 340 nm,  $\lambda_{em}$  = 410 nm

A 液 10%MeCN, 89.9%H<sub>2</sub>O, 0.1%FA

B 液 90%MeCN, 9.915%H<sub>2</sub>O, 0.085%FA

使用したカラム : ZORBAX 300SB-C18, 5  $\mu$ m, 2.1 x 250 mm

グラジエント条件 B 液の組成比

0~30 min : 0→100%

イオンソース強度 : 40

測定レンジ : +-9 m/z

多機能光アフィニティーラベルによる標的特定法の確立 (第 4 章)

HeLa 細胞ライセートを用いたビオチン結合タンパク質の解析

HeLa S3 cytoplasm lysate 溶液 (総タンパク質量 2.0mg, PBS バッファー pH 7.4) にビオチンプローブ **8a** および **8b** (各 50  $\mu$ M) を加えたサンプルとプローブの他にも阻害剤としてビオチン溶液 (500  $\mu$ M) を加えたサンプルの二つを調整し、それぞれ全量 500  $\mu$ L とした。これらのサンプルを調整した後 37  $^{\circ}$ C、12 時間インキュベートした。インキュベート後、光照射 (250 W 水銀灯ランプ, 360 nm, 0  $^{\circ}$ C, 15 sec) を行った。この光照射したサンプルに SDS sample buffer (2 $\times$ ) を加え、室温で 2 時間変性させた。限外ろ過 (15000 rpm, 4  $^{\circ}$ C, 30 min) で 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いて三回洗

浄後、アルキル化液 (55 mM ヨードアセトアミド 25 mM 重炭酸アンモニウム 水溶液) を 20  $\mu$ L 加え、遮光下で 30 min 攪拌させた。洗浄用 25 mM Tris-HCl (pH 8.0) を用いて 5 回限外ろ過 (15000 rpm, 4 °C, 30 min) で洗浄し、アビジン-アガロースを 75  $\mu$ L 加えた。このあと 2 時間、室温でインキュベートし、その後この担体を 0.2% SDS-PBS 溶液 (100  $\mu$ L) で 5 回、PBS バッファーで 5 回、Tris-HCl (pH 8.0) で 5 回洗浄した。

洗浄後、PBS バッファーを加えてから光照射 (250 W 高圧水銀灯ランプ, 360 nm, 37 °C, 15 min) を行って、ラベル標的を溶出させた。この上清を集め、trypsin/Lys-C を用いて 37 °C で遮光下、一晚消化させた。この後、消化サンプルを HPLC or LC-MS で解析した。

HPLC 及び LC-MS 条件は以下のとおりである。

流量 : 0.4 mL / 1 min

検出波長 : 215 nm, Fluorescence =  $\lambda_{ex}$  = 340 nm,  $\lambda_{em}$  = 410 nm

A 液 10% MeCN, 89.9% H<sub>2</sub>O, 0.1% FA

B 液 90% MeCN, 9.915% H<sub>2</sub>O, 0.085% FA

使用したカラム : ZORBAX 300SB-C18, 5  $\mu$ m, 2.1 x 250 mm

グラジエント条件 B 液の組成比

0~45 min : 0→100%

イオンソース強度 : 40

測定レンジ : +-9 m/z

## 参考文献

1. Ziegler, S., Pries, V., Hedberg, C., Waldmann, H. Target Identification for Small Bioactive Molecules : Finding the Needle in the Haystack. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 2744.
2. Stockwell, B. R., Exploring biology with small organic molecules. *Nature*, **2004**, *432*, 846.
3. Schreiber, S. L., Small molecules: the missing link in the central dogma. *Nat. Chem. Biol.*, **2005**, *1*, 61.
4. Tashiro, E., Imoto, M., Target identification of bioactive compounds. *Bioorg. Med. Chem.* **2012**, *20*, 1910.
5. Medvedev, A., Kopylov, A., Buneeva, O., Zgoda, V., Archakov, A. Affinity-based proteomic profiling: Problems and achievements. *Proteomics*, **2012**, *12*, 621.
6. Jeffery, D. A., Bogoy, M. Chemical proteomics and its application to drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2003**, *14*, 87.
7. Singh, A., Thornton, E. R., Westheimer, F. H. The Photolysis of Diazoacetylchymotrypsin. *J. Biol. Chem.*, **1962**, *237*, 3009.
8. Hatanaka, Y., Sadakane, Y. Photoaffinity labeling in drug discovery and developments: chemical gateway for entering proteomic frontier. *Curr. Top. Med. Chem.*, **2002**, *2*, 271.
9. Hatanaka, Y. Organic Chemistry for Structural Biology : Probing the Functional Structure of Proteins by Photaffinity Labeling. *J. Syn. Org. Chem. Jpn.*, **1998**, *56*, 581.
10. Manglik, A., Kruse, A. C., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Mathiesen, J. M., Sunahara, R. K., Pardo, L. Weis, W. I. Kobilka, B. K. Granier, S. Crystal structure of the  $\mu$ -opioid receptor bound to a morphinan antagonist. *Nature*, **2012**, *485*, 321.

11. Cherezov, V., Rosenbaum, D.M., Hanson, M.A., Rasmussen, S.G., Thian, F.S., Kobilka, T.S., Choi, H.J., Kuhn, P., Weis, W.I., Kobilka, B.K., Stevens, R.C. High-resolution crystal structure of an engineered human beta2-adrenergic G protein-coupled receptor. *Science*, **2007**, *318*, 1258.
12. Geng, Y., Bush, M., Mosyak, L., Wang, F., Fan, Q. R. Structural mechanism of ligand activation in human GABAB receptor. *Nature*, **2013**, *504*, 254.
13. Inomata, K., Ohno, A., Tochio, H., Isogai, S., Tenno, T., Nakase, I., Takeuchi, T., Futaki, S., Ito, Y., Hiroaki, H., Shirakawa, M. High-resolution multi-dimensional NMR spectroscopy of proteins in human cells. *Nature*, **2009**, *458*, 106.
14. Viegas, A., Manso, J., Nobrega, F. L., Cabrita, E. J. Saturation-Transfer Difference (STD) NMR: A Simple and Fast Method for Ligand Screening and Characterization of Protein Binding. *J. Chem. Educ.*, **2011**, *88*, 990.
15. Borshell, N., Papp, T., Congreve, M. Deal watch: Valuation benefits of structure-enabled drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, **2011**, *10*, 166.
16. Matzinger, S., Bally, T., Patterson, E. V., McMahon, R. J. The C<sub>7</sub>H<sub>6</sub> Potential Energy Surface Revisited: Relative Energies and IR Assignment. *J. Am. Chem. Soc.*, **1996**, *118*, 1535.
17. Platz, M. S. Comparison of Phenylcarbene and Phenylnitrene. *Acc. Chem. Res.*, **1995**, *28*, 487.
18. Galardy, R.E., Craig, L. C., Jamieson, J. D., Printz, M. P. Photoaffinity Labeling of Peptide Hormone Binding Sites. *J. Biol. Chem.*, **1974**, *249*, 3510.
19. Dormán, G., Prestwich, G. D. Benzophenone Photophores in Biochemistry. *Biochemistry*, **1994**, *33*, 5661.
20. Brunner, J. Senn, H., Richards, F. M. 3-Trifluoromethyl-3-phenyldiazirine. A new carbene generating group for photolabeling reagents. *J. Biol. Chem.*, **1980**, *255*, 3313
21. Brunner, J., New Photolabeling and Crosslinking Methods., *Annu. Rev. Biochem.*, **1993**, *62*, 483.



22. Hatanaka, Y., Hashimoto, M., Kurihara, H., Nakayama, H., Kanaoka, Y. A Novel Family of Aromatic Diazirines for Photoaffinity Labeling. *J. Org. Chem.*, **1994**, *59*, 383.
23. Burgermeister, W., Nassal, M., Wieland, T., Helmreich, J. M. Ernst. A carbene-generating photoaffinity probe for beta-adrenergic receptors. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1983**, *729*, 21.
24. Nakayama, H., Hatanaka, Y., Yoshida, E., Oka, K., Takanohashi, M., Amano, Y., Kanaoka, Y. Photolabeled sites with a tetrodotoxin derivative in the domain III and IV of the electroplax sodium channel. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **1992**, *184*, 900.
25. Payandeh, J., Scheuer, T., Zheng, N., Catterall, W. A. The crystal structure of a voltage-gated sodium channel. *Nature*, **2011**, *475*, 353.
26. Chavan, A. J., Nemoto, Y., Narumiya, S., Kozaki, S., Haley, B. E. NAD<sup>+</sup> binding site of Clostridium botulinum C3 ADP-ribosyltransferase. Identification of peptide in the adenine ring binding domain using 2-azido NAD. *J. Biol. Chem.*, **1992**, *25*, 267.
27. Masuda, S., Tomohiro, T., Hatanaka, Y. Rapidly photoactivatable ATP probes for specific labeling of tropomyosin within the actomyosin protein complex., *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2011**, *21*, 2252.
28. Hatanaka, Y., Hashimoto, M., Kanaoka, Y. A novel biotinylated heterobifunctional cross-linking reagent bearing an aromatic diazirine. *Bioorg. Med. Chem.*, **1994**, *2*, 1367.
29. Hsu, S. M., Raine, L., Fanger, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.* **1981**, *29*, 577.
30. Hatanaka, Y., Hashimoto, M., Nishihara, S., Narimatsu, H., Kanaoka, Y. Synthesis and characterization of a carbene-generating biotinylated N-acetylglucosamine for photoaffinity labeling of  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galactosyltransferase. *Carbohydr. Res.*, **1996**, *294*, 95.

31. Hatanaka, Y., Hashimoto, M., Kanaoka, Y. A Rapid and Efficient Method for Identifying Photoaffinity Biotinylated Sites within Proteins. *J. Am. Chem. Soc.*, **1998**, *120*, 453.
32. Hashimoto, M., Hatanaka, Y. Identification of Photolabeled Peptides for the Acceptor Substrate Binding Domain of  $\beta$ 1,4-Galactosyltransferase. *Chem. Pharm. Bull.*, **1999** *47*, 667.
33. Gastinel, L. N., Cambillau, C., Bourne, Y. Crystal structures of the bovine [beta]4galactosyltransferase catalytic domain and its complex with uridine diphosphogalactose. *EMBO J.*, **1999**, *18*, 13, 3546.
34. Bayer, E. A., Wilchek, M., The use of the avidin-biotin complex as a tool in molecular biology. *Methods of biochemical analysis*, **1980**, *26*, 1.
35. Koumanov, F., Yang, J., Jones, A. E., Hatanaka, Y., Holman, G. D. Cell-surface biotinylation of GLUT4 using bis-mannose photolabels. *Biochem. J.*, **1998**, *330*, 1209.
36. Hatanaka, Y., Kanaoka, Y. Biotinyl diazirine photophore: an approach to high-resolution photoaffinity labeling for probing receptor-ligand interface. *Heterocycles*, **1998**, *47*, 625.
37. Tomohiro, T., Hashimoto, M., Hatanaka, Y. Cross-linking chemistry and biology: development of multifunctional photoaffinity probes. *Chem. Rec.*, **2005**, *5*, 385.
38. Kashiwayama, Y., Tomohiro, T., Narita, K., Suzumura, M., Glumoff, T., Hiltunen, J. K., Veldhoven, P. P. Van, Hatanaka, Y., Imanaka T. Identification of a substrate-binding site in a peroxisomal beta-oxidation enzyme by photoaffinity labeling with a novel palmitoyl derivative. *J. Biol. Chem.*, **2010**, *285*, 26315.
39. Hashimoto, M., Yang, J., Holman, G. D., Cell-Surface Recognition of Biotinylated Membrane Proteins Requires Very Long Spacer Arms: An Example from Glucose-Transporter Probes. *ChemBioChem*, **2001**, *2*, 52.
40. Hashimoto, M., Hatanaka, Y., Yang, J., Dhesi, J., Holman, G. D. Synthesis of biotinylated bis(d-glucose) derivatives for glucose transporter photoaffinity labelling. *Carbohydr. Res.*, **2001**, *331*, 119.

41. Park, J., Sadakane, Y., Masuda, K., Tomohiro, T., Nakano, T., Hatanaka, Y. Synthesis of diazirinyl photoprobe carrying a novel cleavable biotin. *ChemBioChem*, **2005**, *6*, 814.
42. Burkard, N., Bender, T., Westmeier, J., Nardmann, C., Huss, M., Wieczorek, H., Grond, S., von Zezschwitz, P. New Fluorous Photoaffinity Labels (F-PAL) and Their Application in V-ATPase Inhibition Studies. *Eur. J. Org. Chem.*, **2010**, *11*, 2176.
43. Li, G., Liu, Y., Liu, Y., Chen, L., Wu, S., Liu, Y., Li, X., Photoaffinity Labeling of Small-Molecule-Binding Proteins by DNA-Templated Chemistry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2013**, *52*, 9544.
44. Speers, A. E., Cravatt, B. F. A Tandem Orthogonal Proteolysis Strategy for High-Content Chemical Proteomics. *J. Am. Chem. Soc.*, **2005**, *127*, 10018.
45. Hosoya, T., Hiramatsu, T., Ikemoto, T., Nakanishi, M., Aoyama, H., Hosoya, A., Iwata, T., Maruyama, K., Endoc.M., Suzuki, M. Novel bifunctional probe for radioisotope-free photoaffinity labeling: compact structure comprised of photospecific ligand ligation and detectable tag anchoring units. *Org. Biomol. Chem.*, **2004**, *2*, 637.
46. Lapinsky, D. J. Tandem photoaffinity labeling-bioorthogonal conjugation in medicinal chemistry. *Bioorg. Med. Chem.*, **2012**, *20*, 6237.
47. Tomohiro, T., Kato, K., Masuda, S., Kishi, H., Hatanaka, Y., Photochemical construction of coumarin fluorophore on affinity-anchored protein. *Bioconjugate Chem.*, **2011**, *22*, 315.
48. Hohl, I., Robinson, D. G., Chrispeels, N. J., Hinz, G. Transport of storage proteins to the vacuole is mediated by vesicles without a clathrin coat. *J. Cell. Sci.*, **1996**, *109*, 2539.
49. Hillmer, S., Movafeghi, A., Robinson, D. G., Hinz, G. Vacuolar Storage Proteins Are Sorted in the Cis-Cisternae of the Pea Cotyledon Golgi Apparatus. *J. Cell. Biol.*, **2001**, *152*, 41.

50. Nishizawa, K., Maruyama, N., Satoh, R., Higasa, T., Utsumi, S., A vacuolar sorting determinant of soybean  $\beta$ -subunit resides in a C-terminal sequence. *Plant Sci.*, **2004**, *167*, 937.
51. Maruyama, N., Utsumi, S. Analysis of Interactions between Vacuolar Sorting Determinants of Soybean Seed Storage Proteins and Receptors. *Soy Protein Research, Japan*, **2008**, *11*, 51.
52. Shimada, T., Fuji, K., Tamura, K., Kondo, M., Nishimura, M., Hara-Nishimura, I. Vacuolar sorting receptor for seed storage proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **2003**, *100*, 16095.
53. Martinek, K., Varfolomeyev, S. D., and Berezin, I. V. Interaction of R-chymotrypsin with N-cinnamoylimidazole. Substrate sensitive to light. *Eur. J. Biochem.*, **1971**, *19*, 242.
54. Turner, A.D., Pizzo, S.V., Rozakis,G., Porter, N.A. Photoreactivation of irreversibly inhibited serine proteases. *J. Am. Chem. Soc.*, **1988**, *110*, 244.
55. Tomohiro, T., Inoguchi, H., Masuda, S., Hatanaka, Y. Affinity-based fluorogenic labeling of ATP-binding proteins with sequential photoactivatable cross-linkers. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **2013**, *23*, 5605.
56. Nishizawa, K., Maruyama, N., Satoh, R., Fuchikami, Y., Higasa, T., Utsumi, S. A C-terminal sequence of soybean  $\beta$ -conglycinin  $\alpha'$  subunit acts as a vacuolar sorting determinant in seed cells. *Plant J.*, **2003**, *34*, 647.
57. Nishizawa, K., Maruyama, N., Utsumi, S. The C-terminal region of  $\alpha'$  subunit of soybean  $\beta$ -conglycinin contains two types of vacuolar sorting determinants. *Plant Mol. Biol.*, **2006**, *62*, 111.
58. Hashimoto, M., Kanaoka, Y., Hatanaka, Y. A versatile approach for functionalization of 3-aryl-3-(trifluoromethyl)diazirine photophors. *Heterocycles*, **1997**, *46*, 119.
59. Gygi, S. P., Rist, B., Gerber, S. A., Turecek, F., Gelb, M. H., Aebersold, R. Quantitative analysis of complex protein mixtures using isotope-coded affinity tags. *Nat. Biotechnol.*, **1999**, *10*, 994.

60. Blagoev, B., Kratchmarova, I., Ong, S-E., Nielsen, M., Foster, L. J., Mann, M.  
A proteomics strategy to elucidate functional protein-protein interactions applied to EGF signaling. *Nat. Biotechnol.*, **2003**, *21*, 315.
61. Thompson, A., Schäfer, J., Kuhn, k., Kienle, S., Schwarz, J., Schmidt, G., Neumann, T., Hamon, C. Tandem mass tags: a novel quantification strategy for comparative analysis of complex protein mixtures by MS/MS. *Anal. Chem.*, **2003**, *75*, 1895.
62. Dayon, L., Hainard, A., Licker, V., Turck, N., Kuhn, K., Hochstrasser, D. F., Burkhard, P. R., Sanchez, J-C. Relative quantification of proteins in human cerebrospinal fluids by MS/MS using 6-plex isobaric tags. *Anal. Chem.*, **2008**, *80*, 2921.
63. Palaniappan, K. K., Pitcher, A. A., Smart, B. P., Spiciarich, D. R., Iavarone, A. T., Bertozzi, C. R. Isotopic Signature Transfer and Mass Pattern Prediction (IsoStamp): An Enabling Technique for Chemically-Directed Proteomics. *ACS Chem. Biol.*, **2011**, *6*, 829.
64. Munchbach, M., Quadroni, M., Miotto, G., James, P. Q. Uantitation and facilitated de novo sequencing of proteins by isotopic N-terminal labeling of peptides with a fragmentation-directing moiety. *Anal. Chem.*, **2000**, *72*, 4047.
65. Pugliese, L., Coda, A., Malcovati, M., Bolognesi, M. Three-dimensional structure of the tetragonal crystal form of egg-white avidin in its functional complex with biotin at 2.7 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **1993**, *231*, 698.
66. Denton, R. M. Hormonal regulation of fatty acid synthesis in adipose tissue through changes in the activities of pyruvate dehydrogenase (EC 1.2.4.1) and acetyl-CoA carboxylase (EC 6.4.1.2). *Proceedings of the Nutrition Society*, **1975**, *34*, 217.
67. Scrutton, M. C., Utter, M. F. Pyruvate carboxylase. IX. Some properties of the activation by certain acyl derivatives of coenzyme A. *J. Biol Chem.*, **1967**, *242*, 1723.
68. Jin, Y-B., Islam, Md. N., Sueda, S., Kondo, H. Identification of the Catalytic Residues Involved in the Carboxyl Transfer of Pyruvate Carboxylase. *Biochemisitry*, **2004**, *43*, 5912.

69. Xiang, S., Tong, L. Crystal structures of human and *Staphylococcus aureus* pyruvate carboxylase and molecular insights into the carboxyltransfer reaction., *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **2008**, *15*, 295.

70. Broussard, T. C., Kobe, M. J., Pakhomova, S., Neau, D. B., Price, A. E., Champion, T. S., Waldrop, G. L. The Three-Dimensional Structure of the Biotin Carboxylase-Biotin Carboxyl Carrier Protein Complex of *E. coli* Acetyl-CoA Carboxylase. *Structure*, **2013**, *21*, 650.

71. Lietzan, A. D., St. Maurice, M. A substrate-induced biotin binding pocket in the carboxyltransferase domain of pyruvate carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **2013**, *88*, 19915.

#### 発表論文

1. Morimoto, S., Tomohiro, T., Maruyama, N., Hatanaka, Y. Photoaffinity casting of a coumarin flag for rapid identification of ligand-binding sites within protein. *Chem. Commun.*, **2013**, *49*, 1811

2. Tomohiro, T., Morimoto, S., Shima, T., Chiba, J., Hatanaka, Y. An Isotope-Coded Fluorogenic Cross-Linker for High-Performance Target Identification Based on Photoaffinity Labeling. *Angew. Chem. Int. Ed.*, **2014**, *53*, 13502

## 謝辞

本研究に関し、様々なご指導をいただきました富山大学理事 畑中保丸先生、薬学部生体認識化学研究室 友廣岳則准教授、千葉順哉助教にお礼申し上げます。

貴重な大豆タンパク質をご提供頂いた京都大学農学部品質設計開発学分野 丸山伸之准教授にお礼申し上げます。

HeLa lysate をご提供頂いた産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門の岡田知子博士にお礼申し上げます。

また、いろいろな研究機器の取り扱いについてお世話になりました富山大学生命科学研究センターの五味知浩准教授、澤谷知子技官を含めたスタッフの皆様にお礼申し上げます。

最後に研究室に在籍していらした諸先輩方の教えや先行研究結果がなくてはこのような結果をまとめ上げることができませんでした。また、共に実験し、意見を酌み交わしながら切磋琢磨した研究室の仲間達や後輩達、いろいろな助けや励みがあったからこそ研究を続けることが出来ました。重ねてお礼を申し上げます。

本研究結果が研究室に役立ち、そして未来の後輩たちの良き財産となるようお願い、謝辞にかえさせていただきます。ありがとうございました。